



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE AGUASCALIENTES**

**CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**TESIS**

**“IDENTIFICACIÓN Y ESTUDIO DE EXPRESIÓN DE DOS  
GENES RELACIONADOS CON LA ABERTURA Y CIERRE DE  
ESTOMAS EN *Opuntia ficus-indica* y *Pereskia sacharosa*  
(CACTACEAE)”**

**PRESENTA**

**M. en C. Virginia Herrera Martínez**

**PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**COMITÉ TUTORAL**

**COTUTOR. Dr. José Francisco Morales Domínguez**

**COTUTORA. Dra. Ruth Elena Soria Guerra**

**ASESOR. Dr. Eugenio Pérez Molphe Balch**

**SINODALES**

**Dra. Nora Lilia Vasco Méndez**

**Dr. Gonzalo de Allende Arrarás**

**Aguascalientes, Ags. 19 de noviembre de 2015.**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE AGUASCALIENTES

CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

**VIRGINIA HERRERA MARTINEZ  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
PRESENTE.**

Estimada alumna:

Por medio de este conducto me permito comunicar a Usted que habiendo recibido los votos aprobatorios de los revisores de su trabajo de tesis y/o caso práctico titulado: **“Identificación y estudio de expresión de dos genes relacionados con la abertura y cierre de estomas en *Opuntia ficus-indica* y *Pereskia sacharosa* (CACTACEAE)”**, hago de su conocimiento que puede imprimir dicho documento y continuar con los trámites para la presentación de su examen de grado.

Sin otro particular me permito saludarle muy afectuosamente.

**ATENTAMENTE**

Aguascalientes, Ags., 22 de octubre de 2015

*“Se lumen proferre”*

**EL DECANO**

M. en C. JOSÉ DE JESÚS RUIZ GALLEGOS

c.c.p.- Archivo.  
JJRG,yscd



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE AGUASCALIENTES  
CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS  
Departamento de Química



ANIVERSARIO  
UAA

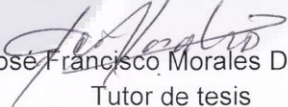
**M. en C. José de Jesús Ruíz Gallegos**  
**Decano del Centro de Ciencias Básicas**  
**PRESENTE**

Por este medio le comunico que he revisado la versión final del escrito de la tesis "**Identificación y estudio de expresión de dos genes relacionados con la abertura y cierre de estomas en *opuntia ficus-indica* y *pereskia sacharosa* (cactaceae)**", presentada por la alumna **M. en C. Virginia Herrera Martínez**, como requisito para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas. A mi juicio este escrito cumple con todas las características para que la alumna siga con el proceso de impresión definitiva y a la programación del examen de grado.

Además la M. en C. Virginia Herrera Martínez, cuenta también con una publicación aceptada en una revista indizada derivado de su proyecto de tesis.

Sin más por el momento reciba un cordial saludo

ATENTAMENTE  
"SE LUMEN PROFERRE"

  
Dr. José Francisco Morales Domínguez  
Tutor de tesis  
Departamento de Química  
Centro de Ciencias Básicas.

Aguascalientes, Ags, a 19 de octubre de 2015





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE AGUASCALIENTES  
CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS  
Departamento de Química



ANIVERSARIO  
uaa

FORMATO DE CARTA DE VOTO APROBATORIO

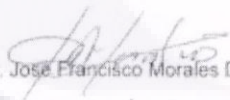
MC. JOSÉ DE JESÚS RUÍZ GALLEGOS  
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS  
P R E S E N T E


Por medio del presente como Tutores designados de la estudiante VIRGINIA HERRERA MARTÍNEZ con ID 18090 quien realizó la tesis titulada: "IDENTIFICACIÓN Y ESTUDIO DE EXPRESIÓN DE DOS GENES RELACIONADOS CON LA ABERTURA Y CIERRE DE ESTOMAS EN *Opuntia ficus-indica* Y *Pereskia sacharosa* (CACTACEAE)", y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el VOTO APROBATORIO, para que ella pueda proceder a imprimirla y así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Ponemos lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, nos permitimos enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE  
"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 21 de Octubre de 2015

  
Dr. José Francisco Morales Domínguez

  
Dra. Ruth Elena Soria Guerra

Tutores de Tesis

c.c.p. - Interesado  
c.c.p. - Secretaría de Investigación y Posgrado  
c.c.p. - Jefatura del Depto. de Química  
c.c.p. - Consejo Académico  
c.c.p. - Secretario Técnico

FORMATO DE CARTA DE VOTO APROBATORIO

**MC. JOSÉ DE JESÚS RUÍZ GALLEGOS**  
**DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS**  
**P R E S E N T E**

Por medio de la presente, como miembro del Comité Tutorial designado de la estudiante **VIRGINIA HERRERA MARTÍNEZ**, con ID **18090**, quien realizó la tesis titulada: **IDENTIFICACIÓN Y ESTUDIO DE EXPRESIÓN DE DOS GENES RELACIONADOS CON LA ABERTURA Y CIERRE DE ESTOMAS EN *Opuntia ficus-indica* y *Pereskia sacharosa* (CACTACEAE)**, y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimirla, y así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
"Se Lumen Proferre"  
Aguascalientes, Ags., a 21 de octubre de 2015.



**Dr. Eugenio Pérez Molphe Balch**  
**Miembro del Comité Tutorial**

c.c.p.- Interesado  
c.c.p.- Secretaría de Investigación y Posgrado  
c.c.p.- Jefatura del Depto. de Química  
c.c.p.- Consejero Académico  
c.c.p.- Minuta Secretario Técnico

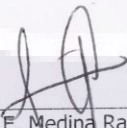


**dictamen de revisión de la tesis / trabajo práctico**


DATOS DEL ESTUDIANTE	
NOMBRE: Virginia Herrera Martínez	ID (No. de Registro): 18090
PROGRAMA: Doctorado en Ciencias Biológicas	ÁREA: Biotecnología Vegetal
TUTOR/TUORES: Dr. José Francisco Morales Domínguez Dra. Ruth Elena Soria Guerra	
TESIS ( * )	TRABAJO PRÁCTICO ( )
OBJETIVO: Identificar, caracterizar y determinar el perfil de expresión de genes que codifican para PNP's y expansinas, posiblemente implicados en la abertura y cierre de estomas en <i>Opuntia ficus-indica</i> y <i>Pereskia sacharosa</i>	
DICTAMEN	
CUMPLE CON CRÉDITOS ACADÉMICOS:	( * )
CONGRUENCIAS CON LAS LGAC DEL PROGRAMA:	( * )
CONGRUENCIA CON LOS CUERPOS ACADÉMICOS:	( * )
CUMPLE CON LAS NORMAS OPERATIVAS:	( * )
COINCIDENCIA DEL OBJETIVO CON EL REGISTRO:	( * )

Aguascalientes, Ags. a 30 de Octubre de 2015

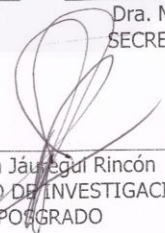
**FIRMAS**



\_\_\_\_\_  
Dra. Ileana E. Medina Ramírez  
CONSEJERO ACADÉMICO DEL ÁREA



\_\_\_\_\_  
Dra. Ma. Consolación Martínez Salgado  
SECRETARIO TÉCNICO DEL POSGRADO



\_\_\_\_\_  
Dr. Juan Jáuregui Rincón  
SECRETARIO DE INVESTIGACIÓN  
Y POSGRADO

Código: FO-040200-23  
Revisión: 00  
Emisión: 21/02/11

## AGRADECIMIENTOS

A LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE AGUASCALIENTES Y AL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (CONACyT) POR EL APOYO PARA ESTUDIOS DE DOCTORADO (BECA No. 217981).

AL PROGRAMA DE FORTALECIMIENTO DE CUERPOS ACADÉMICOS (PRODEP) POR EL RECURSO FINANCIERO AL PROYECTO “AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE ALGUNOS GENES DE RESPUESTA A ESTRÉS EN CACTÁCEAS”.

A LOS MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORAL, DR. FRANCISCO MORALES DOMÍNGUEZ, RUTH ELENA SORIA GUERRA Y DR. EUGENIO PÉREZ MOLPHE BALCH POR EL INVALUABLE APOYO PARA LA REALIZACIÓN DE ESTA INVESTIGACIÓN, QUE INCLUYÓ REACTIVOS Y MATERIAL VEGETAL, PERO SOBRE TODO LA PACIENCIA Y LA GUÍA PARA LA APROXIMACIÓN AL MÉTODO CIENTÍFICO.

A LOS SINODALES, DRA. NORA LILIA VASCO MÉNDEZ Y DR. GONZALO DE ALLENDE ARRARÁS POR LAS OBSERVACIONES Y SUGERENCIAS EN EL MEJORAMIENTO DE ESTE TRABAJO.

POR LA CONTRIBUCIÓN INDIVIDUAL A CADA UNO DE LOS ASPECTOS DE LA TESIS: CRISTI GARCIDUEÑAS, MARTHITA PÉREZ, DR. ROBERTO RICO, MONTSE VALLE, ISAAC REYES, MAESTRA MARGARITA DE LA CERDA, ARA ADABACHE, MARIO MEJÍA, MIGUE MARÍN, MEMO CEBREROZ, ALDO LARA, OSCAR ORTEGA, MARTÍN CONTRERAS, MARI RODRÍGUEZ, ALONSO MARTÍNEZ, MARIANA MUÑOZ, DAVID URRUTIA, SANDRIX HERNÁNDEZ, NANCY MEZA Y JOSAFATH QUEZADA.

