

**Universidad de los Andes  
Facultad de Ciencias  
Departamento de Biología  
Instituto de Ciencias Ambientales y Ecológicas (ICAE)  
Centro Jardín Botánico de Mérida (CJB)**

**Relación entre anatomía foliar, forma de vida y mecanismos  
de resistencia a temperaturas congelantes en diferentes  
especies en el Páramo de Piedras Blancas.**

Carmen Julia Azócar Durán

**Tutores:**

Fermín Rada, ICAE

Rebeca Luque, CJB

**Mérida, Febrero de 2006**

Este trabajo fue realizado en el Instituto de Ciencias Ambientales y Ecológicas y el Centro Jardín Botánico de Mérida, bajo la tutoría del **Dr. Fermín Rada** y la cotutoría de la **Dra. Rebeca Luque**. Fue financiado parcialmente por el CDCHT ULA a través del proyecto **C-1292-04-01-F**

*A la Negra y al Catire*

## AGRADECIMIENTOS

Con este trabajo culmina mi carrera, que ha sido una experiencia única y enriquecedora desde muchos puntos de vista; he tenido la dicha de estar rodeada de gente maravillosa y es este un momento propicio para expresarles mi agradecimiento:

- A Dios, porque para mi Existe y Está muy cerca, regalándome oportunidades, bendiciones e innumerables lecciones... como ésta.
- A mi familia por el amor, el apoyo y el ejemplo...
- Al Prof. Fermín Rada, porque, además de ser el tutor de este trabajo, estuvo siempre dispuesto a ayudarme y a aclarar mis dudas (las grandes y las pequeñas), con una amabilidad y una disposición que superaron mis expectativas... gracias profe.
- A la Prof. Rebeca Luque, cotutora de este trabajo, por acentuar más en mi el amor a las plantas y por acogerme y brindarme su apoyo en buena parte de mi carrera.
- A Josefina Peraza por enseñarme a “caminar” dentro del laboratorio... y por tantos buenos ratos y tantos buenos consejos.
- A mis amigos de siempre Yani, Iula, Migue, Oswaldito, David, y a los más recientes, el Raga, la Xime, Kike y Nelson, por todo lo compartido: las alegrías, las tristezas, los sueños... el cariño! y a Leo H. por estar pendiente y darme su ayuda con los grafiquitos...
- A Toño, quien ha estado a mi lado estos últimos tiempos, brindándome su compañía, su apoyo y su cariño...
- A la gente del ICAE y del Centro Jardín Botánico, y en especial a Giuseppe Adamo, a Francisca Ely y al Prof. Javier Estrada, por tratar de ayudarme a resolver “las pequeñas dudas”.
- A los Profs. Carlos García, Roberto Skwierinski y María Vielma, jurados de este trabajo, por sus observaciones durante el desarrollo del mismo.
- A Sioly por su devoción a los estudiantes y a mis compañeros de carrera...

A todos ustedes: Gracias!.. Pero, además de agradecerles, quisiera hacerles una pequeña advertencia... y es que, mi camino apenas comienza y espero seguir contando con ustedes en el futuro....

Carmen J.

## RESUMEN

El desarrollo de las plantas en alta montaña está limitado por componentes físicos del ambiente, estos factores pueden llegar a crear condiciones de estrés para estos organismos. Entre los factores más importantes se encuentran las bajas temperaturas (heladas y congelamiento). En zonas templadas el congelamiento se concentra principalmente en la época de invierno, el patrón de ocurrencia de estos períodos hace que los mismos no resulten tan críticos para las plantas, ya que éstas centralizan su crecimiento y reproducción en períodos térmicos más favorables (primavera y verano). Sin embargo, en alta montaña tropical las temperaturas congelantes pueden ocurrir cualquier día del año, por esta razón, las plantas que habitan estos ambientes deben mantener un estado fisiológico y tener las adaptaciones morfológicas necesarias para resistir esas condiciones térmicas durante todo el año, manteniendo además, funciones básicas como la reproducción y el crecimiento.

Se estudió el mecanismo de resistencia al congelamiento en individuos de ocho especies, leñosas y herbáceas, pertenecientes al estrato intermedio en la vegetación del Páramo de Piedras Blancas (4200m) y se estudió la anatomía foliar de cuatro de ellas para encontrar caracteres anatómicos que estuvieran relacionados con el mecanismo de resistencia utilizado por la especie, y por otro lado, se buscó la correspondencia entre el carácter leñoso o herbáceo de la planta y dicho mecanismo.

Se encontró que de las ocho especies, solo dos son evasoras (*Hinterbubera lanuginosa* e *Hypericum laricifolium*) mientras que las otras seis (*Castilleja fissifolia*, *Lasiocephalus longipenicillatus*, *Monticalia salerosa*, *Senecio formosus*, *Senecio funckii* y *Valeriana parviflora*) son tolerantes al congelamiento, lo cual sugiere que no existe relación entre la forma de vida y el mecanismo de resistencia, ya que se esperaba que las especies leñosas (*M. sclerosa* y *V. parviflora*) fueran especies evasoras al congelamiento. Se encontró también una serie de características morfológicas y anatómicas que

podrían estar relacionados con el mecanismo de resistencia, como por ejemplo, el área foliar específica (AFE), el tamaño celular y el tamaño de los espacios intercelulares. Asimismo, se evidenciaron caracteres que son comunes a las cuatro especies, como la pubescencia y la presencia ciertas sustancias como de grasas y taninos, sobre todo a nivel de epidermis.

## ÍNDICE GENERAL

<b>Sección I: Introducción.-</b> .....	<b>1</b>
1. Introducción.....	2
2. Hipótesis.- .....	10
3. Objetivos: .....	10
Objetivo general: .....	10
Objetivos específicos: .....	11
<b>Sección II: Metodología.-</b> .....	<b>12</b>
1. Área de estudio.-.....	13
2. Especies estudiadas.- .....	16
3. Microclima .....	17
4. Mecanismos de Resistencia.- .....	18
4.1. Análisis térmico. ....	18
4.2. Determinación de temperatura de daño. ....	19
5. Área foliar y área foliar específica.- .....	20
6. Estudios anatómicos.- .....	21
6.1. Cortes.....	21
6.2. Obtención de epidermis.- .....	22
6.3. Pruebas microquímicas.- .....	22
6.4. Tamaños celulares.- .....	24
6.5. Densidad estomática.- .....	24
7. Análisis estadístico.- .....	24
7.1. Mecanismos de resistencia.- .....	24
7.2. Estudios anatómicos.- .....	24
<b>Sección III: Resultados.....</b>	<b>26</b>
1. Microclima.-.....	27
2. Mecanismos de resistencia.-.....	32
2.1. Congelamiento y daño.....	32
3. Área foliar y área foliar específica.-.....	35

4. Anatomía foliar.....	36
4.1. Descripción anatómica.....	36
<i>Castilleja fissifolia</i> .....	36
<i>Senecio formosus</i> .....	38
<i>Hinterhubera lanuginosa</i> .....	40
<i>Hypericum laricifolium</i> .....	42
4.2. Pruebas microquímicas.....	44
4.3 . Áreas celulares.....	45
4.4. Densidad estomática e Índice estomático.....	47
<b>Sección IV: Discusión.-</b> .....	<b>48</b>
1. Microclima.-.....	49
2. Mecanismos de resistencia.-.....	51
3. Área foliar y área foliar específica.- .....	54
4. Anatomía foliar.-.....	55
5. Conclusiones generales:.....	58
<b>Sección V: Bibliografía.-</b> .....	<b>59</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS Y LÁMINAS

<b>Figura II-1.</b> Ubicación del área de estudio.....	13
<b>Figura II-2.</b> Climadiagrama de Pico El Águila Edo. Mérida. ....	14
<b>Figura II-3.</b> Vista general de Piedras Blancas. ....	15
<b>Figura II-4.</b> Proceso de congelamiento en tejidos vegetales.....	19
<b>Figura II-5.</b> Modelo de curva de daño. Datos obtenidos en este trabajo en tallos de la especie <i>Valeriana parviflora</i> .....	20
<b>Figura III-1.</b> Temperaturas máximas (●), mínimas (●) y promedios (●) diarias a nivel de aire en época seca y época húmeda. ....	27
<b>Figura III-2.</b> Temperaturas máximas (●), mínimas (●) y promedios (●) diarias a nivel de suelo protegido en época seca y época húmeda. ....	29
<b>Figura III-3.</b> Temperaturas máximas (●), mínimas (●) y promedios (●) a nivel de suelo desnudo en época seca. ....	30
<b>Figura III-4.</b> Porcentaje de días con temperaturas por debajo de los 0 ° C a nivel de aire suelo protegido y suelo desnudo para época seca y época húmeda. ....	31
<b>Figura III-5.</b> Porcentaje de absorbancia a 530 nm a distintas temperaturas en hojas. ....	32
<b>Figura III-6.</b> Porcentaje de absorbancia a 530 nm a diferentes temperaturas en tallos. ....	33
<b>Lámina 1.</b> <i>Castilleja fissifolia</i> . ....	37
<b>Lámina 2.</b> <i>Senecio formosus</i> . ....	39
<b>Lámina 3.</b> <i>Hinterhubera lanuginosa</i> . ....	41
<b>Lámina 4.</b> <i>Hypericum laricifolium</i> . ....	43

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla III-1.</b> Temperaturas mínimas y máximas absolutas y promedios $\pm$ error estándar a nivel de aire en época seca y época húmeda. ....	28
<b>Tabla III-2.</b> Temperaturas mínimas y máximas absolutas y promedios $\pm$ error estándar a nivel del suelo protegido por vegetación en época seca y época húmeda. ....	29
<b>Tabla III-3.</b> Temperaturas máximas y mínimas absolutas y promedios a nivel de suelo desnudo para época seca. ....	31
<b>Tabla III-4.</b> Temperaturas de daño $\pm$ error estándar calculados para tallos y hojas .....	34
<b>Tabla III-5.</b> Temperaturas de sobreenfriamiento, temperaturas de daño en hojas $\pm$ error estándar y mecanismos de resistencia a temperaturas congelantes para cada una de las especies. ....	35
<b>Tabla III-6.</b> Área foliar (AF) y área foliar específica (AFE) $\pm$ error estándar calculados para cada una de las especies. ....	36
<b>Tabla III-7.</b> Resumen de resultados de pruebas microquímicas.....	45
<b>Tabla III-8.</b> Áreas celulares promedio de las epidermis adaxial y abaxial $\pm$ error estándar de cada una de las especies en vista paradormal.....	46
<b>Tabla III-9.</b> Áreas celulares promedio de las epidermis adaxial y abaxial $\pm$ error estándar de cada una de las especies en vista transversal. ....	46
<b>Tabla III-10.</b> Áreas celulares promedio del parénquima en empalizada y del parénquima esponjoso $\pm$ error estándar de cada una de las especies en corte transversal. ....	46
<b>Tabla III-11.</b> Densidad estomática calculada para cada una de las especies. ....	47

## **Sección I: Introducción.-**

## **1. Introducción.**

Las plantas son organismos incapaces de desplazarse de un lugar a otro en busca de ambientes más adecuados para su desarrollo, por esa razón, con frecuencia están sometidas a condiciones de estrés medioambiental (Azcón-Bieto y Talón, 2000). Según estos mismos autores, esa inmovilidad es el factor que determina que las plantas hayan desarrollado mecanismos adaptativos que les permiten habitar ambientes muy diversos, y así han conseguido colonizar casi todos los ambientes de la Tierra, independientemente de la altitud y de la latitud de los mismos.

La vida en alta montaña está limitada por componentes físicos del ambiente (Körner, 1999); estos factores llegan a crear condiciones de estrés para las plantas. Dentro de los factores más importantes podemos mencionar: déficit de agua, salinidad, deficiencia de oxígeno, altas y bajas temperaturas (heladas y congelamiento) (Larcher, 1995; Taiz y Zeiger, 2002). El estrés es usualmente definido como la exposición a un factor externo que supone una condición extraordinariamente desfavorable para la planta (Larcher, 1995).

En zonas templadas los períodos de congelamiento se concentran principalmente en la época de invierno, el patrón de ocurrencia de estos períodos hace que los mismos no resulten tan críticos para las plantas, ya que éstas centralizan sus períodos de crecimiento y reproducción en períodos térmicos más favorables (primavera y verano). En estos lugares

ocurre un proceso conocido como “endurecimiento” (*hardening*), que es equivalente a la aclimatación. Es bien sabido que las plantas tienen un estado fisiológico óptimo y característico para las condiciones particulares a las que están expuestas. Cuando las condiciones ambientales cambian, por ejemplo con el cambio de estaciones, ocurre una acomodación del metabolismo celular que conduce a la reparación de la maquinaria celular dañada y a la expresión de adaptaciones adecuadas. Este proceso ocurre posterior a una fase inicial o de alarma, que tiene lugar cuando la planta recibe un estímulo, como por ejemplo, la disminución de la temperatura. Los nuevos cambios producidos permiten alcanzar un nuevo estado fisiológico óptimo que dan a las plantas un mayor grado de resistencia (Larcher, 1995; Azcón-Bieto y Talón, 2000; Taiz y Zeiger, 2002). Este proceso no ocurre en alta montaña tropical debido a que las diferencias de temperatura entre los doce meses del año no exceden los 3 °C, sin embargo, pueden ocurrir diferencias de hasta más de 10 °C en un curso diario (Sarmiento, 1986) y las temperaturas congelantes pueden ocurrir en cualquier época del año, entonces, no solo la ocurrencia de las temperaturas congelantes sino la frecuencia a la que ocurren constituyen el factor climático más estresante que deben enfrentar las plantas en estos ambientes (Rundel, 1994). Por esta razón, deben permanecer en un estado fisiológico activo y tener las adaptaciones morfológicas necesarias para resistir esas condiciones térmicas durante todo el año, manteniendo además, funciones básicas como la reproducción y el crecimiento.

En los Andes venezolanos los límites de la zona periglacial, la cual es la zona afectada por temperaturas congelantes diarias u ocasionales, se encuentra entre los 3600 y los 4700 m. Por encima de los 4100 m (piso periglacial) se evidencian ciclos de congelamientos nocturnos-descongelamientos diurnos muy frecuentes (Schubert, 1980; Monasterio y Molinillo, 2003).

Como respuesta a esta condición puede evidenciarse en las plantas un alto nivel de especialización, que se manifiesta en el desarrollo de una amplia variedad de mecanismos que les permiten sobrevivir en hábitats expuestos a períodos de congelamiento.

