DOCTORADO EN CIENCIAS Y BIOTECNOLOGÍA DE PLANTAS

Regulación ambiental de la fotosíntesis de algunas especies de *Clusia* L. (Clusiaceae) en México

Tesis que para obtener el grado de Doctor en Ciencias presenta:

Jesús Gustavo Vargas Soto

Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C.

Mérida, Yucatán, México.

2010

Declaración de Propiedad

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento provienen de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán y que dicha información le pertenece en términos de la ley de propiedad industrial, por lo que no me reservo ningún derecho sobre ello.

Jesús Gustavo Vargas Soto

Índice General

	página
Agradecimientos	vii
Índice de cuadros	ix
Índice de figuras	xi
Resumen	xv
Abstract	xvii
Introducción	1-2
Capítulo I. Antecedentes	3-20
Hipótesis	16
Capítulo II. Carbon isotope composition and mode of photosynthesis in *Clusia* species from Mexico	21-36
Capítulo III. Expresión de fotosíntesis CAM para tres especies de *Clusia* en distintas comunidades vegetales de la Península de Yucatán, México	37-61
Capítulo IV. Fijación y cambios estacionales de CO_2 en *Clusia flava*	63-76
Capitulo V Expresión de CAM en plántulas de dos especies de *Clusia* bajo condiciones de bosque seco	77-100
Discusión General	101-104
Conclusiones generales	105
Perspectivas	107

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. José Luis Andrade Torres por la dirección y por compartir sus conocimientos, dedicación y tiempo para la realización de este trabajo.

Al Dr. Klaus Winter quien llevo a cabo la codirección de esta tesis y que sin su ayuda no habría sido posible llegar a concluir este trabajo.

A Luis Simá por todo ese tiempo y conocimiento compartido durante los trabajos de campo; que sin su gran apoyo no habrían sido el sustento de este trabajo.

Al personal de la Unidad de Recursos Naturales del Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C., por compartir el área de trabajo y sus conocimientos: principalmente a Paulino Simá.

A los integrantes de mi comité de revisión: Dra. Patricia Delgado, Dr. Erick de la Barrera, Dr. Juan Manuel Dupuy; Dr. Rafael Durán; Dr. Jorge Santamaría.

Al Fondo Sectorial SEP-CONACYT proyecto 48344/24588 y a la Fundación Andrew W. Mellon por el apoyo financiero otorgado.

Finalmente agradecer al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca de Doctorado que se me otorgó, y con la que se logró realizar este trabajo de investigación.

Índice de cuadros

	página
Diferencias entre plantas C_3, C_4 y con Metabolismo ácido de las crasuláceas	4
Clasificación del género *Clusia* en Centroamérica en base a morfología floral, ITS y tipo de fotosíntesis predominante	12
Valores $\delta^{13}C$ hojas de especies de *Clusia* de herbario	30-32
Distribución de especies de *Clusia* en bosque seco	33
Variables foliares en tres localidades en estación de lluvias	52
Variables foliares en tres localidades en estación de sequia	52
Clusia flava hemiepifita en tres localidades durante lluvias	53
Clusia flava hemiepifita en tres localidades durante sequia	53
Tres especies de *Clusia* en FCP durante la temporada de lluvias	54
Tres especies de *Clusia* en FCP durante la temporada de sequía	54
Condiciones ambientales promedio durante los días en que se midió la fijación de CO_2 en *C. flava*	67
Parámetros foliares en *Clusia flava*	67
Valores acidez total en *Clusia flava* por la mañana, en el atardecer y valores (ΔH^+) en tres temporadas en jardín botánico	68

Condiciones ambientales 2005: FFF (Flujo de fotones para fotosíntesis, H.R, Ψ (Potencial hídrico), ºC (Temperatura) 82

Parámetros foliares en *C. rosea* y *C. flava* durante la temporada de nortes, sequía y lluvias en el año 2005 90-92

Índice de figuras

página

Curso diario de la asimilación de CO_2 y asimilación de ácido málico en plantas con metabolismo ácido de las crasuláceas 7

Especies de *Clusia* de la Península de Yucatán 15

Frecuencias de valores foliares de $\delta^{13}C$ de especies of *Clusia* de México con (diagonal) o sin (blanco) fotosíntesis CAM 34

Frecuencias de valores foliares de $\delta^{13}C$ de las 6 especies de *Clusia* con ≥ 7 especímenes analizados 35

Relación entre valores foliares de $\delta^{13}C$ y altitud de las especies mexicanas de *Clusia* 36

Localidades en la península de Yucatán donde se colectaron muestras de hojas 40

Diferencias de acidez titulable (mañana-tarde) en hojas expuestas y bajo sombra de árboles de *C. flava* en tres localidades y dos estaciones del año 43

Diferencias de acidez titulable (mañana-tarde) en hojas expuestas y bajo sombra de hojas de plantas hemiepífitas de *C. flava* en dos localidades y dos estaciones del año 44

Diferencias de acidez titulable (mañana-tarde) en hojas expuestas y bajo sombra de hojas de tres especies en FCP 45

Diferencias de malato (mañana-tarde) en hojas expuestas y sombra de *C. flava* en tres localidades y dos estaciones del año 46

Diferencias de malato (mañana-tarde) en hojas expuestas y sombra de plantas hemiepífitas de *C. flava* en dos localidades y dos estaciones del año 47

Diferencias de malato (mañana-tarde) en hojas expuestas y sombra de *C. flava* en tres especies en FCP 48

Diferencias de citrato (mañana-tarde) en hojas expuestas y sombra de árboles de *C. flava* en tres localidades y dos estaciones del año 49

Diferencias de citrato (mañana-tarde) en hojas expuestas y sombra de plantas hemiepífitas de *C. flava* en dos localidades y dos estaciones del año 50

Diferencias de citrato (mañana-tarde) en hojas expuestas y de sombra de tres especies de *Clusia* para dos estaciones del año en FCP 51

Precipitación y evaporación mensual (mm) en el jardín botánico. Datos de la estación meteorológica, Jardín botánico 66

Delta (Δ) acidez total titulable en *Clusia flava* para hojas expuestas y de sombra en tres estaciones 69

Fijación de CO_2 durante un periodo de 24 Hrs. en *Clusia flava* 70

Porcentaje de biomasa (g peso seco) total mensual acumulada en plántulas expuestas de *C. flava* y *C. rosea* 81

Biomasa (g peso seco) total mensual acumulada en plántulas en sombra de *C. flava* y *C. rosea* 82

Relación entre la diferencia mañana-atardecer de la acidez y la suculencia en plántulas expuestas de *C. flava* y *C. rosea* 83

Diferencia de la acidez mañana-atardecer *versus* biomasa total en plántulas expuestas de *C. flava* y *C. rosea* 84

Diferencia acidez mañana-atardecer *versus* área foliar específica en plántulas expuestas de *C. flava* y *C. rosea* 85

Diferencia acidez mañana-atardecer *versus* suculencia en

plántulas expuestas de *C. flava* y *C. rosea* 86

Diferencia acidez mañana-atardecer *versus* biomasa total en plántulas en sombra de *C. flava* y *C. rosea* 87

Diferencia acidez mañana-atardecer *versus* AFE de plántulas en sombra de *C. flava* y *C. rosea* 88

RESUMEN

El género *Clusia* en México no tiene una descripción precisa sobre el número de especies que lo conforman y mucho menos sobre su tipo de fotosíntesis. En este trabajo se determinó el número de especies distribuidas en la República, así como su tipo de fotosíntesis. Además, esta tesis se concentró en determinar la regulación ambiental de cuatro especies del género *Clusia* en la península de Yucatán, bajo la premisa de que hay una mayor expresión de fotosíntesis intermedia (C_3/CAM) y CAM debido a la estacionalidad y prolongada sequía de la región. Los resultados muestran que hay un estimado de 18 especies (identificadas) en México, según registros de listados florísticos y muestras del Herbario Nacional, MEXUS. Del total de especies observadas y mediante muestras herborizadas se obtuvo el valor de $\delta^{13}C$, el cual nos indicó una mayor proporción de especies con fotosíntesis intermedia (C_3/CAM), seguidas en número de las especies CAM y en menor proporción las especies C_3. En lo que respecta a las especies de la Península de Yucatán, se han registrado 6 especies desde selvas bajas hasta selvas medianas subperennifolias. De las seis especies, se tienen identificadas a *Clusia flava* Jacq., *C. chanekiana* Lundell, *C. guatemalensis* Hemsl. y *C. rosea* Jacq.; las tres primeras muestran una alta producción de ácidos orgánicos totales en el campo, tanto, en la estación de lluvias como la de sequía, por lo que son consideradas en este trabajo como especies CAM fuerte; aspecto que fue confirmado con valores del contenido isotópico del carbono. Para *C. flava*, estudiando individuos provenientes de esquejes en el jardín botánico del CICY, se obtuvo un patrón de fijación de CO_2 y una producción de ácidos orgánicos totales típica de una planta con metabolismo ácido (CAM). Por otro lado, plántulas de *C. rosea* y de *C. flava* con riego constante y en invernadero presentaron fotosíntesis intermedia y fotosíntesis CAM, respectivamente; Sin embargo, al someterlas a un tratamiento luz/sombra (simulado por el dosel del jardín botánico) y sin riego las plántulas de *C. rosea* cambiaron el tipo de fotosíntesis hacia CAM mientras más severa era la sequía y *C. flava* siempre fue CAM. Con estos resultados se concluye que existen al menos 18 especies de *Clusia* en México, la mayoría son intermedias (C_3/CAM) y en la península de Yucatán se tienen 5 especies CAM y una especie intermedia: *C. rosea*.

ABSTRACT

In Mexico, the genus *Clusia* does not possess a precise description on the number of species and the type of photosynthesis for these species. In this dissertation, I determined the type of photosynthesis for the species reported for Mexico. Also, I reported the environmental regulation on the photosynthesis for four species of the genus *Clusia* from the Yucatan Peninsula, under the hypothesis that there would be a higher expression of the intermediate type of photosynthesis (C_3/CAM) and CAM because of the seasonality and the prolonged dry season in this region. The results showed that there are about 18 species in Mexico, according to the floristic records and herbarium specimens of the Herbario Nacional, MEXUS. From these herbarium specimens, the $\delta^{13}C$ value was obtained; such a value indicated that most species have intermediate photosynthesis (C_3/CAM), followed by some strong CAM species and a smallest proportion of species C_3. In the Yucatan Peninsula, six species have been found in the tropical deciduous forests. From these 6 species, four have been determined: *Clusia flava* Jacq., *C. chanekiana* Lundell, *C. guatemalensis* Hemsl. y *C. rosea* Jacq.; the first three species showed a high production of organc acids in the field along the year, and were considered strong CAM, also confirmed by isotopic carbon analysis. In the CICY Botanical Garden, cuttings of *C. flava* were studied and the photosynthetic pattern, obtained by gas exchange measurements and the organic acids content, was typical of a CAM plant. Also, seedlings of *C. flava* and *C. rosea* growing in the greenhouse under constant watering showed CAM and C_3/CAM photosynthesis, respectively; however, after withholding water, *C. rosea* seedlings became CAM when growing in the Botanical Garden, while *C. flava* seedlings had always CAM photosynthesis. In conclusion, in Mexico, there were 18 species of *Clusia*, the majority withC_3/CAM photosynthesis and in the Yucatan Peninsula there were 5 CAM species and one intermediate C_3/CAM, *C. rosea*.

Introducción

La fotosíntesis, bajo condiciones naturales es regulada bioquímicamente para mantener el balance entre la tasa de síntesis y la concentración de metabolitos. Los mecanismos de regulación pueden responder a un estímulo ambiental (factores exógenos) o a ciertas limitaciones bioquímicas en células del mesófilo (factores endógenos), (Geiger y Servaites, 1994). Por ejemplo, las plantas pueden responder a cambios en la diferencia de presión de vapor (DPV), mediante un descenso en la bioquímica de la fotosíntesis en las células del mesófilo (Wise *et al.*, 1991) y a un exceso del Flujo de fotones para fotosíntesis FFF mediante un incremento en la eficiencia del transporte de electrones (Ögren y Sjostrom, 1990). De esta manera, las interacciones entre factores exógenos y endógenos pueden determinar el patrón de regulación de la fotosíntesis (Singsaas *et al.*, 2000).

En el caso del metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM siglas en ingles), generalmente el agua es el factor más importante, por lo que este tipo de fotosíntesis es considerada como una adaptación derivada a periodos de escasez en este recurso. Una de las estrategias más notables para evitar la pérdida de agua por transpiración en plantas de este tipo, es la adquisición del CO_2 durante la noche, lo que evita una gran pérdida de agua al mantener los estomas cerrados durante el día; lo que permite que estas plantas presenten una gran eficiencia en el uso de agua (EUA) (Lüttge 2004). Para plantas con este tipo de fotosíntesis se ha reportado que diversos factores (solos o en conjunto) determinan la regulación en la expresión del tipo de fotosíntesis y su funcionamiento en distintos ambientes. Por ejemplo, el CO_2 y el H_2O tienen un acoplamiento para la regulación estomática, la temperatura tiene efectos sobre el funcionamiento del metabolismo y las membranas celulares en el flujo de carbono. En el caso de la luz, se le atribuyen múltiples interacciones, puede provocar fotorespiración, puede fotoinhibir, dañar las células del mesófilo, puede provocar cambios en el tipo de fotosíntesis y permitir la expresión de CAM en algunas plantas (Cushman 2001). Aunque las plantas que presentan este tipo de metabolismo típicamente están adaptadas a ambientes áridos; como es el caso de las cactáceas, agaváceas y euforbiáceas que pueden dominar en los desiertos; muchas especies CAM habitan los bosques tropicales donde la disponibilidad de agua es mucho mayor. Muchas de las especies CAM que habitan en este tipo de bosque son epífitas y están sujetas a un problema muy particular de escasez de agua (Zotz y Hietz 2001) y se estima que el 57% de todas las epifitas son plantas CAM (Andrade *et al.* 2007). Sin embargo, se ha observado que la estacionalidad

y los cambios en las condiciones ambientales pueden provocar cambios en la fotosíntesis de algunas especies epifitas, como es el caso de las bromelias *Tillandsia brachycaulos* y *T. elongata* que con buena disponibilidad de agua pueden expresar fotosíntesis C_3 y CAM, pero al restringirles el agua se vuelven totalmente CAM. (Graham y Andrade 2004).

Se sugiere que los cambios de C_3 a CAM o viceversa, no sólo pueden estar relacionados con la escasez de agua, sino con otras variables ambientales como la temperatura, el flujo de fotones para fotosíntesis (FFF) y la humedad relativa (Lüttge 2000). Por ejemplo, esta situación ha sido estudiada en árboles del género *Clusia* que incluye especies que pueden ser epifitas, hemiepífitas, arbustos y árboles (una excepción dentro de la fotosíntesis CAM) en las cuales se ha reportado una amplia expresión en la fotosíntesis CAM como respuesta a cambios en estas variables ambientales; como son la fotosíntesis C_3-CAM, CAM fuerte y CAM débil (Holtum *et al.*, 2004; Lüttge, 2006; Andrade *et al.*2007). Por lo que este trabajo tuvo como objetivo conocer el número de especies del género *Clusia* y su fotosíntesis en la República mexicana, así como determinar el número de especies en la península de Yucatán, su tipo de fotosíntesis y la regulación ambiental del mismo en las distintas comunidades vegetales de la península.

Capítulo I. Antecedentes

Fotosíntesis

La fotosíntesis es un proceso por el cual los organismos que tienen clorofila pueden obtener energía del sol en forma de fotones y transformarla en energía química aprovechable para su crecimiento y reproducción. Las plantas pueden presentar alguno de los tres tipos de fotosíntesis: C_3, C_4 y el metabolismo ácido de las crasuláceas, CAM (por sus siglas en inglés), con características diferentes en parámetros anatómicos, morfológicos y fisiológicos (Tabla 1). La ruta fotosintética de tipo C_3 es la más ancestral y ocurre en la mayoría de las plantas; El término C_3 se deriva de que el primer producto de este tipo de fotosíntesis es una molécula de 3 carbonos y como primer producto estable de la fijación se obtiene fosfoglicerato. En la fotosíntesis de tipo C_4 el producto inicial es una molécula de 4 carbonos y el producto estable observado es el malato; ésta es común en monocotiledóneas como hierbas, pero, no tan común en dicotiledóneas como árboles y arbustos (Ehleringer y Cerling 2002). La fotosíntesis de tipo CAM, se presenta en alrededor del 7% de las plantas y lleva este nombre en honor a la familia de plantas en la que fue documentada por primera vez (Crasulaceae). Este tipo de metabolismo se ha reportado en epífitas y en muchas suculentas de varías regiones áridas, aunque se tiene bien documentada su presencia en ambientes tropicales para varias especies (Winter *et al.*, 1986; Medina 1987).

El metabolismo ácido de las crasuláceas presenta variantes en la fijación de CO_2 dependiendo de las condiciones ambientales, del desarrollo de la planta y de la especie. Esta no es una característica del grupo de las plantas CAM, ya que lo pueden presentar especies con metabolismo C_3 y C_4 obteniendo variantes C_3-C_4 (Bowes y Salvucci 1989; Reiskind *et al.*, 1997). Esta característica de compartir las rutas de fijación de CO_2 para algunas plantas se ha dado en llamar plasticidad fotosintética, que no es más que cambios en la capacidad de respuesta en la fijación de CO_2 a factores ambientales, ontogénicos, fenótipicos y de origen (filogenéticos).

	C_3	C_4	CAM
Porcentaje de plantas vasculares	89%	3%	7%
Distribución	Amplia	Sitios cálidos	Sitios xéricos y epifíticos
Producto estable de la fijación de CO_2	Fosfoglicerato	Malato	Malato y citrato
Anatomía	-	Vaina del haz vascular con cloroplastos (Kranz)	Suculencia celular
Fotorespiración	Hasta 40% de la fotosíntesis	No detectable	No detectable
Frecuencia estomática (mm^{-2})	40-300	100-160	1-8
Punto de compensación de asimilación de CO_2 $\mu mol\ m.^{2}s^{-1}$	30-80	<10	<5
g H_2O perdido por CO_2 fijado	450-950	250-350	<50
Productividad máxima (Ton ha^{-1} $año^{-1}$)	40	60-80	Baja pero cultivos > C_3

Tabla 1. Diferencias entre plantas C_3, C_4 y con Metabolismo ácido de las crasuláceas (Modificado de Jones H. 1992; Sage RF y Monson RK)

La fotosíntesis C_3 es un proceso de múltiples pasos en que el carbono en forma de CO_2 es fijado en productos orgánicos estables, esto ocurre virtualmente en todas las células del mesófilo en la hoja. En el primer paso, la Ribulosa bifosfato carboxilasa oxigenasa (Rubisco) combina Ribulosa bifosfato (RuBP) una molécula de 5 carbonos con el CO_2 para formar dos moléculas de fosfoglicerato. Sin embargo, la Rubisco es una enzima capaz de catalizar dos reacciones distintas: una para formar dos moléculas de

fosfoglicerato cuando el CO_2 es el sustrato y la otra da como resultado una molécula de fosfoglicerato y fosfoglicolato (molécula de 2 carbonos) cuando el oxígeno es el sustrato. Esta última función de oxigenasa da como resultado una fijación menor de carbono y eventualmente es muy importante para la producción de CO_2 en un proceso llamado fotorespiración (Taiz y Zeiger 1998). La proporción de Rubisco que puede catalizar CO_2 y O_2 es dependiente de la relación $[CO_2]/[O_2]$, a su vez esta relación es dependiente de la temperatura, ya que la actividad oxigenasa incrementa de manera proporcional a la temperatura. Esta dependencia de Rubisco sobre la relación $[CO_2]/[O_2]$ establece una firme relación entre las condiciones atmosféricas actuales y la actividad fotosintética. Como consecuencia de la sensibilidad de Rubisco por el O_2 la eficiencia de la fotosíntesis C_3 disminuye cuando el CO_2 atmosférico también lo hace.

Para el caso de la fotosíntesis C_4 esta resulta ventajosa en condiciones de baja concentración de CO_2 y/o altas temperaturas. Este tipo de fotosíntesis representa una modificación bioquímica y morfológica del tipo C_3 para reducir la actividad oxigenasa de la Rubisco y poder incrementar la tasa de fotosíntesis en ambientes con baja concentración de CO_2. En las plantas C_4, el ciclo C_3 de la fotosíntesis está restringido al interior de las células de la hoja (haz de la vaina). Estas células del haz de la vaina son células del mesófilo en las cuales se encuentra una enzima mucho más activa, la Fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPc) la cual fija CO_2 en oxaloacetato, un ácido de cuatro carbonos. El ácido de cuatro carbonos se difunde desde las células del mesófilo hasta las células del haz de la vaina, donde es descarboxilado y refijado en la ruta de tipo C_3. Como resultado de la alta actividad de PEP carboxilasa, el CO_2 se concentra en las regiones donde Rubisco está localizada, de esto resulta una alta relación $[CO_2]/[O_2]$ y así se disminuye el proceso de la fotorespiración. El costo adicional de la fotosíntesis C_4 es el requerimiento de Adenosina trifosfato (ATP), el cual se asocia con la regeneración de Fosfoenol piruvato (PEP) a partir de piruvato (Ehleringer y Cerling 2002).

Metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM)

En contraste con las plantas C_3 y C_4, en el metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM) la fijación de CO_2 (Fig 1), predominantemente se realiza durante la noche y subsecuentemente, durante el período de luz, se lleva a cabo la asimilación del CO_2 fijado. La fijación nocturna de CO_2 fue sujeto de investigación por Saussure en 1804, sin embargo el primer reporte formal

de tejido fotosintético que muestra acidez durante la noche y desacidificación durante el día fue de Heyne en 1815; pero no fue sino hasta 1948 que se hicieron todas las conexiones entre estas observaciones y se concluyó finalmente con el llamado ciclo CAM derivado de los trabajos de Bonner y Bonner en 1948. Subsecuentemente a este descubrimiento, se han realizado varios trabajos sobre esta ruta de asimilación de CO_2 y en las últimas 5 décadas la investigación sobre CAM ha entrado en su segunda fase, obteniendo información sobre regulación metabólica y variaciones bioquímicas entre grupos de plantas (Winter y Smith 1996).

De manera general, podemos describir a CAM en 4 fases con la siguiente secuencia de pasos metabólicos: Durante la noche se da la formación del aceptor de CO_2 Fosfoenolpiruvato (PEP) por vía glicolítica mediante el rompimiento de los carbohidratos (almidón o azucares solubles) almacenados en las células del clorénquima. El siguiente paso es la fijación de CO_2 en el citosol mediante la PEP carboxilasa (PEPc) y como resultado se produce ácido málico, el cual se almacena en las vacuolas de las células del clorénquima. Durante el día el ácido málico es liberado de las vacuolas y ocurre la descarboxilación del malato en el citoplasma, con la formación de compuestos de tres carbonos como piruvato y/o fosfoenol piruvato. El CO_2 liberado se asimila vía ribulosa 1,5 bifosfato carboxilasa/oxigenasa (Rubisco) y la reducción del carbono mediante la ruta C_3 con regeneración y almacenamiento de carbohidratos a partir de piruvato y PEP en la gluconeogénesis (Kluge y Ting 1978; Osmond 1978).

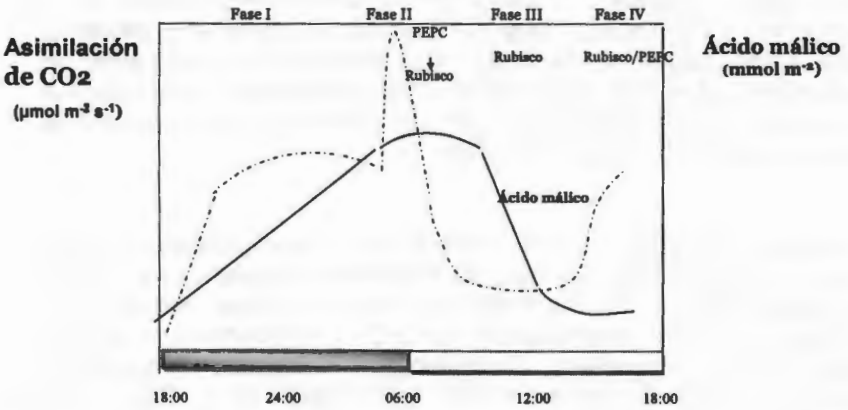


Figura 1. Asimilación de CO_2 y acumulación de ácido málico durante un día (modificada de Winter y Smith 1996)

Variantes de CAM

Se tiene documentada una gran diversidad bioquímica en la fotosíntesis CAM, ya que en muchas especies la mayor parte de carbohidratos se almacenan como azúcares solubles, lo que resulta más costoso en las células que los glucanos insolubles como el almidón. Adicionalmente, estas plantas CAM pueden utilizar a la PEP carboxicinasa como la principal enzima descarboxilante; además de acumular grandes cantidades nocturnas de ácido cítrico (Lüttge 1988). Aunque la acumulación de ácido cítrico está asociada con la ganancia neta de carbono, no se conoce el papel que realiza en el metabolismo de la planta, pero se sugiere que le brinda algunos beneficios a la planta, como la facilitación de una mayor acumulación de ácidos en el periodo nocturno (Lüttge 2006). Por otro lado, muchas plantas CAM ocupan cierta cantidad del CO_2 diurno directamente utilizando la fotosíntesis C_3, esto se da dependiendo de la especie, el estado de desarrollo y las condiciones ambientales que prevalecen en el momento. Por ejemplo, en muchos tallos suculentos como los de las cactáceas, el CO_2 atmosférico se fija exclusivamente durante la noche, inclusive cuando tienen agua suficiente (Nobel 1988). En otras especies la fijación nocturna de CO_2 es tan baja, que sólo contribuye para reducir la pérdida neta de CO_2 producido durante la respiración nocturna en

comparación con las plantas C_3; a este tipo de variante se le conoce como CAM de reciclaje (CAM-cycling; Ting 1985), donde usualmente la ganancia de carbono se da durante el día. Entre estos extremos se puede tener un patrón intermedio, en el cual ciertas plantas que fijan de manera prolongada CO_2 al principio y al final del período de luz, también lo hacen durante el periodo de oscuridad (Winter y Smith 1996).

En la actualidad existen muchos trabajos que hacen referencia a las variaciones en la fijación de CO_2 para las especies conocidas como CAM y las más representativas son las CAM facultativas, es decir aquellas que pueden utilizar las rutas fotosintéticas CAM-C_3 y se encuentran en las siguientes familias: *Aizoaceae, Crassulaceae, Cactaceae, Clusiaceae, Portulacaceae y Vitaceae* (Winter y Smith 1996; Grams *et al.*, 1998). Este tipo de metabolismo les sirve para mantener una integridad fotosintética y reducir la pérdida de agua, además de ganar mayor cantidad de CO_2 aumentando su crecimiento, lo cual las puede hacer exitosas reproductivamente. Otra variante del metabolismo ácido de las crasuláceas es el denominado CAM de reciclaje, que como se mencionó anteriormente sirve para mantener un balance positivo de carbono, incrementando la eficiencia en el uso de agua y reduciendo la fotorespiración. Una variante más es el CAM reducido (CAM idling) donde las plantas no fijan CO_2 exógeno ni en el día ni en la noche ya que mantienen los estomas cerrados; sin embargo, pueden refijar el CO_2 que se produce durante la respiración, lo que ayuda a proteger al aparato fotosintético de la fotoinhibición, reducir la pérdida de agua y mantener un buen balance de carbono (Lüttge 2004).

Las especies CAM latentes son plantas que fijan CO_2 durante el día, pero, también refijan el CO_2 de la respiración. Aunque se desconoce bastante de ellas se piensa que tienen una progresión de C_3 a CAM, lo que les permite ser exitosas en cualquier ambiente. Otro tipo de plantas CAM, son aquellas que fijan el CO_2 temprano en la mañana y luego durante la noche (Fase II CAM), pero además refijan el CO_2 que proviene de respiración, su importancia se debe a un incremento en la eficiencia del uso de agua (EUA) y reducción de la fotorespiración. Un tipo más de CAM se da en plantas que utilizan únicamente la fase I de CAM, las cuales fijan CO_2 durante la noche y de igual manera que la anterior incrementa el EUA y reduce la fotorespiración (Cushman 2001).