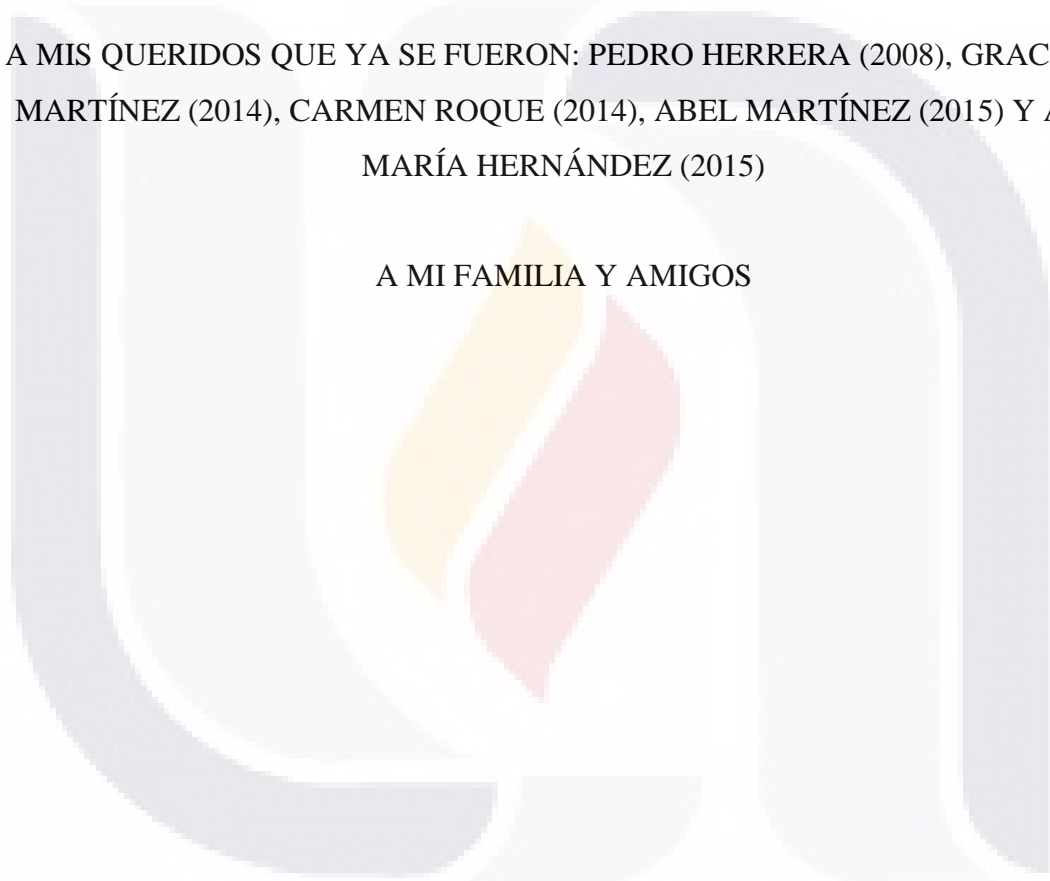
**DEDICATORIA**

AL PILAR DE MI VIDA: LUIS RÍOS HERNÁNDEZ

AL DR. FRANCISCO MORALES POR SU EMPEÑO EN ESTIMULAR A SUS  
ESTUDIANTES A LOGRAR SUS OBJETIVOS

A MIS QUERIDOS QUE YA SE FUERON: PEDRO HERRERA (2008), GRACIELA  
MARTÍNEZ (2014), CARMEN ROQUE (2014), ABEL MARTÍNEZ (2015) Y ANA  
MARÍA HERNÁNDEZ (2015)

A MI FAMILIA Y AMIGOS





**ÍNDICE GENERAL**

ÍNDICE GENERAL ..... 1

ÍNDICE DE TABLAS ..... 4

ÍNDICE DE FIGURAS ..... 5

RESUMEN ..... 7

ABSTRACT..... 10

1. ANTECEDENTES ..... 13

    1.1. LA FAMILIA CACTACEAE ..... 13

        1.1.1 Subfamilias ..... 13

        1.1.2. Morfología ..... 14

        1.1.3. Especies bajo estudio ..... 18

    1.2. ESTOMAS ..... 19

        1.2.1. ¿Qué son los estomas? ..... 19

        1.2.2. Tipos de estomas..... 21

        1.2.3. Densidad estomática e índice estomático ..... 23

        1.2.4. Movimiento estomático ..... 23

        1.2.5. Factores que afectan el movimiento estomático ..... 25

    1.3. GENES DE ESTUDIO ..... 29

        1.3.1. Expansinas ..... 29

        1.3.2. Péptidos natriuréticos en plantas..... 31

    1.4. ESTRATEGIAS DE SUPERVIVENCIA EN CACTÁCEAS ..... 34

    1.5. METABOLISMO ÁCIDO CRASULÁCEO (CAM) ..... 35

    1.6. COMPORTAMIENTO DE CACTÁCEAS *IN VITRO* ..... 37

    1.7. METABOLISMO C3 ..... 37

2. JUSTIFICACIÓN ..... 38

3. HIPÓTESIS ..... 39

4. OBJETIVOS ..... 39

    4.1. OBJETIVO GENERAL..... 39

    4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS ..... 39

5. METODOLOGÍA ..... 40

    5.1. MATERIALES ..... 40

5.1.1 MATERIAL VEGETAL .....	40
5.1.1.2 Ejemplares <i>in vitro</i> .....	40
5.1.1.3 Epidermis de cactáceas .....	40
5.2. MÉTODOS .....	40
5.2.1 ESTUDIO DEL APARATO ESTOMÁTICO EN CACTÁCEAS .....	40
5.2.1.1 Densidad y Tipos de estoma .....	40
5.2.1.2 Apertura Estomática .....	42
5.2.1.3 Verificación de metabolismo CAM y C3 en cactáceas .....	43
5.2.2 ESTUDIOS MOLÉCULARES.....	44
5.2.2.1 Aislamiento de ADN genómico (Lodhi <i>et al.</i> , 1994) .....	44
5.2.2.2 Aislamiento de ARN total (López-Gómez y Gómez-Lim, 1992) .....	44
5.2.2.3 Cálculo de la concentración de Ácidos Nucleicos .....	45
5.2.2.4 Identificación de los genes $\alpha$ -expansinas y PNP's en cactáceas mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) .....	45
5.2.2.5 Purificación de los productos de amplificación obtenidos por PCR y RT-PCR.....	46
5.2.2.6 Clonación de los fragmentos de PCR para actina y PNP de <i>Opuntia ficus-indica</i> y <i>Pereskia sacharosa</i> .....	46
5.2.2.7 PCR en tiempo real para el número de copias del gen PNP .....	47
5.2.2.8 Secuenciación .....	48
5.2.2.9 Análisis bioinformático de las secuencias <i>OfPNPA</i> ( <i>O. ficus-indica</i> ) y <i>PsPNPA</i> ( <i>P. sacharosa</i> ).....	48
5.2.3 Expresion de los genes de $\alpha$ -Expansina y PNP's mediante RT-PCR .....	49
5.2.3.1 Hibridación <i>in situ</i> con ADN .....	49
5.2.3.2 Inmunolocalización de receptor para PNP's con anticuerpo de PNA de humano (en conejo). .....	49
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	51
6.1 ESTUDIO DEL APARATO ESTOMÁTICO EN CACTÁCEAS.....	51
6.1.1 Densidad y tipos de estomas .....	51
6.1.2 Apertura Estomática .....	55
6.1.3 Verificación de metabolismo CAM y C3 en cactáceas .....	65
6.2 ESTUDIOS MOLECULARES.....	68
6.2.1 Aislamiento de ADN genómico y ARN total .....	68
6.2.2 Identificación de los genes de $\alpha$ -Expansina y PNP's mediante la PCR.....	70

6.2.3 Clonación de los fragmentos de PCR para Actina y PNP en *Opuntia ficus-indica* y *Pereskia sacharosa* ..... 71

6.2.4 PCR en tiempo real para el número de copias del gen PNP ..... 72

6.2.5 Análisis Bioinformático ..... 73

6.2.6 Expresión de los genes de  $\alpha$ -Expansina y PNPs ..... 81

6.2.9 Inmunolocalización de receptor para PNPs con anticuerpo de PNA de humano 85

7. CONCLUSIONES ..... 87

8. PERSPECTIVAS ..... 89

9. BIBLIOGRAFÍA ..... 90

ANEXOS ..... 100



**ÍNDICE DE TABLAS**

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para amplificar los genes PNP-A y  $\alpha$ -Expansina en Cactáceas.....46

Tabla 2. Reacción de Ligación para la clonación .....47

Tabla 3. Reacción de restricción para el escrutinio de clonas .....47

Tabla 4. Densidad estomática y tipo de estoma de los especímenes analizados. ....51

Tabla 5. Análisis de Varianza para AIA en *O. ficus-indica*. .....56

Tabla 6. Análisis de Varianza para nuevas concentraciones de AIA en *O. ficus-indica*. ....57

Tabla 7. Análisis de Varianza para AIA en *P. sacharosa*. .....58

Tabla 8. Análisis de Varianza para nuevas concentraciones de AIA en *P. sacharosa*. ....60

Tabla 9. Análisis de Varianza de ABA en *P. sacharosa*. .....61

Tabla 10. Análisis de Varianza de ABA en *O. ficus-indica*. .....62

Tabla 11. Correlaciones entre Condición y Especie. ....67

Tabla 12. Cuantificación y determinación de pureza de ADN de 11 especies de cactáceas.....69

Tabla 13. PCR en tiempo real para la estimación del número de .....73

**ÍNDICE DE FIGURAS**

Figura 1. Las dos principales especies de cactáceas utilizadas en este estudio: *Opuntia ficus- indica* y *Pereskia sacharosa*..... 19

Figura 2. Esquema del complejo estomático. Al interior de las células guarda se pueden visualizar los cloroplastos de color verde.. .....20

Figura 3. 3A) Variantes de estomas paracíticos.. .....22

Figura 4. Ciclo diario de la toma de CO<sub>2</sub> (línea sólida) y acumulación de ácido málico .....36