Los mecanismos de resistencia a bajas temperaturas se clasifican fundamentalmente en mecanismos de evasión, en los cuales las plantas responden reduciendo el impacto de las bajas temperaturas, y mecanismos de tolerancia, en donde las plantas resisten este factor adverso (Levitt, 1972).

Según Körner (1999) estos mecanismos se dividen de la siguiente manera: 1) Evasión a la exposición a bajas temperaturas, 2) Evasión al congelamiento de tejidos expuestos, 3) tolerancia al congelamiento y 4) sustitución de tejidos dañados.

Entre los mecanismos de evasión a la exposición se encuentran: la fenología (en montaña extratropical), la forma de vida, las estructuras aislantes y la preferencia de microhábitat (Körner, 1999; Schulze *et al*, 2005).

La evasión al congelamiento se logra a través de dos vías: ajuste osmótico y superenfriamiento. El ajuste osmótico consiste en la acumulación

de solutos, en general, azúcares, de esta manera el punto de congelamiento disminuye. El superenfriamiento se logra a través del retraso de la formación de cristales de hielo (nucleación), lo cual permite que los tejidos enfríen sustancialmente por debajo del punto de congelamiento. Este retraso se logra a través de la ausencia de sustancias que inicien el proceso de cristalización, por la compartimentación del agua en el interior de las células (vacuolas), por la impregnación de las paredes celulares con lignina o por la estructura específica del agua en las soluciones (Levitt, 1972; Larcher, 1995; Körner, 1999; Schulze *et al*, 2005).

Cuando se habla de congelamiento en tejidos vegetales, se hace referencia a la formación de cuerpos de hielo en los espacios intercelulares, ya que la formación de estos cuerpos en el interior de la célula ocasionan la muerte de la misma. La formación de hielo en los espacios intercelulares se ve favorecida principalmente por el alto punto de congelamiento de la solución presente en estos espacios, en comparación con el contenido celular, que, por tener mayor concentración de solutos presenta un punto de congelamiento más bajo. La membrana celular también juega un papel de aislante impidiendo la formación del hielo en el interior de la célula (Levitt, 1972).

Cuando comienza la formación de hielo en los espacios intercelulares, la presión de vapor en los mismos cae abruptamente, este gradiente de presión favorece el paso de agua desde el interior de la célula hacia el exterior. La tolerancia al congelamiento se logra básicamente resistiendo el déficit hídrico

que se genera por esta transferencia de agua desde la célula hacia los cuerpos de hielo que se forman en el exterior de la misma (Asahina, 1978; Körner, 1999).

Ambos tipos de mecanismos, tolerancia y evasión al congelamiento, han sido observados en plantas que habitan tanto ambientes de alta montaña tropical como extratropical (Azócar *et al.*, 1988; Squeo *et al.*, 1991, 1996). Squeo *et al* (1991) trabajaron con 14 especies pertenecientes a tres estratos diferentes de vegetación para estudiar la relación existente entre altura de la planta y mecanismo de resistencia a temperaturas congelantes; encontrando que especies arborescentes tienden a ser evasoras, mientras que las especies que crecen cercanas al suelo tienden a ser tolerantes debido a que el microhábitat térmico en este estrato es más riguroso. Esta “rigurosidad” se debe principalmente a que el suelo recibe mucha radiación durante el día y, por ser una superficie oscura, refleja muy poco. En períodos largos de irradiación, las temperaturas pueden sobrepasar los 50 °C a nivel de superficie. Por las noches, este calor es emitido, de manera que su temperatura disminuye, incluso por debajo de 0 °C (Schulze *et al.*, 2005). Sin embargo, para las especies de nivel intermedio no se encuentra un único tipo de mecanismo, sino que son evasoras algunas y tolerantes otras. Argumentan a este resultado el hecho de que en este estrato las condiciones también son intermedias y que el tipo de mecanismo utilizado pareciera estar más bien relacionado con la forma de vida, ya que encuentran que las

plantas de condición herbácea tienden a ser tolerantes y las plantas leñosas a ser evasoras.

La hoja es el órgano de mayor plasticidad anatómica y funcional de la planta, que muestra especialización como órgano fotosintético (Esau, 1967; Fahn, 1978; Flores-Vindas, 1999). Factores ambientales, como el déficit de agua, de nutrientes y la temperatura, pueden inducir modificaciones en la estructura de estos órganos (Esau, 1967). Según Haberlandt (1965) existe conexión entre las numerosas funciones de un organismo y el arreglo anatómico requerido para tales fines, entonces, podría pensarse que, siendo la hoja el órgano más plástico de las plantas, los cambios anatómicos inducidos por factores ambientales podrían evidenciarse en dicha estructura.

Las plantas tolerantes a temperaturas congelantes son, como se dijo anteriormente, tolerantes al déficit hídrico, debido a la transferencia de agua desde el protoplasto hasta cuerpos crecientes de hielo en los espacios intercelulares; además, deben minimizar el sobreenfriamiento de la solución extraprotoplástica de manera de garantizar que se exporte suficiente cantidad de agua a estos espacios para evitar el congelamiento intracelular (Beck, 1994; Körner, 1999). Esta tolerancia al déficit hídrico hace entonces que muchas de ellas suelen **mostrar** caracteres xeromórficos, que son más o menos acentuados dependiendo de la especie y de las condiciones ambientales a las cuales están sometidas.

Las características anatómicas más resaltantes que exhiben las plantas como adaptación a situaciones de déficit hídrico, son, entre otras, un

parénquima en empalizada bien desarrollado, incluso más que el esponjoso, y menores espacios intercelulares, de manera de reducir la superficie interna expuesta. Estas adaptaciones conducen además a una menor relación entre la superficie externa foliar y su volumen, teniendo entonces hojas más pequeñas (Esau, 1967; Fahn, 1978; Flores-Vindas, 1999); esto se traduce en menores áreas foliares y menores áreas foliares específicas.

Cuando varias especies que difieren en resistencia son comparadas, frecuentemente se encuentra que dicha resistencia varía inversamente con las características de tamaño de las plantas, como por ejemplo, altura, longitud de la hoja, longitud de los entrenudos y especialmente el tamaño celular (Levitt, 1972). En base a esta información puede evidenciarse que existen diversos precedentes para este trabajo; sin embargo, es interesante analizar un poco más las relaciones forma-función de especies que crecen a elevada altitud, es decir, encontrar la correspondencia entre su anatomía y los mecanismos que utilizan para adaptarse a situaciones de congelamiento. Según Carlquist (1994) existen relativamente pocos estudios anatómicos en plantas de alta montaña y resultan particularmente escasos los trabajos comparativos analizados en términos ecológicos.

En este trabajo se estudió la anatomía foliar de especies colectadas en el Páramo de Piedras Blancas, el cual es uno de los más altos en los Andes Venezolanos (Squeo *et al.*, 1991) con el fin de observar, por un lado, si es posible encontrar alguna característica de la anatomía foliar que esté relacionada con los mecanismos de resistencia a bajas temperaturas en cada

una de ellas; y, por otro lado, si existe correspondencia entre el carácter leñoso o herbáceo de la planta y su mecanismo de resistencia. Cabe destacar además que son pocos los estudios anatómicos realizados a estas especies y los existentes tienen un carácter casi en su totalidad descriptivo.

## **2. Hipótesis.-**

- Ya que una determinada función está relacionada con un arreglo anatómico necesario para llevarla a cabo, deben existir algunas características anatómicas en la hoja relacionadas directamente con el mecanismo de evasión o tolerancia al congelamiento que posee la especie.
- En estudios anteriores se ha encontrado la tendencia de especies leñosas a ser evasoras mientras que las especies herbáceas tienden a ser tolerantes al congelamiento. Se espera que especies arbustivas posean mecanismos de evasión y que especies con menor cantidad de tejido leñoso, hierbas y sufrútices, sean tolerantes al congelamiento.

## **3. Objetivos:**

Objetivo general:

Estudiar, para diferentes especies, leñosas y herbáceas, si existen características anatómicas en la hoja que se relacionen directamente con sus mecanismos de resistencia a bajas temperaturas.

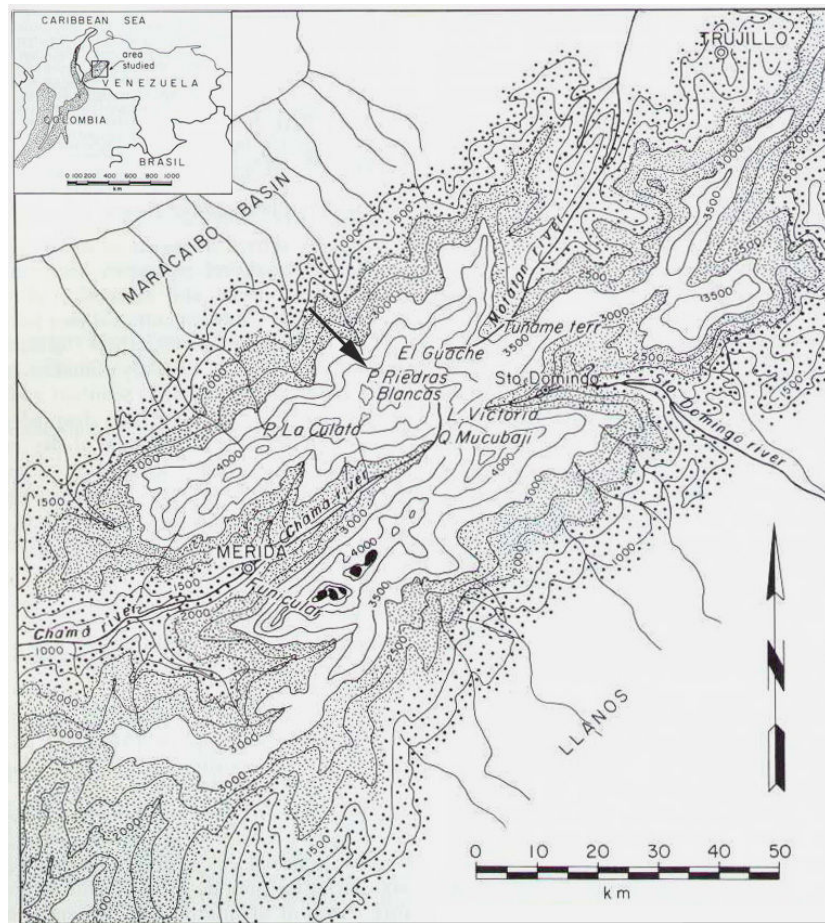
Objetivos específicos:

- Estudiar el mecanismo de resistencia a temperaturas congelantes de ocho especies, leñosas y herbáceas, a través de la determinación de la temperatura de congelamiento y la temperatura de daño.
- Determinar área foliar y área foliar específica de las diferentes especies.
- Estudiar la anatomía foliar de cuatro de las especies y relacionar caracteres anatómicos de la hoja con el mecanismo de resistencia a temperaturas congelantes que posee la especie.

## **Sección II: Metodología.-**

## 1. Área de estudio.-

El estudio se llevó a cabo en el Páramo de Piedras Blancas, a 3 Km de Pico El Águila, perteneciente a la Sierra de la Culata (Ca. 8 56' N, 70 48" W) a una altitud de 4200 m. El área corresponde a un páramo desértico sometido a temperaturas congelantes en cualquier día del año (Orozco, 1986; Azócar et al., 1988).

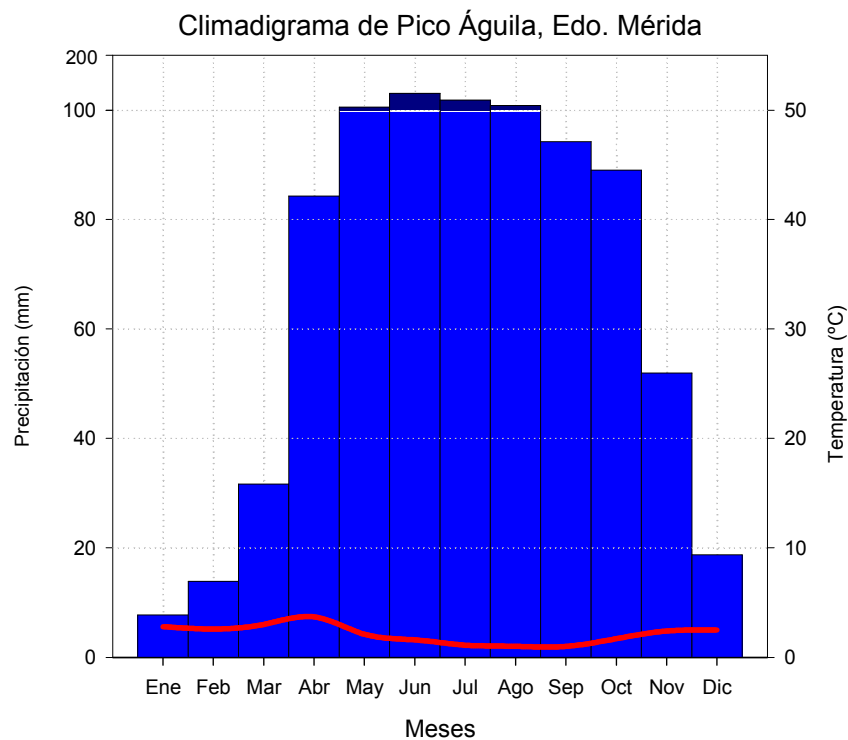


**Figura II-1. Ubicación del área de estudio.**

(Tomado de Salgado-Labouriau, 1986).

Exhibe un régimen pluviométrico unimodal, con una precipitación promedio de 798 mm (Torres, 2003). Presenta una época de sequía que va de diciembre a marzo y una época húmeda que va de abril a noviembre (Márquez, 2002), entre estos, los meses que reciben la mayor concentración de precipitación corresponden al período de mayo a agosto.

La temperatura promedio anual es de 2,8 °C; no se observan grandes variaciones de la misma entre estaciones hídricas, pero sí entre el día y la noche, esta condición queda descrita por Hedberg (1964) como “verano de día e invierno de noche”.



**Figura II-2. Climadiagrama de Pico El Águila Edo. Mérida.**

(Chacón, datos no publicados).

El lugar se caracteriza por laderas, afloramientos rocosos y depresiones o fondos de valle. Los suelos son esqueléticos, arenosos, poco profundos y pedregosos (Orozco, 1986).



**Figura II-3. Vista general de Piedras Blancas.**

Según Monasterio (1980) el páramo desértico es un Rosetal alto y abierto que consta fundamentalmente de dos estratos de vegetación: el primero formado por individuos adultos de los género *Espeletia* Mutis ex Bompl. y *Coespeletia* Cuatr., con una altura de 1-3 m, su cobertura varía entre 5 y 30%; y el segundo estrato, ubicado muy cercano al suelo, formado principalmente por plantas en cojín, gramíneas e individuos juveniles de los géneros *Espeletia* y *Coespeletia*, cuya cobertura varía entre 2 y 40 %. Esta autora menciona además que en algunas asociaciones se encuentran arbustos de pequeño porte, de 20-40cm de altura, perennifolios pertenecientes principalmente a los géneros: *Senecio* L., *Hinterhubera* Sch.