Por tanto, dependiendo del estado de desarrollo o influencia ambiental, la variación en la asimilación de carbono, el flujo de ácidos y la conductancia

estomática se pueden modificar las cuatro fases propuestas por Osmond en 1978 en este tipo de fotosíntesis. Al parecer estas son las variantes más importantes descritas hasta el momento, sin embargo, en los últimos años se ha reportado una nueva variante denominada C_4-CAM, la cual se da en la familia *Portulacacea.* Esta familia, contiene individuos con estos dos tipos de fotosíntesis e individuos que comparten ambas rutas, sin embargo, se ha dicho que ambos tipos de metabolismo son incompatibles debido a barreras anatómicas (Sage 2002). Debido a toda la información obtenida en los últimos años, la fotosíntesis CAM ha sido objeto de muchos estudios que van desde el nivel molecular hasta el ecológico (Holtum 2002).

Regulación ontogénica y ambiental de CAM

Bastantes estudios fisiológicos y ecofisiológicos han reportado las ventajas ecológicas que pueden tener las plantas con algunas variantes del CAM. Por ejemplo, en las cactáceas *Neobuxbaumia tetetzo* y *Ferocactus recurvus* se expresa el metabolismo C_3 en los primeros estadios de plántula y posteriormente se adquiere el CAM, lo que les permite desarrollarse y posteriormente establecerse, para poder continuar con su ciclo de vida. (Altesor *et al.,* 1992). Otro ejemplo es la respuesta a condiciones de sequía por *Kalanchoe draigemontiana*, la cual puede expresar fuertemente el CAM bajo estas condiciones, sin embargo conforme la sequía va disminuyendo el metabolismo se va regulando hasta cambiar a C_3. Para algunas plantas como agaváceas y cactáceas la baja disponibilidad de agua sólo permite expresar CAM sin ninguna variante (Nobel 1988), lo mismo sucede para la especie *Kalanchoe beharensis,* pero ésta puede modificar el CAM a C_3-CAM y CAM de reciclaje dependiendo de la etapa de desarrollo, la temperatura y la disponibilidad de agua (Winter y Holtum 2002). Un comportamiento muy parecido se ha observado en la especie *Mesembryanthemum crystallinum*, la cual puede inducir el CAM por efecto de la falta de agua (déficit hídrico), salinidad, y altas temperaturas (Winter y Ziegler 1992). En *Kalanchoe blossfeldiana* la transición de C_3-CAM depende del fotoperíodo (Brulfert *et al.*, 1988) y en el género *Talinum* y *Sedum* algunas especies presentan expresión de CAM de reciclaje como respuesta a falta de agua y descenso o ascenso de la temperatura (Martin *et al.*, 1988). Las especies del género *Peperomia* pueden mostrar fotosíntesis de tipo C_3, CAM o CAM de reciclaje durante el desarrollo y en la etapa adulta debido a estrés hídrico (Ting *et al.*, 1996). Otro tipo de regulación de CAM es el que se lleva a cabo en el Género *Cissus* (*Vitaceae)* donde la fotosíntesis se expresa de manera diferente en el tallo y en la hoja

(plasticidad fenotípica) y, de igual manera que las anteriores, la expresión está regulada por condiciones ambientales como disponibilidad de agua, temperatura y luz (Virzo de Santo y Bartoli 1996).

De esta misma manera, se pueden mencionar varios casos sobre especies que presentan variaciones en la expresión de CAM, entre ellos, en la última década las especies del Género *Clusia* L. han despertado un gran interés entre fisiólogos y ecofisiólogos, ya que expresan variantes de CAM de acuerdo a su desarrollo ontogenético y forma de vida (Wanek *et al.*, 2002). Otras especies del género pueden ser CAM facultativas dependiendo de los cambios en las condiciones ambientales y acumular grandes cantidades de ácido cítrico durante el periodo de fijación de CO_2 (Lüttge 1996), además de presentar flexibilidad en el metabolismo de nitrógeno, el cual puede estar asociado con la fotosíntesis y la etapa de desarrollo (Arndt, 2002).

Género *Clusia* L.

El género *Clusia* L. pertenece a la familia *Clusiaceae* (antes *Guttiferae*), la cual comprende 37 géneros y 1610 especies, las cuales han sido de particular interés en el estudio de diversificación floral (Stevens 2003; Gustafsson 2003). El género *Clusia*, de origen neotropical, está constituido por alrededor de 300-400 especies que se distribuyen desde México y el sur de los Estados Unidos, hasta Bolivia y el Sur de Brasil (Pipoly *et al.*, 1998). Este género presenta distintas formas de vida que van desde árboles terrestres, arbustos, epifitas, hemiepífitas (incluyendo estranguladores) y ocasionalmente lianas. Estas especies y formas de vida pueden ser observadas en un diverso intervalo de ambientes, como pueden ser bosques de montaña, bosques bajos, savanas o dunas costeras (Lüttge 1996 y 2006). Las especies de *Clusia* se caracterizan por tener flores pequeñas, aunque, en algunos casos se pueden encontrar flores hermosas y de un gran tamaño como en *Clusia grandiflora*, cuyas flores tienen un diámetro cercano a los 150 mm (Lüttge 2006).
Las especies de *Clusia* de Centroamérica se presentan en tres clados de acuerdo a la morfología floral (tabla 2): el de *Clusia flava,* el de *Clusia minor* y el de *Clusia multiflora* (Hammel 1986). Este género habría sido uno más entre un numero extenso de árboles y arbustos del neotrópico, pero a partir del descubrimiento de la fotosíntesis CAM en algunas especies, los estudios sobre este género aumentaron en varias disciplinas Por ejemplo, los estudios relacionados con la morfología floral, su origen y el tipo de fotosíntesis (Gustafsson 2002 *et al.*, 2002 y 2003; Vassen *et al.*, 2002 y Gehrig *et al.*, 2003); así como la asociación de los grupos florales y la

producción de resinas con la biología de la polinización en especies de Venezuela, Brasil y Centroamérica (Bittrich y Amaral 1996 y 1997; Porto *et al.*, 2000;). Las flores tienen poco tiempo de vida y el análisis taxonómico se dificulta debido a la pobre preservación de éstas al secarse, pero, las ceras epicuticulares dentro del género tienen importancia taxonómica y pueden ser utilizadas para separar entre especies o secciones infragenéricas (Medina *et al.*, 2004 y 2006).

Todos estos aspectos han generado que la atención sobre el género aumente y se centren los estudios a resolver preguntas como: ¿Cuántas especies lo conforman?, ¿Cuántas de estas especies son C3, C3-CAM y CAM? Y ¿Cuál es el origen del género y a qué se debe la plasticidad en su fisiología?
Hasta el momento se sabe que el género como mínimo tiene una edad filogenética de 90 $x10^6$ años y que es considerado monofilético (Gustafsson *et al.*, 2002). Sin embargo, una secuenciación de ADN ribosomal mediante ITS (Espacios transcritos internos) demostró que la evolución de CAM en el género fue polifilética (Vassen *et al.*, 2002; Gehrig *et al.*, 2003 y Holtum *et al.*, 2004).

Los análisis de ITS en 80 especies de *Clusia* y un árbol derivado filogenéticamente sugieren que CAM evolucionó por lo menos dos veces en el género. Una reversión de CAM a C_3 se observó en ocho especies individuales y en un grupo de tres especies (Gustafsson *et al.*, 2006). Situación muy similar a la que sucede en la familia de las bromeliáceas, pero en el caso de *Clusia* se caracteriza por una alta plasticidad, hay muchas especies intermedias C_3/CAM. Situación que parece una regla dentro del género, ya que hasta el momento se conocen pocas especies C_3 y especialmente CAM obligadas (Holtum *et al.*, 2004). En resumen, se tiene un género con una extraordinaria plasticidad evolutiva y con una alta tasa de especiación que puede servir para comprender la evolución de la fotosíntesis CAM (Lüttge 2006).

Tabla 2. Clasificación del género *Clusia* en Centroamérica en base a morfología floral, ITS y tipo de fotosíntesis predominante.

Morfología floral	Especie representativa	Tipo de fotosíntesis predominante
Grupo I	*Clusia flava*	CAM
Grupo II	*Clusia minor*	C3-CAM
Grupo III	*Clusia multiflora*	C3

Hammel 1986; Gehrig *et al.* 2003 y Holtum *et al.*, 2004

Formas de vida y Fotosíntesis

La forma de vida se define como un tipo distintivo en la expresión de un organismo en su morfología y anatomía en cierto hábitat; por ejemplo, algunas plantas de *Clusia* pueden encontrarse ya sea como árbol, arbusto, enredadera o epífita. Para el caso del género *Clusia* la colonización del hábitat ha sido posible gracias a que presenta cierta flexibilidad en la fotosíntesis y a su plasticidad fenotípica (Winter y Smith 1996; Lüttge 2006).

Lüttge (2006) menciona que durante un trabajo de campo en febrero de 1800 en Venezuela, Alexander von Humboldt descubrió que *Clusia rosea* acumulaba una alta presión de gas interno, con una alta concentración de oxígeno cercana a 40%; también menciona que Willy Hartenburg reportó observaciones en experimentos de invernadero con *Clusia mexicana* Vesque; cuyos individuos, en los días brillantes, no tomaban CO_2 en el periodo diurno, pero siempre observaba salida de CO_2 que no podía explicarse por respiración. Así que sin poder dar explicación a los

fenómenos observados, tanto, A. von Humboldt como Hartenburg no tuvieron la oportunidad de dar a conocer la presencia de la fijación nocturna en una especie del género *Clusia*. Fue hasta 1983 que la presencia del metabolismo ácido de las crasuláceas se reportó por vez primera en una especie del género *Clusia* y resultó ser en México, con una especie llamada *Clusia lundelli* localizada dentro de la Reserva de la biosfera de los Tuxtlas en el estado de Veracruz. La especie en cuestión llamó mucho la atención a los investigadores Clara Tinoco Ojanguren y Carlos Vázquez-Yanes, debido a que presentaba un tipo de fotosíntesis poco común en árboles (Tinoco-Ojanguren y Vázquez-Yanes 1983). Posteriormente a la publicación de este trabajo se desprendieron una gran cantidad de reportes relacionados con el metabolismo fotosintético de las especies del género como es el caso de *Clusia rosea* (Ting 1985; Ting *et al.*, 1987).

Hasta el momento se han obtenido varios reportes de investigaciones sobre la flexibilidad con la que se lleva a cabo la fijación de CO_2 en respuesta a cambios en las condiciones ambientales (Franco *et al.*, 1990, 1994; Borland *et al.*, 1992; 1993 y 1996; Winter *et al.*, 1992). Además, se han obtenido datos sobre la producción de altas concentraciones de ácido cítrico durante la fijación del CO_2, algo característico del género y que aparentemente no es utilizado en el metabolismo energético, por lo que quedan muchos interrogantes por responder al respecto (Zotz y Winter 1993; Borland *et al.*, 1996). También se han realizado estudios sobre fluorescencia de la clorofila (Franco *et al.*, 1996 y 1999; Haag-Kerwer *et al.*, 1996 y Herzog *et al.*, 1998 y 1999); Estudios mediante isótopos de $\delta^{13}C$ para conocer el tipo de fotosíntesis en distintas especies (Gehrig et al. 2003; Holtum *et al.*, 2004 y Winter *et al.*, 2002); además de una última revisión publicada para el género, en la cual se abarcan aspectos como su flexibilidad fotosintética y plasticidad ecofisiológica (Lüttge 2006).
En la mayoría de las investigaciones con las especies del género, se pueden observar reportes de países como Brasil, Costa Rica, Honduras, Jamaica, Venezuela y Panamá. Pero no se tiene registrada ninguna investigación para México, salvo el trabajo pionero del año 1983, que dio a conocer al mundo la importancia de estas especies.

El Género *Clusia* L. en México

El género *Clusia* L. en la República Mexicana está representado por alrededor de 24 especies (CONABIO 2004). Sin embargo, no se sabe el número exacto de las especies que representan a este género en el país.

La única información que se ha generado sobre ellas se debe a los diferentes listados florísticos y colecciones de herbario que se tienen hasta el momento y a su presencia en distintas comunidades vegetales como las dunas costeras, las selvas altas, medianas y bajas, y además, la especie *Clusia salvinii* que se distribuye en bosques templados de pino y encino. En el año de 1979 Maguire proporcionó un estudio sobre las especies de este género en nuestro país y obtuvo un total de 14 especies, de las cuales una de ellas resultó endémica para el estado de Chiapas (*Clusia tetra-trianthera*). Además, su estudio resalta la importancia de la relación entre las especies que se encuentran en el país con las especies que se registran en Centro América, debido a que existe la probabilidad de que muchas hayan migrado de esta última región y colonizado nuevas regiones en el país. Este razonamiento se deriva a partir de conocer el lugar de origen del género (las Guyanas en Sudamérica) y se piensa que un ancestro de estas especies fue migrando y se diversificó, hasta colonizar Centroamérica en el Neóceno tardío (Emiliani *et al.*, 1972).

Como se mencionó anteriormente, el Género está dividido en tres grandes grupos: Grupo I en el cual se considera como especie representativa a *Clusia flava*, para el caso del grupo II la especie considerada como representativa es *Clusia minor* y por último, el Grupo III representado por *Clusia multiflora*; En México, se puede encontrar por lo menos una especie perteneciente a cada grupo dentro de las 24 reportadas hasta el momento.

El Género *Clusia* en la Península de Yucatán.

En la Península de Yucatán, se registran poblaciones pertenecientes a los grupos I y II (Gehrig et al. 2003), estas especies son *Clusia flava*, *Clusia rosea*, *Clusia chanekiana*, *Clusia* sp.1 y *Clusia aff. guatemalensis*. Registros del Herbario de CICY y observaciones personales, nos han mostrado que , *C. flava* se distribuye en el estado de Yucatán en distintas comunidades vegetales como dunas costeras (Río Lagartos), selvas bajas caducifolias y selvas medianas sub-caducifolias como las de los municipios de Libre Unión y Tizimin; al igual que con vegetación asociada a cenotes como en Tixcacaltuyub y Yaxcabá. En el estado de Campeche se pueden observar tres especies *C. flava, C. chanekiana* y *C. rosea* las cuales se distribuyen en vegetación secundaria y selvas medianas subperennifolias dentro de la reserva de la biosfera de Calakmul. Por último, en el estado de Quintana Roo *C. rosea* se encuentra distribuida de manera natural en la selva alta perennifolia de la Unión, al igual que *C. flava.* También podemos observar a

esta última en la vegetación de selva baja caducifolia dentro de la reserva de la biosfera de Sian Ka'an y compartiendo una comunidad de selva baja inundable en el municipio de Felipe Carrillo Puerto, con otras dos especies (*C. chanekiana* y *C. aff. Guatemalensis*; figura 1).

Figura 2. Especies de *Clusia* de la Península de Yucatán

Por tanto, el objetivo de este estudio ecofisiológico es determinar la relación que tienen las especies que conforman el género *Clusia*; con la expresión y tipo de fotosíntesis como respuesta a las condiciones ambientales de distintas comunidades vegetales en la Península de Yucatán. Este trabajo consta de cinco apartados o capítulos, entre los que se encuentra un

capitulo preliminar en el que se recabó información sobre las especies del género *Clusia* en México y su tipo de fotosíntesis. Con la finalidad de evaluar las siguientes hipótesis:

Hipótesis

1. El número de especies que presentarán fotosíntesis CAM y C_3/CAM (grupos filogenéticos I y II) en la República Mexicana será mayor, con respecto a las que presentarán fotosíntesis C_3 (grupo III); esto se debe a que las especies de *Clusia* del país ocurren en comunidades estacionales que pueden presentar un periodo sequía prolongado, en las que resulta ventajoso utilizar una fotosíntesis que sea eficiente en el uso de agua.

2. Las especies del género *Clusia* pertenecientes al grupo I como *Clusia flava y C. chanekiana* deberán expresar CAM en estaciones y ambientes secos, porque CAM es una estrategia para sobrevivir a condiciones de sequía. Mientras que en estaciones y ambientes más húmedos expresarán cierta proporción de fotosíntesis C_3, debido a la disponibilidad de agua y a una mayor humedad relativa.

3. *Clusia rosea* es una especie intermedia que pertenece al grupo II; por tanto, plántulas de esta especie pueden mantenerse en períodos largos de sequía al disminuir su asimilación de carbono tras activar CAM. Pero, en periodos de disponibilidad de agua, utilizará los dos tipos de fotosíntesis para optimizar el crecimiento que se vio limitado en la época seca. Mientras, que plántulas de *C. flava* en las mismas condiciones ambientales sólo expresarán CAM y verán limitado su crecimiento con respecto a las plántulas de *C. rosea.*

4. La vegetación donde han sido observadas las especies del género *Clusia* en la península de Yucatán está conformada por bosques secos con una baja disponibilidad de agua durante el año y es muy probable que la mayor parte de estas especies presenten valores $\delta^{13}C$ característicos de fotosíntesis CAM; sin embargo, se podrían tener especies que presenten valores $\delta^{13}C$ tipo C_3 y presenten acidez tisular obteniendo así especies CAM débiles, ya que pueden fijar cierta una pequeña cantidad de CO_2 por la noche.

Referencias

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

Arndt, K. S., Wanek W, Hoch G, Andreas R. y Popp M. 2002. Flexibility of nitrogen metabolism in the tropical C_3-crassulacean acid metabolism tree species, *Clusia minor*. Functional Plant. Biology 29: 741-747.

Borland A.M. y Griffiths, H. 1996. Variations in the phases of crassulacean acid metabolism and regulation of carboxylation patterns determined by carbon isotope-discrimination techniques. in: Winter K y Smith J.A.C 1996. Crassulacean acid metabolism. Biochemistry, ecophysiology and evolution. Winter K y Smith J.A.C (edits) Springer-Verlag Berlin Heidelberg 1996.

Borland A.M., Griffiths H., Maxwell, C., Broadmeadow M.S.J., Griffiths N.M. Barnes J.D. 1992. On the ecophysiology of the Clusiaceae in Trinidad : Expression of CAM in *Clusia minor* L. during the transition from the wet to dry season and characterization of three endemic species. New Phytologist. 349-357.

Borland A.M. Griffiths H., Broadmeadow M.S.J. Fordham H. y Maxwell K. 1993. Short-term changes in carbone isotope discrimination in the C3-CAM intermediate *Clusia minor* L. growing in Trinidad. Oecologia 95:444-453.

Cushman, J.C. 2001. Crassulacean acid metabolism. A plastic photosynthetic adaptation to arid environments. Plant Physiology 127: 1439-1448.

Ehleringer J.R. y Cerling T. E. 2002. C_3 y C_4 photosynthesis in: The earth system: biological and ecological dimensions of global environmental change. Harold Mooney y Canadell Joseph (eds) Encyclopedia of global environmental change. John Willey Ltd, Chichester.

Franco A.C., Ball E. y Lüttge U. 1990. Patterns of gas exchange and organic acid oscillations in tropical trees of the genus *Clusia*. Oecologia 85:108-114.

Franco A.C., Olivares E., Ball E., Lüttge U y Haag-Kerwer A. 1994. In situ studies of Crassulacean acid metabolism in several sympatric species of tropical trees of genus

Gehrig H.H., Aranda J., Cushman A., Virgo A., Cushman J.C. Hammel B.E. y Winter K. 2003. Cladogram of panamaniam *Clusia* Based on Nuclear DNA: implications for the origins of Crassulacean Acid Metabolism. Plant Biology 5: 59-69.

Grams T. E. E., Herzog B. y Lüttge U. 1998. Are the species in the genus *Clusia* with obligate C_3- photosynthesis? J. of Plant physiology. 152:1-9.

Gustafsson M. H. Bittrich V. y Stevens P.F. 2002. Phylogeny of Clusiaceae based on rbcL sequences. International Journal of Plant Sciences 163(6):1045-1054.

Hammel, B.E. 1986. New species of Clusiaceae from central America whit notes on *Clusia* and synonymy in the tribe Clusieae. Selbyana. 9:112-120.

Holtum J.A. 2002. Crassulacean acid metabolism. Plasticity in expression, Complexity of control. Funct. Plant. Biol. 29:657-661.

Holtum J.A. Aranda J., Virgo A., Gehrig H.H. y Winter K. 2004. $\delta^{13}C$ values and Crassulacean acid metabolism in *Clusia* species from Panama. Trees 18:658-668.

Kluge M y Ting P. 1978. Crassulacean acid metabolism . Analysis of an ecological adaptation. Springer, Berlin.

Lüttge U. 1988. Day-night changes of citric-acid levels in crassulacean acid metabolism: phenomenon and ecological significance. Plant Cell Environment 11:445-451.

Lüttge U. 1996. *Clusia*: Plasticity and diversity in genus of C_3/CAM intermediate tropical trees. In crassulacean acid metabolism. Biochemistry, ecophysiology and evolution. Winter K y Smith J.A.C (edits) Springer-Verlag Berlin Heidelberg 1996.

Lüttge U. 2006. Photosynthetic flexibility and ecophysiology plasticity: questions and lesson from *Clusia,* the only CAM tree, in the neotropics. New Phytologist. 171:7-25.

Maguire B. 1979 On the Genus *Clusia* (Clusiaceae) in Mexico. Taxon. 28:13-18.

Martin C.E. Higley M, Wang W-Z. 1988. Recycling of CO2 via crassulacean acid metabolism in the rock outcrop succulent *Sedum pulchellum.* Photosynthesis Research 18:3

Medina E. 1987. Aspectos ecológicos de plantas CAM en los trópicos. Revista de Biología Tropical 35(Suppl):55-70.

Osmond C.B. 1978 Crassulacean acid metabolism: a curiosity in context. Annual Review of Plant Physiology 29:379-414.

Pipoly. J.J., Kearns D. y Berry P.E. 1998. *Clusia*. In Flora of the Venezuelan Guayana. Vol. 4 Caesalpinaceae-Ericaceae (Berry, P. E., Holst, B.K. y Yatskievich, K, eds.). St. Louis Missouri: Missouri botanical garden Press. pp. 260-294.

Sage R. 2002. Are crassulacean acid metabolism and C_4 photosynthesis incompatible? Funct. Plant Biol. 29:775-785.

Stevens P.F. 2002. Angiosperm phylogeny Http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/

Taiz L y Zeiger E. 1998. Plant Physiology. 2a Ed. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Suderland, Massachusetts.

Ting I. P. 1985. Crassulacean acid metabolism. Ann. Rev. Plant. Physiol. 36:595-622.

Ting I.P., Hann J., Holmbrook, N.M., Putz, F. E., Stenberg, L. da S.L., Price, D. y Goldstein G. 1987. Photosynthesis in hemi-epiphytic species of *Clusia* and *Ficus*. Oecologia. 74:339-346.

Ting I P., Patel A., Kaur, S., Hann, J y Walling L. 1996. Ontogenetic development of crassulacean acid metabolism as modified by water stress in *Peperomia*. in: Winter K y Smith J.A.C 1996. Crassulacean acid metabolism. Biochemistry, ecophysiology and evolution. Winter K y Smith J.A.C (edits) Springer-Verlag Berlin Heidelberg 1996.

Tinoco-Ojuanguren C. y Vásquez Yánez C. 1983. Especies CAM en la selva húmeda tropical de los Tuxtlas Veracruz. Boletín de la Sociedad Botánica de México 45:150-153.

Vassen, A., Begerow, D., Lüttge U y Hammp R. 2002. The genus *Clusia* L. molecular evidence for independent evolution of photosynthetic flexibility. Plant Biology 4:86-93.

Virzo de Santo A. y Bartoli G. 1996. Crassulacean acid metabolism in Leaves and stems *Cissus quadrangularis.* in: Winter K y Smith J.A.C 1996. Crassulacean acid metabolism. Biochemistry, ecophysiology and evolution. Winter K y Smith J.A.C (edits) Springer-Verlag Berlin Heidelberg 1996.

Wanek, W. Hubert W., Arndt, S.K. y Popp, M. 2002. Mode of photosynthesis during different life stages of hemiepiphytic *Clusia* species. Functional Plant Biology 29: 725-732.

Winter K. y Holtum J.A.M. 2002. How closely do the δ^{13} C values of crassulacean acid metabolism plants reflect the proportion of CO_2 fixed during day and night? Plant Physiology 129: 1843-1851.

Winter K y Smith J.A.C. 1996. Crassulacean acid metabolism. Biochemistry, ecophysiology and evolution. Winter K y Smith J.A.C (eds) Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

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

Winter K., Osmond CB y Hubick KT (1986) Crassulacean acid metabolism in the shade. Studies on an epiphytic Fern, Pyrrosia longifolia. and other rainforest species from Australia. Oecologia 68: 224-230.

Winter, K., Zotz, G., Baur, B y Dietz K-J. 1992. Light and dark CO_2 fixation in Clusia uvitana and the effects of plant water status and CO_2 availability. Oecologia. 91:47-51.

Zotz, G. y Winter K. 1993. Short term regulation of crassulacean acid metabolism activity in a tropical hemiepiphyte, *Clusia uvitana*. Plant Physiology. 102: 835-841.

Capítulo II

Carbon isotope composition and mode of photosynthesis in *Clusia* species from Mexico

Capítulo publicado en la revista Photosynthetica

Abstract

The neotropical genus *Clusia* is remarkable because it comprises arborescent species exhibiting crassulacean acid metabolism (CAM) as was first reported for a Mexican species, *Clusia lundellii*. Here, the occurrence of CAM photosynthesis was studied in 20 species of *Clusia*, 18 from Mexico and 2 from Guatemala, using leaf carbon isotopic composition. In most species, samples from individuals collected in different locations were analyzed. CAM was present in at least 11 species, eight of which contained specimens with $\delta^{13}C$ values less negative than –20.0 ‰, indicating strong CAM (*C. chanekiana*, *C. flava*, *C. lundellii*, *C. mexicana*, *C. quadrangula*, *C. rosea*, *C. suborbicularis* and *C. tetra-trianthera*). $\delta^{13}C$ was highly variable in some species, but CAM expression did not appear to be correlated to life form (epiphytic, hemiepiphytic, terrestrial) or habitat. CAM specimens were not collected at altitudes above 1 700 m a.s.l.

Additional key words: crassulacean acid metabolism; photosynthetic pathway; species differences; stable carbon isotopes.

Introduction

The neotropical genus *Clusia*, which comprises about 300 woody species, exhibits great diversity of life forms including epiphytes, hemi-epiphytes (some stranglers), lianas, shrubs, and trees (Hammel 1986, Lüttge 2006). Moreover, the genus shows great plasticity in expression of photosynthetic pathways. Many *Clusia* species are C_3 plants, numerous species are known to exhibit pronounced crassulacean acid metabolism (CAM), and some species exhibit varying proportions of daytime versus nighttime net CO_2 uptake depending on environmental conditions (C_3-CAM intermediates and facultative CAM species) (Tinoco-Ojanguren and Vázquez-Yanes 1983, Holtum *et al.* 2004, Lüttge 2006, Winter *et al.* 2008).

Clusia species from Central America can be divided into three major clades, which correspond to three morphological species groups, the *C. flava* group, the *C. minor* group and the *C. multiflora* group (Hammel 1986). This

grouping has recently been corroborated by molecular phylogenies suggesting that CAM is present in mainly two of the three clades, the *C. flava* and the *C. minor* groups (Gustafsson *et al.* 2002, Vaasen *et al.* 2002, Gehrig *et al.* 2003). However, probably less than 25 % of *Clusia* species have been investigated regarding the presence of CAM photosynthesis, a task that is complicated by variation in CAM expression due to environment. Furthermore, only a few species have been studied in contrasting environments (Holtum *et al.* 2004, Lüttge 2006).

Surveys to determine the presence of CAM activity can be based on carbon isotope composition ($\delta^{13}C$) of plants because of the differential enzyme-mediated discrimination against $^{13}CO_2$ between C_3 ($\delta^{13}C$ values can range from –35 to –20 ‰) and CAM ($\delta^{13}C$ values ranging typically from –22 to –10 ‰) photosynthetic carbon assimilation (Ehleringer and Osmond 1989, Santiago *et al.* 2005). However, $\delta^{13}C$ values alone cannot detect CAM when dark CO_2 fixation makes a small but significant contribution to total carbon gain. Combining information on $\delta^{13}C$ values and net CO_2 exchange or diel variations in leaf titratable acidity has shown that weak CAM may occur in many species of Bromeliaceae, Clusiaceae and Orchidaceae with $\delta^{13}C$ values typical of C_3 photosynthesis (Pierce *et al.* 2002, Winter and Holtum 2002, Crayn *et al.* 2004, Holtum *et al.* 2004, Silvera *et al.* 2005).

Although the very first report of CAM in *Clusia* was made for *C. lundellii* in Mexico (Tinoco-Ojanguren and Vázquez-Yanes 1983), no further CAM studies on Mexican *Clusia* species have been carried out since then. In order to extend our knowledge on photosynthetic modes in *Clusia* species, we have measured $\delta^{13}C$ values for 20 species from sites in Mexico, Belize and Guatemala.