Figura 5. Impresiones epidérmicas de estomas tipo opuntioide de cactáceas cultivadas *in vitro* con vista 4X. Método adaptado en el laboratorio de biología molecular de plantas....52

Figura 6. Impresiones epidérmicas de estomas tipo paralelocítico de cactáceas cultivadas *in vitro* con vista 4X. Método adaptado en el laboratorio de biología molecular de plantas....52

Figura 7. Intervalos de confianza de Tukey para AIA en *O. ficus-indica*. .....55

Figura 8. Apertura estomática de *Opuntia ficus-indica* en presencia de AIA.. .....56

Figura 9. Intervalos de confianza de Tukey para AIA en *O. ficus-indica*. .....57

Figura 10. Diagramas de caja para nuevas concentraciones de AIA en *O. ficus-indica*. ....57

Figura 11. Intervalos del 95% de confianza para AIA en *P*.. .....58

Figura 12. Apertura estomática de *P. sacharosa* en presencia de AIA. ....59

Figura 13. Intervalos del 95% de confianza para nuevas concentraciones de AIA en *P. sacharosa*. .....59

Figura 14. Apertura estomática de *P. sacharosa* en presencia de AIA. ....60

Figura 15. Intervalos del 95% de confianza para ABA en *P. sacharosa*. .....61

Figura 16. Apertura estomática de *P. sacharosa* en presencia de .....61

Figura 17. Intervalos del 95% de confianza para ABA en *Opuntia ficus-indica*. .....62

Figura 18. Apertura estomática de *O. ficus-indica* en presencia de .....63

Figura 19. Series de tiempo de pH.....66

Figura 20. Serie de tiempo de pH para nopal y limón silvestre y para nopal bajo fotoperiodo y bajo luz continua (ambas *in vitro*).....67

Figura 21. Imagen representativa de ADN genómico extraído de .....69

Figura 22. Imagen representativa de ARN total extraído .....69

Figura 23. Productos de PCR para la amplificación de Péptido .....70

Figura 24. Productos de PCR para la amplificación de: A) Péptido Natriurético: carril 1) *A. thaliana*, carril 2) *O. ficus-indica*, carril 3) marcador de peso molecular de 1 kb, B)  $\alpha$ -Expansina en *Opuntia ficus-indica*: carril 1) marcador de peso molecular de 1 kb, carril 2) Expansina amplificada con el oligonucleótido específico (ExE), carril 3) Expansina amplificada con el oligonucleótido degenerado (ExD). .....71

Figura 25. Perfil de Restricción y PCR para el gen Actina. A) Por restricción:.....72

Figura 26. Electroforesis de PCR y Perfil de restricción para .....72

Figura 27. Alineamiento de la secuencia genómica y ADNc de *A. thaliana* .....75

Figura 28. BLAST realizado en la base de datos del NCBI. ....76

Figura 29. Dominios conservados de *OfPNPA*.....76

Figura 30. Alineamiento múltiple realizado en Clustal W2 entre *OfPNPA* y B6RN55 proteína P12 en *Citrus japonica*. .....77

Figura 31. Árbol filogenético construido con el algoritmo del Vecino más cercano mediante el software MEGA3.1. ....78

Figura 32. Secuencia de PNP en *P. sacharosa* (PsPNP). La extensión de 320 pb está flanqueada por los oligonucleótidos en sentido y antisentido marcados en amarillo. ....78

Figura 33. Alineamiento de *PsPNP* con el ADNc y genómico de *A. thaliana*.. .....79

Figura 34. Alineamiento BLASTX de PsPNP en las bases de datos del NCBI. ....80

Figura 35. Alineamiento en aminoácidos de *AtPNPA* y *PsPNP* mediante el software .....80

Figura 36. Hipótesis filogenética de la secuencia *PsPNP* de *P. sacharosa* (PNPA *P. sacharosa*) construida con MegAling del software DNASTar.....81

Figura 37. Perfil de expresión de los genes  $\alpha$  expansinas y PNPb bajo inducción de ABA. 82

Figura 38. Amplificación de actina en *P. sacharosa*, bajo inducción de AIA y el RNA ribosomal (RNAr) como control de concentración en cada condición.....83

Figura 39. Perfil de expresión del gen de  $\alpha$  expansina en periodos de .....84

Figura 40. Hibridación *in situ* en estomas de *O. ficus-indica* con una sonda de .....84

Figura 41. Inmunolocalización en estomas de *O. ficus-indica* con .....85

## RESUMEN

Las cactáceas han evolucionado para crecer en medio ambientes caracterizados por temperaturas elevadas y poca disponibilidad de agua. El mecanismo por el cual han alcanzado dicha adaptación es mediante la regulación de la apertura y cierre de los estomas, que son los poros mediante los cuales se da el intercambio gaseoso entre la planta y la atmósfera, según la demanda del carbono, momento del día y las condiciones de humedad. En cactáceas esta regulación radica en que los estomas abren preferentemente por la noche para evitar la excesiva pérdida de agua y para captar el dióxido de carbono, que en las horas de luz va a ser metabolizado y transformado en compuestos ricos en energía, indispensables para la propia planta y para toda la cadena trófica. La expresión de este tipo de metabolismo llamado Metabolismo Ácido de las Crasuláceas (CAM) requiere de la inducción de varios genes, entre ellos los que actúan directamente sobre el comportamiento del estoma.

En este trabajo se estudiaron dos genes relacionados con el movimiento estomático: las  $\alpha$ -expansinas, que intervienen en los cambios de volumen que experimentan las células guarda al abrir o cerrar el poro, y los péptidos natriuréticos (PNPs) que regulan la homeostasis de agua y solutos. La identificación de estos genes en *Opuntia ficus-indica* (*OfPNPA*) y *Pereskia sacharosa* (*PsPNPA*) se realizó mediante PCR. El producto de amplificación para  $\alpha$ -expansina fue de 900 pb. Si bien no se logró la secuenciación de este gen en las especies bajo estudio, el trabajo de laboratorio se realizó con la confianza de que, previamente ya había sido secuenciado dicho gen en guayaba y en otras plantas donde su secuencia fue con una alta similitud a las expansinas, utilizando los mismos oligonucleótidos degenerados. Por otra parte, los productos amplificados de PNPs fueron de aproximadamente 280 pb. Las secuencias obtenidas compartieron el 99% de identidad con un PNP de *Hedera helix* y con los dominios conservados de expansina y de péptido natriurético. El análisis filogenético mostró que *OfPNPA* y *PsPNPA* son homólogos de un PNP de *Erucastrum strigosum* y de una secuencia EG45 de *Arabidopsis thaliana* perteneciente al dominio catalítico de las endoglucanasas. Adicionalmente se estimó el

número de copias del gen PNP en ambas especies mediante PCR en tiempo real utilizando la actina como gen de referencia. Como resultado, se observó que el gen de *PNP* se encuentra en una sola copia en los genomas de *Opuntia ficus-indica* y *Pereskia sacharosa*. Además se realizó una hibridación *in situ* para localizar PNPs a nivel de estomas utilizando segmentos de epidermis de *Opuntia* y como sonda el fragmento *OfPNPA* y una inmunolocalización con un anticuerpo que reconoce el receptor de péptido natriurético (PN) de humanos (producido en conejo) en epidermis de *O. ficus-indica*, encontrando una reacción positiva en ambas pruebas.

Ya que la expresión génica de expansinas y PNPs podría estar relacionada con los factores que inciden sobre la apertura y cierre estomáticos, se realizó un estudio de la expresión en respuesta a varias concentraciones de ácido indolacético (AIA) que promovería la apertura de los estomas y de ácido abscísico (ABA) que influiría en el cierre estomático en *Opuntia ficus-indica* y *Pereskia sacharosa*. Además se determinó el grado de apertura de los estomas en cada concentración. Los resultados mostraron que la mayor respuesta al ABA fue de 100  $\mu\text{M}$  para ambas especies y al AIA de 10  $\mu\text{M}$  para *Pereskia* y de 100  $\mu\text{M}$  para *Opuntia*. Para el estudio de expresión se realizaron diversas extracciones de ARN total en ambas especies bajo la inducción de los dos reguladores de crecimiento, donde se obtuvieron resultados parciales ya que la expresión no se observó en varias de las concentraciones evaluadas. A pesar de ello los resultados no fueron concluyentes. Por ejemplo en *Pereskia* solo amplificó la actina para AIA, no así para PNP y  $\alpha$ -expansina. En *Opuntia* el resultado más relevante fue con ABA, en donde se observó una sobreexpresión de PNP y  $\alpha$ -expansina a 1 mM atribuida a la posible saturación con fitohormona, reflejada en la apertura estomática. Adicionalmente se pretendió relacionar la apertura estomática, el tipo de metabolismo y la expresión de los genes PNP y  $\alpha$ -expansina, tanto en *Citrus aurantifolia* (planta C3), como en *Opuntia*, con una periodicidad de 6 h. Este sondeo mostró un ligero aumento en la expresión de la expansina en limón a las 6 pm donde ocurrió la menor apertura estomática. La resolución en la lectura de las 6 am no fue suficiente, ya que las muestras aparecieron barridas. Esto mismo ocurrió para PNP en todas las lecturas y en las muestras de *Opuntia*.



En el aspecto fisiológico se verificó el metabolismo CAM en base a la determinación de pH cada hora, durante 24 horas, bajo el fundamento de que las plantas CAM presentan una variación de pH a lo largo del día debida a la acumulación nocturna de ácido málico en las vacuolas de las células guarda de los estomas. Para ello se trabajó con cuatro plantas CAM naturales (*ex vitro*) que fueron *Cylindropuntia imbricata* (cardenche), *Myrtillocactus geometrizans* (garambullo), *Aloe barbadensis* (sábila) y *Opuntia* sp., además con *Opuntia ficus-indica in vitro* bajo luz continua y fotoperiodo de 12 h y utilizando *Citrus aurantifolia* (limón) (planta C3) como control. Los resultados mostraron que en plantas silvestres había un aumento del pH en las horas de mayor incidencia de luz y una disminución de pH desde el atardecer hasta las 9 de la mañana. Este comportamiento no se observó en plantas de *Opuntia* bajo luz continua, cuyo patrón fue muy parecido al del limón. Sin embargo, al someter estas plantas a un fotoperiodo de 12 h por dos semanas la planta fue recuperando su metabolismo CAM.