Bip ex Wedd., *Lachemilla* (Focke) y *Draba* L. El porcentaje de suelo desnudo varía entre 50 y 90%.

## 2. Especies estudiadas.-

Para realizar los estudios anatómicos y de mecanismos de resistencia a temperaturas congelantes, las especies escogidas fueron: *Castilleja fissifolia* L.f. (Scrophulariaceae), *Hinterhubera lanuginosa* CUATR. et. ARIST. (Asteraceae), *Hypericum laricifolium* Juss (Hypericaceae) y *Senecio formosus* Kunth. (Asteraceae); las cuales representan un estrato intermedio de la vegetación del páramo.

Las formas de vida según Vareschi (1970) y las distribuciones altitudinales de las especies según Estrada (2003) son las siguientes:

- *C. fissifolia* es un sufrútice, cuyo rango altitudinal se encuentra entre los 1800 y los 4300 m.
- *S. formosus* es una alhíerba perenne, cuyo rango altitudinal se encuentra entre los 2800 y 4350 m.
- *H. lanuginosa* es un arbusto enano y su rango altitudinal se encuentra entre los 3000 y 4200 m.
- *H. laricifolium* es un arbustillo y su rango altitudinal se encuentra entre los 2200 y 4200 m.

Para estudios de mecanismos de resistencia a temperaturas congelantes se seleccionaron además otras cuatro especies: *Lasiocephalus longipenicillatus* (Sch. Bip ex Sand-wit) Cuatr. (Asteraceae), *Monticalia sclerosa* (Cuatr.) C. Jeffrey (Asteraceae), *Senecio funckii* Sch. Bip (Asteraceae), y *Valeriana parviflora* Treviranus (Miegev) (Valerianaceae). Las dos primeras son hierbas, las dos últimas arbustos; estas especies también representan un estrato intermedio en la vegetación del páramo. Las formas de vida según Vareschi (1970) y las distribuciones altitudinales exhibidas por estas especies según Estrada (2003):

- *L. longipenicillatus* es un sufrútice perenne y su rango altitudinal está entre 2600 y 4610 m
- *S. funckii* es una altihierba perenne y su rango altitudinal se encuentra entre los 2900 y 4300 m.
- *M. sclerosa* es un arbustillo enano y su rango altitudinal se encuentra entre los 4000 y 4400 m (Briceño y Morillo, 1992).
- *V. parviflora* es un arbusto y su rango altitudinal se encuentra entre los 3000 y 4300 m.

### **3. Microclima**

Se colocaron tres data loggers modelo HOBO Pro Series Temp, Ext © 1998 ONSET en el área de estudio, a fin de obtener registros de temperaturas a nivel de suelo y aire, tanto en época seca como en época

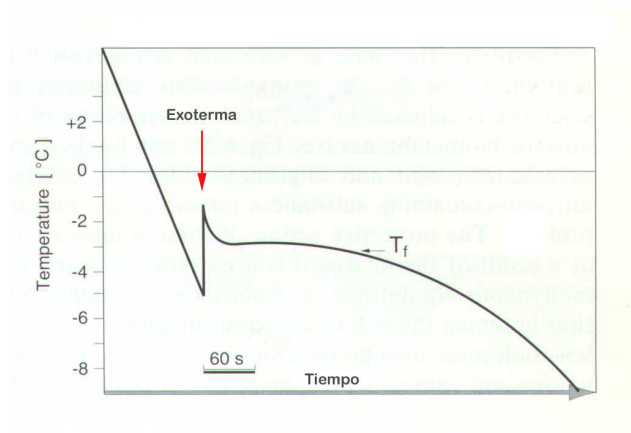
húmeda. Los dos primeros fueron colocados con uno de los sensores a nivel de suelo pero bajo la cobertura de algunas plantas, el otro sensor se colocó a una altura aproximada de 50 cm. El tercer data logger se colocó ligeramente enterrado en suelo totalmente expuesto.

#### **4. Mecanismos de Resistencia.-**

##### **4.1. Análisis térmico.**

Este análisis se realizó con la finalidad de determinar a que temperatura ocurre el congelamiento del tejido foliar. Para ello se cortaron pequeñas secciones de tejido y se colocaron inmediatamente en pequeños tubos de ensayo sellados de manera de evitar cambios en sus contenidos de agua. Estas secciones tenían insertadas termocuplas cobre-constantan a través de las cuales la temperatura fue continuamente monitoreada con un data logger de 8 canales conectados a un microcomputador. Se usaron 14 réplicas por cada especie.

Estos tubos fueron colocados en un baño refrigerado; se procedió a bajar la temperatura de 5° a -25° C a una tasa de 10° por hora. Por medio del microcomputador se detectó cualquier incremento significativo de la temperatura (exoterma) producido por la formación de hielo, debido a que este es un proceso que libera calor (figura II-4) (Squeo *et al.*, 1991).



**Figura II-4. Proceso de congelamiento en tejidos vegetales.**

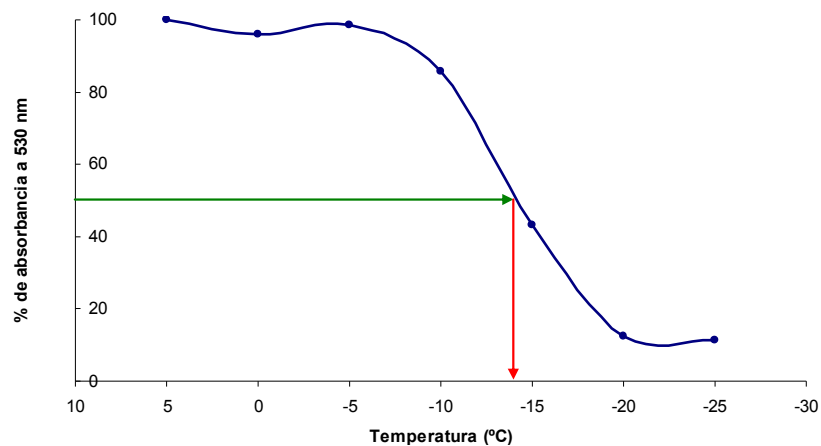
(Tomado de Larcher, 1995).

#### **4.2. Determinación de temperatura de daño.**

Para la determinación de las temperatura de daño se usó el método refinado de Cloruro de tetrazolium (TTC) (Steponkus y Lanphear, 1967). Se tomaron muestras de hoja se colocaron en tubos e inmediatamente se sumergieron en un baño de alcohol refrigerado (Grant Instrument Ltd). Posterior a ello se bajó la temperatura desde 5° hasta -25° C a una tasa de 10° C por hora. A intervalos de 5 °C se removieron muestras, que luego se incubaron a 4° C por 8 horas, después de lo cual se añadieron 3 ml de la solución de TTC a cada muestra (50 mg c/u) al vacío por 30 min. y se dejaron a 4° C por 48 horas. Se usaron tres réplicas por cada especie para cada temperatura.

Por último, las muestras se extrajeron con etanol 95% y se determinó la absorbancia a 530nm en un espectrofotómetro (Coleman 55, Perkin-Elmer).

La temperatura de daño fue definida como aquella en la cual la absorbancia correspondió a un 50% de la absorbancia a 5° C (figura II-5) (Steponkus y Lamphear, 1967; Levitt, 1972; Squeo *et al.*, 1991). El carácter evasor o tolerante de una planta se determina comparando la temperatura de congelamiento con la temperatura de daño; si no existen diferencias significativas entre la temperatura de congelamiento y la temperatura de daño se dice que la planta es evasora, si existen diferencias significativas entre ambas temperaturas se dice que la planta es tolerante al congelamiento.



**Figura II-5. Modelo de curva de daño. Datos obtenidos en este trabajo en tallos de la especie *Valeriana parviflora***

## **5. Área foliar y área foliar específica.-**

Se determinó el área foliar y el área foliar específica. La medición del área foliar se hizo a través de un medidor de área foliar (LI-COR Mod. LI-

3100). La determinación del área foliar específica se hizo a través de la ecuación:

$$AFE = AF \text{ (cm}^2\text{)} / PS \text{ (g)} \quad (\text{ec. 1})$$

En donde: AF es el área foliar y PS es el peso seco de la muestra.

Para aquellas especies en las que las hojas son muy pequeñas, se midió tanto el área como el peso seco de grupos de hojas.

## **6. Estudios anatómicos.-**

### **6.1. Cortes.**

Se colectaron muestras de las especies (n = 3), las cuales fueron fijadas en FAA (mezcla formalina, alcohol etílico y ácido acético) *in situ* (Johansen, 1940). También se colectaron individuos de estas especies y se depositaron en el herbario MERC como ejemplares testigo.

Se realizaron cortes a mano alzada, que fueron teñidos utilizando la técnica de doble tinción: Fuscina básica 0,2% y azul de Alcian 0,5% (Luque *et al.*, 1996). Para el montaje de estos cortes se usó glicerina líquida al 50%.

Por otro lado, posterior a su deshidratación a través de la serie butílica y su inclusión en parafina, se realizaron cortes permanentes a micrótomo (Sass, 1958). Estos cortes fueron teñidos, al igual que los cortes a mano alzada, utilizando el método de la doble tinción. Para el montaje de estos cortes se usó Bálsamo de Canadá según Johansen (1940).

## **6.2. Obtención de epidermis.-**

Para la obtención de las epidermis se cortaron pequeños trozos de hojas (u hojas completas en aquellas especies donde estas son muy pequeñas), se sumergieron en ácido nítrico al 10% y se calentaron hasta que las epidermis comenzaron a desprenderse. Posterior a ello se procedió a retirar la epidermis con ayuda de un pincel bajo la lupa y se tiñeron usando el mismo método que el usado para teñir los cortes a mano alzada.

Se tomaron fotografías de los cortes a través de una cámara digital. El tamaño de las células epidérmicas, del parénquima en empalizada y del parénquima esponjoso se obtuvo midiendo las dimensiones de ancho y largo de las células a través de la observación de las mismas en un microscopio Zeis que posee un ocular graduado.

## **6.3. Pruebas microquímicas.-**

Para estas pruebas se realizaron cortes finos a mano alzada de hojas de cada una de las especies. Se realizaron las siguientes pruebas según D'Ambrogio (1986):

- Sudán III: esta prueba evidencia la presencia de grasas y aceites; para ello se deshidrata el material, pasándolo a través de etanol 30, 50 y 70%, posterior a ello se colocan los cortes en un vidrio de reloj y se añaden 2 gotas de Sudán. Se deja actuar el reactivo por 10 minutos después de los cuales se colocan los cortes en un portaobjeto con una

gota de glicerina líquida, se coloca un cubreobjeto y se observan al microscopio. Si la reacción es positiva los cortes se tiñen de rojo pálido.

- Lugol: este reactivo evidencia la presencia de almidón, para ello se colocan los cortes en un portaobjeto y se añaden 2 gotas de Lugol, se esperan unos minutos después de los cuales se les añade una gota de glicerina y se observan al microscopio. El almidón se tiñe de color morado.
- Cloruro férrico al 10%: esta prueba se usa para detectar la presencia de taninos, para ello se colocan los cortes en un vidrio de reloj y se añaden 2 gotas de cloruro férrico al 10%. Se deja actuar el reactivo por 2 o 3 minutos y posteriormente se colocan los cortes en un portaobjeto con una gota de glicerina y se observan al microscopio. La reacción es positiva cuando el material se tiñe de color amarillo oscuro.
- Fluoroglucinol o fuoroglucina acidificada (modificada): esta prueba evidencia la presencia de ligninas, para ello se colocan 2 gotas fluoroglucinol y 2 gotas de ácido clorhídrico (HCl 10%) en un vidrio de reloj, posterior a ello se sumergen los cortes en esta solución. Después de unos minutos se colocan los cortes en un portaobjeto con una gota de glicerina y se observan al microscopio.

#### **6.4. Tamaños celulares.-**

Se tomaron medidas de largo y ancho de las células del parénquima en empalizada, parénquima esponjoso, epidermis adaxial y abaxial para las cuatro especies. Se midieron 60 células (20 x campo).

#### **6.5. Densidad estomática.-**

Se calculó la densidad estomática de las cuatro especies contando el número de estomas por  $\text{mm}^2$  de superficie en 2 campos de 3 hojas diferentes.

### **7. Análisis estadístico.-**

#### **7.1. Mecanismos de resistencia.-**

Para determinar si existen diferencias significativas entre la temperatura de congelamiento y la temperatura de daño foliar se realizó la prueba U de Mann-Whitney de comparación de medias.

#### **7.2. Estudios anatómicos.-**

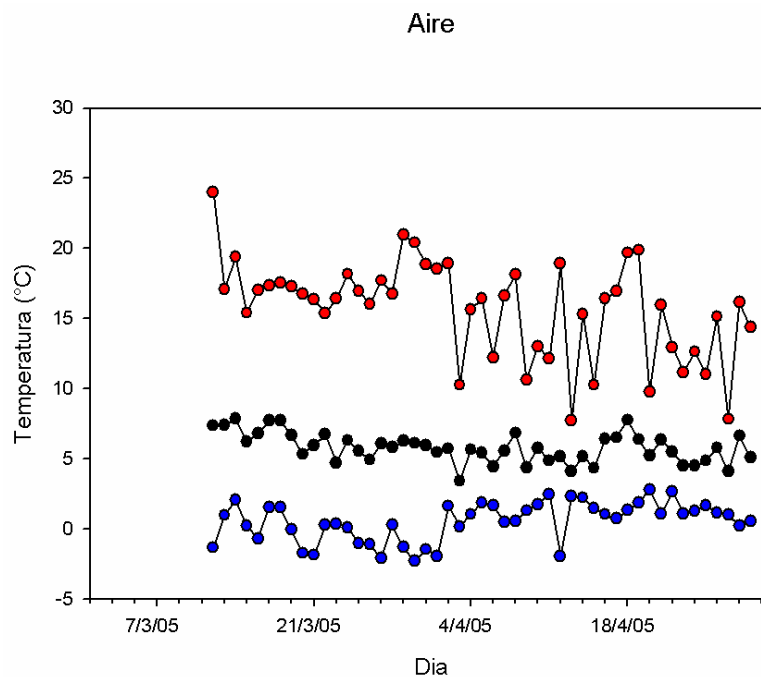
Para determinar si existen diferencias significativas entre los promedios de las áreas celulares del parénquima en empalizada, parénquima esponjoso y

epidermis adaxial y abaxial de las cuatro especies, se realizó un ANOVA de una vía.