Materials and methods

Plant material was obtained from the National Herbarium of Mexico (MEXU) and from the herbarium of Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C. (CICY). Species names, collector, voucher number, location, altitude and life form were obtained from the specimen vouchers. Carbon isotope ratios ($^{13}C/^{12}C$) were determined from about 3 mg of dried material (Pierce *et al.* 2002, Winter and Holtum 2002, Holtum *et al.* 2004). Samples were analyzed at the Analytical Chemistry Laboratory, Institute of Ecology, University of Georgia, Athens, GE, USA by isotope ratio mass spectrometry. The abundance of ^{13}C in each sample was calculated relative to the abundance of ^{13}C in standard CO_2 that had been calibrated against Pee Dee belemnite

(*Belemnitella americana*) and the stable carbon isotope composition was expressed in conventional delta (δ) notation as the $^{13}C/^{12}C$ ratio relative to the standard: $\delta^{13}C=[(^{13}C/^{12}C \text{ of sample})/(^{13}C/^{12}C \text{ of standard})-1]\times1000$.

Results

The $\delta^{13}C$ values of leaves of 140 specimens of 20 species of *Clusia* ranged from a minimum of –33.6 to a maximum of –13.5 ‰ (Table 1). In eight species, at least one specimen had a $\delta^{13}C$ less negative than –20 ‰ characteristic of pronounced CAM (*C. chanekiana*, *C. flava*, *C. lundellii*, *C. mexicana*, *C. quadrangula*, *C. rosea*, *C. suborbicularis* and *C. tetratrianthera*). CAM was most prominent in *C. flava*, which was sampled 39 times. All specimens of *C. flava* except one exhibited $\delta^{13}C$ values less negative than –20 ‰ and $\delta^{13}C$ values of 31 specimens were in the very narrow range between –16.5 and –13.5 ‰. *Clusia rosea* ranked second in terms of the importance of CAM to carbon gain, with 5 of 7 specimens showing $\delta^{13}C$ values less negative than –20 ‰ (–18.5 to –14.5 ‰). *Clusia lundellii* (13 specimens), *C. quadrangula* (12 specimens), and *C. mexicana* (5 specimens) had one specimen each with a $\delta^{13}C$ value less negative than –20 ‰, and 2 (*C. quadrangula*) to 4 specimens (*C. lundellii*, *C. mexicana*) in the –24 to –20 ‰ range, indicative of a potential contribution of net dark CO_2 fixation to carbon gain. Further species containing specimens with $\delta^{13}C$ values in the –24 to –20 ‰ range were *C. minor*, a known CAM species, *C. guatemalensis*, and *C. salvinii*. Specimens of the remaining 9 species (*C. belizensis*, *C. gentlei*, *C. pringlei*, *C. stenophylla*, *C. torresii*, *C. uniflora* and *C. uvitana*) had $\delta^{13}C$ values more negative than –24.8 ‰. One of these species (*C. uvitana*) is known to exhibit CAM.

The mean $\delta^{13}C$ values showed a bimodal distribution with a large mode at –26.0 ‰ and a small mode at –14.0 ‰ (Fig. 1). Several species showed a very broad range of leaf $\delta^{13}C$ values. Fig. 2 depicts the frequency distribution of leaf $\delta^{13}C$ values for the six species for which 7 or more specimens were analyzed. *C. quadrangula* covered the largest range of $\delta^{13}C$ values (–33.6 to –19.9 ‰; Fig. 2C).

The ecological amplitude for most species of Mexican *Clusia* is large. Species were distributed over a mean-annual-precipitation range of 300–4 500 mm and occurred at altitudes from 0–2 300 m a.s.l. (Tables 1 and 2). Many species were present in dry, wet and cloud forests (Table 2). Specimens of *C. flava* and *C. quadrangula* were also collected in coastal dune and desert scrub habitats (Table 2).

Specimens with C_3-type leaf $\delta^{13}C$ values were collected across the entire altitudinal sampling range. The upper limit for the occurrence of strong CAM was 1 700 m (*C. tetra-trianthera*, –13.5 ‰). Eighty two percent of all specimens with $\delta^{13}C$ values less negative than –20.0 ‰ were collected at altitudes ≤ 500 m a.s.l. (Fig. 3). *C. salvinii*, which was sampled multiple times at mainly high altitudes (1562 ± 103 m a.s.l., n = 24; $\delta^{13}C$ = –26.8 ± 0.8 ‰, n = 26) showed a particularly wide range of $\delta^{13}C$ values from –31.4 ‰ for a plant at 350 m a.s.l. to –20.9 ‰ for a plant at 2 100 m a.s.l.

Discussion

Of the 20 species studied, five can be considered strong CAM species based on carbon isotope ratios: *C. chanekiana, C. flava, C. rosea, C. suborbicularis* and *C. tetra-trianthera*. While CAM in *C. rosea* has been documented previously (Ting *et al.* 1985, Holtum *et al.* 2004), our broad survey amongst 39 specimens of *C. flava* now provides unequivocal evidence for the presence of strong CAM in this species as suggested by Holtum *et al.* (2004). CAM in *C. chanekiana*, *C. suborbicularis* and *C. tetra-trianthera* has not been reported before. For *C. suborbicularis* only one specimen collected in Guatemala was analyzed and further studies of this species are warranted.

In three additional CAM species, *C. quadrangula, C. lundellii*, and *C. mexicana,* mean $\delta^{13}C$ values were –25.1 ‰, –24.8 ‰ and –21.1 ‰, respectively, with some specimens showing $\delta^{13}C$ values typical of strong CAM. $\delta^{13}C$ values in the C_3 range do not exclude the presence of CAM. According to the calibration regression by Winter and Holtum (2002), which applies to non-stressed plants at or close to sea-level, the above-mentioned mean $\delta^{13}C$ values may reflect a 10, 12, and 32 % contribution, respectively, of dark CO_2 fixation to total carbon gain. *Clusia lundellii* was the first *Clusia* species ever reported to possess CAM based on measurements of diel changes in leaf acidity (Tinoco-Ojanguren and Vázquez-Yanes 1983). *C. mexicana* was reported to lack daytime CO_2 assimilation in 1937 by Willy Hartenburg (Lüttge 2006), consistent with the operation of the CAM pathway, and *C. quadrangula* has been shown to exhibit weak CAM (Holtum *et al.* 2004).

C. minor is an extremely well characterized C_3-CAM species (Franco *et al.* 1991, Borland *et al.*1996, Roberts *et al.* 1998, de Mattos and Lüttge 2001). In our study, $\delta^{13}C$ values of seven specimens ranged from –23.5 to –28.6 ‰, indicating that plants gained carbon mainly via the C_3 pathway. The

same is true for a single specimen of *C. uvitana* (–25.9 ‰), a species having the capacity for CAM (Winter *et al.* 1992).

Leaf acidity and CO_2 exchange measurements are required to examine whether any of the other *Clusia* species in our study can exhibit CAM. In *C. guatemalensis* $\delta^{13}C$ values of 15 specimens ranged from –30.4 to –23.2 ‰ (mean –26.7 ‰), and preliminary measurements of day/night changes in leaf titratable acidity suggested the presence of CAM in this species from the Yucatan peninsula (Gustavo Vargas-Soto and Jose Luis Andrade, unpublished). Thus, at least 10 of 18 *Clusia* species from Mexico seem to be able to perform CAM, and some of these are strong CAM species. It also appears that the Mexican flora contains fewer *Clusia* species than the Panamanian flora (Holtum *et al.* 2004), but that the proportion of strong CAM species is larger in Mexico than in Panama, where only *C. rosea* can be considered strong CAM. The mean annual precipitation range within the Mexican habitats of the present study is much larger (300 to 4500 mm) than that for Panamanian habitats (1 800–4 000 mm; Condit 1998), and the greater aridity of many Mexican sites is expected to favour CAM. Consistent with previous studies in Venezuela and Panama (Diaz *et al.* 1996, Holtum *et al.* 2004), no Mexican *Clusia* species known to exhibit CAM was collected above 1 700 m a.s.l. $\delta^{13}C$ values of C_3 plants are known to become less negative with increasing altitude (Körner *et al.* 1991). We did not find a clear altitudinal trend in $\delta^{13}C$ for Mexican *Clusia*, not even for the species currently considered C_3 plants. High altitude effects on $\delta^{13}C$ (Körner *et al.* 1988, Cordell *et al.* 1999, Haltine and Marshall 2000, Crayn *et al.* 2001), independent of CAM, may be largely responsible for $\delta^{13}C$ values up to –20.9 ‰ at 2 100 m a.s.l. in *C. salvinii*, although we cannot exclude a capacity for CAM in this species in the absence of titratable acidity measurements.

Our survey provides a foundation for future rigorous field and laboratory studies on Mexican *Clusia* species, especially on those exhibiting CAM and covering a wide range of habitats, involving titratable acidity measurements to determine weak CAM. It has been predicted that as temperature increases and precipitation decreases in Mexico in the context of climate change, drier ecosystems such as dry tropical forests and thorn desert scrub communities will be favored (Villers-Ruiz and Trejo-Vázquez 1997). Under this scenario, *Clusia* species with water-conserving CAM photosynthesis could become more important ecologically, and should also be considered for reforestation purposes.

References

Borland, A.M., Griffiths, H., Maxwell, C., Fordham, M.C., Broadmeadow, M.S.J.: CAM induction in *Clusia minor* L. during the transition from wet to dry season in Trinidad: the role of organic acid speciation and decarboxylation. – Plant Cell Environ. **19**: 655-664, 1996.

Condit, R.: Ecological implications of changes in drought patterns: shifts in forest composition in Panama. – Climate Change **39**: 413-427, 1998.

Cordell, S., Goldstein, G., Meinzer, F.C., Handley, L.L.: Allocation of nitrogen and carbon in leaves of *Metrosideros polymorpha* regulates carboxylation capacity and $\delta^{13}C$ along an altitudinal gradient. – Funct. Ecol. **13**: 811-818, 2002.

Crayn, D.M., Smith, J.A.C., Winter, K.: Carbon-isotope ratios and photosynthetic pathways in the neotropical family Rapateaceae. – Plant Biol. **3**: 569-576, 2001.

Crayn, D.M., Winter, K., Smith, J.A.C.: Multiple origins of crassulacean acid metabolism and the epiphytic habit in the Neotropical family Bromeliaceae. – Proc. nat. Acad. Sci. USA **101**: 3703-3708, 2004.

de Mattos, E.A., Lüttge, U.: Chlorophyll fluorescence and organic acid oscillations during transition from CAM to C_3-photosynthesis in *Clusia minor* L. (Clusiaceae). – Ann. Bot. **88**: 457-463, 2001.

Diaz, M., Haag-Kerwer, A., Wingfield, R., Ball, E., Olivares, E., Grams, T. E. E., Ziegler, H., Lüttge, U.: Relationships between carbon and hydrogen isotope ratios and nitrogen levels in leaves of *Clusia* species and two other Clusiaceae genera at various sites and different altitudes in Venezuela. – Trees **10**: 351-358, 1996.

Ehleringer, J.R., Osmond, C.B.: Stable isotopes. – In: Pearcy, R. W., Ehleringer, J. R., Rundel, P. W. (ed.): Plant Physiological Ecology, Field Methods and Instrumentation. Pp. 281-300. Chapman and Hall, London 1989.

Franco, A.C., Ball, E., Lüttge, U.: The influence of nitrogen, light and water stress on CO_2 exchange and organic acid accumulation in the

tropical C_3-CAM tree, *Clusia minor*. – J. exp. Bot. **42**: 597-603, 1991.

García, E.: [Modificaciones al sistema de clasificación climática de Koeppen.] – Instituto de Geografía, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City 1987. [In Span.]

Gehrig, H.H., Aranda, J., Cushman, M.A., Virgo, A., Cushman, J.C., Hammel, B.E., Winter, K.: Cladogram of Panamanian *Clusia* based on nuclear DNA: implications for the origin of crassulacean acid metabolism. – Plant Biol. **5**: 59-70, 2003.

Gustafsson, M.H.G., Bittrich, B., Stevens, P. F.: Phylogeny of Clusiaceae based on *RBCL* sequences. – Int. J. Plant Sci. **163**: 1045-1054, 2002.

Hammel, B.E.: New species of Clusiaceae from Central America with notes on *Clusia* and synonymy in the tribe Clusieae. – Selbyana **9**: 112-120, 1986.

Holtum, J.A.M., Aranda, J., Virgo, A., Gehrig, H.H., Winter, K.: $\delta^{13}C$ values and crassulacean acid metabolism in *Clusia* species from Panama. – Trees **18**: 658-668, 2004.

Hultine, K.R., Marshall, J.D.: Altitude trends in conifer leaf morphology and stable carbon isotope composition. – Oecologia **123**: 32-40, 2000.

Körner, C., Farquhar, G. D., Roksandic, Z.: A global survey of carbon isotope discrimination in plants from high altitude. – Oecologia **74**: 623-632, 1988.

Körner, C., Farquhar, G. D., Wong, S. C.: Carbon isotope discrimination by plants follows latitudinal and altitudinal trends. – Oecologia **88**: 30-40, 1991.

Lüttge, U.: Photosynthetic flexibility and ecophysiological plasticity: questions and lessons from *Clusia*, the only CAM tree, in the neotropics. – New Phytol. **171**: 7-25, 2006.

Moreno-Casasola, P., Espejel, I.: Classification and ordination of coastal sand dune vegetation along the Gulf and Caribbean Sea of Mexico. – Vegetatio **66**: 147-182, 1986.

Pierce, S., Winter, K., Griffiths, H.: Carbon isotope ratio and the extent of daily CAM use by Bromeliaceae. – New Phytol. **156**: 75-83, 2002.

Roberts, A., Borland, A.M., Maxwell, C., Griffiths, H.: Ecophysiology of the C_3-CAM intermediate *Clusia minor* L. in Trinidad: seasonal and short-term photosynthetic characteristics of sun and shade leaves. – J. exp. Bot. **49**: 1563-1573, 1998.

Rzedowsky, J.: [Vegetación de México.] – Limusa, Mexico City 1978. [In Span.]

Santiago, L.S., Silvera, K., Andrade, J.L., Dawson, T.E.: [The use of stable isotopes in tropical biology.] – Interciencia **30**: 536-542, 2005. [In Span.]

Silvera, K., Santiago, L.S.,Winter, K.: Distribution of crassulacean acid metabolism in orchids of Panama: evidence of selection for weak and strong modes. – Funct. Plant Biol. **32**: 397-407, 2005.

Ting, I.P., Lord, E.M., Sternberg, d.S.L., DeNiro, M.J.: Crassulacean acid metabolism in the strangler *Clusia rosea* Jacq. – Science **229**: 969-971, 1985.

Tinoco-Ojanguren, C., Vázquez-Yanes, C.: [CAM species in the tropical rain forest of Los Tuxtlas, Veracruz.] – Bol. Soc. Bot. Mex. **45**: 150-153, 1983. [In Span.]

Trejo, I., Dirzo, R.: Floristic diversity of Mexican seasonally dry tropical forests. – Biodivers. Conserv. 11: 2063-2084, 2002.

Vaasen, A., Begerow, D., Lüttge, U., Hampp, R.: The genus *Clusia* L.: molecular evidence for independent evolution of photosynthetic flexibility. – Plant Biol. **4**: 86-93, 2002.

Villers-Ruiz, L., Trejo-Vázquez, I.: Assessment to the vulnerability of forest ecosystems to climate change in Mexico. – Climate Res. **9**: 87-93, 1997.

Webster, G. L.: Panorama of neotropical cloud forests. – In: Biodiversity and conservation of neotropical montane forests: proceedings. Pp. 53-77. New York Botanical Garden, Bronx 1995.

Winter, K., García, M., Holtum, J.A.M.: On the nature of facultative and constitutive CAM: environmental and developmental control of CAM expression during early growth of *Clusia, Kalanchoe* and *Opuntia* – J. exp. Bot. **59**: 1829-1840, 2008.

Winter, K., Holtum, J.A.M.: How closely do the $\delta^{13}C$ values of crassulacean acid metabolism plants reflect the proportion of CO_2 fixed during day and night? – Plant Physiol. **129**: 1843-1851, 2002.

Winter, K., Zotz, G., Baur, B., Dietz, K.J.: Light and dark CO_2 fixation in *Clusia uvitana* as affected by plant water status and CO_2 availability. – Oecologia **91**: 47-51, 1992.

Table 1. $\delta^{13}C$ values of leaves from herbarium samples of *Clusia* spp. Samples were obtained from the National Herbarium of Mexico (MEXU) and from the herbarium of the Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY). S, shrub; T, tree; H, hemiepiphyte; E, epiphyte, ND, not determined.

Taxon	Collector, voucher number, herbarium	Altitude [m]	Life-form	$\delta^{13}C$ [‰]
C. belizensis Standl.	Lundell 20218 MEXU	540	T	−28.4
	E. Martinez 15621 MEXU	180	S	−27.8
C. chanekiana Lundell	E. Martinez 28126 CICY	129	E	−17.1
C. flava Jacq.	B. Croat 39480 MEXU	1260	T	−22.4
	E. Ucan 948 CICY	100	T	−19.9
	Ramamoorthy 3298 MEXU	200	S	−18.9
	D. Vasquez 229 MEXU	300	H	−18.3
	Levy and Durán 451 MEXU	400	T	−17.7
	E. Rojas 21 MEXU	0	T	−17.5
	E. Martinez 28126 MEXU	129	E	−17.4
	P. Simá 786 CICY	20	T	−16.7
	Laurence 3920 MEXU	150	E	−16.5
	E. Ucan 3881 CICY	22	T	−16.4
	P. Vera Caletti 218 MEXU	430	H	−16.3
	Reyes Garcia 182 MEXU	500	T	−16.3
	O. Téllez 3425 MEXU	10	T	−16.2
	Durán y Marmolejo 1075 MEXU	10	T	−16.2
	C. Cowan 4662 CICY	200	T	−16.1
	Lundell 6366 MEXU	126	H	−16.0
	Schatz *et al.* MEXU	200	E	−16.0
	S. Koch 8419 MEXU	0	S	−16.0
	R. M. López MEXU	20	T	−15.7
	P. Simá 766 CICY	20	E	−15.6
	S. Sinaca 867 MEXU	300	E	−15.4
	E. Cabrera 6392 MEXU	10	T	−15.4
	R. Durán 1541 CICY	20	T	−15.4
	E. Rojas 021 CICY	20	T	−15.3
	A. Gomez-Pompa 4847 MEXU	10	E	−15.2
	Magaña 331 MEXU	60	T	−15.2
	Reyes Garcia 1050 MEXU	1150	T	−15.2
	C. Chan 5095 CICY	25	T	−15.1
	E. Ucan y C. Chan 3836 CICY	21	E	−15.1
	E. Ucan 3310 CICY	20	H	−15.0
	O. Téllez 1282 CICY	5	T	−15.0
	O. Téllez 3193 MEXU	10	T	−14.8
	E. Cabrera 3467 MEXU	10	T	−14.7
	C. Chan 2360 CICY	5	T	−14.6
	Reyes Garcia 1286 MEXU	1050	T	−14.3
	G. Ibarra 806 MEXU	200	S	−14.2
	Steere MEXU	29	T	−14.2
	E. Martinez 30799 MEXU	300	T	−13.6
	F. Menendez 120 MEXU	10	S	−13.5
C. gentlei Lundell	Espejo 1123 MEXU	900	T	−24.9
C. guatemalensis Hemsl.	T. Wendt 3866 MEXU	350	H	−30.4
	Hawkins 1453 MEXU	665	E	−29.5
	F. Ventura 7662 MEXU	1400	S	−28.7
	Lundell 20109 MEXU	ND	E	−28.7
	A. Durán and S. Levy 118 MEXU	950	E	−28.1
	Heath and Long 817 MEXU	1400	T	−27.7
	Alonso Méndez 9593 MEXU	ND	T	−26.4
	F. Ventura 4576 MEXU	760	S	−26.3
	R. Torres 5922 MEXU	1170	ND	−26.0
	Sousa MEXU	1500	E	−25.3
	E. Martinez 8782 MEXU	1600	T	−24.8
	Campos 4272 MEXU	ND	T	−24.8
	J. Rzedowski 19097 MEXU	650	ND	−24.2
	R. del Castillo 873 MEXU	1985	S	−23.2

Table 1 (continued)

Taxon	Collector, voucher number, herbarium	Altitude [m]	Life-form	$\delta^{13}C$ [‰]
C. aff. *guatemalensis* Hemsl.	X. Munn 60 MEXU	1835	T	–26.9
C. lundellii Standl.	Davidse 31924 MEXU	150	T	–28.1
	P. Zamora 2427 MEXU	ND	T	–27.5
	S. Avendaño y Durán 3114 MEXU	ND	T	–27.4
	Castillo and Vasquez 1382 MEXU	1300	T	–26.6
	E. Martínez 15621 MEXU	180	S	–26.4
	H. Navare 396 MEXU	1650	T	–25.9
	M. Cházaro 1066 MEXU	ND	S	–25.6
	Calzado *et al.* 8895 MEXU	1550	T	–25.4
	M. Rosas 173 MEXU	1400	T	–23.4
	Merino Rosas 173 MEXU	1400	ND	–23.3
	Nevling and Gómez-P. 2280 MEXU	1300	E	–22.8
	R. Cedillo 86 MEXU	ND	E	–21.4
	G. Ibarra 1094 MEXU	160	S	–19.0
C. massoniana Lundell	Davidse and Brandt 31960 MEXU	300-620	T	–29.5
	G. Ibarra 4015 MEXU	400	T	–29.4
	E. Martínez 7648 MEXU	540	T	–27.4
	J. Meave and A. Howe 1109 MEXU	510	T	–27.3
C. mexicana Vesque	Valdivia 2430 MEXU	650	E	–23.3
	F. Ventura MEXU	1500	S	–22.9
	F. Ventura 4210 MEXU	1030	S	–22.1
	Avendaño and Durán 3051 MEXU	ND	T	–21.7
	G. Ibarra 2937 MEXU	520	E	–15.8
C. minor L.	E. Martínez 8952 MEXU	80	T	–28.6
	Estrada 792 MEXU	1120	T	–28.5
	B. Vásquez 187 MEXU	152	T	–27.1
	P. Basurto and Ramam. 2395 MEXU	100	T	–27.1
	G. Ibarra 1986 MEXU	200	E	–26.1
	Gilly and Hernández X 214 MEXU	10	H	–26.0
	T. Wendt *et al.* 3181 MEXU	130	E	–23.5
C. multiflora Kunth	Croat and Hammel 63664 MEXU	1800	T	–26.2
C. pringlei Lundell	J. L. Panero 3923 MEXU	1900	S	–27.5
C. quadrangula Bartlett	Davidse and Prantt 32054 MEXU	80-420	E	–33.6
	E. Contreras 6773 MEXU	300	T	–33.0
	R. Cedillo 1915 MEXU	1500	T	–31.8
	F. Martínez *et al.* 25068 MEXU	150	E	–31.3
	B. Ortiz 100 MEXU	150	E	–30.2
	D. Lorente 2975 MEXU	750	E	–29.4
	E. Martínez *et al.* 21058 MEXU	200	T	–29.0
	G. Ibarra 3753 MEXU	550	H	–27.9
	Castillo *et al.* 17075 MEXU	690	S	–26.0
	R. Ortega 445 MEXU	600	S	–21.5
	Dorantes 1234 MEXU	650	S	–21.0
	Medina 133 MEXU	600	T	–19.9
C. rosea Jacq.	A. Espejo 1971 MEXU	1400	T	–25.8
	Nuñez 983bis MEXU	1680	T	–24.2
	E. Martínez 30274 MEXU	250	T	–18.5
	H. Uitzil 34 CICY	0	T	–18.4
	E. Martínez 30274 CICY	250	T	–16.2
	Lundell 16233 MEXU	600	E	–15.4
	C. Beutelspachel MEXU	800	T	–14.5
C. salvinii Donn. Sm.	R. Cedillo 2976 MEXU	350	S	–31.4
	Campos A. 3322 MEXU	1900	T	–29.7
	Flores Franco 4470 MEXU	1515	T	–29.2
	S. Salas 1223 MEXU	1760	S	–28.8
	J. Soto 12380 MEXU	950	T	–28.7
	Machoca and Chazado 7514 MEXU	1550	T	–28.5
	J. Soto 7895 MEXU	1150	S	–27.8

Table 1 (continued)

Taxon	Collector, voucher number, herbarium	Altitude [m]	Life-form	$\delta^{13}C$ [‰]
C. salvinii Donn. Sm.	O. Téllez 12924 MEXU	ND	T	−27.8
	Cedillo 3326 MEXU	950	T	−27.7
	García A. 1304 MEXU	1870	T	−27.5
	E. Martínez MEXU	1800	E	−27.2
	M. Ishinki 726 MEXU	1880	T	−27.1
	MEXU	2000	ND	−27.0
	S. Moreno 157 MEXU	1900	T	−26.9
	G. Medrano 5161 MEXU	1500	T	−26.9
	Breedlove 28158 MEXU	800	T	−26.8
	E. Guizar y Niembro 381 MEXU	1850	T	−26.4
	C. Soto and R. Moreno MEXU	1300	T	−26.0
	Vasquez and Phillips 275 MEXU	1350	T	−25.6
	O. Téllez 9735 MEXU	ND	T	−25.0
	Zamudio and Perez 8287 MEXU	1820	T	−24.8
	R. Mallorga 1541 MEXU	2300	T	−24.5
	M. Osorio 2619 MEXU	2300	T	−24.0
	J.Clónico (12153) MEXU	1210	S	−22.5
	Cházaro *et al.* (7763) MEXU	2100	S	−20.9
C. stenophylla Standl.	G. Ibarra 2358 MEXU	1000	T	−29.6
C. suborbicularis Lundell	E. Contreras 8276 MEXU	600	T	−14.5
C. tetra-trianthera Maguire	Breedlove 28177 MEXU	1350	T	−13.7
	Breedlove 37928 MEXU	1700	T	−13.5
C. torresii Standl.	A. Méndez 6664 MEXU	150	T	−27.8
C. uniflora Lundell	Hamshire *et al.* 620 MEXU	1400	T	−25.1
C. uvitana Pittier	González Espinosa *et al.* 1384 MEXU	900	E	−25.9

Table 2. Ecological range for *Clusia* species from Mexico. Dry forest category includes seasonally dry, dry deciduous and seasonally flooded tropical forests. Other includes disturbed vegetation and cultivated lands. [1]Moreno-Casasola and Espejel (1986); [2]Rzedowski (1978); [3]Trejo and Dirzo (2002); [4]García (1987); [5]Webster (1995).

Species	Habitat Coastal dune	Desert scrub	Dry forest	Rain forest	Riparian	Cloud forest	Other
C. flava	••	•	••••••••••••• •••••••••••••	••••••••• ••		•	
C. guatemalensis			•	•••••		••••••••	•
C. hundellii			•••	•••	•	••••••	
C. mexicana			•	••		•	
C. minor			•	••	•		•
C. minor				•••••		•••	
C. quadrangula		••	••	•••••	•	•	•
C. rosea			••••	•		••	
C. salvinii		•	••	•••		••••••••••••• ••••••	••
Annual precip. [mm]	450[1]	300–400[2]	600–1800[3]	2200–4000[4]	80–1030	1500–4500[5]	1350–1500

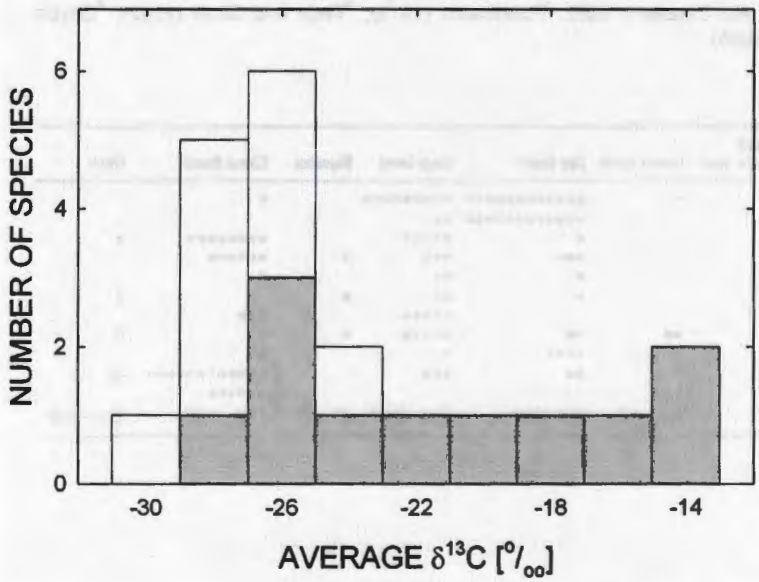


Fig. 1. Frequency of leaf $\delta^{13}C$ for Mexican species of *Clusia* with presence (diagonal) or absence (open) of CAM. The presence of CAM was based on carbon stable isotope values and on previously published data. Each bar represents a 2 ‰ range of $\delta^{13}C$.