Además de modificar el metabolismo, las condiciones del cultivo *in vitro* también afectan la morfología de la planta. A este respecto, se evaluaron las posibles diferencias en la tipología, frecuencia y densidad estomáticas en tres zonas de la planta: apical, media y basal bajo dos condiciones de cultivo (*in vitro* y *ex vitro*) en cuatro especies de cactáceas: *O. ficus-indica*, *Hylocereus undatus*, *Escontria chiotilla* y *Mammillaria petterssonii*. Se obtuvo la densidad estomática (DE) y el índice estomático (IE) en cada uno de los niveles de ambos factores (zona y tipo de cultivo). Los resultados mostraron que los estomas corresponden al tipo ciclocítico, tetracítico u opuntioide en *O. ficus-indica* y de tipo paralelocítico en *E. chiotilla*, *H. undatus* y *M. petterssonii*. Se observó que en el cultivo *ex vitro* la DE fue menor que en condiciones *in vitro*, exceptuando *H. undatus*. La región apical fue la que presentó mayor DE tanto *in vitro* como *ex vitro* y la interacción entre el tipo cultivo y las zonas del explante fueron altamente significativas, lo cual implica que el impacto del tipo de cultivo es diferente en las zonas del tallo.

## ABSTRACT

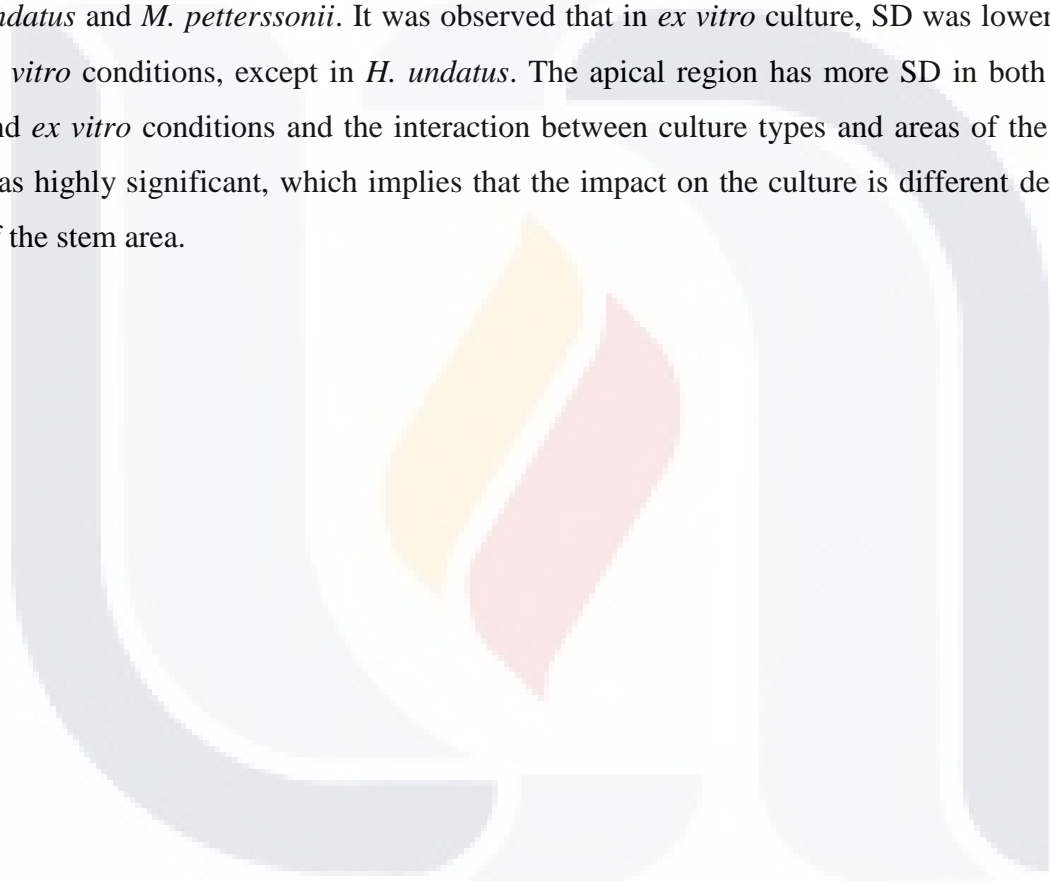
Cacti have evolved to grow in environments characterized by high temperatures and low water availability. The mechanism for this adaptation is by regulate the opening and closing of stomata, which are pores through which gas exchange occurs between the plant and the atmosphere, as carbon demand, time of day and moisture conditions are required. In cacti, this regulation is by stomatal opening at night to prevent excessive water loss and to capture carbon dioxide, which in daylight hours will be metabolized and converted into energy-rich compounds, essential for the own plant and for the whole food chain. Expression of this type, called CAM metabolism, requires induction of several genes, including those that act directly on the behavior of the stoma.

In this work we study two genes related with stomatal movement: The  $\alpha$ -expansins, involved in volume changes experienced by guard cells when opening or closing the pores, and natriuretic peptides (PNPs) that regulate water homeostasis and solutes. The identification of these genes in *Opuntia ficus-indica* (*OfPNPA*) and *Pereskia sacharosa* (*PsPNPA*) was performed by PCR. The amplification product for  $\alpha$ -expansin was 900 bp. While the sequencing of this gene was not achieved in the species under study, the laboratory work was performed with the confidence that we had been previously sequenced this gene in guava using the same degenerated oligonucleotides. Moreover, the amplification products of PNPs were approximately 280 bp. The obtained sequences shared 99% identity with *Hedera helix* PNP and with conserved expansin and natriuretic peptide domains. Phylogenetic analysis showed that *PsPNPA* and *OfPNPA* are homologous to a *Erucastrum strigosum* PNP and an EG45 sequence from *Arabidopsis thaliana* belonging to the endoglucanases catalytic domain. Additionally, the copy number of PNP gene in both species was estimated by real-time PCR using actin as reference gene. We found that the PNP gene has a single copy in *O. ficus-indica* and *P. sacharosa* genomes. Moreover hybridization *in situ* was performed to localize PNPs at stomata level, using *Opuntia* epidermis segments and *OfPNPA* fragment as a probe. The immunolocalization was performed with a specific antibody recognizing the human natriuretic peptide receptor (PN) (produced in rabbits) in cactus epidermis. We found a positive reaction in both tests.

Since gene expression of expansins and PNPs could be related to stomatal opening and closing factors, an expression study was done in response to several concentrations of indole acetic acid (IAA) and abscisic acid (ABA) in *O. ficus-indica* and *P. sacharosa*. Furthermore, the opening grade of the stomata in each concentration was determined. The results showed that the highest response to ABA was 100  $\mu$ M for both species and 10  $\mu$ M for *Pereskia* and 100  $\mu$ M for *Opuntia* for AIA. In order to study the gene expression, different RNA extractions in both species under both inducing growth regulators were performed. However the results were inconclusive. For example, in *Pereskia* actin amplified only for AIA, but not for PNP and  $\alpha$ -expansin. In *Opuntia* the most relevant result was with ABA, wherein an overexpression of PNP and  $\alpha$ -expansin at 1 mM attributed to the possible saturation with this phytohormone, was reflected in stomatal opening. Additionally we try to relate stomatal opening, type of metabolism and expression of the PNP and  $\alpha$ -expansin genes, in *Citrus aurantifolia* (C3 plant), and *Opuntia*, with a periodicity of 6 h. This analysis showed a slight increase in expansin expression at 6 pm in lemon where the lower stomatal opening occurred. Resolution reading at 6am was not enough, because the samples appeared swept. The same happened to PNP in all readings and *Opuntia* samples.

In physiological aspects, CAM metabolism was verified based on pH determination every hour for 24 hours, on the basis that the CAM plants show a pH variation throughout the day due to accumulation of malic acid in the guard cells vacuoles of stomata. For this experiment we worked with four natural CAM plants (*ex vitro*): *Cylindropuntia imbricata* (cardenche), *Myrtillocactus geometrizans* (garambullo), *Aloe barbadensis* (sábila) and *Opuntia sp.*, we also include *O. ficus-indica in vitro* under continuous light and 12 h photoperiod using *C. aurantifolia* (limón) (C3 plant) as a control. The results showed that the wild plants had a pH increase in the hours of greatest incidence of light and a decrease in pH from sunset until 9 am. This behavior was not observed in *Opuntia* plants under continuous light whose pattern was very similar to the lemon. However when these plants were subjecting to a 12 h photoperiod for two weeks, the plants recovering their CAM metabolism.

In addition to changes in the metabolism, *in vitro* culture conditions also affect the plant morphology. In this respect, the differences in the type, frequency and stomatal density in three plant areas, apical, middle and basal, were evaluated under two different culture (*in vitro* and *ex vitro*) in four species of cacti: *O. ficus-indica*, *Hylocereus undatus*, *Escontria chiotilla* and *Mammillaria petterssonii*. Stomatal density (SD) and stomatal index (SI) in each condition was obtained. The results showed that stomata are of the ciclocitic, tetracytic or opuntioide type in *O. ficus-indica* and paralelocitic type in *E. chiotilla*, *H. undatus* and *M. petterssonii*. It was observed that in *ex vitro* culture, SD was lower than in *in vitro* conditions, except in *H. undatus*. The apical region has more SD in both *in vitro* and *ex vitro* conditions and the interaction between culture types and areas of the explant was highly significant, which implies that the impact on the culture is different depending of the stem area.