## **Sección III: Resultados.**

## 1. Microclima.-

La figura III-1 muestra las temperaturas promedio, máximas y mínimas a nivel de aire. Se puede diferenciar la época seca de la húmeda, que comienza el día 4-abr-2005. Se observa que en época seca las temperaturas mínimas son más negativas que las de la época húmeda y, por otro lado, las temperaturas máximas son mayores también en la época seca; esto indica que la época seca es la que presenta mayores variaciones diarias de temperatura.



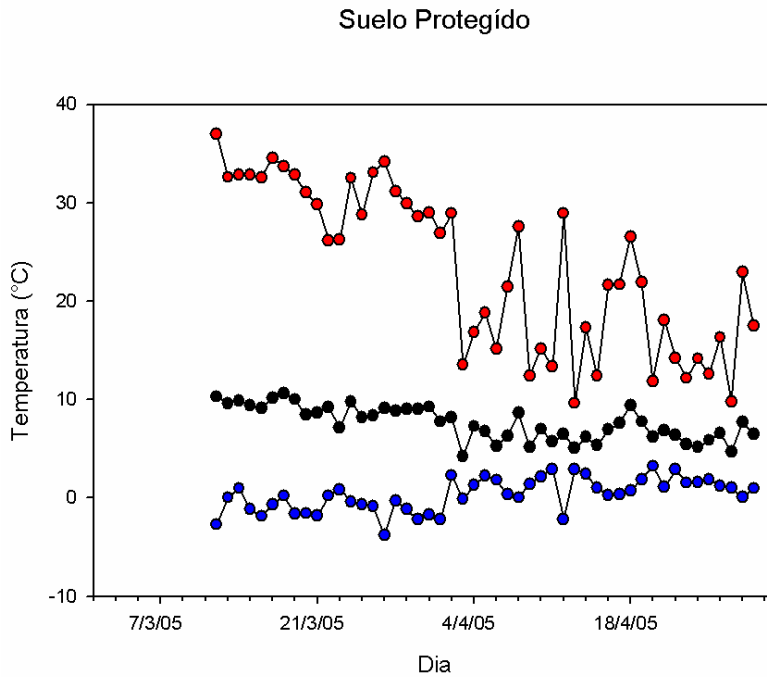
**Figura III-1. Temperaturas máximas (●), mínimas (●) y promedios (●) diarias a nivel de aire en época seca y época húmeda.**

La tabla III-1 resume las temperaturas mínimas y máximas absolutas y promedios que se observan en el gráfico anterior. Los datos corresponden a 32 días de época seca (del 4 de marzo al 4 de abril) y 25 días de época húmeda (del 5 de abril al 29 de abril).

**Tabla III-1. Temperaturas mínimas y máximas absolutas y promedios  $\pm$  error estándar a nivel de aire en época seca y época húmeda.**

	T min abs (°C)	T min prom (°C)	T máx. abs (°C)	T máx. prom (°C)	T prom (°C)
Época seca	-2,85	-0,07 $\pm$ 0,17	24,01	17,83 $\pm$ 0,29	6,44 $\pm$ 0,06
Época húmeda	-0,72	1,43 $\pm$ 0,12	27,79	14,24 $\pm$ 0,64	5,54 $\pm$ 0,04

La figura III-2 muestra las temperaturas promedio, máximas y mínimas a nivel de suelo protegido por vegetación en ambas épocas. Al igual que en el gráfico anterior, se observan mayores variaciones de temperatura en época seca. Se observa además que las temperaturas máximas son mayores que las registradas a nivel de aire.



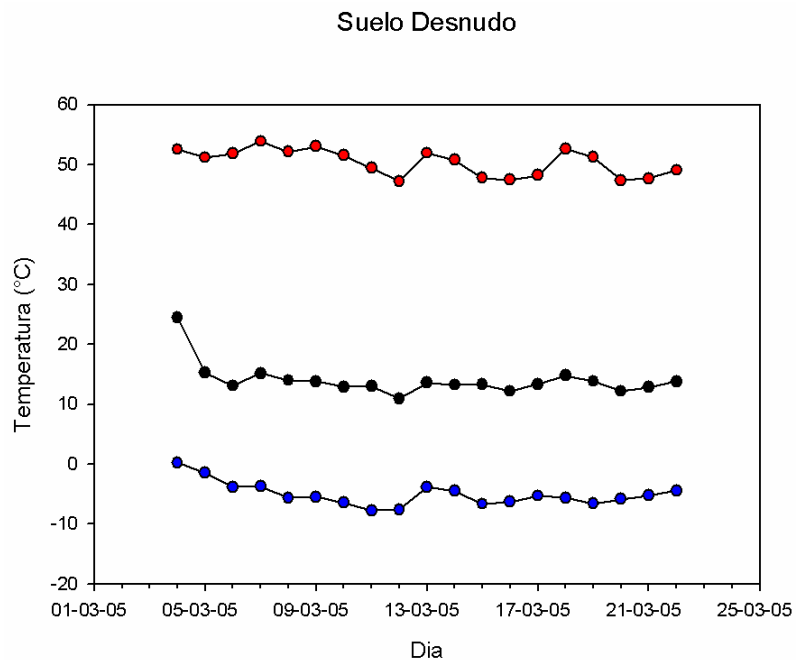
**Figura III-2. Temperaturas máximas (●), mínimas (●) y promedios (●) diarias a nivel de suelo protegido en época seca y época húmeda.**

La tabla III-2 resume las temperaturas mínimas y máximas absolutas y promedios que se observan en el gráfico anterior. Los datos también corresponden a 32 días de época seca y 25 días de época húmeda.

**Tabla III-2. Temperaturas mínimas y máximas absolutas y promedios  $\pm$  error estándar a nivel del suelo protegido por vegetación en época seca y época húmeda.**

	T min abs (°C)	T min prom (°C)	T máx. abs (°C)	T máx. prom (°C)	T prom (°C)
Época seca	-4,97	-0,92 $\pm$ 0,19	36,94	29,52 $\pm$ 0,61	8,38 $\pm$ 0,10
Época húmeda	-1,6	1,39 $\pm$ 0,16	27,57	16,56 $\pm$ 0,73	6,17 $\pm$ 0,05

En la figura III-3 se presentan los registros de temperatura a nivel de suelo desnudo durante la época seca. Es en esta condición en donde se observan las temperaturas más bajas durante la noche y más altas durante el día. Comparando estos registros con los de suelo protegido y con los de aire, se hace muy evidente el hecho de que es el suelo el estrato que presenta condiciones de temperatura más contrastantes y que la presencia de vegetación (figura III-2) hace que las variaciones de temperatura entre el día y la noche sean un poco menores. Para esta condición se dispone únicamente de datos para época seca, se esperaría que, al igual que ocurre en aire y en suelo protegido, en época húmeda esas variaciones entre día y noche también sean menores.



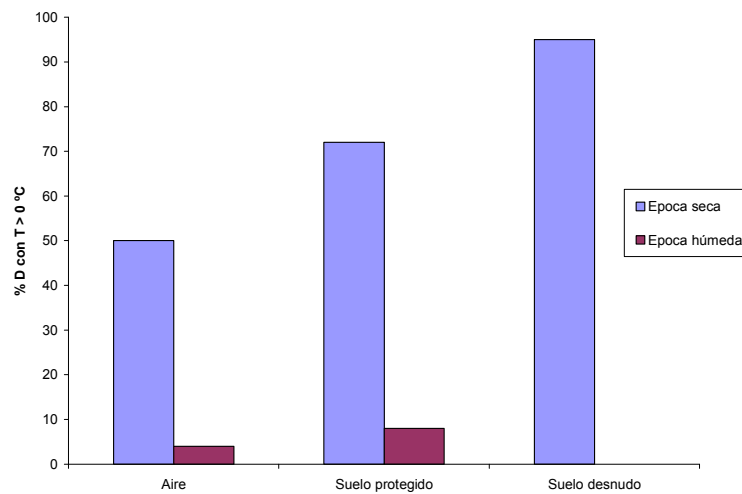
**Figura III-3. Temperaturas máximas (●), mínimas (●) y promedios (●) a nivel de suelo desnudo en época seca.**

La tabla III-3 resume las temperaturas promedio y máximas y mínimas absolutas que se observan en el gráfico anterior. Los datos corresponden a 19 días de registros (del 4 de marzo al 22 de marzo).

**Tabla III-3. Temperaturas máximas y mínimas absolutas y promedios a nivel de suelo desnudo para época seca.**

T min abs (°C)	T min prom (°C)	T máx. abs (°C)	T máx. prom (°C)	T prom (°C)
-7,76	-5,06	53,9	50,36	13,63

Sumando el número de días con registros de temperaturas por debajo de 0 °C (figura III-4) se observa una vez más que la época con mayor número de días con heladas, tanto a nivel de suelo como de aire, es la época seca.



**Figura III-4. Porcentaje de días con temperaturas por debajo de los 0 ° C a nivel de aire suelo protegido y suelo desnudo para época seca y época húmeda.**

## 2. Mecanismos de resistencia.-

### 2.1. Congelamiento y daño.

La figura III-5 muestra los valores de absorbancia a 530nm del formazán producido en hojas en las cuatro especies después de ser sometidas a distintas temperaturas congelantes. Puede observarse que estos valores caen por debajo del 50% entre los -10 y los -15 ° C para las cuatro especies, de manera que, según la metodología, la temperatura de daño se calcula tomando como referencia estos dos puntos.

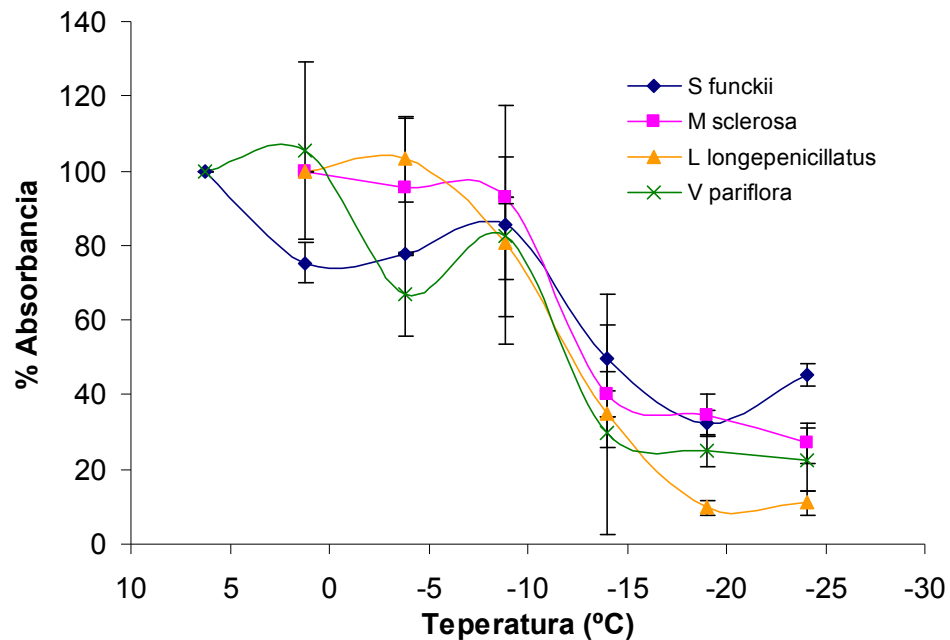
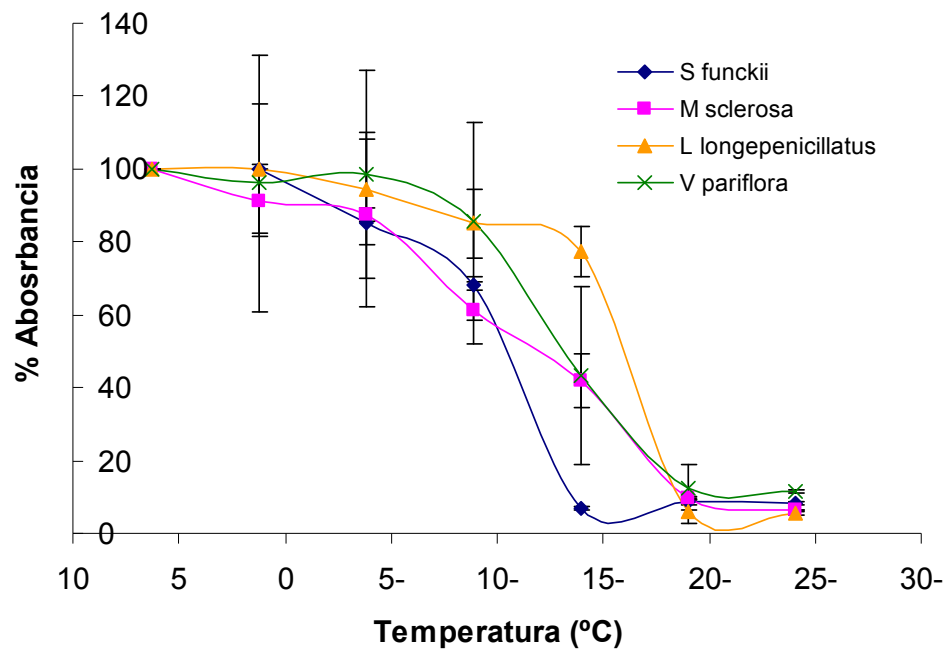


Figura III-5. Porcentaje de absorbancia a 530 nm a distintas temperaturas en hojas.

La figura III-6 muestra los resultados de este mismo análisis en tallos, que son órganos que contienen menores cantidades de clorofila y tiene diferente estructura, por eso los valores varían un poco en relación a los de hojas.



**Figura III-6. Porcentaje de absorbancia a 530 nm a diferentes temperaturas en tallos.**

La tabla III-4 muestra las temperaturas de daño calculadas para tallos y hojas a partir de las absorbancias obtenidas para cada una de las especies. No se colocan los errores en las temperaturas de las primeras cuatro especies debido a que son datos extraídos del trabajo de Squeo et al (1991) y en él no se muestran estos valores.