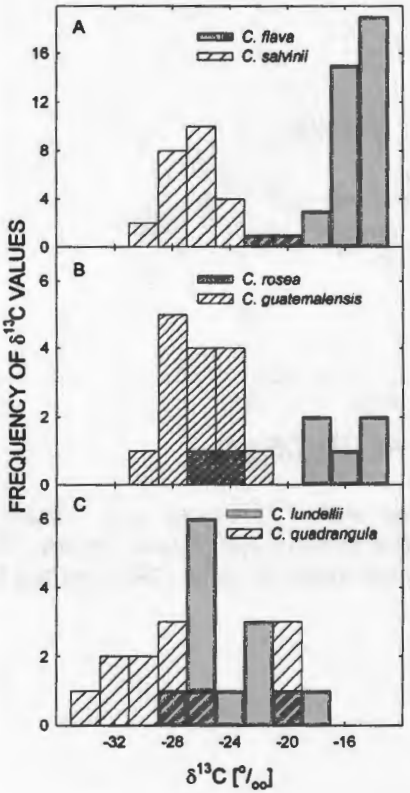


Fig. 2. Frequency of leaf $\delta^{13}C$ values of the six *Clusia* species with ≥ 7 specimens analyzed. (A) *C. salvinii* (diagonal bars) and *C. flava* (gray bars). (B) *C. guatemalensis* (diagonal bars) and *C. rosea* (gray bars). (C) *C. lundellii* (diagonal bars) and *C. quadrangula* (gray bars). Each bar represents a 2 ‰ range of $\delta^{13}C$.

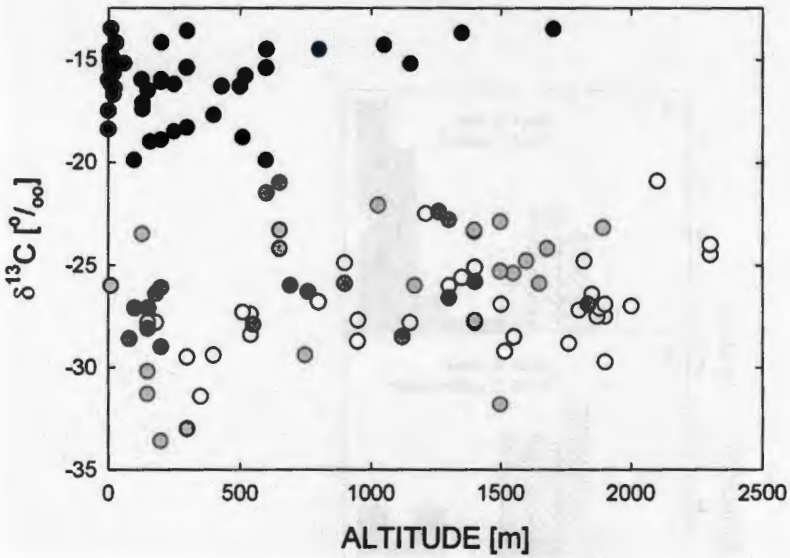


Fig. 3. Relationship between leaf $\delta^{13}C$ values and altitude for Mexican species of *Clusia* that exhibited strong CAM (closed circles), those known to perform CAM (gray circles), and those in which CAM has not been detected (open circles).

Capítulo III

Expresión de fotosíntesis CAM para tres especies de *Clusia* en distintas comunidades vegetales de la Península de Yucatán, México

Introducción

Las plantas del género Neotropical *Clusia* conforman alrededor de 300 especies, las cuales exhiben una diversidad de formas de vida, que va desde arbustos, árboles, hemiepífitas y enredaderas (Hammel 1986; Pipoly et al. 1998). Sin embargo, se desconoce en la actualidad el número de especies del género que pueden pertenecer a cada forma de vida. Dada la plasticidad en la forma de vida, algunas especies pueden ser flexibles en la expresión de su tipo de fotosíntesis en relación con el ambiente, ya que algunas pueden expresar fotosíntesis tipo C_3, CAM o intermedias (C_3/CAM), situación que está íntimamente relacionada con su origen filogenético (Gehrig *et al.* 2003); Esta característica ha resultado de mucho interés para el estudio del género, ya que se debe a una gran presión selectiva ejercida por el ambiente (Herzog, *et. al.* 1999). La distribución de las especies de *Clusia* va desde las dunas costeras, pasando por selvas bajas, medianas y altas (Lüttge 1998); En ciertos casos, una sola especie puede encontrarse en varias comunidades, lo que las expone a condiciones ambientales muy contrastantes. Tal situación resulta de bastante interés, ya que se pueden evaluar distintos aspectos fisiológicos para una sola especie que ocurre en varias comunidades con características ambientales distintas. La expresión de CAM en el género está fuertemente regulada por las condiciones ambientales, situación bien conocida para las especies CAM obligadas como *C. hilariana* y las especies intermedias C_3-CAM como *C. minor*, *C. parviflora* y *C. rosea* (Grams 1997; Herzog 1998; Lüttge 1999). Recientemente, el estudio del tipo de fotosíntesis en las especies del género ha cobrado mucha importancia con estudios que van desde los ecofisiológicos hasta los fisiológicos. Una herramienta muy importante para determinar la ruta de asimilación de CO_2 en estas plantas es la evaluación mediante isótopos estables de carbono, dado que las mediciones de los valores de $\delta^{13}C$ se realizan en menor tiempo y resultan convenientes para muchas especies C_3-CAM (Winter y Holtum 2002). Por otro lado, las contribuciones pequeñas de fijación de carbono nocturno no son fácilmente detectables con mediciones de los valores de $\delta^{13}C$ y, en cambio, pueden ser cuantificadas mediante acidez titulable (Holtum *et al.* 2004). Por tanto, se determinó la expresión y el tipo de fotosíntesis de especies de *Clusia* distribuidas en tres comunidades vegetales con condiciones ambientales

contrastantes en la Península de Yucatán, México. Esto se hizo con el fin de comparar la expresión y tipo de fotosíntesis de tres especies del Género, en distintas comunidades vegetales. Evaluando aspectos morfológicos y fisiológicos que permitan integrar adecuadamente el modo de fotosíntesis con respecto al ambiente.

Por tanto, los objetivos particulares planteados son los siguientes:

1. Comparar la concentración de ácido total titulable, ácido málico y ácido cítrico entre especies y comunidades.
2. Cuantificar y analizar la concentración de clorofila total y la relación clorofila a/b, el área foliar específica y la suculencia de cada especie.
3. Relacionar las condiciones ambientales de cada comunidad con las variables morfológicas y fisiológicas con el tipo de fotosíntesis expresado en cada especie.

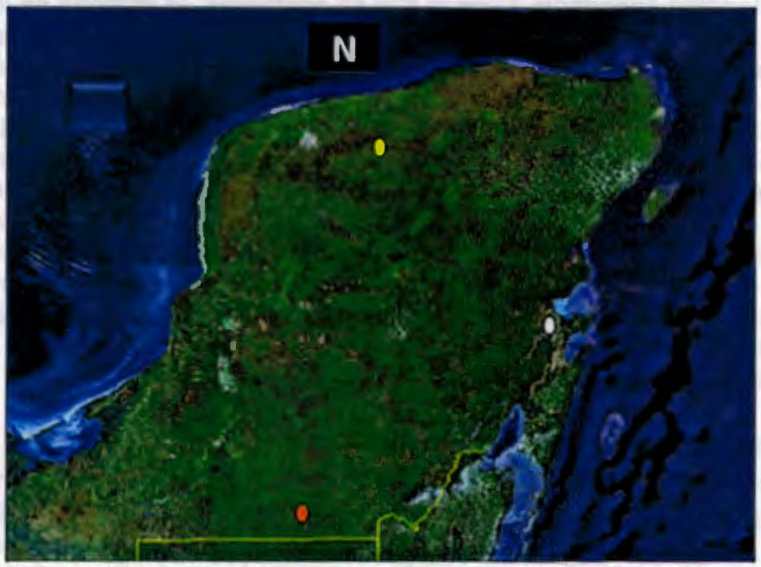
Sitio de estudio

La península de Yucatán está localizada en el Este de México entre 16° 06' y 21° 37' latitud norte y 87° 32' y 90° 23' latitud oeste. Limita al este con el Mar Caribe, al oeste con el Golfo de México y al sur con Belice, Guatemala y el Estado de Tabasco. La Península, está conformada por los estados de Campeche, Quintana Roo y Yucatán. En general su conformación es la de una gran roca plana de origen sedimentario, comprendida por una superficie de 141 523 Km^2 y que se originó por la elevación de la placa continental, la cual estuvo sumergida durante el periodo terciario (parte Norte) y el cuaternario (parte Este).

La vegetación de la península está conformada por selva alta perennifolia, que se localiza en la zona sur; selva mediana subperennifolia que ocupa la mayor parte de la península y abarca gran parte de los estados de Campeche y Quintana Roo, selva mediana subcaducifolia que se distribuye en el oriente del estado de Yucatán y norte de Campeche, además de una pequeña parte de Quintana Roo (Duran *et al.*, 1999). La Selva baja caducifolia se establece en uno de los climas menos húmedos de la región y se distribuye en la parte norte y noroeste de la península. Por otro lado, la selva baja inundable es un tipo de vegetación característico de la península, ya que no se encuentra en ninguna otra región de México. La vegetación

está constituida por asociaciones vegetales llamadas tintales, pucteales y mucales (Olmsted y Duran 1986); otro tipo de vegetación lo constituyen los humedales como son los pastizales inundables y el manglar.
Una característica importante y con la que se relacionan la mayoría de los diferentes tipos de vegetación de la península es la marcada estacionalidad que se presenta en Yucatán, ya que se pueden distinguir tres estaciones, en las cuales las condiciones ambientales y la disponibilidad de agua varían considerablemente (Orellana 1999). Así, la estación de sequía se encuentra comprendida entre los meses de Marzo a Mayo y se caracteriza por una precipitación casi nula. En el caso de la estación de lluvias, esta se encuentra comprendida entre los meses de Junio-Octubre y por último una estación conocida como Nortes, a la cual también se le denomina estación de sequía temprana y que se presenta en los meses de Noviembre-Febrero. Esta última estación se caracteriza por la presencia de fuertes vientos (> 80 Km. h-), así como lluvias esporádicas (20-60 mm) y temperaturas bajas (< 20 °C); Herrera-Silveira 1995, Orellana 1999; Andrade 2003.)

Se colectaron muestras de hoja de distintas especies de *Clusia* en la península en los siguientes tipos de vegetación y localidades: Selva mediana subcaducifolia (20° 41′ 11" N y 88° 09′ 03" O) en Xocén, Yucatán, en una selva mediana sub-perennifolia (18° 30′ 18" N y 89° 29′ 12" O) en la zona arqueológica de Chicaná en Calakmul, Campeche y en la selva baja inundable muy cerca de Sian ka′an en el ejido el paraíso (19°26′ 12" N y 87° 33′ 11" O) en Felipe Carrillo Puerto (FCP), Quintana Roo.



Mapa 1. Localidades en la península de Yucatán donde se colectaron muestras de hojas (Xocén-amarillo, FCP- blanco y Chicaná- naranja).Escala 1:50,000.

Materiales y Métodos

Para la realización de este trabajo, se establecieron transectos de 100 m largo x 20 m de ancho en las localidades de Xocén y Felipe Carrillo Puerto, un transecto por cada localidad, mientras que en Chicaná se estableció un transecto de 150 m. x 20 m; (El tamaño de este transecto es diferente a los anteriores debido a la presencia de restos de ruinas arqueológicas, que limitaban la uniformidad del terreno). Dentro de los transectos de Xocén y Chicaná se marcaron 14 individuos (10 árboles y 4 hemiepífitas), mientras que en Felipe Carrillo Puerto se marcaron 10 árboles, debido a la ausencia de alguna otra forma de vida en esta localidad. Se colectaron de esta muestra 10 hojas maduras (expuestas al sol y bajo la sombra) de las especies y formas de vida presentes en cada localidad.

Las colectas se realizaron de acuerdo a la estación del año; así para la estación de lluvias las hojas fueron colectadas del 16-18 Agosto 2004 en Chicaná y Felipe Carillo Puerto (FCP) y 3-4 Septiembre 2004 en Xocén. Para la estación de nortes se colectó en Felipe Carrillo Puerto los días 14-15 Diciembre de 2004. En el caso de las localidades de Chicaná, Campeche y Xocén en Valladolid se colectaron hojas en el mes de febrero de 2005 Las muestras colectadas fueron llevadas al Laboratorio de Fisiología ambiental de plantas de la Unidad de Recursos Naturales del CICY, para obtener su peso fresco, estimar el área foliar (con un medidor de área foliar Li-cor 3100) y llevar acabo el secado de las muestras a 65 °C x 48 hrs. Estos datos nos sirven para estimar la suculencia del tejido (gH_2O/m^{-2}) donde suculencia = área foliar / peso fresco y área foliar específica (área foliar/ peso seco).

Determinación de pigmentos y ácidos orgánicos

Las muestras utilizadas en estos pasos fueron colectadas al final del periodo de luz y al inicio de este, para mantenerlas a -196°C en nitrógeno líquido hasta su procesamiento en laboratorio. El valor mostrado de ácidos orgánicos es la diferencia (Δ) entre los valores obtenidos por la mañana y al atardecer.

1. Cuantificación de clorofila

Para la cuantificación de clorofila *a* y *b* se utilizaron discos de hoja de aproximadamente 1.3 cm^2 Se maceró el tejido en un mortero con acetona al 80% y se centrifugó durante 5 minutos a 4 °C, posteriormente se tomó el sobrenadante de la muestra y se determinó la absorbancia a 646 y 663 nm para posteriormente calcular el contenido de clorofila a, b y total de acuerdo a la ecuación propuesta por Wellburn 1994:

Clorofila a = $12.21\ A_{663} - 2.81\ A_{646}$

Clorofila b = $20.13\ A_{646} - 5.03\ A_{663}$

Clorofila total = Clorofila $_a$ + Clorofila $_b$

2. Determinación de ácidos orgánicos

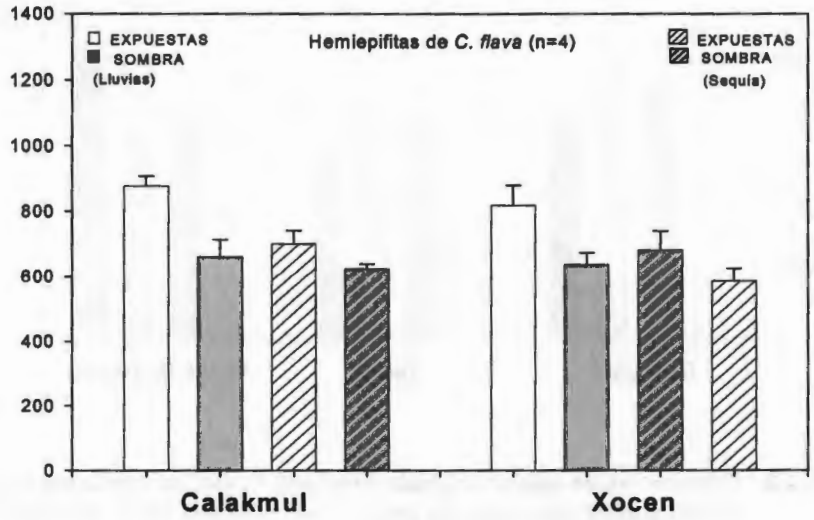
Para la cuantificación de ácidos orgánicos se tomaron 10 muestras al final del período de luz y a inicios de este, para cada especie en las distintas localidades y temporadas del año. Las estimaciones de acidez total

titulable se realizaron en discos de hoja de 1.3 cm^2, como sigue: se maceró el tejido en un mortero de porcelana con 10 ml de agua destilada, posteriormente se aforó el contenido a 50 ml y se dejó hervir por 5 minutos, se retiró, dejando enfriar y aforando nuevamente hasta 50 ml, para posteriormente titular con NaOH .01 N hasta un pH de 8.4 (Lüttge 1988). La cuantificación de ácido málico (Möllering 1985) y cítrico (Hohorst 1965). Ambos casos realizados mediante actividad enzimática, con pequeñas modificaciones: En el caso de ácido málico se homogenizo la muestra en 1 ml. solución tampón (0.6 M glicilglicina, 0.1 Glutamato, pH 10.0), 3.46 mM NAD y 1.5 x 10^3 UL^{-1} de glutamato oxalaocetato transaminasa. Al estabilizar las lecturas espectrofotométricas, la reacción se inicia con la adición de 2.2 x 10^4 L^{-1} de malato deshidrogenasa, registrando los cambios que son directamente proporcionales a la concentración de malato en la muestra. Para citrato: La muestra se homogenizo con un 1 ml. de solución tampón (0.5 M Glicilglicina pH 7.8; 0.6 mM Zn^{+2}) 0.2 mM NADH y una solución y una solución compuesta por 3.8 x 10^3 U L^{-1} de malato deshidrogenasa y 8.8 x 10^3 U L^{-1} de Lactato deshidrogenasa. Una vez estabilizadas las lecturas (340 nm) se adiciona 2.7 x 10^2 U L^{-1} de citrato liasa registrando los cambios del NADH que son directamente proporcionales a la cantidad de citrato. Para el análisis de los resultados se utilizó un ANOVA medidas repetidas, en el programa STATISTICA 7.0, comparando entre factores como son: exposición de la hoja (expuestas vs sombra), entre estaciones (lluvias vs sequía) y entre localidades (Calakmul, Xocen y FCP) para *C. flava*, así como exposición (expuestas vs sombra), estaciones (lluvia vs sequía) y entre especies (para la localidad de FCP). Tomando en cuneta para ello que las variables dependientes cumplieran con los supuestos de homogeneidad de varianza, además se evaluaron las interacciones entre los factores.

RESULTADOS

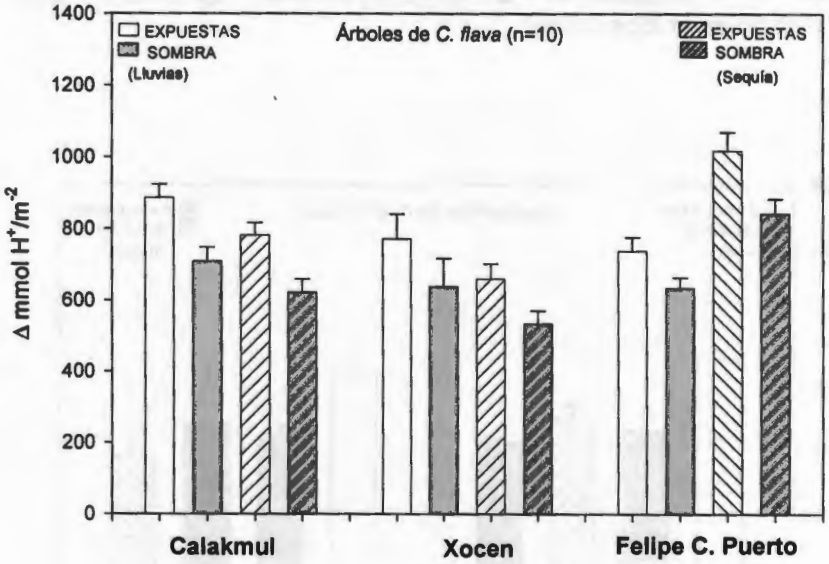
Clusia flava presentó una mayor cantidad de ácidos totales titulables (delta +H), que en cualquier otra especie con fotosíntesis CAM. Tal como se muestra en la gráfica 1, se tienen valores delta de alrededor de 600 mmol m^{-2} (sequía) a 750 mmol de protones (lluvias) en hojas de sombra y de 800 (sequía) a 900 mmol m^{-2} (lluvias) en hojas expuestas para árboles de *Clusia flava* localizados en una comunidad de selva mediana subperennifolia; y cercanos a los 1000 mmol/m^{-2} en hojas expuestas para la selva baja inundable (FCP). Se encontraron diferencias significativas en la concentración de delta de protones entre hojas expuestas (mayor concentración) y de sombra, así como entre localidades, con una mayor

producción en la localidad de FCP (ANOVA medidas repetidas P< 0.05; Tuckey P<0.05 en ambos casos).



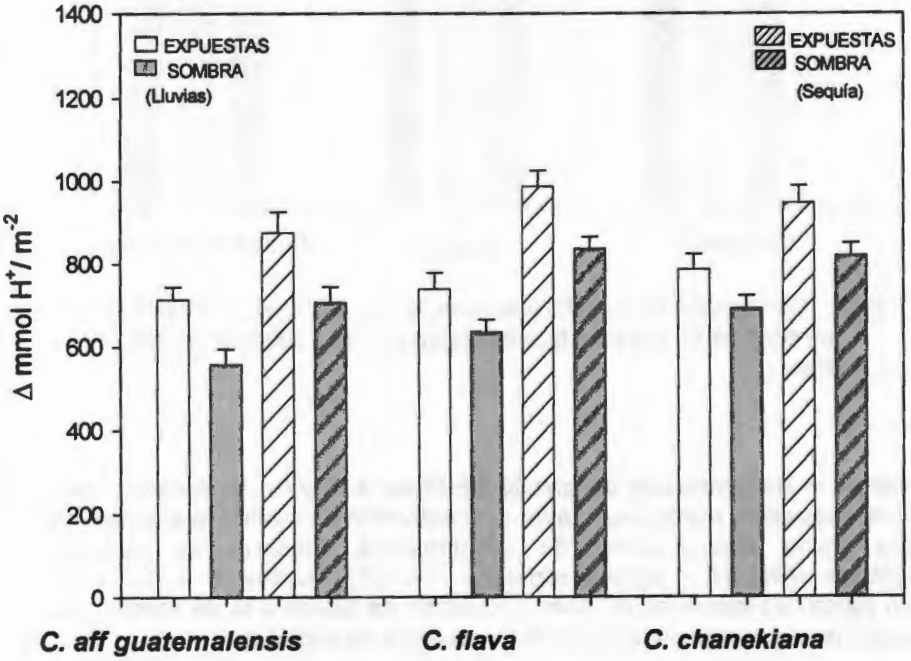
Grafica 1. Diferencias de acidez titulable (mañana-tarde) en hojas expuestas y bajo sombra de árboles de *C. flava* en tres localidades y dos estaciones del año.

En el gráfico 2, se observa que el valor de delta protones se encuentra alrededor de los 900 mmol m^{-2} en hojas expuestas para individuos hemiepífitos, durante la temporada de lluvias y bajo esta misma condición (exposición de luz) en sequía se encuentra entre los 600 y 700 mmol m^{-2} lo que indica una menor asimilación de carbono en esta última temporada ANOVA medidas repetidas P< 0.05; Tuckey P<0.05.

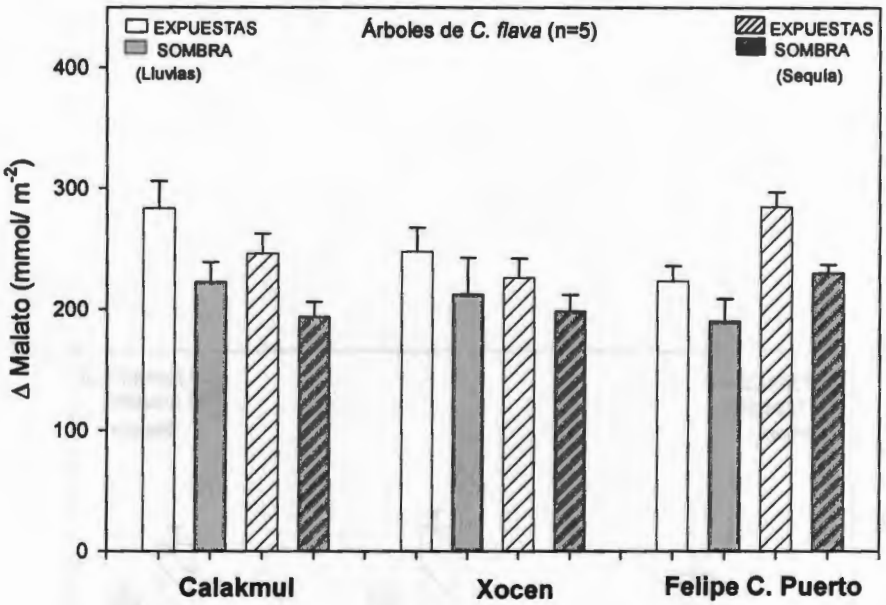


Grafica 2. Diferencias de acidez titulable (mañana-tarde) en hojas expuestas y bajo sombra de hojas de plantas hemiepífitas de *C. flava* en dos localidades y dos estaciones del año.

El gráfico 3 muestra los valores de acidez total (delta) en una localidad (FCP) para tres especies; donde los valores que se obtuvieron variaron entre los 700-900 mmol/m^{-2} y fueron mayores en hojas expuestas para las tres especies; además, la cantidad de ácidos fijados fue mayor en la temporada de sequía (ANOVA medidas repetidas $P< 0.05$; Tuckey $P<0.05$ en ambos casos).

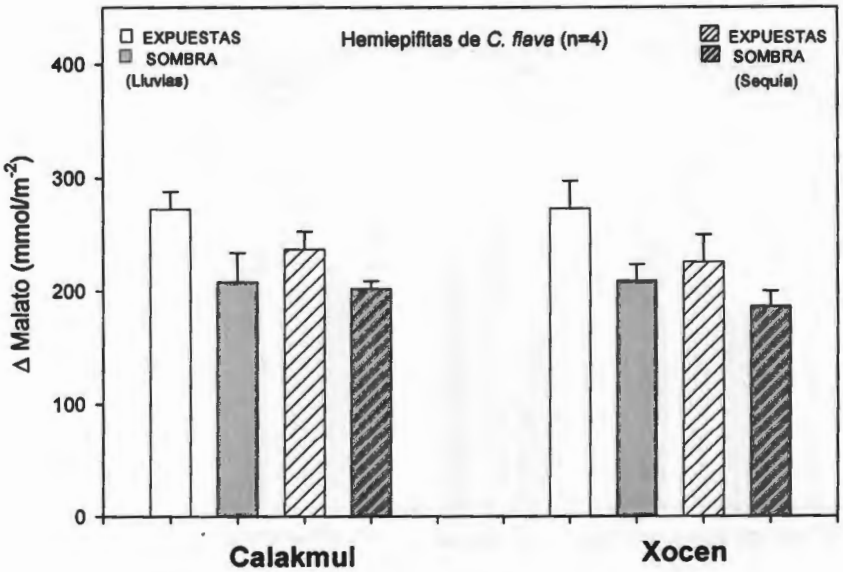


Grafica 3. Diferencias de acidez titulable (mañana-tarde) en hojas expuestas y bajo sombra de hojas de tres especies en FCP.

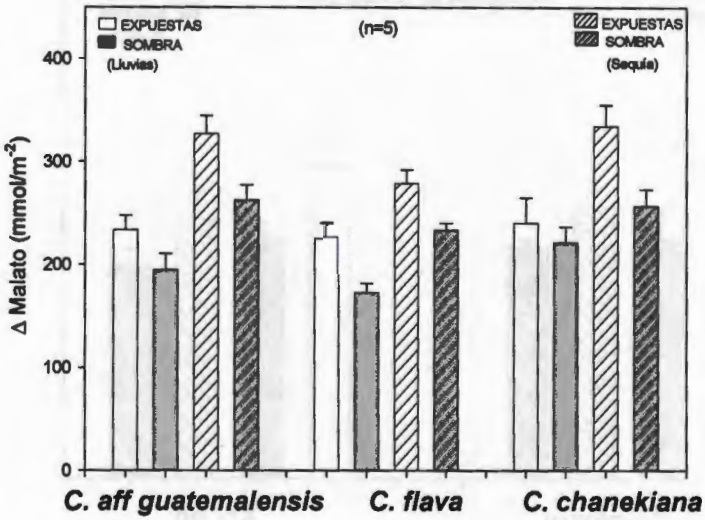


Grafica 4. Diferencias de malato (mañana-tarde) en hojas expuestas y sombra de *C. flava* en tres localidades y dos estaciones del año.

Al analizar la concentración de malato (Gráficas 4, 5 y 6), se encontró que en hojas expuestas existe una mayor concentración de malato que en las de sombra como consecuencia de la ganancia nocturna de carbono atmosférico (ANOVA medidas repetidas $P<0.05$; Tuckey $P<0.05$). Este mismo patrón se mantiene durante la estación de lluvias y la de sequía, sin embargo, no hubo diferencias significativas entre localidades.