## 1. ANTECEDENTES

### 1.1. LA FAMILIA CACTACEAE

Los miembros de la familia Cactaceae son plantas dicotiledóneas pertenecientes al orden *Caryophyllales*. Las cactáceas son autóctonas del continente americano distribuyéndose en las regiones áridas y semiáridas desde Canadá hasta Argentina y Chile, en altitudes de hasta 4000 metros sobre el nivel del mar. Esta familia consta de 129 géneros y cerca de 1900 especies, siendo México el país con mayor diversidad ya que cuenta con 850 especies, por lo que se considera centro de diversificación de este tipo de plantas. Las cactáceas mexicanas presentan un alto grado de endemismo, 73% a nivel de género y 78% a nivel de especie (Durán y Méndez, 2010).

#### 1.1.1 Subfamilias

La clasificación de cactáceas desarrollada por el Grupo de Sistemática Internacional de Cactáceas reconoce cuatro subfamilias (Anderson, 2001):

a) **Pereskioideae**, cuyo único género es *Pereskia* y posee las características más ancestrales de esta familia. Son plantas en forma de árbol, arbusto o trepadoras. El tallo es suculento y leñoso y con púas dispuestas. Presenta hojas y espinas, flores solitarias o en inflorescencia diurnas y fruto indehiscente en forma de baya carnosa. Semillas de 1.7 a 7.5 mm color marrón oscuro brillante. Presenta metabolismo tipo CAM en los tallos y C3 en las hojas; se distribuye desde el sur de México a través de América Central y el Caribe, hasta el este de Sudamérica.

b) **Maihuenioideae**, es un arbusto cespitoso cuyo género es *Maihuenia*. El tallo es suculento y cilíndrico. Las hojas son pequeñas y persistentes, presentan tres espinas por areola; las flores son terminales y solitarias, los frutos son un tanto carnosos con pequeñas escamas. Las semillas miden de 3 a 4 mm de diámetro y son brillantes. Sólo presenta metabolismo C3. Se localiza únicamente en Argentina y Chile.

c) **Opuntioideae**, engloba plantas de crecimiento arbóreo, arbustivo o cespitoso. Quince géneros pertenecen a esta subfamilia. El tallo es normalmente segmentado, cada segmento recibe el nombre de cladodio. Presenta hojas efímeras y pequeñas, además de gloquidios (pelos barbados delgados) y espinas presentes. Las flores son casi siempre laterales, sésiles, solitarias y diurnas. Los frutos son en forma de baya indehiscente y algunas veces se deseca en la madurez, las semillas son ovales de 3 a 12 mm. Se distribuyen por todo el continente americano. El género *Opuntia* presenta un genoma diploide con 22 cromosomas, sin embargo es posible encontrar híbridos diploides, tetraploides o hasta octaploides propagados vegetativamente (Russell y Felker, 1987).

d) **Cactoideae**, comprende plantas que pueden ser arbóreas, arbustivas, cespitosas, trepadoras o epífitas, sus raíces pueden ser fibrosas o tuberosas. Los tallos usualmente son de globosos a columnares, acanalados o tuberculados. Las hojas son vestigiales o ausentes. Carece de gloquidios, las flores son sésiles y pueden ser diurnas o nocturnas; el fruto puede ser dehiscente o indehiscente, carnoso o seco y varía en tamaño y forma; las semillas también varían en diámetro y algunas veces presentan apéndices; la testa tiene una arquitectura variable. Se distribuye por todo el hemisferio oeste, con una especie *Rhipsalis baccifera* también distribuida en África, Madagascar, Sri Lanka e islas del Océano Índico. Esta subfamilia contiene cerca de 100 géneros.

### **1.1.2. Morfología**

La morfología de las cactáceas presenta las siguientes características (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1978).

#### **Flores**

Pueden ser solitarias o estar en inflorescencia; son hermafroditas. La floración se lleva a cabo principalmente en primavera.

## **Polen**

Los granos de polen de cactáceas presentan gran diversidad de formas y tamaños pero que a nivel de especie se mantienen constantes, los hay desde monocarpados (una sola cara) hasta "cubo-dodecaedro" seis caras cuadradas y doce hexagonales.

## **Fruto**

Es un fruto complejo, ya que se origina a partir del ovario, del tejido medular del eje y cortical y del carpelo. Los frutos de cactáceas de géneros más primitivos presentan aréolas numerosas provistas de abundante lana y espinas, en tanto que los géneros más evolucionados producen bayas "chilitos" a partir de aréolas que pueden desaparecer o permanecer en forma diminuta.

## **Raíz**

La raíz de las cactáceas es similar a otras dicotiledóneas. Se origina de la radícula del embrión, fija a la planta al suelo, absorbe agua y nutrientes y en algunos géneros los almacena.

Se observan tres tipos principales raíces: 1) cuando la raíz principal se desarrolla más que las secundarias, 2) cuando las secundarias crecen en mayor proporción que las primarias y 3) cuando ambas presentan el mismo desarrollo. Generalmente la raíz principal finge como sostén de la planta y las raíces adventicias se encargan de la absorción, que sólo se efectúa durante un periodo corto del año, normalmente en temporada de lluvias. Si la raíz se especializa en almacenar puede ser: napiforme o tuberosa, algunas se desarrollan en las aréolas del tallo o pericarpio. También se pueden encontrar raíces aéreas en trepadoras y epífitas.

## **Tallo**

Los tallos son de tipo suculento, siendo excepcionalmente leñosos. Las especies de esta familia presentan tallos cilíndricos, globulares o planos (cladidos). Estas características y la arquitectura de la planta determinan las diferentes formas de vida (Ortega-Baes *et al.*, 2010).

Según la forma del tallo las cactáceas pueden ser arborescentes, arbustivas, trepadoras, rastreras, con ramas discoides (cladodios), podarios, postradas ó cespitosas. En casi todos los géneros debajo de la epidermis se encuentra el colénquima que da solidez al tallo. Los estomas están más o menos hundidos lo que permite la formación de espacios aéreos que se saturan de vapor de agua disminuyendo la transpiración, siendo su número más escaso que en especies no xerófitas.

La cámara subestomática es muy larga sobre todo en algunas especies de opuntia que presentan una gruesa zona de colénquima. Más abajo del tejido tegumentario y del colénquima en caso de que exista, se puede ubicar el parénquima en empalizada o clorofiliano formado por varias capas de células prismáticas, grandes y alargadas de paredes delgadas con abundantes cloroplastos, es donde se lleva a cabo la fotosíntesis. Más abajo se encuentra en parénquima colector de células grandes, esféricas, turgentes por la gran cantidad de agua y polisacáridos que almacenan, a este tejido se debe la succulencia de estas plantas.

### **Hojas**

Las hojas son básicamente tallos con extensiones laterales, tienen origen en las yemas y su crecimiento se debe más a la expansión celular que a la multiplicación de células.

Las hojas típicas están formadas principalmente por un mesófilo clorofílico que en dicotiledóneas se diferencia claramente en mesófilo en empalizada (de una a tres capas) y en mesófilo esponjoso el cual está rodeado por grandes espacios de aire, en monocotiledóneas el mesófilo no se encuentra bien diferenciado. Este tejido se ubica entre una epidermis superior e inferior protegida por una capa cerosa llamada cutícula. El parénquima se organiza de diferente forma según esté presente o en monocotiledónea o dicotiledónea.



TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Las hojas en cactáceas están bien diferenciadas en los géneros *Pereskia*, *Peresklopsis* y *Quiabentia*, presentan limbo grueso y de forma elíptica o palmeada con nervaduras pennadas; peciolo muy corto o faltante. En Opuntioideae las hojas se modifican de modo que la base se transforma en un tubérculo, en tanto que el parénquima clorofílico y en empalizada rodean el haz vascular central; el peciolo desaparece y el limbo se reduce, adquiriendo forma cónica, cilíndrica o de espina. Las espinas son órganos muy característicos de las cactáceas que se forman de los tejidos meristemáticos de las areólas en la base, pasando por un proceso de endurecimiento por lignificación. Se han clasificado en tres clases: gruesas, defensivas y glandulares. Las espinas gruesas más comunes son las setosas, aciculares, subuladas, cónicas, cilíndricas, aplanadas, rectas, curvas, retorcidas, ganchudas y plumosas, de color blanco hasta negro; las defensivas están comprendidas por las glóquidas o "aguates" propias de la familia Opuntioideae, son muy delgadas, pequeñas y rígidas, poseen en el exterior células fusiformes que dejan una porción libre retrobarbada que permite su fácil acceso a la piel pero son difíciles de extraer; las suaves incluyen a las cerdas largas y rígidas y pelos largos o los tricomas que están formados por hileras de células cuyo conjunto forma la lana o fieltro que existe en todas las aréolas. Las espinas glandulares de las cuales los productos de secreción son azucarados y atraen a insectos como hormigas. La función que se le adjudica a las espinas están la de defender la planta de daños causados por animales, protección contra el sol debido a la sombra que proyectan sobre el tallo, impedir la excesiva transpiración y facilitar la condensación de agua atmosférica a la par de los pelos lanosos.

### **Estomas**

La mayoría de cactáceas presentan estomas más o menos hundidos de tipo paralelocítico, que se caracterizan por presentar tres o más células subsidiarias paralelas al eje longitudinal de las células oclusivas.

### 1.1.3. Especies bajo estudio

#### ***Opuntia ficus-indica* (Linnaeus)P. Miller 1768**

Pueden ser plantas arbustivas o arbóreas de 1 a 6 m de altura; por lo general con troncos bien desarrollados de hasta 35 cm de diámetro. Los segmentos del tallo son variables, estrechamente obovados u oblongos, aplanados, verdes de 20 a 60 cm de largo y de 10 a 25 cm de ancho. Aréolas estrechamente elípticas de 2 a 5 cm de separación. Las espinas son inconspicuas y a menudo ausentes. Las flores van de amarillas a rojas de 5 a 10 cm de diámetro. El fruto, de ovoide a oblongo, verde, naranja o rojo de 6 a 10cm de largo con gloquidios y algunas veces espinas. Su distribución es mundial, y ha sido naturalizada en Sudáfrica, Australia y el Mediterráneo (Anderson, 2001) (**Fig.1**).