**Tabla III-4. Temperaturas de daño  $\pm$  error estándar calculados para tallos y hojas**

Especie	T daño en hoja (°C)	T daño en tallo (°C)
<i>C. fissifolia</i>	-14,8*	-11,7*
<i>L. longipenicillatus</i>	-12,8 $\pm$ 2,2	-15,9 $\pm$ 0,3
<i>S. formosus</i>	-9,3*	-7,9*
<i>S. funckii</i>	-14,0 $\pm$ 1,8	-10,4 $\pm$ 0,0
<i>H. lanuginosa</i>	-12,3*	-13,8*
<i>H. laricifolium</i>	-10,9*	-11,2*
<i>M. sclerosa</i>	-13,1 $\pm$ 0,5	-11,8 $\pm$ 1,9
<i>V. parviflora</i>	-13,1 $\pm$ 0,5	-11,7 $\pm$ 4,2

\* Datos extraídos de Squeo *et al* (1991)

El análisis térmico (tabla III-5) revela que la mayoría de las especies tienen temperaturas de congelamiento foliar muy por debajo de los 0 ° C, llegando a ser de -12,3 ° C en *H. lanuginosa*: Solo dos de ellas, *S. formosus* y *C. fissifolia*, muestran temperaturas más cercanas a 0 ° C. Comparando estos valores con los de las temperaturas de daño, se evidencia que seis de las especies, incluyendo leñosas y herbáceas, utilizan mecanismos de tolerancia, mientras que solo dos, ambas leñosas, utilizan mecanismos de evasión.

**Tabla III-5. Temperaturas de sobreenfriamiento, temperaturas de daño en hojas ± error estándar y mecanismos de resistencia a temperaturas congelantes para cada una de las especies.**

<b>Especie</b>	<b>Forma de vida</b>	<b>T cong (°C)</b>	<b>T daño (°C)</b>	<b>Mecanismo</b>
<i>C. fissifolia</i>	Sufrutice	-4,1*	-14,8*	Tolerancia
<i>L. longipenicillatus</i>	Sufrutice	-6,3 ± 0,4**	-12,8 ± 2,2**	Tolerancia
<i>S. formosus</i>	Hierba	-3,5*	-9,3*	Tolerancia
<i>S. funckii</i>	Hierba	-6,2 ± 0,4**	-14,0 ± 1,8**	Tolerancia
<i>H. lanuginosa</i>	Arbusto	-12,7*	-12,3*	<b>Evasión</b>
<i>H. laricifolium</i>	Arbusto	-9,4*	-10,9*	<b>Evasión</b>
<i>M. sclerosa</i>	Arbusto	-6,1 ± 0,3**	-13,1 ± 0,5**	Tolerancia
<i>V. parviflora</i>	Arbusto	-7,2 ± 0,5**	-13,1 ± 0,5**	Tolerancia

\* Datos extraídos de Squeo *et al* (1991)

\*\* Se encontraron diferencias significativas entre las temperaturas de congelamiento y las temperaturas de daño de estas cuatro especies, Z= 2,65 y P= 0,0081 para *L. longipenicillatus*, Z=2,65 y P=0,0081 para *S. funckii*, Z=2,65 y P=0,0079 para *M. salerosa* y Z=2,65 y P=0,0081 para *V. parviflora*.

### **3. Área foliar y área foliar específica.-**

En el caso del área foliar (AF) (tabla III-6) se tiene que todas las especies difieren en este parámetro. Estas diferencias reflejan que a pesar de que se trata de especies que pertenecen al mismo estrato de vegetación, presentan grandes diferencias en cuanto a forma y tamaño de las hojas, a excepción de *H. lanuginosa* y *H. laricifolium*, que son las especies que presentan AF similares (0,04 y 0,02 cm<sup>2</sup> por hoja, respectivamente) y hojas con crecimiento imbricado. Con respecto al área foliar específica (AFE) se tiene que las especies herbáceas, *C. fissifolia*, *L. longipenicillatus*, *S. formosus* y *S. funckii*,

tienen AFE mayores a las de las especies arbustivas, a excepción de *V. parviflora*, que no se ajusta a esta tendencia.

**Tabla III-6. Área foliar (AF) y área foliar específica (AFE)  $\pm$  error estándar calculados para cada una de las especies.**

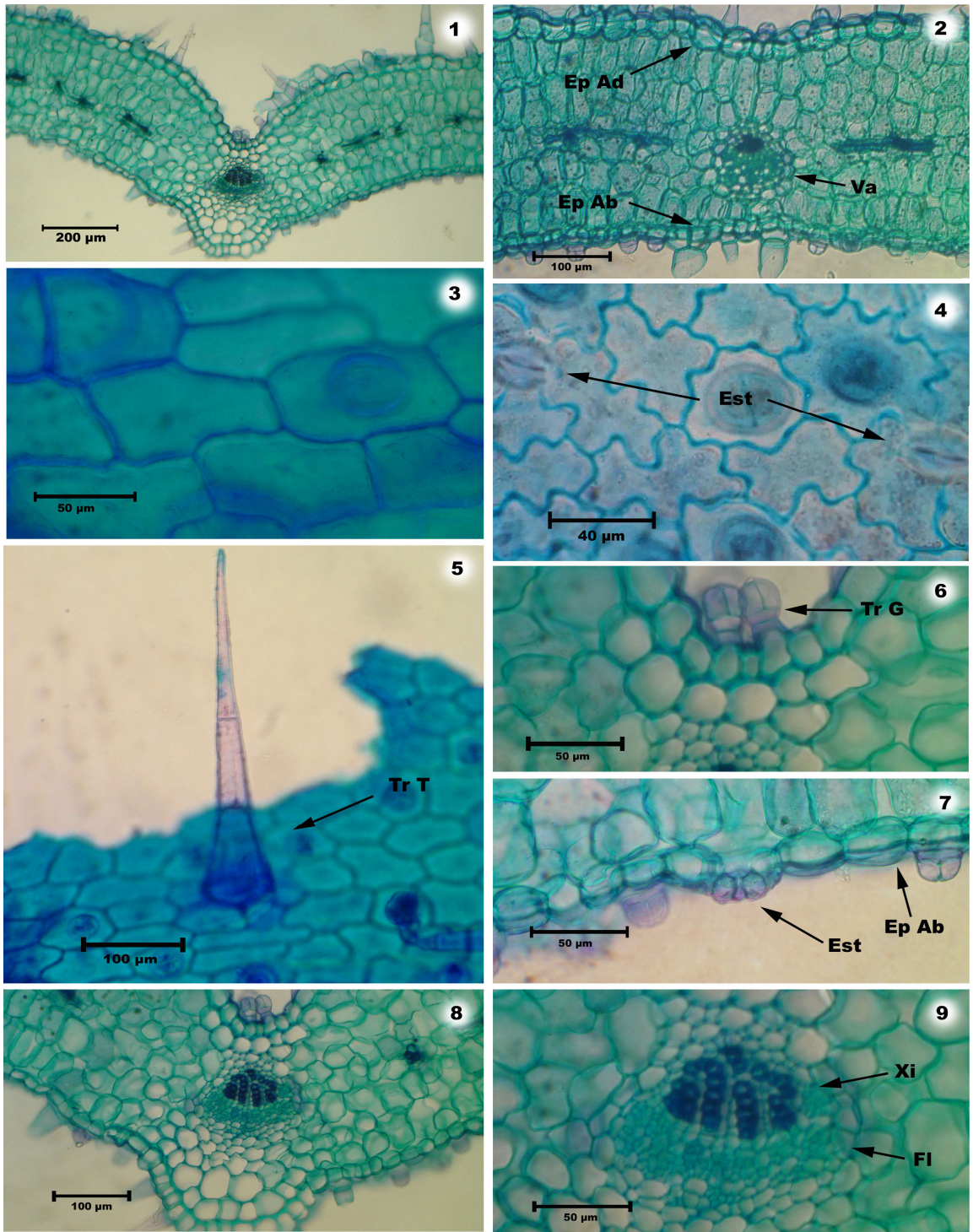
Especie	AF (cm <sup>2</sup> )	AFE (cm <sup>2</sup> /g)
<i>C. fissifolia</i>	1,9 $\pm$ 0,1	127,14 $\pm$ 7,36
<i>L. longipenicillatus</i>	5,0 $\pm$ 0,3	77,03 $\pm$ 4,63
<i>S. formosus</i>	24,5 $\pm$ 2,5	90,40 $\pm$ 8,11
<i>S. funckii</i>	3,1 $\pm$ 0,2	161,15 $\pm$ 8,85
<i>H. lanuginosa</i>	0,04 $\pm$ 0,00	76,16 $\pm$ 6,36
<i>H. laricifolium</i>	0,02 $\pm$ 0,00	65,10 $\pm$ 4,19
<i>M. sclerosa</i>	1,5 $\pm$ 0,1	41,31 $\pm$ 1,56
<i>V. parviflora</i>	0,29 $\pm$ 0,02	104,78 $\pm$ 11,03

#### 4. Anatomía foliar.

##### 4.1. Descripción anatómica.

###### *Castilleja fissifolia*

La lámina 1 muestra caracteres de la anatomía foliar de *C. fissifolia*, observándose hoja bifacial (fig. 1). Epidermis de la superficie adaxial (Fig. 2, Ep Ad) uniestratificada, de células cuadradas a rectangulares en corte transversal, de  $30,3 \pm 0,8 \mu\text{m}$  de alto por  $39 \pm 1,1 \mu\text{m}$  de ancho, poliédricas con tendencia a rectangulares en vista paradermal (fig. 3) de  $82,6 \pm 3,2 \mu\text{m}$  de largo por  $30,5 \pm 1,0 \mu\text{m}$  de ancho; tricomas

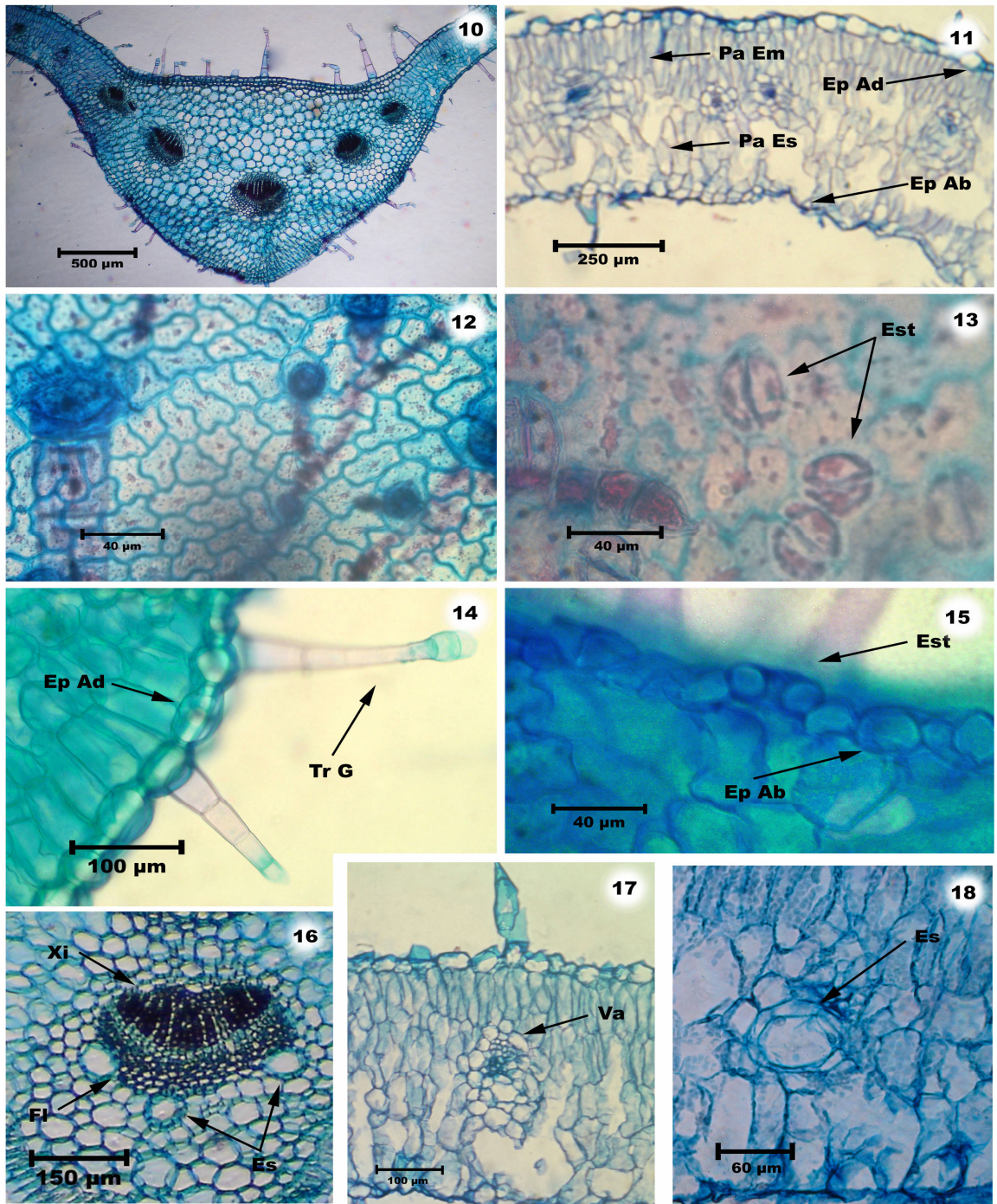


**Lámina 1.** Figs. 1-9 Caracteres de la anatomía foliar de *Castilleja fissifolia*. 1-2 Corte transversal de la hoja. 3 Epidermis adaxial en vista paradermal. 4 Epidermis abaxial en vista paradermal con estomas. 5 Epidermis adaxial con tricoma tector. 6 Tricomas glandulares asociados al nervio medio. 7 Estoma en vista transversal. 8 y 9 Nervio medio. (Ep Ad: epidermis adaxial; Ep Ab: epidermis abaxial; Va: vaina parenquimática; Est: estoma; Tr G: tricoma glandular; Tr T: tricoma tector; Xi: xilema; Fl: floema). Fotos: Luque, R & Azócar ,CJ.

tectores (fig. 5 y 6, Tr T) y glandulares (Tr G), estos últimos asociados al nervio medio. Estomas (Est) ocasionales. Epidermis de la superficie abaxial (fig. 2 y 7, Ep Ab) uniestratificada, de células cuadradas a rectangulares en corte transversal de  $19,8 \pm 0,5 \mu\text{m}$  de alto por  $32,3 \pm 1,2 \mu\text{m}$  de ancho, de contornos sinuosos en vista paradermal (fig. 4) de  $57,9 \pm 1,9 \mu\text{m}$  de largo por  $32,8 \pm 1,3 \mu\text{m}$  de ancho, tricomas tectores (Tr T). Mesófilo poco diferenciado, compacto (fig. 2). Parénquima en empalizada (Pa Em) formado por dos corridas celulares de  $59,5 \pm 1,9 \mu\text{m}$  de alto por  $33,5 \pm 1 \mu\text{m}$  de ancho. Parénquima esponjoso (Pa Es) formado por tres corridas celulares, células de forma variable ( $46,7 \pm 1,7 \mu\text{m}$  de alto por  $40,6 \pm 1,0 \mu\text{m}$  de ancho). Haces colaterales abiertos rodeados por una vaina parenquimática (fig. 2, Va) simple. Nervio medio formado por un haz vascular, colateral abierto (fig. 8 y 9). Xilema y floema primarios bien diferenciados (fig. 9, Xi y FI).