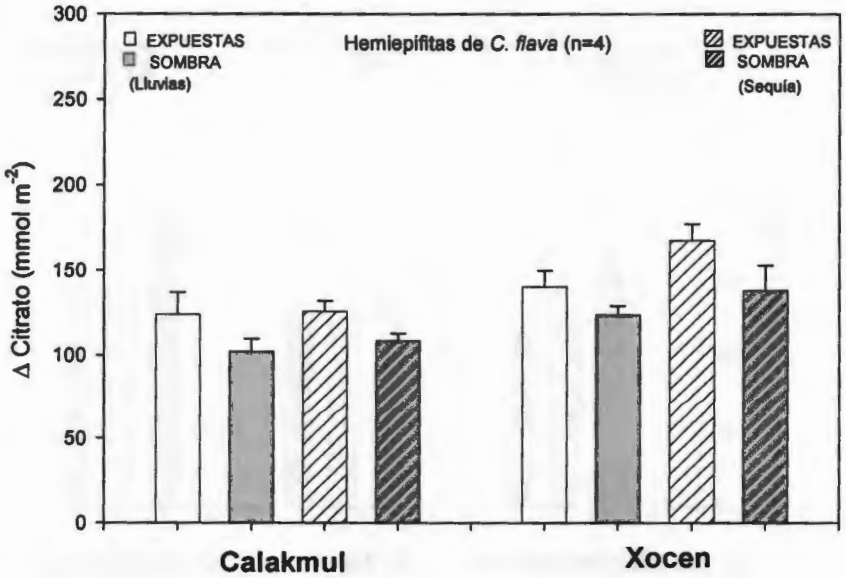


Grafica 5. Diferencias de malato (mañana-tarde) en hojas expuestas y sombra de plantas hemiepífitas de *C. flava* en dos localidades y dos estaciones del año.



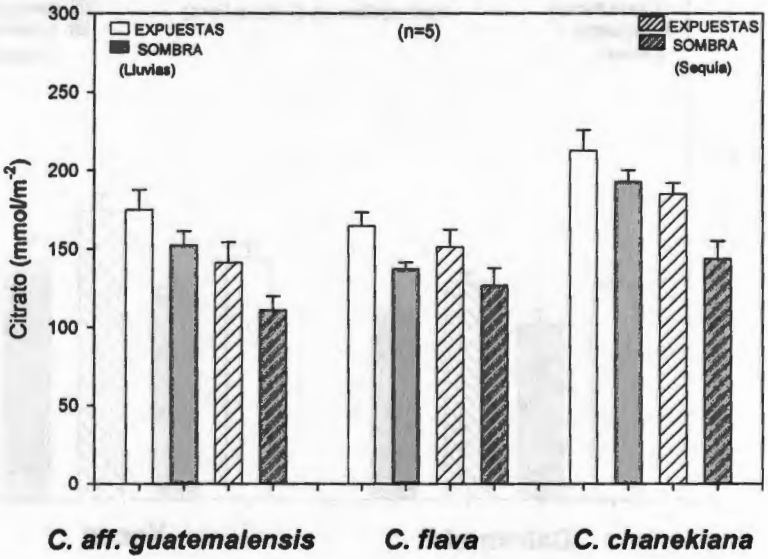
Grafica 6. Diferencias de malato (mañana-tarde) en hojas expuestas y sombra de *C. flava* en tres especies en FCP.

En el gráfico 7 se presentan valores de delta citrato y se muestra que las hojas de sombra en la localidad de Calakmul tienen valores alrededor de 100 (lluvias) y 140 mmol m^{-2} (sequía), mientras las expuestas tienen deltas de 130 (lluvias) a 160 mmol m^{-2} (sequía). La cantidad de citrato fue mayor en hojas expuestas y en la temporada de sequía (ANOVA medidas repetidas $P<0.05$; Tuckey $P<0.05$).

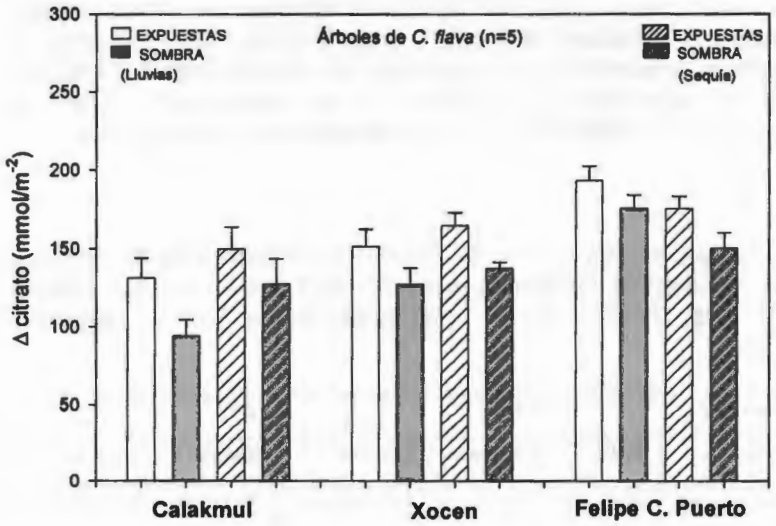


Grafica 7. Diferencias de citrato (mañana-tarde) en hojas expuestas y sombra de árboles de *C. flava* en tres localidades y dos estaciones del año.

En la gráfica 8 las hemiepífitas de Calakmul presentaron valores alrededor de 100 (lluvias) y 120 mmol m^{-2} (sequía) en hojas de sombra, mientras que las expuestas mostraron valores cercanos a 130 mmol m^{-2}, tanto en lluvias como en sequía. El delta de citrato fue significativamente diferente entre las hojas expuestas (mayor) y de sombra, así como entre localidades (mayor en Xocén) (ANOVA medidas repetidas $P<0.05$; Tuckey $P<0.05$ en ambos casos). La gráfica 9 muestra los valores obtenidos de delta citrato en FCP en *C. guatemalensis. C. flava* y *C. chanekiana*. Al igual que con el malato, hubo diferencias significativas entre hojas expuestas (más citrato) *versus* de sombra y entre estaciones, siendo mayor concentración de citrato en la estación de sequía (ANOVA medidas repetidas $P<0.05$; Tuckey $P<0.05$ en ambos casos)



Grafica 8. Diferencias de citrato (mañana-tarde) en hojas expuestas y sombra de plantas hemiepífitas de *C. flava* en dos localidades y dos estaciones del año.



Grafica 9. Diferencias de citrato (mañana-tarde) en hojas expuestas y de sombra de tres especies de *Clusia* para dos estaciones del año en Felipe Carrillo Puerto.

Por último, las variables morfológicas como el área foliar específica, la suculencia y la clorofila total (Tabla 1a y 1b) muestran que existe una relación entre estas variables y la expresión de la fotosíntesis CAM. Por ejemplo, en C. flava para las tres localidades de la península el área foliar específica, la suculencia y las clorofila son mayores en hojas expuestas que en hojas de sombra (ANOVA medidas repetidas $P<0.05$; Tuckey $P<0.05$), pero sin que se observaran diferencias significativas en estas variables para las tres localidades. Al comparar entre estaciones (disponibilidad de agua), estas variable son significativamente mayores en la estación de lluvias que en la de sequía (ANOVA medidas repetidas $P<0.05$; Tuckey $P<0.05$). El mismo fenómeno sucede al comparar individuos con forma de vida hemiepifita (Tabla 2a, 2b), en los que las hojas expuestas presentan una mayor área foliar especifica, suculencia y clorofila que las de sombra (ANOVA medidas repetidas $P<0.05$; Tuckey $P<0.05$).

Al comparar especies en una localidad, se pudo observar el mismo patrón: el área foliar especifica y la suculencia fueron mayores en hojas expuestas (ANOVA medidas repetidas P<0.05; Tuckey P<0.05). Sin embargo, las hojas en sombra presentaron una cantidad de clorofila significativamente mayor que las expuestas. Por último, no se observaron diferencias significativas entre las estaciones, ni entre las especies (Tabla 3 y 3b)

Tabla 1a. Valores (media ± e.e) de diferentes varibles foliares de *Clusia flava*en tres localidades durante la estación de Lluvias. ANOVA medidas repetidas P<0.05; Tuckey P<0.05 (diferentes letras indican diferencias significativas)

	Calakmul		**Xocen**		**FCP**	
Parámetros foliares	Expuestas	Sombra	Expuestas	Sombra	Expuestas	Sombra
Área Foliar especifica (cm^{-2}/g^{-1})	^{a}72.80±1.57	^{b}60.50±1.88	^{b}62.20±3.96	^{c}47.81±1.49	^{c}55.13±2.56	^{c}48.31±1.30
Suculencia (g H_2O/m^{-2})	^{a}921.21±26.35	^{b}831.35±11.74	^{b}867.78±26.27	^{c}758.27±53.30	^{c}790.58±34.94	^{c}720.41±32.84
Clorofila total (mg/m^{-2})	^{a}549.22±29.73	^{a}597.54±36.02	^{b}494.58±32.30	^{a}603.89±35.19	^{c}349.29±30.62	^{b}455.58±24.47

Tabla 1b. Valores (media ± e.e) de *Clusia flava* en tres localidades durante la estación de sequía. ANOVA medidas repetidas P<0.05; Tuckey P<0.05(diferentes letras indican diferencias significativas)

	Calakmul		**Xocen**		**FCP**	
Parámetros foliares	Expuestas	Sombra	Expuestas	Sombra	Expuestas	Sombra
Área Foliar especifica (cm^{-2}/g^{-1})	^{b}58.43±2.97	^{c}46.07±1.67	^{b}53.57±3.36	^{b}51.85±1.91	^{a}69.25±2.07	^{a}61.79±2.02
Suculencia (g H_2O/m^{-2})	^{b}759.94±26.14	^{c}682.90±33.65	^{b}764.97±26.37	^{c}696.51±33.44	^{a}875.27±51.20	^{b}751.01±53.40
Clorofila total (mg/m^{-2})	^{c}472.81±40.73	^{a}554.88±18.45	^{c}432.92±22.35	^{b}499.88±23.83	^{c}444.21±24.40	^{b}500.63±34.27

Tabla 2a. Valores (media ± errorestándar) de *C. flava* hemiepifita en tres localidades, durante lluvias. (Diferentes letras indican diferencias significativas) ANOVA medidas repetidas P<0.05; Tuckey P<0.05

	Calakmul		Xocen	
Parámetros foliares	Expuestas	Sombra	Expuestas	Sombra
Área Foliar específica (cm^{-2}/g^{-1})	^{a}89.10± 9.58	^{a}79.36± 2.44	^{a}83.95± 3.11	^{a}75.45± 5.14
Suculencia ($g\ H_2O/m^{-2}$)	^{a}950.20± 86.36	^{b}811.45± 105.90	^{a}976.11± 82.92	^{b}804.01± 43.87
Clorofila total (mg/m^{-2})	^{a}545.92± 21.19	^{a}591.29± 48.63	^{b}424.09± 31.19	^{b}485.13± 44.24

Tabla 2b. Valores (media± e.e) de *C. flava* hemiepifita en tres localidades durante la estación de sequía. (diferentes letras indican diferencias significativas) ANOVA medidas repetidas P<0.05; Tuckey P<0.05

	Calakmul		Xocen	
Parámetros foliares	Expuestas	Sombra	Expuestas	Sombra
Área Foliar específica (cm^{-2}/g^{-1})	^{a}79.63 ± 6.17	^{b}59.16 ± 5.77	^{a}70.94 ±5.04	^{b}67.22 ± 4.63
Suculencia ($g\ H_2O/m^{-2}$)	^{a}848.75 ±63.05	^{b}782.03 ± 60.69	^{a}855.81 ± 123.90	^{b}754.01 ± 43.87
Clorofila (mg/m^{-2})	^{b}407.24 ± 50.04	^{a}467.99 ± 31.59	^{b}391.65 ± 46.93	^{a}441.78 ± 57.77

Tabla 3a. Valores (media ± e.e) de tres especies de *Clusia* en FCP durante la temporada de Lluvias. (Diferentes letras indican diferencias significativas). ANOVA medidas repetidas P<0.05; Tuckey P<0.05

	Clusia flava		*C. aff guatemalensis*		*C. chanekiana*	
Parámetros foliares	Expuestas	Sombra	Expuestas	Sombra	Expuestas	Sombra
Área Foliar específica (cm^{-2}/g^{-1})	^{a}64.87± 2.30	^{b}53.05±2.98	^{a}69.25±2.07	^{b}61.80±2.02	a55.13±2.56	^{b}48.31±1.30
Suculencia (g H_2O/m^{-2})	^{a}875.27±51.19	^{b}751.01±53.40	^{a}975.89±43.73	^{b}796.78±23.91	^{a}992.25±25.63	^{b}845.51±59.83
Clorofila (mg/m^{-2})	^{b}444.21±24.41	^{a}500.63±34.27	^{b}472.06±23.00	^{a}545.48±19.19	^{b}486.38±35.50	^{a}547.98±22.64

Tabla 3b. Valores (media ± e.e) de tres especies de *Clusia* en FCP durante la temporada de sequía. (Diferentes letras indican diferencias significativas).

	Clusia flava		*C. aff. guatemalensis*		*C. chanekiana*	
Parámetros foliares	Expuestas	Sombra	Expuestas	Sombra	Expuestas	Sombra
Área Foliar específica (cm^{-2}/g^{-1})	^{a}81.33± 2.29	^{b}70.89±1.70	^{a}78.08±1.96	^{b}68.02±2.53	^{a}83.48±1.46	^{a}78.92±1.68
Suculencia (g H_2O/m^{-2})	^{a}890.58±34.94	^{b}720.41±32.83	^{a}839.27±35.27	^{b}730.35±33.44	^{a}841.83±16.50	^{b}717.48±48.68
Clorofila (mg/m^{-2})	^{b}349.29±30.62	^{a}455.58±24.46	^{b}409.99±23.74	^{a}491.88±24.91	^{b}395.51±20.12	^{a}446.08±25.65

Discusión

Las tres especies estudiadas en este apartado, presentan una alta acumulación de ácidos orgánicos, los cuales provienen del CO_2 ganado durante nocturnota noche por las hojas de estas plantas. Esta ganancia de carbono durante la noche, es común en especies que presentan metabolismo ácido de las crasuláceas, por lo tanto, estos resultados nos llevan a deducir que *C. flava* realiza fotosíntesis CAM en las dos estaciones del año y en las tres localidades donde fue evaluada. Estos valores de acidez titulable se consideran bastante altos para una especie con

metabolismo ácido de las crasuláceas, pero, para el género *Clusia* no es una situación desconocida, ya que se han reportado valores que llegan al orden de 900 y 1230 Δ mmol H^+/m^{-2} , como es el caso de *C. hilariana* (Franco *et al.* 1999). Además las especies que presentan valores delta por arriba de los 500 mmol H^+/m^{-2}, son consideradas las especies CAM más fuertes conocidas en la actualidad y de las cuales sus valores de $\delta^{13}C$ prácticamente no cambian y se encuentran en el orden de los - 13 y - 16 como es el caso de *C. flava* (Holtum *et al.* 2004).

De esta manera, *C. flava* está realizando fotosíntesis CAM para las temporadas de lluvias y sequía en estas localidades, sin embargo, su expresión de CAM parece ser diferente, ya que en una localidad de selva baja inundable (en en FCP) la ganancia de CO_2 nocturno (ácido total titulable) en hojas de árboles (expuestas y en sombra), es significativamente mayor que en una selva mediana subcaducifolia (en Xocén).

La misma situación, se observa en su forma de vida hemiepífita, donde la ganancia de carbono es significativamente mayor que en los individuos arbóreos en las localidades de Chicaná y Xocén. De esta manera la presencia de agua en el ambiente, favorece una mayor fijación nocturna de CO_2 y a su vez permite una mayor concentración de ácidos orgánicos (Franco *et al.* 1999; Winter *et al.* 1990).

De esta forma las hojas expuestas están sintetizando más citrato, que a lo largo de la vida de la hoja le servra para contrarrestar el exceso de luz y así garantizar un buen trabajo del fotosistema II evitando efectos de fotoinhibición (Franco *et al.* 1990 y 1996), aunque todavía se desconoce mucho sobre el papel de este ácido dentro del género. Además, la relación ácido málico-cítrico es uno de los componentes integrales y de mayor relevancia en estas respuestas bajo condiciones naturales, ya que el aumento en el CO_2 fijado durante el periodo nocturno puede deberse al ácido cítrico, más que al ácido málico y esto como respuesta a las excesivas cantidades de radiación a las que estuvieron expuestas.

Cabe destacar que durante la última colecta de sequía se obtuvieron precipitaciones durante los dos días de muestreo, lo cual pudo permitirle a las plantas obtener una mayor ganancia de CO_2 que en la temporada anterior (lluvias). Por tanto, estas especies están presentando fluctuaciones muy grandes en su acidez diurna, la cual, paradójicamente, fue mayor durante la temporada de sequía. Según datos de Díaz *et al.* 1996 y Holtum

et al. 2004, la ocurrencia de CAM en especies del género *Clusia* es más probable en altitudes menores de los 1500 m, además, la mayor diversidad de CAM (entre las que se encuentran CAM, idling, CAM cycling, CAM debil y CAM fuerte) en este género, se encuentra entre las especies de Centroamérica y de zonas bajas donde la disponibilidad de agua ha sido importante para la colonización de nuevos hábitats (Gehrig *et al.* 2003).

La mayor ganancia de carbono en estas tres especies se da en las hojas expuestas y durante la estación donde existe mayor disponibilidad de agua (contradictoriamente en este estudio, durante la estación de sequía).. De esta manera las grandes oscilaciones en las cantidades de ácidos orgánicos para las especies de *Clusia* pueden servir para aminorar efectos de estrés debidos a alta exposición a la luz y en ciertos casos por diferentes grados de estrés hídrico (franco *et al.* 1992; Borland *et al.* 1992).

Una de las estrategias morfológicas y fisiológicas de las plantas CAM para evitar la excesiva perdida de agua es la suculencia, ya que la acumulación de grandes volúmenes de agua en las células y la presencia de vacuolas de gran tamaño son esenciales para la acumulación del ácido málico y otros ácidos orgánicos producidos durante la noche (Fitter & Hay 2002). Las plantas del género *Clusia* pueden almacenar una gran cantidad de agua en sus hojas, lo que a su vez permite el almacenamiento de ácidos málico y cítrico en sus vacuolas, reduciendo el volumen de los espacios internos de aire y permitiendo mayor capacidad CAM en especies como *C. rosea* y *C. aripoensis* (Borland *et al.* 1998).

En este trabajo, la suculencia de *C. flava* alcanzó valores de entre 750 y 900 gH_2O/m^2 (Tabla 1a y 1b) y lo que se observa es que las hojas expuestas tienen mayor suculencia que las hojas de sombra, lo cual se relaciona con la alta concentración de ácidos orgánicos en estas especies (Borland *et al.* 1998). Además, la suculencia puede ser un mecanismo importante para poder regular la temperatura de las hojas, debido a que una alta concentración de agua puede permitir el paso de las radiaciones infrarrojas o disiparlas evitando un sobrecalentamiento de la lámina de la hoja, y con ello, la muerte celular. Además de las diferencias entre hojas expuestas y de sombra, encontramos diferencias significativas en la suculencia entre las estaciones, ya que en la época de lluvias las hojas tienen mayor suculencia (esto se debe principalmente a que las hojas tienen mayor cantidad de agua almacenada debido a la presencia de

lluvias), pero no se observaron diferencias en la suculencia entre las tres localidades.

En este rubro hay que mencionar que las plantas hemiepífitas (tabla 2a y 2b) de *Clusia flava* tienen valores altos de suculencia, con respecto a otras especies de *Clusia* como son: *C. rosea*, *C. criuva* y *C. hilariana* (Liebig et al., 2001 y Herzog et al., 1998), lo cual es de suma importancia, por tanto, *C. flava* sería una de las especies más importantes en la acumulación de ácidos orgánicos.

Con respecto a la suculencia de *C. guatemalensis*, *C. flava* y *C. chanekiana* en la localidad de FCP no se obtuvieron diferencias significativas entre especies, pero si entre las estaciones ya que las hojas presentan mayor cantidad de agua en la estación de sequía que en la de lluvias y este aumento en suculencia se asocia con la presencia de lluvias durante los días de colecta. También hay diferencias entre hojas expuestas (mayor suculencia) y de sombra (menor suculencia); además del agua proporcionada por las lluvias, este comportamiento puede estar muy relacionado con las diferencias observadas en su producción de ácidos orgánicos, ya que a mayor disponibilidad de agua, mayor capacidad en la fijación de CO_2 nocturno. Cabe destacar que los valores de suculencia son muy parecidos a los reportados para especies que presentan un CAM fuerte como *C. rosea* y *C. uvitana* (Lee et al. 1989; Borland *et al.* 1998; Winter *et al.* 1992).

En el caso del área foliar específica (tabla 1a y 1b)para *C. flava* se presentaron diferencias significativas entre las localidades de Calakmul, Xocén y Felipe Carrillo Puerto y los árboles que tienen una mayor área foliar específica son los que pertenecen a la primer localidad (Selva mediana sub-perennifolia de Chicaná,), lo cual sugiere que *C. flava* en este lugar tiene una mayor tasa relativa de crecimiento con respecto a los árboles de su especie en otras localidades (Selva mediana sub-caducifolia y selva baja inundable).

Por otro lado, las estaciones (lluvias y sequía) son una variable que está determinando diferencias en el área foliar específica de *C. flava* en estas localidades, de igual forma existen diferencias significativas en el área de hojas expuestas (mayor AFE) con respecto a las hojas en sombra. Lo que nos confirma que las hojas expuestas están creciendo más que las de sombra y, dado que las hojas expuestas tienen más ácidos orgánicos

acumulados, se puede inferir que tienen más carbono disponible para invertir en crecimiento, como consecuencia de la disponibilidad de agua.

De igual forma que en los árboles, el área foliar específica de los individuos hemiepífitos de *C. flava* presentan diferencias significativas respecto a la estacionalidad, por tanto, existe un mayor crecimiento (AFE) en la época de lluvias, especialmente en las hojas expuestas, las cuales tienen una mayor AFE que las de sombra. Sin embargo, el área foliar específica en esta especies varió entre localidades (tabla 2a y 2b). Por último, al comparar el área foliar específica entre los árboles y las hemiepífitas, se observó que las hemiepífitas tienen valores superiores a los que presentan los árboles. Esta situación ya ha sido reportada ampliamente en algunos árboles estranguladores como los Ficus, sin embargo, se tiene poca información al respecto para *Clusia.* Por ejemplo, *C. minor* en su forma de vida hemiepífta presenta un AFE mayor que árboles de su misma especie, lo cual podría permitirle alcanzar una mayor tasa relativa de crecimiento (Holbrook y Putz 1996). Sin embargo, este parámetro puede estar regulado por el tipo de fotosíntesis, así las especies hemiepífitas intermedias (C_3/CAM) pueden tener un AFE mayor que las hemiepífitas CAM obligadas, por lo que, este parámetro puede estar restringido más al tipo de fotosíntesis que a las diferencias anatómicas y estructurales en las hojas. Por tanto, se puede decir que hasta el momento estas especies de *Clusia* tienen una mayor AFE en presencia de agua, que además coincide con las mayores cantidades de ácidos orgánicos (reflejo de la asimilación del CO_2) y suculencia, lo que les garantiza una buena oportunidad para su crecimiento.

Por último, la concentración de clorofila en hojas expuestas y de sombra para *C. flava* en las tres localidades se encuentra en un intervalo de ≈400-550 mg/m^2 (tabla 1a) en ambas estaciones del año. Lo que nos indica que no hay diferencias significativas entre las localidades, pero si en las estaciones del año, ya que hay mayor cantidad de clorofila durante la temporada de lluvias y de manera particular en las hojas de sombra (significativamente diferentes a las expuestas). Los valores encontrados en este estudio son muy similares a los reportados en otros estudios con especies de *Clusia* (Winter *et al.,* 1990; Grams *et al.*, 1997; Liebig et al., 2001 y Olivares 1997); la mayor concentración de clorofila se da con la llegada de las lluvias y esto puede ayudar a tener una mayor capacidad para la obtención de fotones durante el periodo diurno, y podría garantizar el buen funcionamiento del aparato fotosintético. Al realizar la comparación de las tres especies en la localidad de Felipe Carrillo Puerto (tabla 3a y 3b) no se obtuvieron diferencias significativas en la concentración de clorofila total,

tampoco se observaron diferencias en la estacionalidad y solo se observaron diferencias entre hojas expuestas y de sombra, situación similar a la encontrada anteriormente con *C. flava* en tres localidades distintas.

Con base en estos resultados se puede decir que *C. flava* es una especie con fotosíntesis CAM y que lo puede expresar en diferentes grados de acuerdo a la estación del año y a las condiciones ambientales del sitio donde crece. De igual manera, las especies *C.* aff. *guatemalensis* y *C. chanekiana* presentan fluctuaciones diarias de ácidos orgánicos titulables, por lo que también son consideradas como especies con fotosíntesis CAM. Además las hojas expuestas son las que presentan mayor suculencia, mayor concentración de ácidos orgánicos y mayor área foliar lo que sugiere un mayor crecimiento en este tipo de hojas y esto podría traducirse en un mayor crecimiento de todo el individuo. Por tanto, estos resultados proporcionan el primer reporte sobre especies de este género en la Península y su relación a nivel de fotosíntesis con el medio ambiente, además de contar con una de las especies (*C. flava*) que produce la mayor cantidad de acidez tisular reportada hasta el momento.

Referencias:

Andrade, J.L. 2003. Dew deposition on epiphytic bromeliad leaves: an important event in a Mexican tropical dry deciduous forest. Journal of Tropical Ecology 19: 479-488.

Borland A.M., Griffiths H., Maxwell, C., Broadmeadow M.S.J., Griffiths N.M, Barnes J.D. 1992. On the ecophysiology of the Clusiaceae in Trinidad : Expression of CAM in *Clusia* minor L. during the transition from the wet to dry season and characterization of three endemic species. New Phytologist. 349-357.

Borland A.M. Laszlo I.T., Leegood R.C. y Walker R.P. 1998. Inducibility of Crassulacean acid metabolism (CAM) in *Clusia* species; physiological/biochemical characterization and intercellular localization of carboxylation and descarboxylation process in three species which exhibit different degrees of CAM. Planta 205:342-351.

Diaz M., Haag-Kerwer A., Wingfield R., Ball E., Olivares E., Grams T.E.E., Ziegler H. y Lüttge U. 1996. Relationships between carbon and hydrogen isotope ratios and nitrogen levels in leaves of *Clusia* species and two other Clusiaceae genera at various sites and different altitudes in Venezuela. Trees 10:351-358.

Duran G.F. González-Iturbe A. J. A. Granados C. J., Olmsted I., Tun Z.F. 1999. Atlas de Procesos territoriales de Yucatan. Universidad Autónoma de Yucatan. Facultad de Arquitectura.

Franco A.C., Ball E. y Lüttge U. 1990. Patterns of gas exchange and organic acid oscillations in tropical trees of the genus *Clusia*. Oecologia 85:108-114.

Franco A.C. Ball E., y Lüttge U. 1991. the influence of nitrogen, Light and water stress on CO_2 exchange and organic acid accumulation in the tropical C_3-CAM tree, *Clusia minor*. Journal of Experimental Botany. 42:597-603.

Franco A.C., Olivares E., Ball E., Lüttge U y Haag-Kerwer A. 1994. in situ studies of Crassulacean acid metabolism in several sympatric species of tropical trees of genus *Clusia*. New Phytologist 126:203-211.

Franco A.C. Haag-Kerwer, Herzog B., Grams T.E.E., Ball E., De mattos E. Scarano F., Barreto S., Garcia M. Montavi A. y Lüttge U. 1999. The effect of light levels on daily patterns of chlorophyll fluorescence and organic acid accumulation in the tropical CAM tree *Clusia hilariana*. Trees 10:359-365.

Fitter, A.H. y Hay. R.K.M. Environmental Physiology of Plants. 3ª ed. Academic Press. San Diego, 2002.

Grams T.E.E., Haag-Kerwer A., Olivares E., Ball E. Arndt S., Popp M., Medina E. y Lüttge U. 1997. Comparative measurements of chlorophyll a fluorescence, acid accumulation and gas exchange in exposed and shaded plants of *Clusia minor* L. and *C multiflora* H.B.K. in the field. Trees 11:240-247.

Grams T. E. E., Herzog B. y Lüttge U. 1998. Are the species in the genus *Clusia* with obligate C_3- photosynthesis? J. of Plant physiology. 152:1-9.