Anderson (2001) menciona que se desconoce las características originales de *O. ficus-indica* debido a la selección hortícola y la hibridación entre estas plantas. Tiene una fuerte importancia económica en las regiones áridas y semiáridas del mundo.

#### ***Pereskia sacharosa* Grisebach 1879**

Son plantas arbóreas de 5 a 7 m de altura o arbustivas de 2 a 4 m. Ramas a menudo en zig-zag. Las hojas son muy variables, tanto en forma como en tamaño, la mayoría son obovadas y a menudo plegadas a lo largo de la nervadura central, con un largo de 3 a 12 cm y de 2 a 7 cm de ancho, pecioladas, venación pinnada, nervadura central prominente, venas laterales de 4 a 6 cm en ángulos divergentes. Espinas de 0 a 5 en ramas pequeñas, que nacen en clusters y luego se esparcen, muy robustas de 1 a 4 cm de largo. Las flores son solitarias o en inflorescencias terminales de 2 a 4, rosas o tonalidades de este color, de 3 a 7 cm en diámetro. Los frutos tienen forma subglobosa de 4 a 5 cm de largo y de diámetro; pueden ser verdes o amarillentos y carnosos (**Fig. 1**). Se distribuyen en tierras bajas de los Andes y la región del Gran Chaco de Brasil (incluyendo Mato Grosso), Bolivia, Paraguay y el noroeste de Argentina a elevaciones de 1000 a 2500 m (Anderson, 2001).

Nobel (1988) menciona que existe consenso en que las cactáceas se originaron en algún lugar del norte de Sudamérica, siendo el género *Pereskia* el más primitivo. Las hojas de *Pereskia* son los órganos fotosintéticos dominantes en esta especie, al contrario del tallo cuyo intercambio de CO<sub>2</sub> es siempre negativo. En las hojas se fija el carbono utilizando la vía C3, principalmente durante el día. Esto normalmente se cumple en plantas en buenas condiciones de humedad, temperaturas moderadas y niveles cercanos a la saturación de la radiación fotosintéticamente activa (PAR). El hecho de que *Pereskia* pertenezca a la subfamilia más ancestral de las cactáceas concuerda con que tienda a usar principalmente la vía más ancestral de fijación del carbono que es la C3.



**Figura 1.** Las dos principales especies de cactáceas utilizadas en este estudio: *Opuntia ficus- indica* y *Pereskia sacharosa*. Tomadas de [www.hogarmania.com](http://www.hogarmania.com) y [arbolesdelchaco.blogspot.com](http://arbolesdelchaco.blogspot.com).

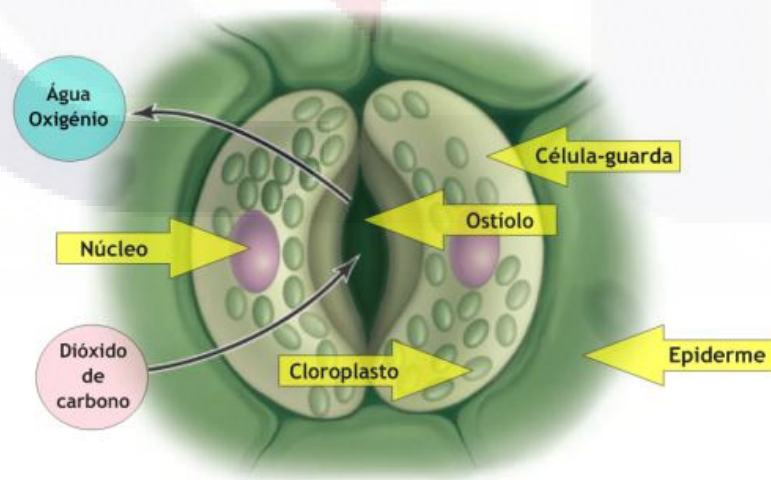
## 1.2. ESTOMAS

### 1.2.1. ¿Qué son los estomas?

Los estomas son poros microscópicos que tienen gran capacidad de difusión, lo que permite la absorción de CO<sub>2</sub> y protege a la planta de la excesiva pérdida de agua, aunque se ha observado que el O<sub>3</sub> y el SO<sub>2</sub> también entran por el estoma. Estos poros se encuentran rodeados por dos células epidérmicas especializadas llamadas oclusivas, que regulan el tamaño de apertura de los estomas y controlan el intercambio de gases en la planta. Estas células a su vez están rodeadas por otro tipo de células epidérmicas diferenciadas llamadas

células subsidiarias, siendo así que el poro o estoma más las células acompañantes o células subsidiarias forman el complejo estomático (**Fig. 2**) (Acharya y Assman, 2009).

La evolución del estoma fue el evento central en el paso de las plantas hacia la tierra, ya que permitió el intercambio gaseoso evitando la desecación. Los estomas son críticos para la biosfera y la producción agrícola y para la cadena alimenticia (Nadeau y Sack, 2002). Los estomas están presentes en todas las plantas superiores, en musgos y helechos, con excepción de plantas acuáticas y hepáticas. Tanto en angiospermas como gimnospermas los estomas se encuentran en casi todas las partes aéreas de las plantas como flores y tallos, aunque algunos no son funcionales. La forma de los estomas es característica de diferentes grupos de plantas, un ejemplo de ello es la diferencia que se da entre las monocotiledóneas y las dicotiledóneas. Por otra parte, la densidad estomática ha permitido diferenciar entre la superficie adaxial y abaxial en diferentes especies. Las plantas con un número mayor de estomas en la superficie adaxial de la hoja toman el nombre de epistomáticas, mientras que las que presentan una mayor densidad estomática en la superficie abaxial son nombradas hipoestomáticas y aquellas que presentan un número similar de estomas en el haz y en el envés de la hoja se llaman ambiestomáticas (Hopkins, 1999).



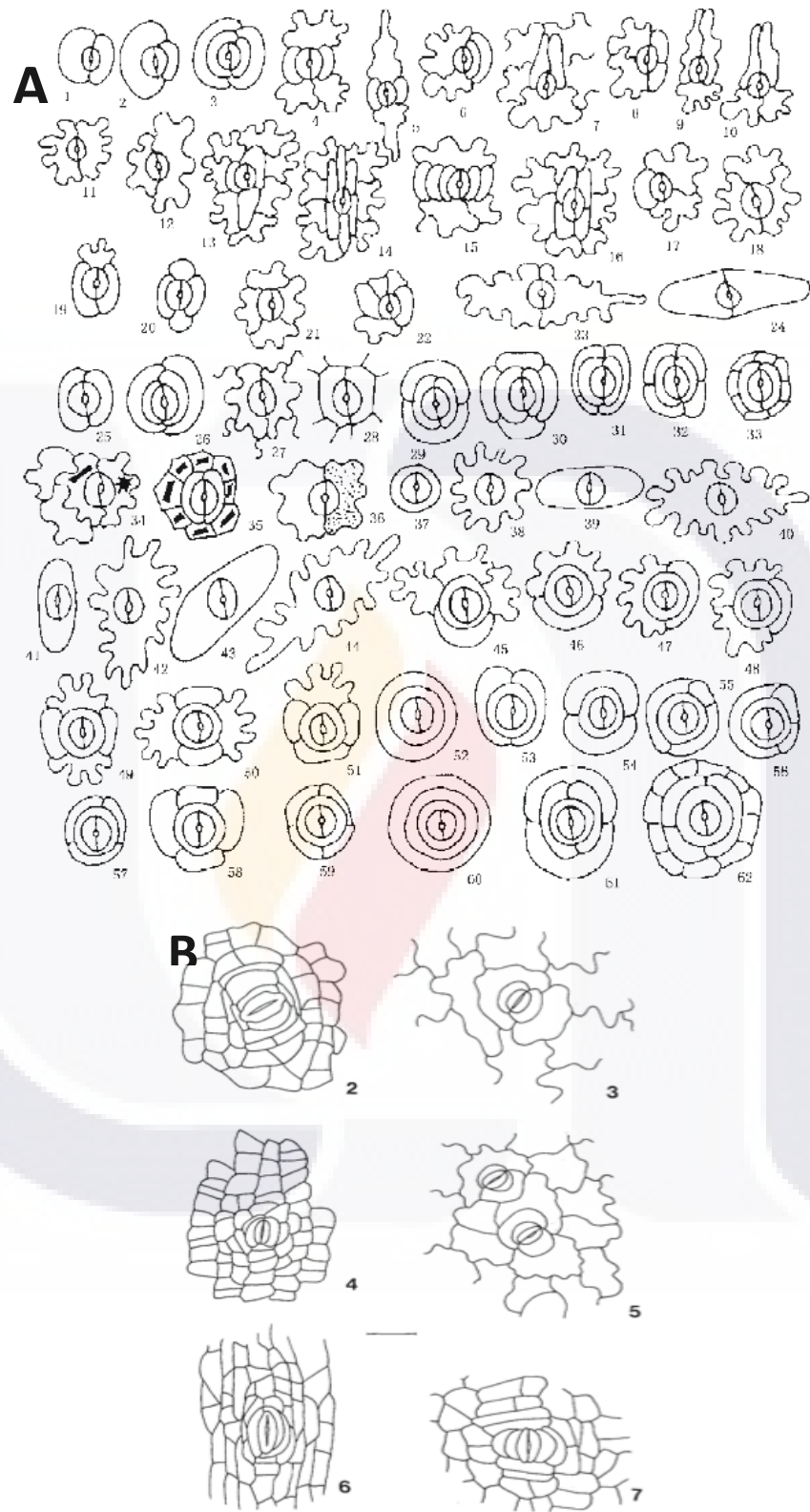
**Figura 2.** Esquema del complejo estomático. Al interior de las células guarda se pueden visualizar los cloroplastos de color verde. Alrededor se encuentran las células subsidiarias demarcadas en color verde.