#### *Senecio formosus.*

La lámina 2 muestra caracteres de la anatomía foliar de *S. formosus*, observándose hoja bifacial, hipoestomática (fig. 11 y 17). Epidermis adaxial (fig. 11, Ep Ad) uniestratificada, de células cuadradas a rectangulares en corte transversal de  $21,9 \pm 0,7 \mu\text{m}$  de alto por  $38,3 \pm 1,5 \mu\text{m}$  de ancho, de contornos sinuosos en vista paradermal (fig. 12)

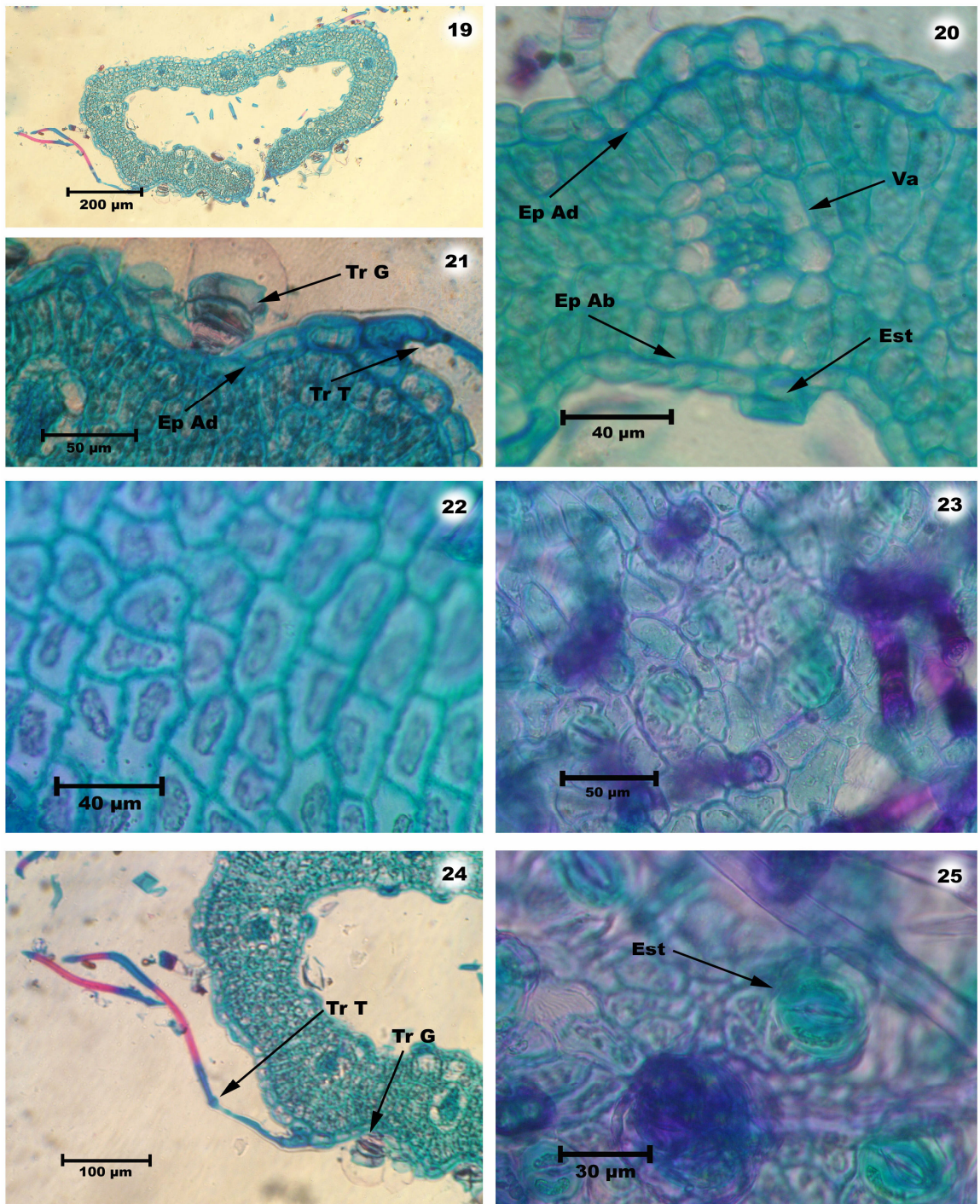


**Lámina 2.** Figs. 10-18 Caracteres de la anatomía foliar de *Senecio formosus*. 10 Corte transversal el nervio medio. 11 Corte transversal del mesófilo 12 Epidermis adaxial con tricomas. 13 Epidermis abaxial con estomas. 14 Tricomas glandulares en vista transversal. 15 Estoma en vista transversal. 16 Detalle de haz vascular del nervio medio. 17 Haz vascular con vaina parenquimática. 18 Detalle de estructura secretora. (Ep Ad: epidermis adaxial; Ep Ab: epidermis abaxial; Pa Em: parénquima en empalizada; Pa Es: parénquima esponjoso; Est: estoma; Tr G: tricoma glandular; Xi: xilema; Fl: floema; Va: vaina parenquimática; ES: estructura secretora). Fotos: Luque, R & Azócar ,CJ.

de  $84,2 \pm 1,8 \mu\text{m}$  de largo por  $37,5 \pm 1,3 \mu\text{m}$  de ancho, tricomas tectores (fig. 14, Tr T) simples, puricelulares. Células de la epidermis abaxial (fig. 10 y 11, Ep Ab) de forma poliédrica en corte transversal de  $30,1 \pm 1,0 \mu\text{m}$  de alto por  $50,7 \pm 1,7 \mu\text{m}$  de ancho y de contornos muy sinuosos en vista paradermal (fig. 13) de  $78,5 \pm 1,9 \mu\text{m}$  de largo por  $34,5 \pm 1,2 \mu\text{m}$  de ancho. Mesófilo bifacial diferenciado, laxo. Parénquima en empalizada (fig. 11 y 17, Pa Em) formado por dos corridas celulares, células alargadas de  $76,6 \pm 1,8 \mu\text{m}$  de alto por  $25,0 \pm 0,8 \mu\text{m}$  de ancho. Parénquima esponjoso (fig. 11 y 17, Pa Es) formado por 3-4 corridas de células de  $50,7 \pm 2,2 \mu\text{m}$  de alto por  $34,0 \pm 1,1 \mu\text{m}$  de ancho. Haces vasculares colaterales abiertos con vaina parenquimática (fig. 17, Va) simple. Nervio medio formado por 3-5 haces vasculares colaterales abiertos con vaina parenquimática (Va) simple. Estructuras secretoras notorias (fig. 18, Es).

### *Hinterhubera lanuginosa*

La lámina 3 muestra caracteres de la anatomía foliar de *H. lanuginosa*, observándose hoja bifacial, hipoestomática. Epidermis de la superficie adaxial (fig. 20 y 21, Ep Ad) uniestratificada, de células cuadradas a rectangulares en corte transversal de  $16,3 \pm 0,4 \mu\text{m}$  de alto por  $21,9 \pm 0,8 \mu\text{m}$  de ancho), de forma rectangular en vista paradermal (fig. 22) de  $44,4 \pm 1,9 \mu\text{m}$  de largo por  $18,3 \pm 0,7 \mu\text{m}$  de ancho. Paredes

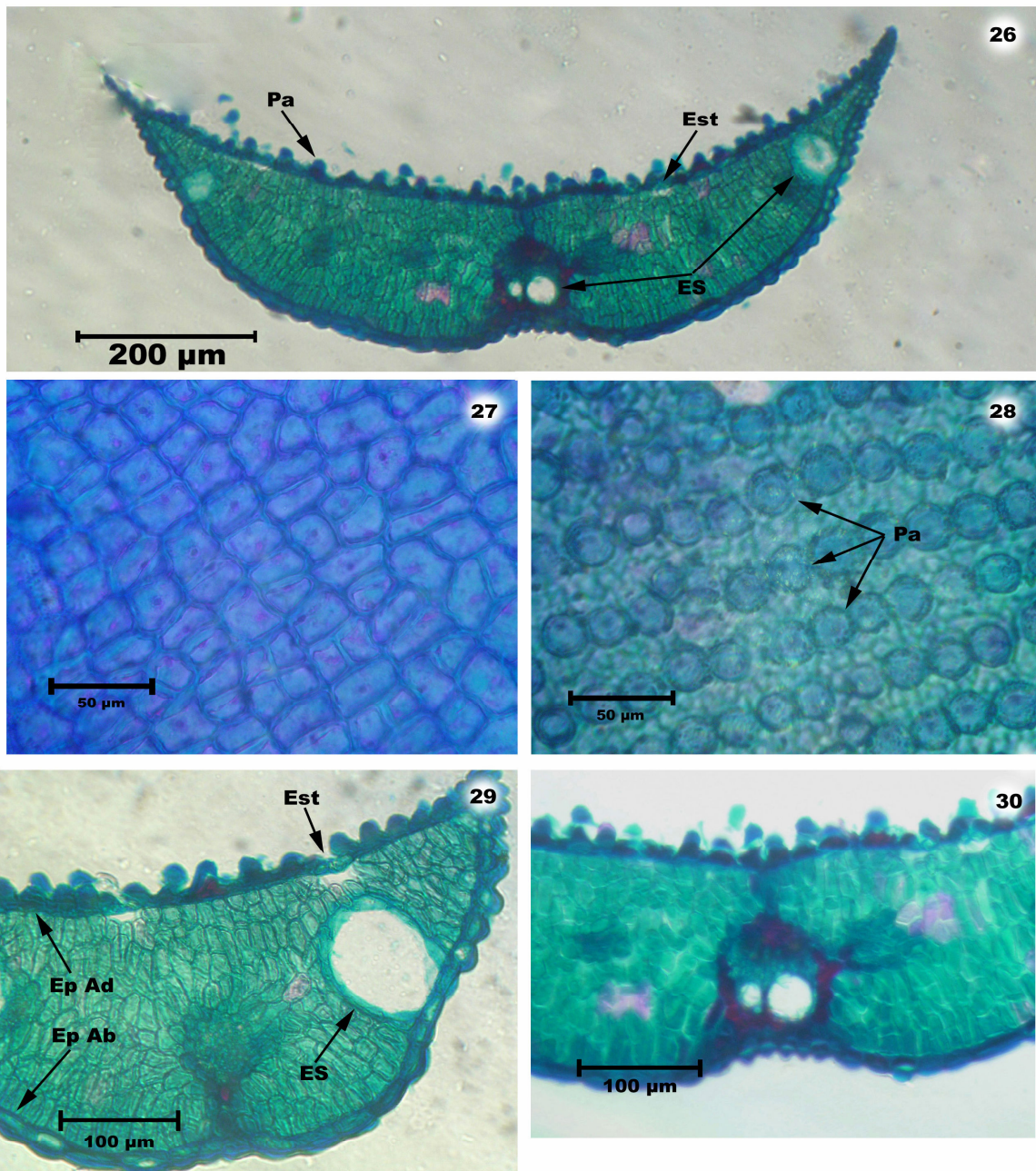


**Lámina 3.** Figs. 19-25 Caracteres de la anatomía foliar de *Hinterubera lanuginosa*. 19 Corte transversal de la hoja. 20 Detalle de haz vascular con vaina parenquimática. 21 Tricoma glandular. 22 Epidermis adaxial en vista paradermal. 23 Epidermis abaxial en vista paradermal con estomas y tricomas tectores. 24 Detalle de tricomas glandulares y tectores. 25 Detalle de estomas. (Ep Ad: epidermis adaxial; Ep Ab: epidermis abaxial; Est: estoma; Tr G: tricoma glandular; Va: vaina parenquimática). Fotos: Luque, R & Azócar ,CJ.

anticlinales rectas, engrosadas. Presencia de tricomas tectores y glandulares (fig. 24, Tr T y Tr G). Epidermis de la superficie abaxial (fig. 20, Ep Ab) uniestratificada, de células cuadradas a rectangulares en vista transversal ( $10,9 \pm 0,3 \mu\text{m}$  de alto por  $17,2 \pm 0,7 \mu\text{m}$  de ancho), de forma variable y paredes sinuosas en vista paradermal (fig. 23) de  $36,6 \pm 1,2 \mu\text{m}$  de largo por  $24,8 \pm 0,8 \mu\text{m}$  de ancho. Paredes anticlinales un poco engrosadas. Presencia de tricomas tectores. Mesófilo diferenciado, compacto (fig. 20). Parénquima en empalizada (fig. 20, Pa Em) formado por dos corridas celulares; células de  $30,2 \pm 0,9 \mu\text{m}$  de alto por  $12,8 \pm 0,3 \mu\text{m}$  de ancho. Parénquima esponjoso (fig. 24, Pa Es), formado por dos corridas celulares; células de formas variables de  $19,4 \pm 0,5 \mu\text{m}$  de alto por  $14,9 \pm 0,5 \mu\text{m}$  de ancho. Haces colaterales los de mayor tamaño abiertos, rodeados por una vaina parenquimática (Va) simple. Nervio medio formado por un haz vascular, colateral abierto rodeado de una vaina parenquimática (fig. 20 y 24, Va) simple.