Hohorst H.J. 1965. L-Malate: determination with malic acid dehydrogenase and DPN. *In* HU Bergmeyer, ed, Methods of Enzymatic Analysis. Academic Press, London, pp 328-332

Holtum J.A. Aranda J., Virgo A., Gehrig H.H. y Winter K. 2004. $\delta^{13}C$ values and Crassulacean acid metabolism in *Clusia* species from Panama. Trees 18:658-668.

Lambers H, Chapin III FS, Pons TL. 1998. Plant Physiological Ecology. Springer-Verlag. New York.

Liebing M. Scarano F.R. de Mattos E.A. Zaluar H. L.T. y Lüttge U. 2001. Ecophysiological and floristic implications of sex expression in the dioecious Neotropical CAM tree *Clusia* hilariana Schltdl. Trees (2001) 15:278-288.

Lüttge U. 1988. Day-night changes of citric-acid levels in Crassulacean acid metabolism: phenomenon and ecological significance. Plant Cell Environment 11:445-451.

Lüttge U. 1999. One morphotype, three physiotypes: Sympatric species of *Clusia* with obligate C_3 photosynthesis, Obligate CAM and C_3-CAM intermediate behavior. Plant Biology 1:138-148.

Olivares E. 1997. Prolonged leaf senescence in *Clusia multiflora*. Trees 11:370-377.

Olmsted, I. y R. Durán. 1986. Aspectos ecológicos de la selva baja inundable de la reserva de Sian Ka'an, Quintana Roo, México. Biótica: 151-179.

Olmsted I., González_Iturbe, J.A., Duran R., Granados J., y Tun F. 1999. Vegetación. In: Garcia de fuentes A., Cordoba J., Y chico Ponce de León P. (eds.)Atlas de procesos territoriales de Yucatán. Universidad Autónoma de Yucatán. Mérida. pp: 184-194.

Orellana, R., Espadas C., y González-Iturbe J.A. 1999. Balance ombrotérmico. Evaluación climática. In: Garcia de fuentes A., Cordoba J., Y chico Ponce de León P. (eds.)Atlas de procesos territoriales de Yucatán. Universidad Autónoma de Yucatán. Mérida.

Pipoly. J.J., Kearns D. y Berry P.E. 1998. *Clusia*. In Flora of the Venezuelan Guayana. Vol. 4 Caesalpinaceae-Ericaceae (Berry, P. E., Holst, B.K. y Yatskievich, K, eds.). St. Louis Missouri: Missouri botanical garden Press. pp. 260-294.

Wellburn A. R. 1994. The Spectral Determination of Chlorophylls a and b, as Well as Total Carotenoids, Using Various Solvents with Spectrophotometers of Different Resolution. J. Plant. Physiology. 144: 307-313.

Winter K.; Lesch M y DIAZ m. 1990. Changes in xanthophylls-cycle components and in fluorescence yield in leaves of a Crassulacean-acid-metabolism plant. *Clusia rosea* Jacq., throughout a 12-hour photoperiod of constant irradiance.

Capítulo IV

Fijación y cambios estacionales de CO_2 en *Clusia flava*

INTRODUCCIÓN

Desde que se reportó por vez primera la presencia del metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM, siglas en ingles) en la hemiepifita Neotropical *Clusia lundelli* (Tinoco Ojanguren y Vásquez-Yanez 1983; Vásquez-Yanez C. 1995) el estudio comparativo entre especies del género ha tomado mucha relevancia; esto con el fin de conocer cuántas y qué especies pueden presentar este tipo de fotosíntesis, todo con la finalidad de relacionar la plasticidad fisiológica del género con su origen filogenético. Muchas especies poseen una enorme flexibilidad fisiológica en la expresión de su fotosíntesis como respuesta a los cambios en las condiciones ambientales, tal como muestran Zotz y Winter (1994) mediante un estudio anual con *Clusia uvitana,* en el que observan un cambio en la expresión de la fotosíntesis CAM a C3, de acuerdo a la estacionalidad. Algo parecido sucede con *C. minor* durante la estación de sequía en Venezuela y durante el cambio estacional lluvias-sequía en varias islas en Trinidad (Franco *et al.* 1994). Esta situación ha llevado a plantearse varias preguntas con el fin de conocer las ventajas que proporciona el cambio de una fotosíntesis a otra, o bien la capacidad de expresar distintos grados de CAM para prevalecer en un ambiente dado (Haag-Kerwer et al. 1996).

Cabe destacar que la plasticidad en las formas de fotosíntesis para las especies del género puede verse afectada por el estado de desarrollo y la edad de la hoja, como sucede en *C. uvitana,* donde sus hojas jóvenes o en desarrollo muestran un intercambio de CO_2 característico de especies C_3, mientras que hojas viejas o maduras tienen una fijación típica de plantas CAM (Zotz y Winter 1996). Por otro lado, se ha reportado que plántulas juveniles de *C.rosea* presentan cierta plasticidad fotosintética dependiendo de la forma de vida, por tanto, el intercambio CO_2 sería diferente entre un individuo que se desarrolla como epifito que uno que se desarrolla como terrestre (Ball *et al.* 1999). Algo contrario sucede con plántulas de tres especies originarias de Costa rica (*C. osaensis, C. valerii y C, peninsulae*) donde la etapa de desarrollo y la forma de vida (epifita y hemiepifita) no son suficientes para controlar ampliamente la expresión de CAM, ya que está se debe más a factores ambientales como disponibilidad de agua e intensidad

de luz (Arndt et al., 2002; Wanek *et al.* 2002). Por tanto, esto sugiere que la expresión de CAM no se relaciona con un solo factor, ya sea forma de vida, estado de desarrollo o condición ambiental donde se desarrolle, de esta manera la inducción de CAM en *Clusia* va a depender de cada especie.

Por tanto, el objetivo de este trabajo es determinar si existen diferencias en la asimilación de CO_2 para *C. flava* y que determinen su crecimiento como respuesta a los cambios estacionales del bosque seco en el jardín botánico de CICY en Mérida, Yucatán. Para cumplir con este objetivo general se plantean los siguientes objetivos particulares.

Objetivos particulares

1. Explorar el efecto de variables ambientales como la humedad relativa, el flujo de fotones para fotosíntesis, la temperatura diurna y nocturna sobre la fijación de CO_2 durante las estaciones de nortes, sequía y lluvias
2. Analizar y relacionar la acidez total titulable, el potencial hídrico foliar y la concentración de clorofila con la fijación de CO_2 durante nortes, sequía y lluvias.

Materiales y Métodos

Para la realización de este trabajo, se llevo acabo el marcaje de 6 individuos de *Clusia flava* en el jardín botánico regional Xíitbal neek' del CICY, localizado en la ciudad de Mérida, Yucatán, México. Se tomaron 10 muestras de hojas maduras expuestas y de sombra (tercer par) durante las temporadas de nortes (febrero-marzo), sequía (abril-mayo) y lluvias (junio-julio 2005), las cuales fueron congeladas a -196 °C en nitrógeno líquido y llevadas para su almacenamiento en el laboratorio de marcadores moleculares de la Unidad de Recursos Naturales del CICY. Esto con el fin de determinar, la producción de ácidos totales titulables, la concentración de ácidos orgánicos (malato y citrato), clorofila total y relación clorofila a/b, así como la suculencia (ver métodos descritos en el capítulo III). El potencial hídrico de hojas y del suelo, fue medido mediante un potenciómetro de punto de rocío. WP4 (DECAGON Devices, Pullman, WA, USA). Tomando muestras circulares de hoja (1.3 cm^{-2}), expuestas y de sombra. En el caso del suelo se colectaron 5 g. de la rizosfera en una profundidad de 10 cm., estos datos fueron tomados a la par de la medición de asimilación de CO_2

Se registraron variables ambientales como el Flujo de Fotones para Fotosíntesis (FFF), el cual se llevó a cabo mediante un ciclo diurno con intervalos de 15 minutos, mediante un cuantómetro Licor (LI-190SA y LI-250A); Esto con el fin de obtener el total de fotones que inciden durante el día en las hojas expuestas y en sombra. También se registraron la humedad relativa y la temperatura ambiental en °C (diurna/nocturna), mediante un termohigrómetro ambiental (modelo TE-1365 by Twiligth). Para medir la fijación de CO_2 se utilizó un analizador de gases infrarrojo (LI-6400; Li-cor Inc., Lincoln, Nebraska, EUA) durante un periodo de 24 hrs., con el fin de observar fijación diurna y nocturna de CO_2 (n=6) El análisis de datos se realizo mediante (ANOVA medidas repetidas), tomando en cuenta como factores del modelo: Exposición (Expuestas vs Sombra) y las estaciones (Nortes, sequía y Lluvias) con las siguientes variables de respuesta (Delta de protones, Área foliar específica, Asimilación CO_2, Suculencia, Clorofila y potencial hídrico).

Resultados

Los resultados de precipitación obtenidos durante las meses de enero 2004 a septiembre 2005. Nos sirven como un indicador para separar las estaciones en diferentes meses, de esta manera se puede utilizar un mes de referencia para considerarlo dentro de las estaciones de nortes (que se caracteriza por eventos intermitentes de vientos fuertes, poca o nula precipitación y temperaturas menores de 20°C) sequía (Marzo-Mayo) y lluvias (Junio octubre). Así, de los meses muestreados, febrero podemos considerarlo como representativo de nortes, abril de sequía y junio de lluvias, como nos muestran (Orellana 1999; Herrera-Silveira 1995).

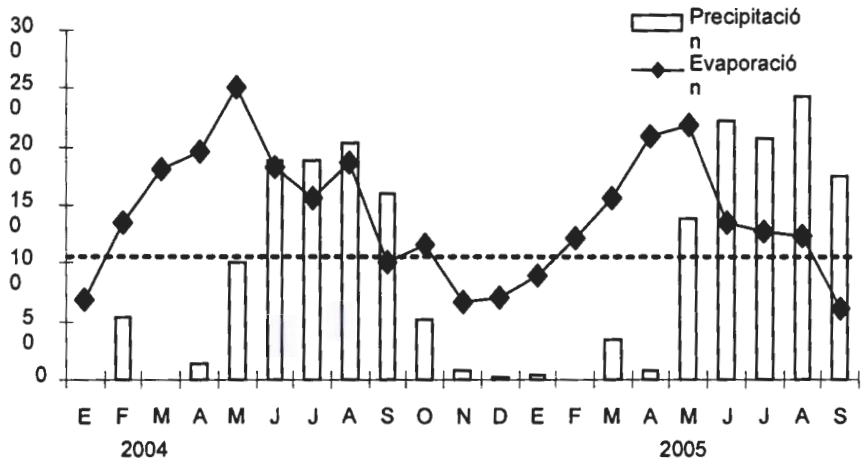


Grafico1. Precipitación y evaporación mensual (mm) en el jardín botánico de CICY.

Tabla1. Condiciones ambientales promedio durante los días en que se midió la fijación de CO_2.

°C (noche) mínima	Humedad Relativa (%) día Medio día	Humedad Relativa noche	Ψ suelo MPa
[a]16	[b]60	>90	[b]-4.87
[b]20	[c]43	>90	[a]-10.35
[b]22	[a]78	>90	[c]-1.278

Tabla 2. Parámetros foliares en *Clusia flava* (media±e.e).

	Febrero		Abril		Junio	
Parámetros foliares	**Expuestas**	**Sombra**	**Expuestas**	**Sombra**	**Expuestas**	**Sombra**
Asimilación de CO_2 integrado día (mmol m^{-2})	-6.08±1.06	N.D.	-4.99±0.31	N.D.	-6.15±0.60	N.D
Asimilación de CO_2 integrado noche (mmol m^{-2})	22.86±1.58	N.D.	13.91±0.99	N.D.	39.52±2.77	N.D.
Área Foliar específica (cm^{-2}/g^{-1})	49.28±1.65	46.09±3.21	[a]51.81±2.96	[b]43.47±2.35	[a]62.60±2.58	[b]54.21±2.7837
Suculencia (gH_2O/m^{-2})	[a]804.40±38.05	[b]716.40±42.44	[a]781.47±32.84	[b]696.53±29.64	[a]931.25±41.92	[b]679.75±30.59
Ψ Mpa	-1.77±0.05	-1.51±0.12	-3.16 ±0.14	-3.07±0.09	-0.65±0.09	-0.69±0.03
Clorofila Total, (mg/m^{-2})	[b]367.52±21.4	[a]392.33±25.15	[b]334.19±25.87	[a]375.03±19.62	[b]437.44±18.01	[a]477.56±16.21

Tabla 3. Valores acidez total en *Clusia flava* por la mañana, en el atardecer y valores (ΔH^+) en tres temporadas en jardín botánico, CICY. (n=6).

	Febrero		**Abril**		**Junio**	
	Sombra	expuestas	Sombra	Expuestas	Sombra	Expuestas
Mañana	1068.41	1087.35	1069.35	1140.18	1179.10	1254.32
Tarde	355.38	264.67	320.14	382.74	339.32	328.49
Delta (ΔH^+)	**713.03**	**822.68**	**749.21**	**757.44**	**839.78**	**925.83**

Se observaron diferencias significativas en el FFF entre plantas expuestas y de sombra (ANOVA medidas repetidas $P<0.05$; Tuckey $P<0.05$); así como entre estaciones, siendo mayor en el mes de abril que en los meses de febrero y junio (Tabla 1).

En esta misma tabla tenemos los valores de temperatura que difirieron significativamente (ANOVA medidas repetidas $P<0.05$; Tuckey $P<0.05$) entre el día y la noche, así como entre estaciones, siendo menor en el mes de febrero que en los meses de abril y junio que son meses cálidos con temperaturas máximas de 40.5 y 38°C respectivamente. La humedad relativa también varió entre el día (menor) y la noche (mayor), así como entre temporadas (lluvias > nortes > sequía) (ANOVA medidas repetidas $P<0.05$; Tuckey $P<0.05$).

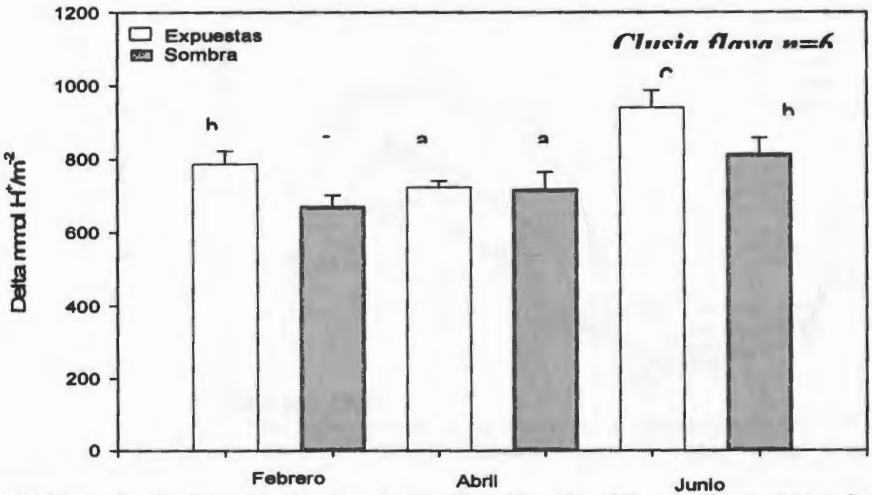


Gráfico 2. Delta (Δ) acidez total titulable en *Clusia flava* para hojas expuestas y de sombra en tres estaciones (nortes: febrero, sequía: abril y lluvias: junio) de 2005. media±e.e.

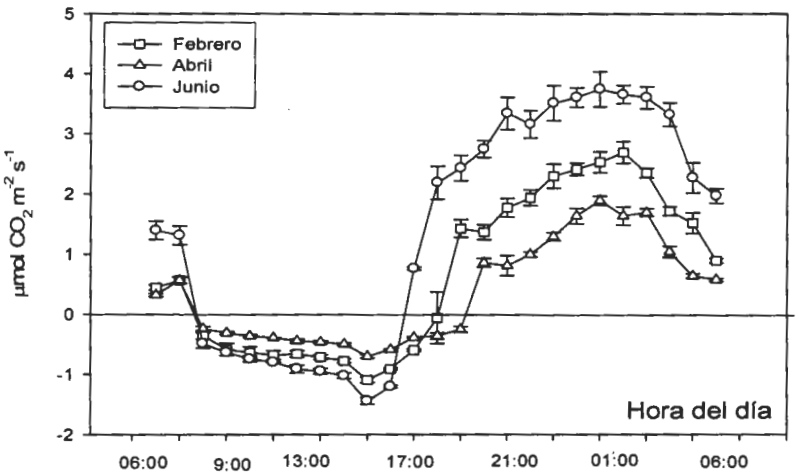


Gráfico 3. Fijación de CO_2 durante un periodo de 24 Hrs. en *Clusia flava* media±e.e. (n=6).

En los gráficos 2 y 3 se puede observar la ganancia de carbono por parte de *Clusia flava* en distintos días característicos de las temporadas de nortes (febrero), sequía (abril) y lluvias (junio). Podemos observar que el delta de ácidos totales titulables es mayor en los meses de febrero (~800 mmol/m^{-2} de $^{+}$H) y junio (~920 mmol/m^{-2} de $^{+}$H), que en el mes de abril (~730 mmol/m^{-2} de $^{+}$H), (ANOVA;Tuckey $p<0.05$). Esta situación es comprensible si observamos el gráfico 3, donde la menor fijación de CO_2 se da en el mes de abril, cuando la disponibilidad de agua es baja y aumenta con la disponibilidad de agua.

Podemos observar que la fijación de CO_2 solo se realiza por la noche y se obtuvieron valores de JCO_2 integrado positivos para la noche y negativos para el día; además este JCO_2 integrado difiere significativamente (ANOVA medidas repetidas $P<0.05$; Tuckey<0.05) entre las temporadas, las plantas tienen mayor éxito de fijación del CO_2 en el mes de junio cuando la disponibilidad de agua de lluvia y en el suelo (Ψ) es mayor (Tabla 2).

Discusión

Con respecto a los parámetros fisiológicos en hojas expuestas y de sombra tenemos el delta de ácidos titulables típico para especies con metabolismo ácido de las crasuláceas, ya que el delta (mmol H^{+}/m^{-2}) nos proporciona la diferencia entre el ácido acumulado durante la noche como consecuencia de la asimilación nocturna de CO_2.

La cantidad de ácido acumulado (superior a los 800 mmol/m^{-2}) es característico de las especies de *Clusia* que tienen la habilidad de acumular grandes cantidades de malato y citrato durante el periodo nocturno (Popp *et al.*, 1987; Franco et al. 1990). Por tanto, *Clusia* flava es una especie CAM fuerte, ya que la diferencia del carbono acumulado y el asimilado sobrepasa los 400 mmol/m^{-2}(Winter *et al.* 2006).

Las mediciones de fijación de CO_2 y la acumulación de ácidos totales, así como los valores integrados de la asimilación de CO_2 y el Delta de $^{+}$H nos demuestran la ocurrencia de CAM en *C. flava*, situación similar a las mediciones hechas por Franco *et al.*, 1994 con *Clusia rosea*, *Clusia sp* y *C. alata*. Algunos registros de $\delta^{13}C$ (ver Capítulo 3) y los valores altos de Delta

H^+ (Gráfico 2) sugieren que *C. flava* es la especie con fotosíntesis CAM más fuerte que se conoce hasta la fecha, es decir, es una especie CAM obligada que solo fija el CO_2 durante la noche (Holtum *et al.* 2004). Por lo que este trabajo ayuda a reforzar las aseveraciones realizadas por Holtum *et al.*, 2004., sobre la ocurrencia de CAM fuerte en esta especie; ya que la diferencia en el valor delta de ^+H mmol/m^{-2} es muy grande (Grafico 2).

Se sabe que factores externos como la temperatura, la disponibilidad de agua y la cantidad de luz diaria son determinantes en la expresión del grado de fotosíntesis CAM y C_3/CAM en especies del género *Clusia* (Grams et al., 1997 y Lüttge 2006). Por tanto, la mayor ganancia en la asimilación de CO_2 se da cuando las condiciones ambientales son favorables para este proceso; ya que la mayor ganancia de carbono se dio durante la temporada de lluvias: cuando el agua está disponible, la temperatura diurna y nocturna es de 10°C y el FFF es de 26 mol m^{-2} d^{-1} (Haag-Kerwer *et al.*, 1996). Esto se debe a que hay una mayor apertura de estomas y la tasa de transpiración es alta, permitiendo así un mejor intercambio para la entrada de CO2; al mesofilo de la hoja. Sin embargo, durante junio (lluvias) a pesar de que se tiene una mayor fijación de carbono atmosférico que en abril (sequía). De esta manera una mayor fijación de CO_2 en presencia de lluvias nos da, una mayor acumulación de ácidos orgánicos totales, que se ven reflejados en el crecimiento de las plántulas durante esta temporada.

Por otro lado, en la temporada de sequía, cuando la temperatura ambiental es muy alta (máximo: 40.5 °C), un FFF igual de alto con 39 mol m^{-2} d^{-1} y aunado a una baja disponibilidad de agua, la planta mantiene cerrados sus estomas para evitar la pérdida de agua y como consecuencia se limita la entrada de CO_2 a los células del mesofilo; limitando así el crecimiento de la planta durante esta temporada.

Este mismo comportamiento se observa en los parámetros de la hoja como: el área foliar específica, la cual fue significativamente mayor en la temporada de lluvias que en las de nortes y sequía. Esto indica que la planta está creciendo en la temporada de lluvias gracias a que la asimilación de CO_2 es mayor; por tanto, estos individuos tienen una tasa relativa de crecimiento mayor en lluvias que en las otras temporadas; situación similar a la observada en capítulos anteriores, para esta y otras especies en distintas comunidades de la Península de Yucatán.

Otra variable importante es la suculencia, la cual resulta mayor en hojas expuestas que de sombra durante los meses de febrero y abril, mientras que en junio no difiere entre hojas de sombra y expuestas y presenta valores muy similares a los encontrados para esta especie en campo. Altos valores de suculencia están relacionados con la acumulación de grandes volúmenes de agua en las células; lo que además permitiría una acumulación mayor de ácidos orgánicos como son el málico y cítrico. Además el agua acumulada en estas hojas sirve como un regulador de la temperatura foliar, evitando la acumulación de energía proveniente de la radiación infrarroja, lo que podría aumentar la temperatura y causar muerte celular.

En el caso de la clorofila, se mantiene estable en los meses de febrero y abril, pero aumenta en el mes de junio, cuando las condiciones ambiéntales (disponibilidad de agua, temperatura y radiación) son muy favorables para el crecimiento de la especie (Herzog et al., 1998; Franco et al., 1996; Borland et al., 1998 y Winter y Zotz 1992).

Por tanto, podemos concluir que *C. flava* es una especie típica CAM y que presenta un CAM fuerte. Además de que su asimilación de carbono puede variar conforme cambia la disponibilidad de factores ambientales como agua y luz. El mayor crecimiento de esta especie se dio en junio a la llegada de las lluvias, por lo que el agua es un factor importante en el grado de expresión de CAM en esta especie. De esta manera obtenemos el primer reporte sobre la asimilación de carbono en *C. flava* en relación con las condiciones ambientales para un bosque seco; mismas que nos ayudan a comprender la relación que hay entre el la expresión de CAM y la regulación ambiental para esta forma de vida (árbol), ya que son un caso excepcional en la naturaleza. Así, la importancia de este trabajo: nos permitirá avanzar más en el conocimiento de los procesos que pueden determinar la fijación de CO_2 bajo las distintas condiciones macro y micro ambientales en las que se encuentran estas especies en bosques estacionales secos, como los de la península de Yucatán. Además, nos ayuda a determinar la importancia que tienen estas especies en edades tempranas para establecerse bajo condiciones ambientales adversas, como son la falta de agua, altas temperaturas y alta radiación solar. Por tanto, trabajar con plántulas de distintas especies del género en el bosque seco (in situ), nos ayudaría para entender los mecanismos de establecimiento y la importancia que juega el metabolismo ácido de las crasuláceas para su supervivencia.

References

Arndt, K. S., Wanek W, Hoch G, Andreas R. y Popp M. 2002. Flexibility of nitrogen metabolism in the tropical C_3-crassulacean acid metabolism tree species, *Clusia minor*. Funct. Plant. Biol. 29:741-747.

Borland A.M. y Griffiths, H. 1996. Variations in the phases of crassulacean acid metabolism and regulation of carboxylation patterns determined by carbon isotope-discrimination techniques. in: Winter K y Smith J.A.C 1996. Crassulacean acid metabolism. Biochemistry, ecophysiology and evolution. Winter K y Smith J.A.C (edits) Springer-Verlag Berlin Heidelberg 1996.

Borland A.M., Griffiths H., Maxwell, C., Broadmeadow M.S.J., Griffiths N.M, Barnes J.D. 1992. On the ecophysiology of the Clusiaceae in Trinidad : Expression of CAM in *Clusia* minor L. during the transition from the wet to dry season and characterization of three endemic species. New Phytologist. 349-357.

Borland A.M. Griffiths H., Broadmeadow M.S.J. Fordham H. y Maxwell K. 1993. Short-term changes in carbone isotope discrimination in the C3-CAM intermediate *Clusia minor* L. growing in Trinidad. Oecologia 95:444-453.

D´Arcy P. 1980. Flora de Panamá. Familia Guttiferae. Annals of the Missouri botanical garden. Vol 67: 975-993.

Diaz M., Haag-Kerwer A., Wingfield R., Ball E., Olivares E., Grams T.E.E., Ziegler H. y Lüttge U. 1996. Relationships between carbon and hydrogen isotope ratios and nitrogen levels in leaves of *Clusia* species and two other Clusiaceae genera at various sites and different altitudes in Venezuela. Trees 10:351-358.

Franco A.C., Ball E. y Lüttge U. 1990. Patterns of gas exchange and organic acid oscillations in tropical trees of the genus *Clusia*. Oecologia 85:108-114.

Franco A.C. Ball E., y Lüttge U. 1991. The influence of nitrogen, Light and water stress on CO_2 exchange and organic acid accumulation in the tropical C_3-CAM tree, *Clusia minor*. Journal of Experimental Botany. 42:597-603.

Franco A.C., Olivares E., Ball E., Lüttge U y Haag-Kerwer A. 1994. In situ studies of Crassulacean acid metabolism in several sympatric species of tropical trees of genus

Grams T. E. E., Herzog B. y Lüttge U. 1998. Are the species in the genus *Clusia* with obligate C_3- photosynthesis? J. of Plant physiology. 152:1-9.

Herzog B., Hoffmann S., Hartung y Lüttge U. 1999. Comparison of photosynthetic responses of the sympatric tropical C_3 species *Clusia* multiflora H.B.K. and the C_3-Cam intermediate species *Clusia* minor L. to irradiance and drought stress in phytotron. Plant biology 1:460-470.

Holtum J.A. 2002. Crassulacean acid metabolism. Plasticity in expression, Complexity of control. Funct. Plant. Biol. 29:657-661.

Holtum J.A. Aranda J., Virgo A., Gehrig H.H. y Winter K. 2004. $\delta^{13}C$ values and Crassulacean acid metabolism in *Clusia* species from Panama. Trees 18:658-668.

Kluge M y Ting P. 1978. Crassulacean acid metabolism . Analysis of an ecological adaptation. Springer, Berlin.

Lüttge U. 1996. *Clusia*: Plasticity and diversity in genus of C_3/CAM intermediate tropical trees. In crassulacean acid metabolism. Biochemistry, ecophysiology and evolution. Winter K y Smith J.A.C (edits) Springer-Verlag Berlin Heidelberg 1996.

Lüttge U. 2006. Photosynthetic flexibility and ecophysiology plasticity: questions and lesson from *Clusia,* the only CAM tree, in the neotropics. New Phytologist. 171:7-25.

Osmond C.B. 1978 Crassulacean acid metabolism: a curiosity in context. Ann. Rev. Plant Physiol. 29:379-414.

Osmond C.B., Allaway W.G. Sutton B.G., Troughton J.H., Queiroz O, Lüttge U. y Winter K. 1973. Carbone isotope discrimination in photosynthesis of CAM plants. Nature. 246:41-42.

Pipoly. J.J., Kearns D. y Berry P.E. 1998. *Clusia*. In Flora of the Venezuelan Guayana. Vol. 4 Caesalpinaceae-Ericaceae (Berry, P. E., Holst, B.K. y Yatskievich, K, eds.). St. Louis Missouri: Missouri botanical garden Press. pp. 260-294.

Ting I. P. 1985. Crassulacean acid metabolism. Ann. Rev. Plant. Physiol. 36:595-622.

Tinoco-Ojuanguren C. y Vásquez Yánez C. 1983. Especies CAM en la selva húmeda tropical de los Tuxtlas Veracruz. Boletín de la sociedad mexicana de botánica de México. 45:150-153.

Vazquez-Yánez C. 1995. Una historia de investigación científica en plantas estranguladoras. Revista Ciencias. 37:57-60.