Tomado de: [cienciasdejoseleg.blogspot.com](http://cienciasdejoseleg.blogspot.com).

### 1.2.2. Tipos de estomas

Anatómicamente se reconocen dos tipos de células oclusivas: las de tipo gramináceo, que son alargadas con extremos bulbosos, de paredes delgadas que pueden contener mitocondrias o cloroplastos y están flanqueadas por dos prominentes células subsidiarias. Las de tipo arriñonado presentan una apertura elíptica con un reborde cuticular externo, este reborde evita la entrada de agua del exterior hacia el espacio de aire del estoma (Hopkins, 1999).

En 2004 Prabhakar publicó un compendio de la estructura y clasificación de los estomas en angiospermas, en el cual se enlistan los de tipo pericítico, desmocítico, diacítico, anisocítico, anisotricítico, isotricítico, tetracítico, staurocítico, anomocítico, paracítico (**Fig. 3A**) y un gran número de variantes de cada tipo. Se hace hincapié en los de tipo paracítico debido a que desde las primeras publicaciones, el tipo de estomas reportado en cactáceas ha sido el paracítico o también llamado paralelocítico debido a que tiene más de dos células subsidiarias paralelas a las células guarda (Eggl, 1984; Loza-Cornejo y Terrazas 2003; Terrazas y Arias, 2003) (**Fig. 3B**). Otro tipo es el opuntioide que asemeja arreglos tetra o hexacíticos.



**Figura 3.** 3A) Variantes de estomas parásitos. Tomado de Prabhakar (2004). 3B) Estomas opuntioides (2, 4, 6, 7) y paralecíticos (3, 5). Tomado de Egli (1984).

### 1.2.3. Densidad estomática e índice estomático

La densidad estomática (DE) es el número de estomas por unidad de área, se ve afectado en gran medida por las condiciones ambientales, ocasionando la variación entre organismos de la misma especie. En arroz la densidad estomática se relaciona positivamente con la actividad fotosintética, por lo que a mayor densidad se espera mayor productividad. La temperatura correlaciona positivamente con la DE como consecuencia del aumento en el estrés hídrico. La temperatura también puede afectar el índice estomático (IE), esto sugiere una influencia en la iniciación estomática (Verdugo *et al.*, 1999). Aunque también hay reportes de que no hay algún cambio (Royer, 2001).

Estudios han mostrado que la densidad estomática puede cambiar en ciertas etapas de crecimiento de la planta o en respuesta a las condiciones ambientales, al igual que del tipo de especie, posición de la hoja y nivel de ploidia, aunque normalmente se pueden encontrar en un rango de 20 a 400 estomas por  $\text{mm}^2$  en hoja, en tamaño puede alcanzar de 5 a 15  $\mu\text{m}$  de ancho y cerca de 20  $\mu\text{m}$  de longitud. El tamaño del poro estomático está determinado por el volumen de las células oclusivas y por la presión de turgencia (Zhang *et al.*, 2011).

El índice estomático (IE) es una función del número de estomas y de las células epidérmicas. Se ve afectado por la iniciación del estoma y la expansión de las células epidérmicas. La expansión responde a variables como la luz, temperatura, humedad y posición de la hoja; por ejemplo se ha encontrado que el hábitat (frío vs cálido) no afecta el índice estomático, en cambio el  $\text{CO}_2$  juega un papel más importante en la iniciación del estoma. Se ha asociado negativamente el nivel de ploidia con el IE (Royer, 2001).

### 1.2.4. Movimiento estomático

El movimiento de los estomas es una de las primeras respuestas que se presentan ante la presencia de cambios ambientales, y la sensibilidad de los estomas es esencial para la supervivencia y productividad de la planta (Zhang *et al.*, 2011).

La apertura de estomas está determinada por la presión de turgencia de las células oclusivas. Hubbard *et al.*, (2007), menciona que en *Vicia faba* hay una pérdida aproximada del 40% en el volumen de las células oclusivas durante el cierre. El mecanismo por el cual las células guarda aumentan su volumen sin que se opere un cambio perceptible en la totalidad del complejo estomático se debe al arreglo de las fibrillas de celulosa de la pared celular de las células oclusivas ya que al aumentar la presión de turgencia, las células se hinchan a lo largo del eje longitudinal. Este cambio de forma da como resultado la apertura del poro. Los estomas se abren cuando el agua difunde hacia ellos (ósmosis) a través de las células circundantes que pueden ser indiferenciadas o células subsidiarias especializadas. El potencial osmótico puede originarse de varias maneras: por síntesis de ácidos orgánicos o azúcares en las células oclusivas o por el bombeo activo de iones potasio (acompañado por contraiones cloruro o ácidos orgánicos) o la hidrólisis del almidón a azúcares.

La apertura o cierre de los estomas se logra debido a los cambios en el volumen de las células guarda generados por el flujo transmembranal de  $K^+$ ,  $Cl^-$  y malato<sup>2-</sup>, mediante el siguiente mecanismo (Hubbard *et al.*, 2007):

La expulsión de protones mediante bombas dependientes de ATP es uno de los movimientos iniciales en la apertura de los estomas, produciendo la hiperpolarización (menor potencial eléctrico dentro de la célula que fuera) de la membrana simultáneamente que se establece un gradiente de pH. La hiperpolarización permite la apertura de canales de  $K^+$  en la membrana celular que permite la entrada pasiva de  $K^+$  en respuesta a la diferencia de potencial y al gradiente de cargas. El balance de cargas se lleva a cabo en parte por la toma de  $K^+$  en contra de un gradiente de protones y en parte por la entrada de iones cloruro ( $Cl^-$ ) y por la producción dentro de la célula de aniones orgánicos como el malato<sup>2-</sup>. La acumulación de malato también permite mantener el pH celular durante la acumulación de solutos, debido a que cada grupo carboxilo ( $COO^-$ ) libera un protón en el citosol. La acumulación de  $K^+$ ,  $Cl^-$  y malato<sup>2-</sup> en las vacuolas de las células oclusivas pueden disminuir el potencial osmótico e hídrico y la consecuente toma de agua incrementa la turgencia y causa la apertura del estoma. El cierre estomático en respuesta al ácido abscísico, por ejemplo, se ve influido por la entrada de  $Ca^{2+}$  al citosol.



Las bases moleculares del mecanismo de desensamblamiento de pared celular en las células oclusivas sigue poco conocido, se ha reportado que la arabinasa, la cual degrada cadenas de arabinanos (pectinas), incrementa la apertura estomática, sin embargo su función hidrolítica es tiempo-dependiente por lo que termina rompiendo la estructura de la pared celular. Durante la extensión a corto plazo de la pared celular, por ejemplo la mediada por auxinas, se logra en pocos minutos y no destruye la estructura de la pared. El mecanismo de apertura-cierre de estomas es un proceso similar, y no es considerado un proceso de crecimiento. De este modo las expansinas son consideradas el factor más plausible que influye en la pérdida de pared celular a corto plazo (Zhang *et al.*, 2011).

### **1.2.5. Factores que afectan el movimiento estomático**

#### **Factores Ambientales**

Parámetros ambientales como humedad del aire, intensidad de luz, temperatura, movimiento del aire, concentración de CO<sub>2</sub> atmosférico, así como la concentración hormonal endógena y las señales hídricas regulan el movimiento estomático influenciando el desarrollo y la densidad de los estomas (Chaerle y Van Der Straeten, 2007).

En cuanto al CO<sub>2</sub>, Vavasseur y Raghavendra (2005) mencionan que su disminución en la planta estimula la apertura estomática al incrementar el suministro de dicho gas para la fotosíntesis.

Según Sang (2010), la luz es el estímulo ambiental más importante en la apertura de los estomas, y sugiere que la respuesta del estoma a la luz blanca se debe a la expresión de dos sistemas de fotoreceptores: los cloroplastos de las células oclusivas y un fotosistema dependiente de la luz azul, en el cual los pigmentos zeaxantina y fototropina podrían actuar como fotoreceptores. Entonces la función de la luz azul sería activar la ATPasa de H<sup>+</sup> vía fototropina produciendo un potencial eléctrico negativo a través de la membrana en las células guarda. Este gradiente de protones estimula la entrada de iones potasio hacia el

interior de las células guarda a través de canales de potasio produciendo un incremento en el potencial hídrico y facilitando la apertura estomática.

Bidwell (2002) menciona que la fotosíntesis en las células oclusivas afecta la apertura de los estomas, primero, reduciendo la concentración de CO<sub>2</sub> (fuerte estímulo para la apertura de los estomas), segundo, disminuyendo el potencial hídrico por medio de las sustancias osmóticamente activas como los azúcares que se producen por fotosíntesis y por medio de la fotofosforilación que suministra el ATP para que las bombas de iones movilicen K<sup>+</sup> u otras sustancias al interior de las células oclusivas.

Hopkins (1999) señala que el incremento en la temperatura generalmente produce un aumento en la actividad metabólica de las células oclusivas, produciendo la apertura de los estomas (mientras que el agua no llegue a ser un factor limitante) alcanzando un óptimo y luego declinando. Las altas temperaturas estimulan la respiración pero pueden afectar la fotosíntesis. En plantas xerófilas los estomas se vuelven insensibles al CO<sub>2</sub> en presencia de altas temperaturas, de este modo la planta se protege contra el sobrecalentamiento, a pesar de la actividad fotosintética.

## **Factores Hormonales**

### **Ácido Abscísico (ABA)**

El ABA es un ácido de 15 carbonos que se produce por la ruptura de ciertos carotenoides y xantofilas, que son convertidos a ABA aldehído y luego a ABA. Su biosíntesis ocurre en plastidios (especialmente cloroplastos). Se conocen cuatro estereoisómeros que difieren en la orientación del grupo carboxilo y en la unión de la cadena lateral al anillo. La forma que se presenta en estado natural son S-(+)-ABA (George *et al.*, 2008).