### *Hypericum laricifolium*

La lámina 4 muestra caracteres de la anatomía foliar de *H. laricifolium*, observándose hoja bifacial, epiestomática (fig 26). Epidermis de la superficie adaxial (fig. 26, Ep Ad) uniestratificada, papilosa (Pa) de  $18,9 \pm 0,8 \mu\text{m}$  de alto por  $19,5 \pm 0,8 \mu\text{m}$  de ancho, de cuadradas a



**Lámina 4.** Figs. 26-30 Caracteres de la anatomía foliar de *Hypericum laricifolium*. 26 Corte transversal de la hoja. 27 Epidermis abaxial en vista paradermal. 28 Epidermis adaxial papilosa en vista paradermal. 29 Corte transversal del mesófilo, estomas en vista transversal, notorias estructuras secretoras. 30 Estructuras secretoras asociadas al nervio medio. (Ep Ad: epidermis adaxial; Ep Ab: epidermis abaxial; Pa: papila; Est: estoma, ES: estructura secretora). Fotos: Luque, R & Azócar, CJ.

poliédricas contornos sinuosos en vista paradermal (fig. 28) de  $35,2 \pm 1,5 \mu\text{m}$  de largo por  $19,6 \pm 0,7 \mu\text{m}$  de ancho. Paredes anticlinales muy engrosadas. Papilas ubicadas a lo largo de líneas paralelas (fig. 28). Epidermis abaxial (fig. 26 y 29, Ep Ab) uniestratificada, de células rectangulares a elípticas en corte transversal, de  $15,6 \pm 0,3 \mu\text{m}$  de alto por  $25,4 \pm 0,8 \mu\text{m}$  de ancho, con paredes periclinales convexas. Células de forma ligeramente rectangular a cuadrada en vista paradermal (fig. 27) de  $32,8 \pm 1,2 \mu\text{m}$  de largo por  $18,9 \pm 0,8 \mu\text{m}$  de ancho, de paredes rectas y gruesas. Mesófilo poco diferenciado (fig 26). Células más alargadas hacia la superficie abaxial de  $26,0 \pm 0,7 \mu\text{m}$  de alto por  $12 \pm 0,3 \mu\text{m}$  de ancho, menos alargadas hacia la superficie adaxial de  $20,8 \pm 0,8 \mu\text{m}$  de alto por  $13,2 \pm 0,4 \mu\text{m}$  de ancho. Estructuras secretoras (fig. 26, 29 y 30, ES) notorias, asociados o no a los haces vasculares. Haces colaterales abiertos con vaina (Va) parenquimática. Nervio medio formado por un solo haz vascular (fig. 26).

#### **4.2. Pruebas microquímicas**

Los resultados en estas pruebas (tabla III-7) fueron los mismos para las cuatro especies, siendo positivas para las pruebas de Sudán III, Cloruro férrico y Fluoroglucinol y negativas en el caso del Lugol. Se hace evidente entonces la presencia de grasas, ligninas y taninos en todas las especies,

sobre todo a nivel de las epidermis (observación cualitativa), también se observan las coloraciones en el mesófilo, aunque menos evidentes que en las epidermis, a excepción de las ligninas, que se encuentran presentes en elementos del xilema. De igual manera se comprueba la ausencia de almidón en estos tejidos para las cuatro especies.

**Tabla III-7. Resumen de resultados de pruebas microquímicas.**

Especie	Sudán III	Lugol	Cloruro férrico	Fluoroglucinol
<i>C. fissifolia</i>	+	-	+	+
<i>S. formosus</i>	+	-	+	+
<i>H. lanuginosa</i>	+	-	+	+
<i>H.laricifolium</i>	+	-	+	+

#### 4.3 . Áreas celulares

Las tablas III-8, III-9 y III-10 muestran las áreas celulares promedio calculadas para distintos caracteres de la anatomía foliar de cada una de las especies. Se observa que las especies tolerantes (*C. fissifolia* y *S. formosus*) tienen células tanto epidérmicas como mesofilares más grandes que las de las especies evasoras (*H. lanuginosa* y *H. laricifolium*).

**Tabla III-8. Áreas celulares promedio de las epidermis adaxial y abaxial  $\pm$  error estándar de cada una de las especies en vista paradormal.**

Especie	Epidermis adaxial	Epidermis abaxial
	( $\mu\text{m}^2$ )	( $\mu\text{m}^2$ )
<i>C. fissifolia</i>	2469,18 $\pm$ 103,82 (b)*	1901,35 $\pm$ 96,48 (b)**
<i>S. formosus</i>	3139,28 $\pm$ 157,51 (c)*	2701,25 $\pm$ 107,33 (c)**
<i>H. lanuginosa</i>	794,90 $\pm$ 38,61 (a)*	903,85 $\pm$ 38,84 (a)**
<i>H. laricifolium</i>	711,88 $\pm$ 48,14 (a)*	636,04 $\pm$ 39,31 (a)**

Test de Tuckey.\*  $F_{0,05} = 214,2$ ; \*\* $F_{0,05} = 137,4$

**Tabla III-9. Áreas celulares promedio de las epidermis adaxial y abaxial  $\pm$  error estándar de cada una de las especies en vista transversal.**

Especie	Epidermis adaxial	Epidermis abaxial
	( $\mu\text{m}^2$ )	( $\mu\text{m}^2$ )
<i>C. fissifolia</i>	1204,48 $\pm$ 55,47 (b)*	656,35 $\pm$ 35,11 (c)**
<i>S. formosus</i>	861,44 $\pm$ 53,67 (c)*	1560,23 $\pm$ 85,70 (d)**
<i>H. lanuginosa</i>	366,15 $\pm$ 18,12 (a)*	193,65 $\pm$ 11,77 (a)**
<i>H. laricifolium</i>	442,54 $\pm$ 26,49 (a)*	398,54 $\pm$ 15,65 (b)**

Test de Tuckey.\*  $F_{0,05} = 87,4$ ; \*\* $F_{0,05} = 130,2$

**Tabla III-10. Áreas celulares promedio del parénquima en empalizada y del parénquima esponjoso  $\pm$  error estándar de cada una de las especies en corte transversal.**

Especie	Parénquima Empalizada	Parénquima Esponjoso
	( $\mu\text{m}^2$ )	( $\mu\text{m}^2$ )
<i>C. fissifolia</i>	1986,77 $\pm$ 84,39 (b)*	1904,17 $\pm$ 86,62 (b)**
<i>S. formosus</i>	1914,68 $\pm$ 82,81 (b)*	1724,17 $\pm$ 94,48 (b)**
<i>H. lanuginosa</i>	379,27 $\pm$ 12,45 (a)*	288,02 $\pm$ 11,27 (a)**
<i>H. laricifolium</i>	310,21 $\pm$ 10,58 (a)*	273,65 $\pm$ 12,30 (a)**

Test de Tuckey.\*  $F_{0,05} = 245,9$ ; \*\* $F_{0,05} = 192,1$

#### 4.4. Densidad estomática e Índice estomático.

Con respecto a la densidad estomática puede observarse que las especies evasoras (*H. lanuginosa* y *H. laricifolium*) son las que presenta mayores densidades esomáticas con respecto a las especies tolerantes (*C. fissifolia* y *S. formosus*).

**Tabla III-11. Densidad estomática calculada para cada una de las especies.**

<b>Especie</b>	<b>Densidad estomática (est/mm<sup>2</sup>)</b>
<i>C. fissifolia</i>	69,32
<i>S. formosus</i>	82,95
<i>H. lanuginosa</i>	132,95
<i>H. laricifolium</i>	302,27

## **Sección IV: Discusión.-**

## **1. Microclima.-**

El páramo de Piedras Blancas exhibe una marcada estacionalidad hídrica, que repercute de manera evidente sobre la temperatura (Sarmiento, 1986). En época seca los días suelen ser despejados y la radiación es muy intensa (Torres, 2003). La incidencia directa del sol da lugar a un sobrecalentamiento de las superficies, tanto a nivel de suelo como de cuerpos vegetales; en las noches ocurre la pérdida del calor recibido durante el día. Estas fluctuaciones térmicas diarias pueden llegar a superar los 10 ° C (figuras III-1, III-2 y III-3). Queda claro entonces que la época seca es la que representa el período térmico más desfavorable para las plantas: altas temperaturas durante el día debido a la alta radiación y temperaturas por debajo de 0 ° C durante la noche.

Esta condición es mucho más acentuada a nivel de suelo, tanto desnudo como protegido por vegetación, pero más fuertemente en el primero, debido a que es capaz de absorber mayor cantidad de calor, este calor, como se mencionó anteriormente, es nuevamente emitido durante la noche. La presencia de vegetación constituye un factor importante de protección al sobrecalentamiento, como puede evidenciarse al comparar los registros de temperatura en suelo desnudo con respecto a los de suelo protegido. Entonces, suelos desnudos o con poca cobertura representarán condiciones más extremas para el componente biótico en comparación con los suelos que se encuentren protegidos por vegetación. Alvizu (2004) realizó registros

de temperaturas en zonas expuestas y en parches de vegetación, demostrando de manera clara el efecto “aislante” que representan dichos parches. A este respecto, en campo se observa que algunas de las especies estudiadas en este trabajo tienden a crecer bajo la protección de otras plantas, es el caso que individuos de especies como *Senecio formosus* y *Castilleja fissifolia* se les encuentra con frecuencia creciendo bajo la protección de *Hypericum laricifolium*. Así mismo, puede observarse que especies como *Monticalia sclerosa* crece cercana a rocas y los individuos crecen muy juntos unos de otros. En ambientes como el páramo en donde la radiación es tan intensa, no parecen existir problemas de competencia por dicho factor, y es entonces el crecimiento en suelos con vegetación preexistente, la agrupación de individuos y la cercanía a rocas, que absorben calor durante el día y lo emiten durante la noche, estrategias para enfrentar las condiciones térmicas existentes, que se suman a los mecanismos de resistencia al congelamiento presentados por las especies.

Por otro lado, los registros de temperatura de este trabajo sugieren que, así como estas plantas poseen mecanismos de resistencia a las temperaturas congelantes que se presentan durante la noche, deben poseer también mecanismos de resistencias a las altas temperaturas que se presentan durante el día.

En época húmeda, como ya se dijo en la sección de resultados, las variaciones de temperatura son menores, es decir, las máximas disminuyen un poco y las mínimas no son tan negativas. Alvizu (2004) encuentra que al

principio de la época húmeda, no bien entradas las lluvias, disminuye en gran medida la frecuencia de temperaturas congelantes. Es entonces ésta la época térmica más favorable, y ciertas especies concentran su crecimiento en este período, como es el caso de *Polylepis sericea* (Colmenares, 2002).

## **2. Mecanismos de resistencia.-**

Squeo *et al.* (1991) encuentran que las plantas que crecen más cercanas al suelo tienden a ser tolerantes al congelamiento mientras que las plantas más altas tienden a ser evasoras. En zonas templadas tiende a ocurrir lo contrario: las plantas que crecen más cercanas al suelo suelen presentar mecanismos de evasión debido a que con las primeras nevadas quedan protegidas bajo la nieve, de esta manera, permanecen a una temperatura muy constante, que está alrededor de 0 °C. En zonas tropicales, esta situación es distinta debido a problemas de convección y enfriamiento radiativo (Körner, 1999), las plantas de este estrato están sometidas a condiciones de temperatura más extremas y la adaptación a estas condiciones se traduce en el desarrollo de mecanismos de tolerancia al congelamiento.

Según Larcher (1995) la evasión ha sido seleccionada como el mecanismo de resistencia dominante en alta montaña tropical debido a que los períodos de congelamiento ocurren durante pocas horas y las temperaturas no suelen ser muy negativas. Esta afirmación es validada por trabajos en varias

especies del género *Espeletia* (Goldstein *et al.*, 1985, Rada *et al.*, 1985a, 1987), en *Polylepis sericea* (Rada *et al.*, 1985b). Sin embargo, en las especies estudiadas en este trabajo, existe un predominio de la tolerancia sobre la evasión. En tabla III-5 se puede apreciar que las temperaturas de daño para tallos y hojas están muy por debajo de las temperaturas mínimas registradas en cada una de las condiciones (suelo y aire), así mismo, las temperaturas a las cuales congelan (tabla III-6) también son bastante negativas, de esta manera el congelamiento tanto de hojas como de tallos ocurre con muy poca frecuencia, esto es, que las plantas permanecen sin congelarse la mayor parte del tiempo.

Las bajas temperaturas de congelamiento y la tolerancia a dicho congelamiento se traduce en una adaptación exitosa a las condiciones climáticas del páramo. Cabría esperarse que la presencia de estas especies en este ambiente sea el mayor indicativo de tal adaptación, y es cierto, sin embargo, el hecho de que las plantas logren sobrevivir períodos de congelamiento no significa que no lleguen a sufrir pérdidas eventuales de sus tejidos debido a esos períodos de congelamiento (Körner, 1999). Por otro lado, los resultados generados en este trabajo dejan claro que para las especies consideradas, al menos para seis de ellas, el congelamiento no parece ser el factor limitante en la conquista de ambientes con elevada altitud, es decir, sus mecanismos de resistencia al congelamiento podrían asegurar la supervivencia a altitudes incluso mayores; sin embargo, algunas de ellas no logran trascender mucho más allá de la altitud del Páramo de

Piedras Blancas. La limitación para la conquista de zonas más altas podría estar relacionada con problemas de cavitación (embolismos). La cavitación consiste en la ruptura de las columnas de agua que ascienden a través del xilema, debido a que los gases disueltos en el agua, al estar sometidos a tensiones externas, tienden a escapar en forma de burbujas; las burbujas pueden interrumpir la columna líquida y bloquear la conducción (embolia). Las principales causas de este fenómeno son: déficit hídrico asociado a altas tasas de transpiración y altas tensiones xilemáticas, congelamiento del xilema y su posterior descongelamiento, y la acción de algunos patógenos (Azcón-Bieto y Talón, 2000; Taiz y Zeiger, 2002). En la alta montaña tropical, la ocurrencia de temperaturas congelantes durante la noche y las altas tensiones que pueden generarse a primeras horas de la mañana podrían ocasionar embolismos en las plantas. De la misma manera, la alta temperatura del suelo durante el día, unido a humedades relativas extremadamente bajas llevan a altas demandas evaporativas y de igual manera, a altas tensiones xilemáticas. Sin embargo, este es un tema que aún se encuentra poco estudiado, por lo que existe la necesidad de examinar con un poco de más detalle lo relacionado a sistemas conductores en tallos de plantas leñosas y herbáceas, y cómo estos se ven afectados por las condiciones reinantes en la alta montaña tropical.

### 3. Área foliar y área foliar específica.-

Según Castro-Díez *et al.* (2000) la hoja es el órgano más importante desde el punto de vista de asimilación en la mayoría de las plantas superiores, cada especie muestra un patrón determinado de asignación entre protección y producción, que refleja un balance entre las diferentes fuerzas selectivas que han actuado sobre la plantas; de allí la importancia de estudiar caracteres de la hoja que sean indicativas de ese balance. El parámetro usado por estos autores es el PFE (Peso Foliar Específico), el cual es el inverso del Área Foliar Específica (AFE). El PFE es alto cuando existen altas proporciones de tejidos de soporte, células pequeñas, altos contenidos de carbono y bajos contenidos de nitrógeno.