Wanek, W. Hubert W., Arndt, S.K. y Popp, M. 2002. Mode of photosynthesis during different life stages of hemiepiphytic *Clusia* species. Fun. Plant. Biol. 29:725-732.

Winter K y Smith J.A.C 1996. Crassulacean acid metabolism. Biochemistry, ecophysiology and evolution. Winter K y Smith J.A.C (edits) Springer-Verlag Berlin Heidelberg 1996.

Winter, K., Zotz, G., Baur, B y Dietz K-J. 1992. Light and dark CO_2 fixation in *Clusia* uvitana and the effects of plant water status and CO_2 availability. Oecologia. 91:47-51.

Zotz, G. y Winter K. 1993. Short term regulation of crassulacean acid metabolism activity in a tropical hemiepiphyte, *Clusia* uvitana. Plant Physiology. 102: 835-841.

Capitulo V

Expresión de CAM en plántulas de dos especies de *Clusia* bajo condiciones de bosque seco

Los estudios relacionados con la expresión de la fotosíntesis CAM y sus variantes (CAM idling, CAM cycling, CAM fuerte y CAM débil, entre otras; Winter y Smith 1996) se han restringido a especies de algunas familias como las crasuláceas y aizoáceas. Sin embargo, éstas han aportado una información muy útil sobre la expresión del modo de fotosíntesis desde la ontogenia. En el caso de *Clusia* hay muy pocos reportes que nos den información sobre los aspectos de expresión de CAM y sus variantes en plántulas (Ball *et al.*, 1990). En otras especies de *Clusia* se han estudiado plántulas con hábitat epífito y se ha visto que la forma de vida no tiene relación con la expresión de variantes de CAM, sin embargo, la edad de la planta si tiene una relación con esta expresión, pero se desconoce a qué factores ambientales puede estar ligada esta respuesta (Wanek *et al.* 2002).

Debido a que las plántulas de algunas especies de *Clusia* crecen lentamente comparadas con otras especies de árboles, tienen varios problemas para establecerse, es por ello que los árboles adultos han desarrollado la capacidad de producir esquejes para asegurar su supervivencia (Francis 1995). De esta manera no se sabe el origen de árboles establecidos en el campo, además se tienen datos de una baja tasa de reclutamiento en especies entre las que se encuentran *C. rosea*, *C. flava* y muchas más (Passos y Oliveira 2002). Por tanto, nos preguntamos: ¿cómo se explica que un género con una capacidad tan importante de regular su fotosíntesis no pueda establecerse bajo condiciones adversas?. Se ha reportado que la primer fase en el establecimiento de las semillas requiere gran cantidad de agua y baja cantidad de luz, sin embargo, no se ha realizado trabajos a fondo para conocer los requerimientos de estas especies para germinar en campo. Por tanto, nos planteamos el siguiente objetivo: Comparar la expresión de CAM en plántulas de *C. rosea y C. flava* para aclimatarse a condiciones de sequía y a cambios estacionales en un bosque seco. Para cumplir con este objetivo general se establecieron los siguientes objetivos particulares.

Objetivos particulares

1. Comparar la expresión de CAM en plántulas de *C. rosea* y *C. flava*, y relacionarla con el crecimiento de las mismas.
2. Determinar y comparar la expresión de CAM en *C. rosea* y *C. flava* bajo condiciones de déficit hídrico y relacionarla con la capacidad de respuesta y adaptación de estas especies a diferentes condiciones microambientales.

Materiales y Métodos

Para la realización de este trabajo, se llevó acabo una colecta de frutos de ambas especies. En el caso de *C. rosea* los frutos fueron tomados del Jardín botánico del CICY localizado en la ciudad de Mérida, Yucatán, México. Para *Clusia flava* los frutos fueron colectados en octubre de 2004 en una selva baja inundable localizada dentro del municipio de Felipe Carrillo Puerto, en el estado de Quintana Roo.

Todos los frutos colectados fueron trasladados al laboratorio de fisiología ambiental de plantas en la unidad de Recursos Naturales del CICY para su limpieza y lavado con una solución de hipoclorito de sodio al 1% para su desinfección. Posteriormente fueron colocadas 40 semillas para su germinación en 20 charolas de plástico (15 x 15 cm) con un sustrato inerte de agrolita comercial, dentro de una cámara de crecimiento con un periodo aproximado de 28 días en las siguientes condiciones: una temperatura diurna de 32 °C, nocturna de 20 °C y un fotoperíodo de 12 horas (FFF 25-30 $\mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$), una humedad relativa constante del 80% y un riego constante con agua destilada (una vez por semana).

Al término de 28 días las plántulas fueron transplantadas individualmente a vasos de unicel (número 10) con una mezcla de tierra negra y agrolita en proporción 2:1 para ser colocadas en el jardín común del CICY. Al cabo de dos meses las plántulas fueron transplantadas a bolsas negras de polietileno (18 x 22 cm) con 600 g de sustrato (tierra negra y agrolita 2:1). Posteriormente se dejaron 2 meses más en el jardín común (bajo riego constante) y se establecieron los tratamientos al final de este tiempo (Febrero 2005). Para esto, se trasladaron las plántulas (ambas especies) con 4 meses de edad durante la madrugada a dos localidades diferentes del

jardín botánico para obtener así los siguientes tratamientos de exposición a la luz: 60 plántulas expuestas (lugar abierto) y 60 plántulas en sombra (bajo el dosel). Por otro lado, las plántulas se dejaron de regar en el momento de su establecimiento específicamente durante la época de sequía (febrero-mayo,) hasta el final del estudio (junio-julio 2005) cuando llegaron las lluvias. Las mediciones para porcentaje de biomasa total mensual acumulada, se dio tomando una muestra de la biomasa inicial (peso seco) al comenzar el tratamiento; posteriormente se fue tomando mensualmente una muestra de plántulas para obtener la biomasa total (Peso seco) y observar así una diferencia en el incremento de biomasa conforme avanzaba el experimento. Por tanto, febrero se considera el tiempo cero (peso seco inicial) y mensualmente se registro el incremento biomasa total (peso seco); expresando así el porcentaje de biomasa total ganada por mes con respecto al inicio del experimento.

Al momento de establecer los tratamientos se realizó la primera medición de variables ambientales en 3 puntos diferentes dentro del jardín botánico. Así se midió el FFF con un cuantómetro marca Licor (LI-190SA y LI-250A) a intervalos de 30 minutos; la humedad relativa y la temperatura ambiental se registraron con un higrotermómetro ambiental (modelo TE-1365 by Twiligth).

Asimismo, se tomaron los primeros parámetros fisiológicos (tiempo cero) y se colectó 1 muestras de hoja por planta para determinar: la producción de ácidos totales titulables, la concentración de ácidos orgánicos (malato y citrato), la clorofila total y la relación clorofila a/b, los carotenoides, así como la suculencia (métodos descritos anteriormente). Los carotenos fueron determinados mediante espectrofotometría a 480 nm. Mediante una extracción en discos de hoja de 1.3 cm^{-2}, la extracción se realizó en una solución acuosa de acetona 80% que contiene 0.5% de $MgCO_3$. Centrifugando a 5,000 x g mediante 5 minutos a 4°C.

Para determinar el crecimiento, se midió el área foliar específica, la biomasa total (peso seco), de 10 plántulas. Este proceso se repitió mensualmente a partir del mes de febrero y hasta julio de 2005. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el programa STATISTICA 7.0 utilizando un análisis de regresión para Delta +H vs suculencia, área foliar específica y biomasa total. Además, se utilizó un ANOVA de medidas repetidas para los tratamientos de exposición (expuestas-sombra) y Temporada (Norte, sequía y lluvias). De igual manera un modelo de ANOVA de medidas repetidas para comparar clorofila total, ácidos orgánicos y potencial hídrico foliar en *C. rosea* Vs *C. flava* y entre temporadas (nortes, sequía y lluvias).

En el caso de los valores obtenidos en porcentaje, tuvieron que ser transformados a arcoseno porcentaje, debido a que esta variable no muestra normalidad, fue necesario transformarla antes del análisis para estabilizar el error de varianza.

Resultados

La comparación entre *C. rosea* y *C. flava* nos muestra un crecimiento diferente para ambas especies, tanto, en los tratamientos de sombra como en plántulas expuestas; esto puede estar asociado con la cantidad de luz. Así *C. rosea* tiene un porcentaje mayor de ganancia mensual de biomasa (g de peso seco), tanto en plantas expuestas como en sombra, con respecto a *C. flava* al termino del estudio obeteniendo diferencias significativas ANOVA medidas repetidas $P<0.05$; Tuckey $P<0.05$ (Gráfico 1 y 2).

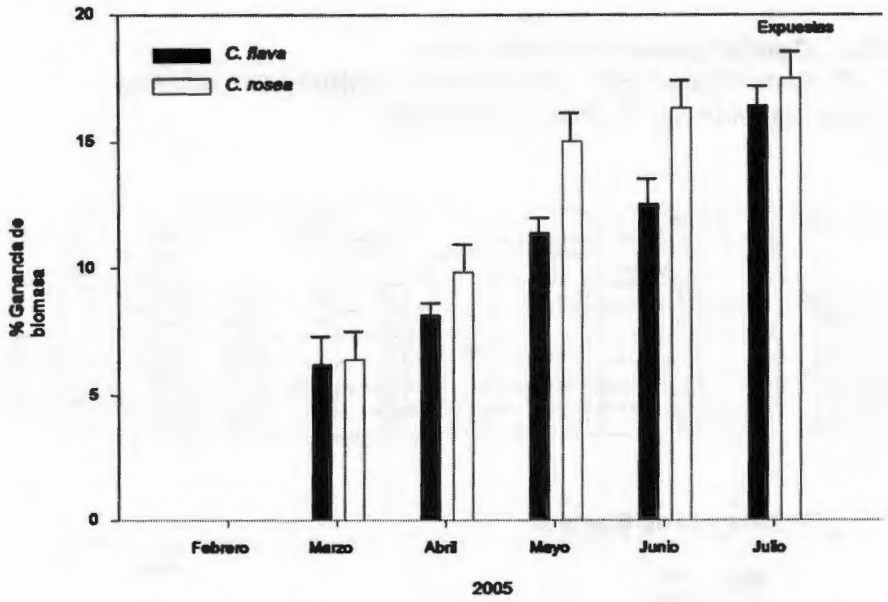


Gráfico 1. Porcentaje de biomasa (g peso seco) total mensual acumulada en plántulas expuestas de *C. flava* y *C. rosea.*

Tabla 1. Condiciones ambientales 2005
FFF (Flujo de fotones para fotosíntesis, H.R (Humedad relativa)
Ψ (Potencial hídrico), °C (Grados Celsius).

Temporada 2005	FFF (mol m^{-2} día)	FFF (mol m^{-2} día) Expuestas	FFF (mol m^{-2} día) Sombra	°C Día Máxima	°C Noche Mínima	H.R (%) medio día	H.R noche	Ψ suelo (*C. rosea*) Mpa 13:00 h	Ψ suelo (*C. flava*) Mpa 13:00 h
Día 0 (Febrero)	34	28	13	31	15	60	>90	0.878	0.956
Día 30 (Marzo)	35	30	17	35	23	55	>90	-6.10	-7.30
Día 60 (Abril)	39	36	24	38	22	43	>90	-10.40	-11.80
Días 90 (Mayo)	35	32	20	40	22	58	>90	-12.80	-12.20
Día 120 (junio)	29	26	15	39	20	78	>90	0.70	0.87
Día 150 (Julio)	28	24	11	37	25	73	>90	0.66	0.92

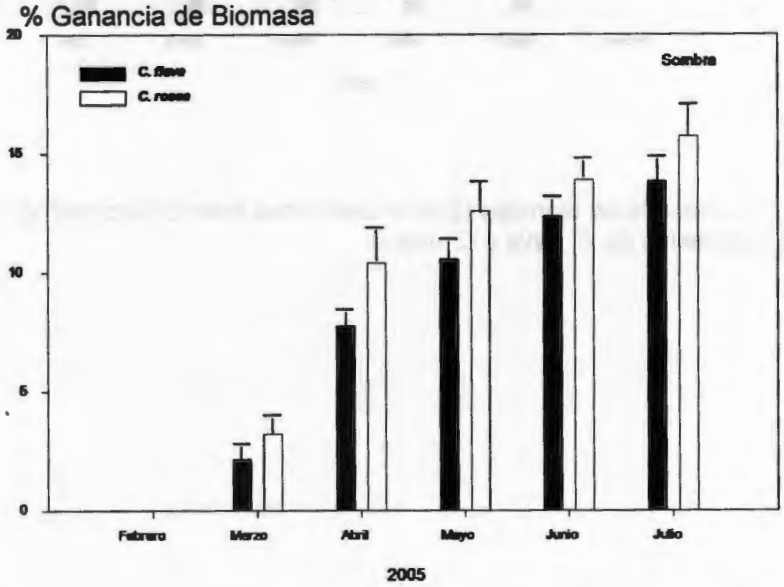


Gráfico 2. % Biomasa (g peso seco) total mensual acumulada en plántulas en sombra de *C. flava* y *C. rosea*.

Una situación muy similar a lo anteriormente descrito se da en la suculencia la cual va en aumento conforme avanza el experimento, se puede observar que se tiene valores (diferencia entre los valores de la mañana y el atardecer) que van de los 400 gH_2O/m^{-2} hasta los 700 al termino del experimento en *C. rosea* y de los 600 hasta los 800 gH_2O/m^{-2} en *C. flava.* Además se observa una relación positiva con la producción de ácidos totales (Delta +H) que va en aumento con forme avanza el tiempo, lo que indica una mayor expresión de CAM, Pero en el caso de *C. rosea* la cantidad en la diferencia (Delta H+) ácidos acumulados es menor que para *C. flava* que puede llegar hasta los 1000 mmol/-2 +H (Gráfico 3) Además de una alta cantidad de ácidos totales al final del estudio hay una mayor acumulación de biomasa en plántulas expuestas con respecto a plántulas en sombra (Gráfico 4). Un patrón similar presenta *C. flava*, sin embargo, esta presenta una biomasa significativamente menor que *C. rosea* durante todo el estudio (ANOVA P<0.5: Tuckey P<0.5).

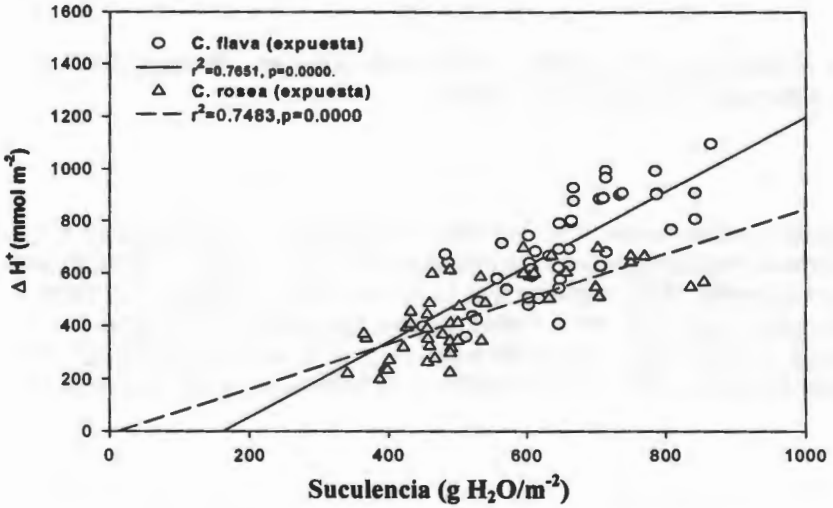


Gráfico 3. Relación entre la diferencia mañana-atardecer de la acidez y la suculencia en plántulas expuestas de *C. flava* y *C. rosea.*

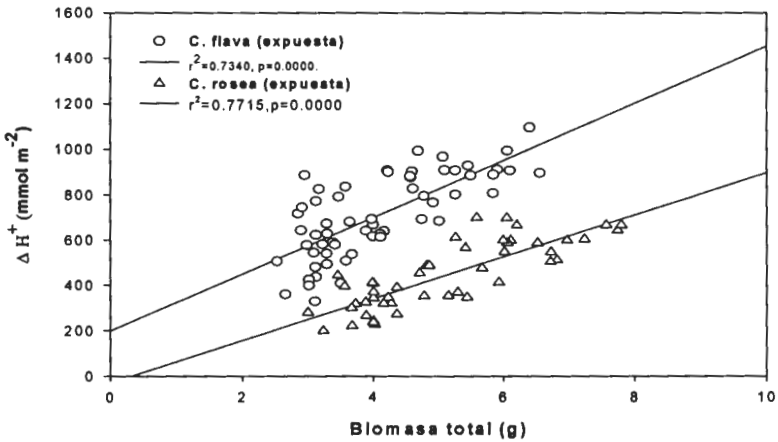


Gráfico 4. Diferencia de la acidez mañana-atardecer vs. Biomasa total en plántulas expuestas de *C. flava* y *C. rosea.*

Existe una relación positiva entre la acidez total y el área foliar específica; ya que conforme aumenta la cantidad de ácido acumulado en el tratamiento el área foliar específica va en aumento. Esto significa que la lámina foliar es mayor, por tanto, más área sirve para acumular más ácidos totales (carbono) y por tanto, las plantas expuestas pueden estar creciendo más, ya que la variable (AFE) es uno de los componentes principales y que modifican la tasa relativa de crecimiento (Gráfico 5).

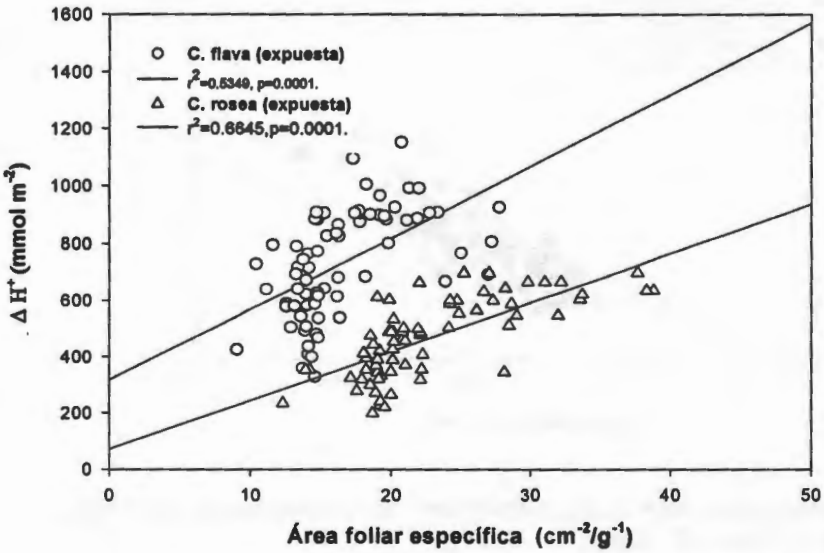


Gráfico 5. Diferencia Acidez mañana-atardecer vs. Área foliar específica en plántulas expuestas de *C. flava* y *C. rosea.*

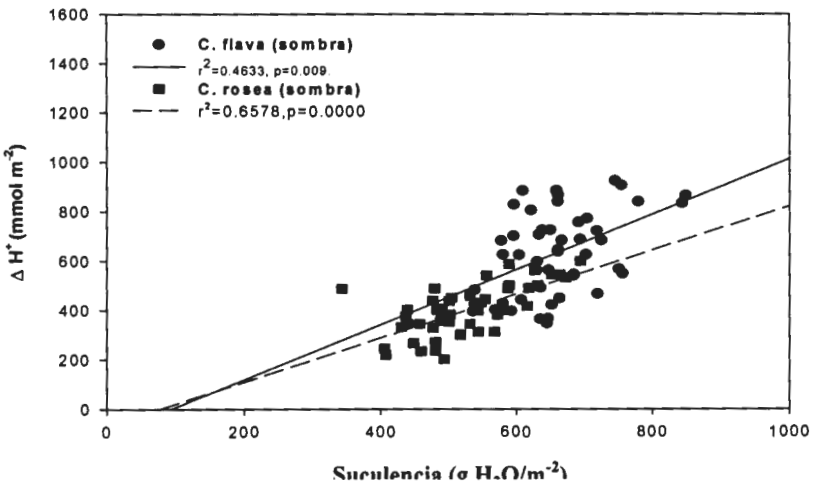


Gráfico 6. Diferencia acidez mañana-atardecer vs. Suculencia en plántulas expuestas de *C. flava* y *C. rosea.*

En el caso de las plántulas en sombra, presentan el mismo patrón de acumulación de ácidos totales y la misma relación con respecto a la suculencia, y la biomasa total. Así, durante el estudio se observa un crecimiento en las plantas debido a la ganancia de carbono y acumulación de agua en esta especie; así como la expresión únicamente de fotosíntesis CAM (Gráficos 6,7 y 8).

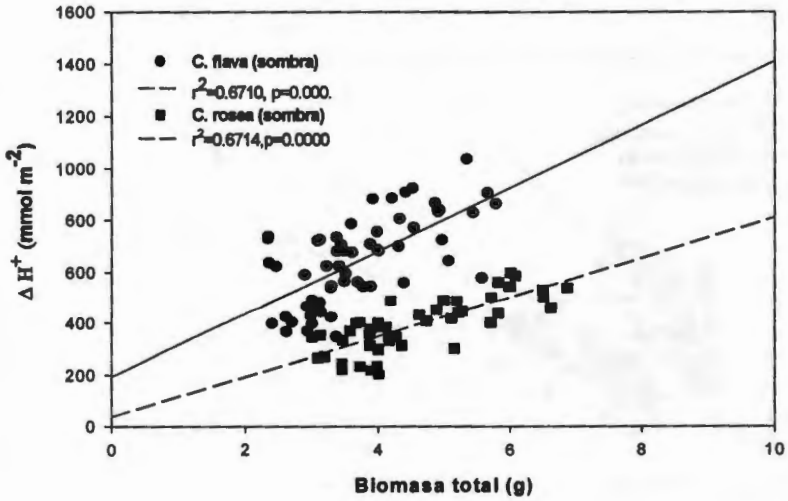


Gráfico 7. Diferencia acidez mañana-atardecer vs. Biomasa total en plántulas en sombra de *C. flava* y *C. rosea*.

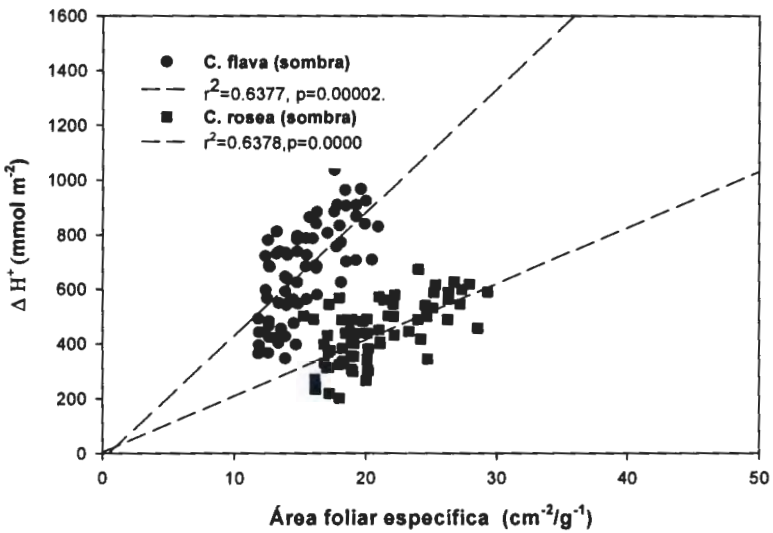


Gráfico 8. Diferencia acidez mañana-atardecer vs. AFE de plántulas en sombra de *C. flava* y *C.rosea.*

Por otro lado, la concentración de clorofila total es alta al inicio del experimento, esto se debe a que las plántulas estaban aclimatadas a baja disponibilidad de luz al estar en condiciones de jardín común. Posteriormente, con la falta de agua y la alta disponibilidad de luz, la concentración de clorofilas totales fue disminuyendo hasta una concentración cercana a los 300 mg/m^{-2} en hojas expuestas en los meses de abril y mayo, sin embargo, estos valores aumentaron poco a poco en los meses de junio y julio a consecuencia de la disponibilidad de agua. Donde si se observaron diferencias significativas (ANOVA $P<0.5$; Tuckey $P<0.5$) para la concentración de clorofilas y la relación a/b durante la presencia de agua en el experimento. Tablas 2-4).

Por otro lado, la concentración de carotenoides totales si tiene una respuesta a la exposición a la luz en *C. rosea* ya que las hojas expuestas presentan cantidades mayores que las hojas en sombra (ANOVA $P<0.5$; Tuckey $P<0.5$) situación que se hace más manifiesta durante los meses de poca disponibilidad de agua (marzo-abril) y cuando se tiene la mayor cantidad de FFF (abril). De esta manera, se obtienen diferencias significativas (ANOVA $P<0.5$: Tuckey $P<0.5$) en este parámetro entre ambas especies, sin embargo, no se tienen diferencias significativas entre plántulas expuestas y de sombra para dada especie. Sin embargo, si se aprecian diferencias significativas en el área foliar de ambas especies cuando existe una buena disponibilidad de agua por las lluvias.

Tabla 2. Parámetros foliares en *C. rosea* y *C. flava* durante la temporada de nortes en el año 2005. (Diferentes letras indican diferencias significativas) ANOVA medidas repetidas P<0.05; Tuckey P<0.05

	Febrero			
	C. rosea		*C. flava*	
Parámetros foliares	**Expuesta**	**sombra**	**Expuesta**	**Sombra**
Ψ Mpa	-1.64±0.07[a]	-1.40±0.15[b]	-1.75±0.14[a]	-1.67±0.16 [b]
Clorofila (mg/m^{-2})	491.62±9.64[a]	509.55±16.10[a]	457.32±10.70[b]	533.16±10.89[a]
Carotenos (mg/m^{-2})	141.54±5.66[a]	140.46±6.35a	135.10±5.40a	134.07±6.06a

Marzo			
C. rosea		*C. flava*	*C. flava*
Expuesta	**sombra**	**Expuesta**	**Sombra**
-2.20±0.16 [a]	-2.11±0.07 [b]	-2.96±0.27 [a]	-2. 75±0.14 [b]
354.23±14.17[c]	412.73±13.02[b]	403.15±8. 70[b]	420.13±6.93 [b]
190.67±6.29[b]	173.03±3.30c	182.00±6. 00[b]	165.15±3.15 c

Tabla 3. Parámetros foliares en *C. rosea* y *C. flava* durante la temporada de sequía en el año 2005(Diferentes letras indican diferencias significativas)
ANOVA medidas repetidas P<0.05; Tuckey P<0.05

	Abril			
	C. rosea		*C. flava*	
Parámetros foliares	**Expuesta**	**sombra**	**Expuesta**	**Sombra**
Ψ Mpa	[a]-4.17±0.11	[b]-3.66±0.20	-4.94±0.13	-4.83±0.11
Clorofila (mg/m^{-2})	[b]317.98±9.06	[a]363.20±11.50	348.67±11.77	346.13±7.88
Carotenos (mg/m^{-2})	[a]193.54±7.93	b168.07±5.64	[a]184.73±7.57	[b]160.43±5.38

Mayo			
C. rosea		*C. flava*	
Expuesta	**sombra**	**Expuesta**	**Sombra**
[a]-5.09±0.25	[b]-4.58±0.23	[b]-4.51±0.34	[a]-5.05±0.08
[b]302.37±12.09	[a]352.30±11.11	327.11±8.30	332.75±7.97
[a]197.10±8.49	[b]161.20±6.53	[a]188.13±8.11	[b]147.01±5.96

Tabla.4. Parámetros foliares en *C. rosea* y *C. flava* durante la temporada de lluvias en el año 2005. Letras diferentes indican diferencias significativas con ANOVA de medidas repetidas $p \leq 0.05$.

	Junio			
	C. rosea		*C. flava*	
Parámetros foliares	**Expuesta**	**sombra**	**Expuesta**	**Sombra**
Ψ Mpa	-1.72±0.08[a]	-1.29±0.06[b]	-2.29±0.10[a]	-1.62±0.17[b]
Clorofila (mg/m^{-2})	400.30±16.3[b]	473.93±16.92[a]	444.04±8.66[a]	534.039±12.27[a]
Carotenos (mg/m^{-2})	191.52±5.16[a]	166.60±9.737[b]	173.33±4.67[c]	159.02±9.29[b]

Julio			
C. rosea		*C. flava*	
Expuesta	**sombra**	**Expuesta**	**Sombra**
-1.52±0.18[a]	-1.63±0.07[a]	-1.52±0.11[a]	-1.11±0.06[b]
485.44±13.95[a]	478.68±18.91[a]	508.11±19.69[a]	544.45±12.85[a]
167.03±2.64[a]	157.63±5.63[b]	159.43±2.53[c]	143.46±5.38c

Discusión

Con los valores de delta de ácidos titulables obtenidos en ambos tratamientos podemos afirmar que *C. rosea* y C. *flava* son especies con metabolismo ácido de las crasuláceas, ya que el delta (mmol H^+/m^{-2}) nos proporciona la diferencia entre el ácido acumulado durante la noche como consecuencia de la asimilación nocturna de CO_2 y que es característico de las especies de *Clusia* que tienen la habilidad de acumular grandes

cantidades de malato y citrato durante el periodo nocturno (Popp et al 1987; Franco et al. 1990).

Hay que señalar que *C. rosea* inicia el experimento con un valor cercano a los 300 mmol H^+/m^{-2} y al final del experimento registra valores cercanos a los 700 mmol H^+/m^{-2}, lo que representa una ganancia de más del 100 % en la acumulación de ácido. Cabe señalar que la cantidad de ácido fue en aumento conforme las condiciones ambientales se modificaban, principalmente por el efecto de falta de agua en el suelo, por lo cual, esta especie fue expresando en mayor grado su fotosíntesis CAM. Por otro lado, C. *flava* inició con valores más altos de Delta H^+, casi el doble que *C. rosea* y terminó con valores arriba de los 1100 mmol H^+/m^{-2}, lo que sugiere que esta especie expresó de manera más fuerte la fotosíntesis CAM.

Algunos registros de $\delta^{13}C$ y valores altos de Delta H^+ sugieren que *C. flava* es la especie con fotosíntesis CAM más fuerte que se conoce hasta la fecha, es decir, es una especie CAM obligada que solo fija el CO_2 durante la noche (Holtum *et al.* 2004). Mientras que *C. rosea* puede presentar valores más bajos de ácidos totales titulables como una consecuencia de estar fijando poco CO_2 durante la noche y fijar la mayor parte durante el día. Por ejemplo hojas maduras de árboles en C. rosea presentan valores cercanos a los 800 gH_2O/m^{-2} y algunas otras especies intermedias (C_3/CAM) tienen valores entre 500 y 650 gH_2O/m^{-2} como es le caso de *C. minor*. Se sabe que la suculencia es un pre-requisito morfológico que colabora en el almacenaje vacuolar de los ácidos orgánicos y que como consecuencia reduce en volumen los espacios internos de aíre, lo cual está muy relacionado con la expresión de CAM en algunas especies de *Clusia* (Borland 1998).

Por otro lado, se sugiere que valores altos de suculencia permiten una baja conductancia de CO_2 interno y que puede reducir sustancialmente la presión parcial a los sitios de carboxilación de Rubisco (Maxwell *et al.*1997). En este caso no se observaron diferencias significativas en la suculencia entre especies ni entre los tratamientos como se observa en los gráficos 3 y 6. Sin embargo, la suculencia aumentó con el tiempo y en relación con la cantidad de ácidos orgánicos, lo que sugiere una mayor proporción de vacuolas en las células para almacenar estos ácidos orgánicos. Además, se tienen más unidades de clorofila en lluvias, para realizar fotosíntesis y aprovechar al máximo su crecimiento ya que pueden capturar una mayor cantidad de fotones y así tener una mayor actividad en el PSII para la producción de

energía en las células. Por último, la expresión de carotenoides es una respuesta a la exposición a altas concentraciones de fotones, ya que estos pigmentos sirven para proteger a los fotosistemas del exceso de energía; por tanto, existe la posibilidad de que estos carotenoides estén jugando un papel importante en la disipación de energía junto al ciclo de las xantofilas para asegurar una buena descarboxilación del ácido málico y permitir una tasa de transporte de electrones en los cloroplastos adecuada (Winter et al. 1990).

Además, en las medidas de crecimiento, como es el caso del área foliar específica, podemos observar que *C. rosea* presenta un área foliar específica mayor que *C. flava* desde inicio hasta el final del experimento lo que sugiere que *C. rosea* tiene una tasa relativa de crecimiento mayor que *C. flava.* Esto sugiere que a mayor concentración de ácido hay un mayor crecimiento en las plántulas (Gráficos 5 y 8). Por último, la biomasa total (peso seco) también presenta una relación con la cantidad de ácidos orgánicos totales y resulta mayor en *C. rosea* en hojas expuestas a partir del inicio de las lluvias, por tanto, esta planta crece rápidamente en condiciones de alta disponibilidad de agua, aprovechando la cantidad de ácidos orgánicos que se están fijando durante la noche.

Por tanto, podemos concluir preliminarmente que, con base en los valores de ácidos totales titulables, *C. flava* se comporta como una especie típica CAM y que *C. rosea* es una especie intermedia regulada en su expresión de fotosíntesis por la disponibilidad de agua ya que su expresión de CAM aumentó a lo largo de la temporada de sequía. Además, concluimos que ambas especies pueden soportar un estrés severo de sequía mediante el aumento en suculencia y modificando sus pigmentos accesorios con el fin de garantizar una buena fotosíntesis para asegurar su permanencia durante el estrés y posteriormente crecer cuando las condiciones son más favorables.

Referencias

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

Arndt, K. S., Wanek W, Hoch G, Andreas R. y Popp M. 2002. Flexibility of nitrogen metabolism in the tropical C_3-crassulacean acid metabolism tree species, *Clusia minor*. Funct. Plant. Biol. 29:741-747.

Basu PS. Sharma A., Sukumaran NP. 1998. Changes in net photosynthetic rate and chlorophyll fluorescence in potato leaves induced by water stress. Photosynthetica 35:13-19.

Borland A.M. y Griffiths, H. 1996. Variations in the phases of crassulacean acid metabolism and regulation of carboxylation patterns determined by carbon isotope-discrimination techniques. in: Winter K y Smith J.A.C 1996. Crassulacean acid metabolism. Biochemistry, ecophysiology and evolution. Winter K y Smith J.A.C (edits) Springer-Verlag Berlin Heidelberg 1996.

Borland A.M., Griffiths H., Maxwell, C., Broadmeadow M.S.J., Griffiths N.M, Barnes J.D. 1992. On the ecophysiology of the Clusiaceae in Trinidad: Expression of CAM in *Clusia* minor L. during the transition from the wet to dry season and characterization of three endemic species. New Phytologist. 349-357.

Comisión Nacional para la conservación de la biodiversidad (CONABIO) 2004. Red Mexicana sobre la información de la biodiversidad. REMIB.

Correia M.J., Chaves M.C. y Pereira J. 1990. Afternoon depression in photosynthesis in grapevine leaves-evidence for a light stress effect. Journal of experimental botany 41:417-426.

Cushman, J.C. 2001. Crassulacean acid metabolism. A plastic photosynthetic adaptation to arid environments. Plant Physiology 127: 1439-1448.

D´Arcy P. 1980. Flora de Panamá. Familia Guttiferae. Annals of the Missouri botanical garden. Vol. 67: 975-993.

Duran G.F. González-Iturbe A. J. A. Granados C. J., Olmsted I., Tun Z.F. 1999. Atlas de Procesos territoriales de Yucatan. Universidad Autónoma de Yucatan. Facultad de Arquitectura.

Franco A.C., Ball E. y Lüttge U. 1990. Patterns of gas exchange and organic acid oscillations in tropical trees of the genus *Clusia*. Oecologia 85:108-114.

Franco A.C., Olivares E., Ball E., Lüttge U y Haag-Kerwer A. 1994. In situ studies of crassulacean acid metabolism in several sympatric species of tropical trees of genus *Clusia*. New Phytologist 126:203-211.

Grams T. E. E., Herzog B. y Lüttge U. 1998. Are the species in the genus *Clusia* with obligate C_3- photosynthesis? J. of Plant physiology. 152:1-9.

Gehrig H.H., Aranda J., Cushman A., Virgo A., Cushman J.C. Hammel B.E. y Winter K. 2003. Cladogram of panamaniam *Clusia* Based on Nuclear DNA: implications for the origins of Crassulacean Acid Metabolism. Plant. Biol. 5: 59-69.

Geiger DR y Servaites J.C. 1994. Diurnal regulation of photosynthetic carbon metabolism in C_3 plants. Ann. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol. 45:235-256

Greer D.H. 1998. Photoinhibition of photosynthesis in dwarf bean (Phaseolus vulgaris) leaves: effect on sink-limitations induced by changes in daily photon receipt. Planta 205:189-196.

Gustafsson M. H. Bittrich V. y Stevens P.F. 2002. Phylogeny of Clusiaceae based on rbcL sequences. Int. J. Plant. Sci. 163(6):1045-1054.

Hale M. L., Squirrel J., Borland A., Wolff Kirsten. 2002. Isolation of polimorphic microsatellite loci in the genus *Clusia* (Clusiaceae). Molecular ecology notes. 2(4)506.

Hammel, B.E. 1986. New species of Clusiaceae from central America whit notes on *Clusia* and synonymy in the tribe Clusieae. Selbyana. 9:112-120.

Hernández-Aguilar S. 1999. Flora ilustrada de la península de Yucatan. En prensa.

Ehleringer J.R. y Cerling Thure E. 2002. C_3 y C_4 photosynthesis in: The earth system: biological and ecological dimensions of global environmental change. Edit. Harold Mooney y Canadell Joseph. Encyclopedia of global environmental change. John Willey Ltd, Chichester.

Holtum J.A. 2002. Crassulacean acid metabolism. Plasticity in expression, Complexity of control. Funct. Plant. Biol. 29:657-661.

Jones H. G. 1992. Plants and microclimate. A quantitative approach to environmental plant physiology. Cambridge university press.

Kluge M y Ting P. 1978. Crassulacean acid metabolism . Analysis of an ecological adaptation. Springer, Berlin.

Leegood, R. C. 1995. Effects of temperature on photosynthesis and photorespiration. in: Smirnoff N. 1995. Environment and plant metabolism (flexibility and acclimation). Bios scientific publishers

Lüttge U. 1988. Day-night changes of citric-acid levels in crassulacean acid metabolism: phenomenon and ecological significance. Plant Cell Environment 11:445-451.

Lüttge U. 1996. *Clusia*: Plasticity and diversity in genus of C_3/CAM intermediate tropical trees. In crassulacean acid metabolism. Biochemistry, ecophysiology and evolution. Winter K y Smith J.A.C (edits) Springer-Verlag Berlin Heidelberg 1996.

Maguire B. 1979 On the Genus *Clusia* (Clusiaceae) in Mexico. Taxon. 28:13-18.

Martin C.E. Higley M, Wang W-Z (1988). Recycling of CO2 via crassulacean acid metabolism in the rock outcrop succulent *Sedum pulchellum.* Photosynthesis Res. 18:3

Medina E. 1987. Aspectos ecológicos de plantas CAM en los trópicos. Rev Biol Trop 35(Suppl):55-70. 37-343.

Ogren E., Sjostrom M. 1990. Estimation of the effect of Photoinhibition on the carbon gain in leaves of a willow canopy. Planta 181: 560-567

Osmond C.B. 1978 Crassulacean acid metabolism: a curiosity in context. Ann. Rev. Plant Physiol. 29:379-414.

Pathre U., Sinha A.K, Shirke PK, Sane PV. 1998 Factors determining the midday depression of photosynthesis in trees under monsoon climate. Trees- Structure and Function 12:471-481.

Pammenter NW, Loreto F y Sharkey T. 1993. End product feedback effects on photosynthetic electron transport. Photosynthesis research 35:5-14.

Pearcy, R. W. 1990. Sunflecks and photosynthesis in plant canopies. Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol. 41, 421-453.

Pipoly. J.J., Kearns D. y Berry P.E. 1998. *Clusia*. In Flora of the Venezuelan Guyana. Vol. 4 Caesalpinaceae-Ericaceae (Berry, P. E., Holst, B.K. y Yatskievich, K, eds.). St. Louis Missouri: Missouri botanical garden Press. pp. 260-294.

Ramírez J.J. Gordillo M .M., Valencia S.A. Duran C. R. Contreras Jiménez J. L., Moreno-Gutiérrez, Calonico-Soto J. 2003. Estudio Florístico del municipio Neri Guerrero. Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Serie Botánica 74(1): 79-142. 2003

Raschke K., Reseman A. 1986. The midday depression of CO_2 assimilation in leaves of *Arbutus unedo* L.: diurnal changes in photosynthetic capacity related to changes in temperature and humidity. Planta 168: 546-558.

Ryberg H. Axelsson L., Windell K & Virgin H. 1980. Chlorophyll b accumulation grana formation in low intensities of red light. Physiologia Plantarum. 49:431-436.

Sage R. 2002. Are crassulacean acid metabolism and C_4 photosynthesis incompatible? Funct. Plant Biol. 29:775-785.

Singaas, E., Ort D., y De lucia E. 2000. Diurnal regulation of photosynthesis in understory saplings. New Phytol. 2000 145: 39-49.

Stevens P.F. 2002. Angiosperm phylogeny. Http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/

Taiz L y Zeiger E. 1998. Plant Physiology. 2a Edi. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Sunderland, Massachusetts.

Ting I. P. 1985. Crassulacean acid metabolism. Ann. Rev. Plant. Physiol. 36:595-622.

Ting IP., Patel A., Kaur, S., Hann, J y Walling L. 1996. Ontogenetic development of crassulacean acid metabolism as modified by water stress in *Peperomia*. in: Winter K y Smith J.A.C 1996. Crassulacean acid metabolism. Biochemistry, ecophysiology and evolution. Winter K y Smith J.A.C (edits) Springer-Verlag Berlin Heidelberg 1996.

Ting I.P., Lord E.M., Stenberg L. da S. L y De Niro M. 1985. Crassulacean acid metabolism in the strangler *Clusia* rosea. Science. 229:969-971.

Ting I.P., Hann J., Holmbrook, N.M., Putz, F. E., Stenberg, L. da S.L., Price, D. y Goldstein G. 1987. Photosynthesis in hemi-epiphytic species of *Clusia* and Ficus. Oecologia. 74:339-346.

Tinoco-Ojuanguren C. y Vásquez Yánez C. 1983. Especies CAM en la selva húmeda tropical de los Tuxtlas Veracruz. Boletín de la sociedad mexicana de botánica de México. 45:150-153.

Valentini R. Epron D., De angelis P., Matteucci G y Dreyer E. 1995. In situ estimation of net CO_2 assimilation photosynthetic electron flow and photorespiration in Turkey oak (Q. cerris) leaves: diurnal cycles under different levels of water supply. Plant cell and environment 18:631-640.

Vassen, A., Begerow, D., Lüttge U y Hammp R. 2002. The genus *Clusia* L. molecular evidence for independent evolution of photosynthetic flexibility. Plant biology. 4:86-93.

Virzo de Santo A. y Bartoli G. 1996. Crassulacean acid metabolism in Leaves and stems *Cissus quadrangularis*. in: Winter K y Smith J.A.C 1996. Crassulacean acid metabolism. Biochemistry, ecophysiology and evolution. Winter K y Smith J.A.C (edits) Springer-Verlag Berlin Heidelberg 1996.

Wanek, W. Hubert W., Arndt, S.K. y Popp, M. 2002. Mode of photosynthesis during different life stages of hemiepiphytic *Clusia* species. Funct. Plant. Biol. 29:725-732.

Winter K., Osmond CB y Hubick KT (1986) Crassulacean acid metabolism in the shade. Studies on an epiphytic Fern, Pyrrosia longifolia. and other rainforest species from Australia. Oecologia 68: 224-230.

Winter K y Smith J.A.C 1996. Crassulacean acid metabolism. Biochemistry, ecophysiology and evolution. Winter K y Smith J.A.C (edits) Springer-Verlag Berlin Heidelberg 1996.

Winter K. y Holtum J.A.M. 2002. How closely do the δ^{13} C values of crassulacean acid metabolism plants reflect the proportion of CO_2 fixed during day and night? Plant Physiology 129, 1843-1851.

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

Winter, K., Zotz, G., Baur, B y Dietz K-J. 1992. Light and dark CO_2 fixation in *Clusia uvitana* and the effects of plant water status and CO_2 availability. Oecologia. 91:47-51.

Wise R., Sparrow D., Ortiz López A. 1991. Biochemical regulation during the mid-day decline of photosynthesis in field-grown sunflower. Plant science 74:45-52.

Zotz, G. y Winter K. 1993. Short term regulation of crassulacean acid metabolism activity in a tropical hemiepiphyte, *Clusia uvitana.* Plant Physiology. 102: 835-841.

Discusión general

Con los resultados del primer capítulo se pudo determinar un total de 18 especies del género *Clusia*. Sin embargo, es muy probable que el número de especies aumente ya que muchos ejemplares no están bien determinados y hace falta crear las herramientas para una mejor identificación de las especies del género en México. Hasta el momento se conoce que estas 18 especies tienen un amplio rango de distribución, desde las dunas costeras hasta las selvas altas y los bosques templados (como es el caso de *Clusia flava* y *Clusia salvinii).*

Al comparar los valores de $\delta^{13}C$ en todas las muestras de herbario, se pudo observar que la mayoría de especies que conforman al género en México presentan una tendencia a la fotosíntesis de tipo intermedia C_3/CAM, con una menor proporción de especies CAM estrictas como: *C. flava*, *C. chanekiana* y *C. tetra-trianthera* y muy pocas especies C_3 como *C. salvinii*, *C. massoniana* y *C. stenophylla*. La distribución de estas especies en distintos tipos de vegetación del neotrópico como dunas costeras, bosques secos y húmedos concuerda con lo reportado en distintos países, como Brasil, Venezuela, Panamá, Costa rica, Guatemala y Belice (Hammel, 1986; Pipoly *et al.*1998; Lopes & Machado 1998).

Aunque hay una menor proporción de especies que en otros países por ejemplo en Brasil se reportan alrededor de 67 especies en su gran mayoría son dioicas (Lopes & Machado 1998; Bittrich y Amaral 1997); mientras que en Venezuela se reportan 80 especies y tan sólo 68 en las Guyanas (centro de origen del género) donde se tiene la mayor radiación de especies endémicas (Pipoly *et al.*, 1998). En el caso de Panamá se reportan alrededor de 40 especies (Gehrig *et al.*, 2003). Mientras que en lugares como Guatemala y Belice no se tiene un número aproximado de especies, pero se estima que hay unas 15 y 9 respectivamente (INAB, 2007; Balick *et al.*, 2000). Cabe destacar que de las 18 especies nativas de México descritas en este estudio, se tiene una especie endémica: *C. tetra-trianthera* (Maguire 1979). En el caso de *C. salvinii,* la especie más ampliamente distribuida en el país, se tiene una característica especial, ya que es la única especie que ocurre en bosques templados de pino-encino, donde las temperaturas invernales pueden ser muy bajas, por lo que se suma un tipo más de vegetación colonizado por el género.

Al comparar la distribución altitudinal de las 18 especies, se pudo observar que las especies con fotosíntesis CAM tienen mayor preferencia por

altitudes menores a los 1000 m, principalmente en ambientes secos como las dunas costeras y las selvas bajas. Con dos excepciones como *C. tetra-trianthera* y *C. flava* en el Estado de Chiapas las cuales se encuentra a más de 1300 m de altitud en un ambiente húmedo de selva alta. Se ha reportado que uno de los grandes problemas a los que se enfrentan las especies de plantas tropicales cuando se distribuyen a grandes altitudes, es el gasto de energía para la regulación de su temperatura foliar, ya que se pueden tener temperaturas bajo cero durante la noche y altas temperaturas durante el día, situación que se ve reflejada también en los cambios estacionales (Lüttge 2004). Aunque todavía existen interrogantes acerca del funcionamiento del metabolismo ácido a grandes altitudes, se han reportado algunas especies de *Clusia* que encuentran entre los 1300 - 1700 m de altitud, como en la cordillera de Venezuela donde las especies CAM puede ser observada a los 1500 m y no por encima de esta altitud., (Diaz *et al.*, 1996), misma situación a la observada en este trabajo con *C. flava y C. tetra trianthera.* Una condición más, que puede ser representativa para la distribución de las especies del género a grandes altitudes, parece ser la talla enana que alcanzan sus individuos, como sucede con una especie (sin determinar) en el volcán San Martin Tuxtla en Veracruz, México y algunas especies de Sudamérica como *C. cajamarcensis,* distribuida entre los 2700-300 m altitud en Perú (León 2006), *C. latipes* a 2300 m y *C. alata* (CAM) a 2600 m en Bolivia (Patiño y Bussmann 2004).

Por tanto, se ha observado que no es una regla que las especies CAM se distribuyan por debajo de los 1000 m; ya que pueden alcanzar inclusive los 2600 m y que la baja productividad o tamaño pequeño de algunos individuos que crecen a altitudes superiores, pueden estar asociadas a ambientes de clima frio. Esto se ve reflejado en una menor disponibilidad de agua, lo que limitaría el desarrollo y crecimiento de los individuos, ya que habría un efecto directo sobre el balance hídrico y de carbono; debido a esto se tendrían menores tasas de transpiración y por consiguiente un efecto directo sobre la conductancia estomática, que reduciría inmediatamente la ganancia en asimilación de carbono (Körner, 1998); En especies CAM un cierre de estomas reflejaría un mayor reciclaje de CO_2 y un nulo o muy bajo crecimiento, lo que podría dar explicación a las tallas pequeñas a grandes altitudes. Esta situación no la enfrentan las especies con fotosíntesis C_3 y C_3/CAM, ya que en este estudio se obtuvo que la mayoría de las especies se distribuyen desde los 0 hasta los 2800 metros de altitud, al igual que otros árboles con fotosíntesis C_3. Esta diferencia entre la mayor distribución de especies C_3 a mayores altitudes, que

especies CAM en *Clusia* puede estar asociada con que, a mayores altitudes la difusión del CO_2 desde las células del mesófilo hasta el sitio de carboxilación es menor, por lo tanto, un descenso en la difusión del CO_2 en plantas distribuidas a grandes altitudes puede tener como consecuencia una baja conductancia estomática y por tanto, una menor asimilación de carbono que se verá reflejada en el crecimiento de las plantas (Körner 2000).

Durante algún tiempo se pensó que existía una relación entre la forma de vida y la expresión de CAM, sin embargo, nosotros observamos que esto no es una regla; ya que las hemiepífitas no tienen un tipo de fotosíntesis diferente a la de los árboles, puesto que los valores de $\delta^{13}C$ son iguales en las especies que presentan estas 2 formas de vida.

Esta misma situación se observa en especies de *C. flava* en la Península de Yucatán en las localidades de Calakmul y Xocén donde los árboles, no son diferentes en el tipo de fotosíntesis de las hemiepífitas; es decir *C. flava* presenta fotosíntesis CAM de manera independiente a la forma de vida. Esta situación ya ha sido reportada para otras especies del género como es el caso de algunas especies de Costa Rica (Wanek *et al.*, 2002) y de especies nativas de Panamá, es decir, no existe ninguna relación entre la forma de vida y el tipo de fotosíntesis (Holtum 2004).

Para *C. flava* su tipo de fotosíntesis no cambió ni entre forma de vida, ni entre las estaciones del año, como se observó en árboles adultos en la reserva de Calakmul, Campeche, en la selva mediana sub-caducifolia de Xocén, Yucatán y la selva baja inundable de Felipe carrillo Puerto en Quintana Roo. La misma situación se observó al medir el intercambio de gases en individuos juveniles, y la alta producción de ácidos totales en plántulas de la misma especie; donde siempre prevaleció la fotosíntesis CAM, por lo que esta especie es considerada CAM estricta, es decir sólo obtiene su ganancia de carbono durante la noche.

En este trabajo los valores de $\delta^{13}C$, la asimilación de CO_2 y la alta producción nocturna de ácidos orgánicos son datos suficientes para confirmar que *C. flava* sea considerada una de las especies CAM más estrictas o fuertes en la expresión de esta fotosíntesis, ya que su producción nocturna de ácidos totales es muy superior a la de muchas otras especies CAM, inclusive dentro de su mismo género (Holtum *et al.,* 2004). En este estudio se compararon dos especies más: *C. guatemalensis* y *C.*

chanekiana en un mismo ambiente con *C. flava* y no se observaron diferencias en la producción de ácidos orgánicos entre las especies, por lo que es muy probable que estas otras especies que se encuentran coexistiendo en una selva baja inundable tengan fotosíntesis CAM. De la misma manera que *C. flava* estas dos especies no cambiaron su ruta fotosintética con respecto a los cambios ambientales dados por la estación del año, pero, si modificaron algunos parámetros fisiológicos y morfológicos como el contenido de clorofilas, la suculencia y el área foliar específica para optimizar su crecimiento cuando existe la disponibilidad de agua.

Por último, al comparar plántulas de dos especies consideradas como CAM estrictas en la fase adulta (*C. flava* y *C. rosea)* en condiciones de ausencia y disponibilidad de agua estacional, se pudo observar que *C. flava* mantiene su fotosíntesis CAM, mientras que plántulas de *C. rosea* pueden realizar fotosíntesis intermedia, es decir fijar CO_2 durante el día y durante la noche (C_3/CAM) cuando hay disponibilidad de agua, pero, fijar CO_2 sólo durante la noche (CAM) en ausencia de agua como lo reportan Ting *et al.*, 1987; Schmitt *et al.*, 1988; y Ball et al., 1991. De esta manera, las plántulas de *C. rosea* tienen un mayor crecimiento que las plántulas de *C. flava* debido a la estrategia en la fijación de CO_2; pero ambas son capaces de resistir períodos largos de sequía debido a su estrategia fotosintética. Esto les confiere una ventaja muy grande para poder sobrevivir a una de las fases más críticas en el desarrollo de las plantas. Además los resultados que se han obtenido en este trabajo, ayudaran para comprender las etapas de floración, fructificación y establecimiento de plántulas en la Península. Ya que este es el primer trabajo que se encarga de describir el número de especies, su distribución y algunos aspectos de la fenología que pueden colaborar para trabajos de distintas áreas como son la ecología de comunidades, la ecología y genética de poblaciones, entre otras. Por tanto, este trabajo tiene como relevancia entre otros aspectos: que los distintos tipos de fotosíntesis que presenta el género, y la relación que estos tienen en las distintas fases de crecimiento de estas plantas, pueden favorecerle para sobrevivir dentro de las comunidades de la península de Yucatán bajo las distintas condiciones ambientales que se presentan en esta región. Por último, la información recabada y obtenida con los distintos experimentos puede servir para realizar un manejo adecuado para la conservación de especies del género, ya que muestran detalles básicos sobre su establecimiento, desarrollo en sus distintas etapas y formas de vida.

Conclusiones

- En México se tienen 24 especies del género *Clusia*, de las cuales 18 están bien descritas taxonómicamente, y existen otras 6 para las cuales no hay elementos suficientes para determinarlas.
- La mayoría de estas especies presentan fotosíntesis intermedia (C_3/CAM).
- Las especies C_3 e intermedias se distribuyen desde los 0 hasta los 2800 m de altitud.
- Las especies CAM están restringidas a alturas por debajo de los 1000 m, con excepción de *C. flava* y *C. tetra-trianthera.*
- Este estudio confirma que la forma de vida no tiene relación con el tipo y expresión de la ruta de fotosíntesis.
- En la península de Yucatán, *C. flava y C. chanekiana* son especies CAM fuertes, y es probable que *C. guatemalensis* sea CAM débil.
- *C. rosea* en etapa de plántula se comporta como una especie intermedia (C_3/CAM), mientras que en esta etapa *C. flava* es CAM estricta.

Perspectivas

Del estudio realizado es evidente la importancia de conocer las especies con las que se está llevando a cabo la investigación, con el fin de dar una explicación más amplia sobre el comportamiento de las especies del género *Clusia*; sobre todo al tener tantas especies capaces de presentar diferentes tipos de fotosíntesis. Por lo que se propone crear una base de datos, una colección de herbario y generar claves de identificación taxonómica para las especies de *Clusia* en México.

También es importante conocer los aspectos ecofisiológicos de las especies en sus fases adulta, juvenil y de plántula para discernir las variables ambientales que determinan las respuestas de flexibilidad fotosintética entre las distintas estaciones del año y en cada comunidad vegetal.

Otro aspecto importante y que requiere de gran atención es el estudio poblacional, el cual ayudará a conocer aspectos intrínsecos de las poblaciones; los cuales pueden asociarse a procesos de genética de poblaciones y a su vez explicar la plasticidad fenotípica y fisiológica de las especies.

Proponer a las especies del género como plantas ornamentales ya que requieren de muy pocos cuidados, debido a su resistencia a grandes periodos de sequía; Además realizar más estudios a nivel fisiológico con el fin de investigar el potencial de este género para la restauración de ambientes perturbados, debido a su gran eficiencia para tolerar ambientes con altos niveles de estrés hídrico.