Ya que el AFE es el inverso del PFE, altos AFE serían indicativo de hojas con células grandes y poco contenido de tejidos de soporte. Esto coincide con lo obtenido en este trabajo en las plantas a las que se les estudió la anatomía foliar, ya que se tiene que las especies herbáceas, *C. fissifolia* y *S. formosus*, presentan valores de AFE mayores (127,14 y 90,40 cm<sup>2</sup>/g) que los de las especies arbustivas, y son estas dos las especies que presentan poco contenido de tejidos de soporte y mayores áreas celulares en comparación con *H. lanuginosa* y *H. laricifolium*, cuyas AFE son 76,16 y 65,10 cm<sup>2</sup>/g, respectivamente, y que presentan mayores contenidos de tejidos de soporte y menores áreas celulares.

#### 4. Anatomía foliar.-

Las especies a las que se les estudió la anatomía foliar comparten una serie de caracteres entre los que se encuentran mesófilo compacto y poco diferenciado, esta característica es muy evidente en *H. laricifolium*, en cuyo mesófilo se observa poca diferenciación entre parénquima en empalizada y parénquima esponjoso, y en *C. fissifolia*, en donde, además de que ambos parénquimas son muy similares, las áreas celulares de los mismos también lo son. En *H.laricifolium* se observa, sin embargo, que las células de la superficie abaxial tienden a ser un poco más alargadas que las de la superficie adaxial, de hecho, cabe acotar que los tamaños celulares del parénquima en empalizada en esta especie corresponden a los tamaños de las células de la superficie abaxial. Esta diferenciación se debe principalmente al crecimiento imbricado de las hojas.

Se observa además que tres de ellas (*C. fissifolia*, *H. lanuginosa* y *S. formosus*) son pubescentes, en concreto, se evidencia la presencia de tricomas glandulares y tectores en ambas superficies. Rosquete (2004) encuentra que la pubescencia en *Espeletia schultzii* tiene como función principal la de disminuir la absorción de radiación solar mediante la reflexión de parte de la misma. Karabourniotis y Fasseas (1996) encuentran en hojas de *Quercus ilex* y *Olea europaea* que los tricomas cumplen una función de filtro a los rayos UV y que también reflejan parte de la radiación que llega a las hojas, de esta manera, constituyen un mecanismo de protección contra la

excesiva radiación y los daños por fotoinhibición que por ella pueden generarse. Con estos antecedentes podría considerarse que los tricomas de las especies estudiadas en este trabajo cumplen una función de defensa a la alta radiación incidente en el Páramo de Piedras Blancas.

El resultado de las pruebas microquímicas evidencia la presencia de grasas, ligninas y taninos en las cuatro especies. Levitt (1972) reporta una serie de trabajos en los que se pone de manifiesto que las plantas que se encuentran en mayor estado de endurecimiento tienen mayor cantidad de estas sustancias en sus tejidos (sobre todo en los que se encuentran más “endurecidos”). Estas sustancias funcionan, entre otras cosas, para proteger los tejidos, ya sea para retardar su congelamiento o para proteger la integridad de las células una vez que el hielo se ha formado en los espacios intercelulares.

En cuanto a los tamaños celulares, se encontró que las especies evasoras tienen células más pequeñas que las de las especies tolerantes, esto se refleja en las áreas celulares y las densidades estomáticas; así mismo, presentan un parénquima muy compacto, en el que no se observan espacios intercelulares. Las especies tolerantes no tienen un parénquima tan compacto, en especial *S. formosus*, que posee un mesófilo bien diferenciado, con un parénquima esponjoso laxo. La disminución de los espacios intercelulares constituye un mecanismo de evasión a la formación de cristales de hielo, debido a que se disminuye la superficie donde éstos pueden formarse (Levitt, 1972, Rada *et al.*, 1987).

Entonces, cada una de las especies a las que se les estudió la anatomía foliar y las especies a las que se les estudió solo el mecanismo de resistencia exhiben una serie de caracteres morfológicos, anatómicos y fisiológicos que les permiten mantenerse en un ambiente estresante desde el punto de vista térmico: la temperatura puede bajar a menos de 0 ° C cualquier día del año, sobre todo en época seca. Sin embargo, muy raramente las especies llegan a congelarse debido a que sus temperaturas de congelamiento son mucho mas bajas que las temperaturas registradas. A pesar de que sus mecanismos de resistencia al congelamiento podrían asegurarles la supervivencia incluso a mayores altitudes, muchas de estas especies no logran ascender más allá de la altitud de Piedras Blancas, posiblemente debido a problemas en la conducción debidos a procesos de cavitación y embolismos. Sería interesante continuar este trabajo estudiando la anatomía de las plantas leñosas tolerantes al congelamiento, como por ejemplo, *Monticalia sclerosa* y *Valeriana parviflora*, a fin de observar si existen diferencias en los caracteres anatómicos de éstas y los caracteres anatómicos de las leñosas evasoras.

Finalmente, los resultados de este trabajo indican que existen caracteres morfológicos y anatómicos que podrían estar relacionados con los mecanismos de resistencia a temperaturas congelantes, como por ejemplo, el AFE, el tamaño celular, el tamaño de los espacios intercelulares y la presencia de ciertas sustancias, especialmente a nivel de la epidermis; sin

embargo, no se observó relación entre el carácter leñoso o herbáceo de la especie y dicho mecanismo.

## **5. Conclusiones generales:**

- El Páramo de Piedras Blancas exhibe una marcada estacionalidad hídrica que tiene una repercusión directa sobre la temperatura.
- En las especies estudiadas en este trabajo, existe un predominio de la tolerancia sobre la evasión como mecanismo de resistencia al congelamiento.
- Las especies arbustivas tienden a presentar AFE menores que las especies herbáceas.
- Las especies evasoras a las que se les realizó anatomía foliar (*H. lanuginosa* y *H. laricifolium*) presentan menores tamaños celulares en relación a las especies tolerantes (*C. fissifolia* y *S. formosus*).
- Tanto las especies evasoras como en las tolerantes se evidenció la presencia de grasas, taninos y ligninas, pero la concentración de estas sustancias es mayor en las evasoras en relación a las tolerantes (observación cualitativa).
- Se acepta la hipótesis que plantea que existen caracteres de la anatomía foliar relacionados con mecanismos de resistencia a bajas temperaturas. Se rechaza la hipótesis que plantea la relación entre la forma de vida de la planta y el mecanismo de resistencia al congelamiento.

## **Sección V: Bibliografía.-**

- Alvizu, P. 2004. Complejidad y Respuesta Funcional de la Vegetación de Páramo a lo largo de Gradientes Altitudinales. Tesis Doctoral. Postgrado en Ecología Tropical. Universidad de los Andes. Mérida, Venezuela. 115p.
- Asahina, E. 1978. Freezing Processes and Injury in Plant Cells. En P. H. Li y A. Sakai (Eds). Plant Cold Hardiness and Freezing Stress. Academia Press, Inc. New Cork. 416 p.
- Azcón-Bieto, J. y M. Talón. 2000. Fundamentos de Fisiología Vegetal. McGraw-Hill Interamericana. Madrid. 522 p.
- Azócar, A., F. Rada, G. Goldstein. 1988. Freezing tolerance in *Draba chionophila*, a “miniature” caulescent rosette species. *Oecologia* 75: 156-160.
- Beck, E. 1994. Cold Tolerance. En P. W. Rundel, A. P. Smith, F. C. Meinzer (Eds). Tropical Alpine Environments. Cambridge University Press. Cambridge. pp. 77-110.
- Briceño, B. y G. Morillo. 2002. Catálogo abreviado de las plantas con flores de los páramos de Venezuela. Parte I. Dicotiledóneas (Magnoliopsida). *Acta Bot. Venez.* V. 25 n 1:1-46.
- Carlquist, S. 1994. Anatomy of tropical alpine plants. En P. W. Rundel, A. P. Smith, F. C. Meinzer (Eds). Tropical Alpine Environments. Cambridge University Press. Cambridge. pp. 111-128.
- Castro-Díez, P., J. P. Puyravaud, J. H. C. Cornelissen. 2000. Leaf structure and anatomy as related to leaf mass per area variation in seedlings of a wide range of woody plant species and types. *Oecologia* 124: 476-486.
- Colmenares, M. 2002. Estudio del crecimiento de *Polylepis sericea* Wedd. en el páramo venezolano. Trabajo Especial de Grado. Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela. 67 p.
- D’Ambrogio de Argüeso, Ana. 1986. Manual de Técnicas en Histología Vegetal. Editorial Hemisferio Sur S.A. Buenos Aires. 83 p.

- Esau, K. 1967. *Anatomy of Seed Plants*. Second Edition. John Wiley & Sons, Inc. New York. 550 p.
- Estrada, J. 2003. Análisis multivariante de la variación altitudinal de la Composición Florística de la Cordillera de Mérida, Venezuela. Trabajo de Ascenso para ascender a la categoría de Profesor Agregado. Universidad de los Andes. Mérida, Venezuela. 268 p.
- Fahn, A. 1978. *Anatomía Vegetal*. Primera Edición Española. H. Blume Ediciones. Madrid. 643 p.
- Flores-Vindas, E. 1999. *La Planta: estructura y función*. Vol. II. Libro Universitario Regional. Cartago. 884 p.
- Goldstein, G., F. Rada, A. Azócar. 1985. Cold hardiness and supercooling along an altitudinal gradient in Andean giant rosette species. *Oecologia* 68: 147-152.
- Haberlandt, G. 1965. *Physiological Plant Anatomy*. Today & Tomorrow's Book Agency. New Delhi. pp. 1-13
- Hedberg, O. 1964. Features of Afroalpine Ecology. *Acta Phytogeografica Suecica* 49: 1-144.
- Johansen, D. 1940. *Plant Microtechnique*. McGraw-Hill. New York. 523 p.
- Karabourniotis G. y C. Fasseas. 1996. The dense indumentum with its polyphenol content may replace the protective role of the epidermis in some young xeromorphic leaves. *Can. J. Bot.* 74: 347-351.
- Körner, Ch. 1999. *Alpine Plant Life: Functional Plant Ecology on High Mountain Ecosystems*. Springer. Heidelberg. 338 p.
- Larcher, W. 1995. *Physiological Plant Ecology*. Third Edition. Springer. Berlin. 506 p.
- Levitt, J. 1972. *Physiological Ecology: responses of plants to environmental stresses*. Academic Press, Inc. New York. 697 p.

- Luque, R., H. De Sousa, J. E. Kraus. 1996. Métodos de coloração de Roeser 1972 –modificado- E. Kropp 1972. Visando la sustituição do azul de astra por azul de alçiao 8 GS ou 8 GX. Acta bot. Bras. 10 (2): 199-212.
- Márquez, E. 2002. Efecto de la Altitud sobre la Distribución de Gramíneas en el Páramo. Tesis de Maestría. Postgrado en Ecología Tropical. Universidad de los Andes. Mérida, Venezuela. 75 p.
- Monasterio, M. 1980. Las formaciones Vegetales de los Páramos de Venezuela. En M. Monasterio (Ed). Estudios Ecológicos en los Páramos Andinos. Ediciones de la Universidad de los Andes. Mérida, Venezuela. pp. 93-158
- Monasterio, M. Y M. Molinillo. 2003. Venezuela. En R. Hofstede, P. Segarra, P. Mena V. (Eds). Los Páramos del Mundo. Proyecto Atlas Mundial de los Páramos. Global Peatland Initiative/NC-IUCN/EcoCiencia. Quito. pp. 205-236.
- Orozco, A. 1986. Economía Hídrica en rosetas juveniles de *Espeletia* en el Páramo Desértico. Tesis de Maestría. Postgrado de Ecología Tropical. Universidad de los Andes. Mérida, Venezuela. 95 p.
- Rada, F., G. Goldstein, A. Azócar, M. Meinzer. 1985a. Freezing avoidance in Andean giant rosette species. Plant Cell Environ 8: 501-507.
- Rada, F., G. Goldstein, A. Azócar, F. Meinzer. 1985b. Daily and seasonal osmotic changes in a Tropical treeline species. Journal of Experimental Botany 36 (167): 989-1000.
- Rada, F., G. G. Goldstein, A. Azócar, F. Torres. 1987. Supercooling along an altitudinal gradient in *Espeletia schultzii*, a caulescent giant rosette species. J Exp Bot 38: 491-497.
- Rosquete, C. 2004. Estudio del balance energético foliar en *Ruilopezia atropurpurea* (A.C Sm.) Cuatrec. (especie no pubescente) y *Espeletia schultzii* Wedd. (especie pubescente), en el Páramo Venezolano.

- Trabajo Especial de Grado. Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela. 62 p.
- Rundel, P. W. 1994. Tropical alpine climates. En P. W. Rundel, A. P. Smith, F. C. Meinzer (Eds). Tropical Alpine Environments. Cambridge University Press. Cambridge. pp. 21-44.
- Salgado-Labouriau, M. 1986. Late quaternary paleoecology of Venezuela high mountains. En F. Vuilleumier y M. Monasterio (Eds). High altitude tropical biogeography. Oxford University Press, Inc. New York. pp. 202-217.
- Sarmiento, G. 1986b. Los principales Gradientes Ecoclimáticos en los Andes Tropicales. En: Simposio. Ecología de Tierras Altas. Anales del IV Congreso Latinoamericano de Botánica. Bogotá. Pp 47-64.
- Sass, J. 1958. Botanical Microtechnique. Third Edition. The Iowa State University Press. Iowa. 227 p.
- Schubert, C. 1980. Aspectos geológicos de los Andes Venezolanos: Historia, Breve Síntesis, el Cuaternario y Bibliografía. En M. Monasterio (Ed). Estudios ecológicos en los Páramos Andinos. Ediciones de la Universidad de los Andes. Mérida, Venezuela. pp. 29-46.
- Schulze, E.D., E. Beck, K. Müller-Hohenstein. 2005. Plant Ecology. Springer Berlin. Heidelberg. 702 p.
- Squeo, F., F. Rada, A. Azócar, G. Goldstein. 1991. Freezing tolerance and avoidance in high tropical Andean plants: Is it equally represented in species with different plant height? *Oecología* 86: 378-382.
- Squeo, F., F. Rada, C. García, M. Ponce, A. Rojas, A. Azócar. 1996. Cold resistance mechanisms in high desert Andean plants. *Oecología* 105: 552-555.
- Steponkus, P.L. y F. Lamphear. 1967. Refinement of the triphenyl tetrazolium chloride method of determining cold injury. *Plant Physiol* 42: 1423-1426.

- Taiz, L. y E. Zeiger. 2002. *Plant Physiology*. Third edition. Sinauer Associates, Inc., Publishers. Massachusetts. 690 p.
- Torres, F. 2003. Estructura y función nictinástica de la vaina foliar de *Coespeletia Cuatrec*. *Plantula* 3(2): 88-99.
- Vareschi, V. 1970. *Flora de los Páramos de Venezuela*. Ediciones del Rectorado. Universidad de los Andes. Mérida, Venezuela. 429 p.