Entre las funciones del ABA se encuentra la apertura estomática que se regula bajo condiciones de estrés hídrico produciendo cierre e inhibiendo la apertura inducida por luz

(Tanaka *et al.*, 2005), el control de agua, la captación de iones por las raíces y está involucrado en la abscisión y senescencia. Se ha visto que en algunos cultivos celulares promueve la morfogénesis y el crecimiento. La captación del ABA por los tejidos se da por difusión de la molécula no disociada, los aniones quedan atrapados dentro de la células disminuyendo los niveles de pH (George *et al.*, 2008).

Las primeras etapas de la acción del ABA son similares al mecanismo de otras hormonas, actúa en las cadenas de transducción que producen el cambio en los patrones de transcripción y traducción o en los efectos sobre las bombas de iones (George *et al.*, 2008). Por ejemplo al disminuir la disponibilidad de agua se genera una señal que desencadena en la biosíntesis del ABA en el sistema vascular y es acarriado por transportadores ATP-dependientes, se une a receptores RCAR/PYR1/PYL produciendo la inactivación de proteínas fosfatasa tipo 2C como la ABI1 y ABI2 y su inactivación inicia una cinasa SNF1 que tiene como blanco la expresión dependiente de ABA y canales iónicos (Raghavendra *et al.*, 2010). La célula guarda responde en coordinación con cascadas de señalización que incluyen la entrada de CO<sub>2</sub>, ABA y Ca<sup>2+</sup>. Estas cascadas de señalización también están mediadas por la regulación quinasa/fosfatasa, metabolitos secundarios y canales iónicos. El ABA induce la despolarización de la membrana plasmática por medio de la inhibición de la ATPasa-H<sup>+</sup>, por la inhibición de los canales de entrada de K<sup>+</sup> y la activación de canales aniónicos lentos activados por calcio (tipo S). Esta despolarización activa la salida de K<sup>+</sup> de la célula, que resulta en la pérdida neta de solutos y de turgencia. Siendo así que la fosforilación de SnRK2 está asociada a 2 de los mayores eventos reguladores de la membrana plasmática, la inhibición de los canales de entrada de K<sup>+</sup> y la activación de canales aniónicos tipo S (por ejemplo SLAC1 e incluye un sitio OST1 de fosforilación requerido para la actividad del canal) (Hubbard *et al.*, 2010).

El tratamiento con ABA induce cambios en la expresión génica en más del 10% en el genoma de *Arabidopsis*, resultando en el incremento de expresión asociada al estrés y la señalización de componentes transcripcionales. El mayor componente de regulación-*Cis* ABA-dependiente está asociado con la expresión de genes de respuesta al estrés, es un elemento de respuesta al ABA (ABRE; ACGTGT). Varios factores de transcripción bZip -

incluyen blancos de SnRK2 ABI5, AREB1/ABF2 y AREB2/ABF4- se une a ABRE e induce la expresión génica ABA-dependiente. Una posible clase de regulador transcripcional son los activadores transcripcionales de unión a calmodulina regulada por  $\text{Ca}^{2+}$  que se une a ABRE-CE y contribuye a la regulación transcripcional dependiente de ABA o funciona en paralelo con la vía de señalización por estrés (Hubbard *et al.*, 2010).

### **Ácido Indolacético (AIA)**

La auxina es el componente regulatorio del crecimiento de la planta, y está involucrado en el control de casi todos los procesos del desarrollo en las plantas, así como en las respuestas a los estímulos del medio ambiente como luz y gravedad. El representante de las auxinas nativas es el ácido indol-3-acético (AIA), y aunque menos abundantes, también se encuentran compuestos relacionados como el ácido fenilacético, ácido indol-3-butírico y ácido 5-cloro indol acético. Las auxinas están involucradas desde la regulación del ciclo celular, el establecimiento y mantenimiento de la polaridad y la diferenciación para controlar la embriogénesis, la formación de patrones y morfogénesis, incluyendo fenómenos de coordinación de la planta completa como la dominancia apical. La distribución en los tejidos vegetales está dada por los procesos metabólicos y de transporte que proveen a las células con distintas cantidades de auxina (Petrásek *et al.*, 2011). Además de entrar por difusión, las auxinas pueden ser transportadas activamente hacia la célula por proteínas transmembranales como la familia AUX/LIKE AUX1 (AUX1/LAX), con la presencia de los acarreadores que sacan auxinas PIN-FORMED y los miembros del subgrupo B de la familia ATP de unión a (ABC) proteínas/P-gluco proteínas (ABCB/PGPs).

La auxina es un regulador pleiotrópico, está implicado en la osmoregulación y los subsecuentes movimientos estomáticos. En muchos casos, los efectos de la auxina han resultado de la inducción selectiva de varios genes así como del cambio en el transporte de iones. En *V. faba* esta fitohormona modula la ATPasa de  $\text{H}^+$  y diferentes canales iónicos, como los canales de entrada y salida de  $\text{K}^+$  y los canales de iones en la membrana plasmática de las células guarda (Cousson y Vavasseur, 1998).

### 1.3. GENES DE ESTUDIO

Existe una diversidad génica cuya expresión pueden ser relacionada con el efecto inductor sobre la apertura estomática en respuesta a factores ambientales, como luz, estado hídrico, CO<sub>2</sub> y que a su vez están ligados a factores de naturaleza endógena, como el tipo de metabolismo; entre estos genes se pueden mencionar: fototropina 2 (*PHOT2*), ATPasas de H<sup>+</sup> 2 (*AHA2*), canales iónicos de K<sup>+</sup> (*KST1*, *KAT1*, *GORK*) transportadores de K<sup>+</sup> (*AKT1*), canales vacuolares de K<sup>+</sup> (*KCO* o *TPK*), transportadores de hexosas (*STP1*) etc., (Roelfsema y Hedrich, 2005). Para realizar este estudio se seleccionaron dos genes íntimamente relacionados con el estado hídrico de las células, en particular de las células guarda, como son los que codifican para las expansinas y los péptidos natriuréticos.

#### 1.3.1. Expansinas

Las expansinas son proteínas relacionadas con la pérdida de la pared celular, catalizan la extensión y la relajación por estrés de la pared bajo reacciones dependientes de pH ácido. Las cantidades a las que son activas son de cerca de 1 parte de proteína por 5000 partes de pared celular en peso seco. Actúan debilitando los enlaces de hidrógeno que unen los polisacáridos presentes en la pared (Taiz y Zeiger, 2002).

Las expansinas están involucradas en los procesos del desarrollo fisiológico de la planta, por ejemplo la elongación de la célula, maduración del fruto, abscisión, etc., y también en las respuestas fisiológicas que requieren una respuesta rápida (movimiento de los estomas) y necesitan que ocurran cambios en la forma de la célula involucrando la expansión temporal de las paredes celulares (Ludidi *et al.*, 2002).

Con base a las homologías de las secuencias, las expansinas están clasificadas en cuatro subgrupos, dos de los cuales son las  $\alpha$  y  $\beta$  expansinas que comparten algunas características, incluyendo el péptido señal en el extremo amino terminal, así como residuos conservados de cisteína y triptófano. Sin embargo difieren en sus motivos N-terminal de unión a polisacáridos (glucosilación). Los otros dos grupos son  $\gamma$  y  $\delta$  expansinas las cuales

son proteínas más cortas y muestran alta similaridad en la porción amino terminal (Cosgrove, 1998).

Las expansinas tienen un péptido señal que dirige al nuevo péptido al retículo endoplásmico y al aparato de Golgi. Esta parte de la proteína es removida cuando entra al retículo endoplásmico. La proteína completa pesa de 25 a 27 kDa y está conformada por dos dominios, un amino-terminal de 120 aminoácidos con una similaridad estructural y de secuencia a la familia 45 de las endoglucanasas (EG45-like region) y un dominio carboxi-terminal de 98 aminoácidos que hipotéticamente es un dominio de enlace a polisacáridos (Cosgrove, 2012).

Es poco conocida la regulación celular durante el movimiento del estoma, por eso ha sido estudiado el papel biológico del gen de expansina AtEXPA1 de *A. thaliana* en la apertura de los estomas. La expansina AtEXPA1 se localiza también en hojas maduras y puede exhibir expresión específica en las células oclusivas, sugiriendo que este tipo de expansinas presentan funciones no conocidas en el crecimiento y desarrollo de la planta (Zhang *et al.*, 2011).

Para mostrar la función de las expansinas en el movimiento de las células oclusivas, se realizaron estudios de apertura estomática en plantas transgénicas de tabaco bajo el control del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor que sobreexpresaban el gen AtEXP1, observándose un aumento en la velocidad de apertura de los estomas aunado a una disminución de la expresión cuando la epidermis se trataba con un anticuerpo anti-EXPA1 (Zhang *et al.*, 2011).

### 1.3.2. Péptidos natriuréticos en plantas

Los peptidos natriuréticos fueron identificados por primera vez en extractos atriales de rata (PNA). En mamíferos, esta hormona es liberada por las células del miocardio en respuesta a un aumento en la presión intracavitaria, provocando vasodilatación, natriuresis y diuresis (Requejo *et al.*, 2008). Los PN constituyen una familia multigénica, implicada en la regulación de la homeostasis de sales y agua. Sus efectos están regulados por la enzima guanilato ciclasa (Maqungo, 2005).

Uno de los primeros trabajos de PN en plantas se llevó a cabo en *Dracena godseffiana* utilizando radioinmunidad, donde se reconocieron dichos péptidos en hojas y tallos. Posteriormente se demostró que el PNA de rata indujo apertura estomática en *Tradescantia* sp., reportándose similar comportamiento con Péptidos Natriuréticos de Plantas (PNP's), ya que al promover la apertura estomática afectan el transporte de iones, causando un rápido y reversible aumento de cGMP (Maqungo, 2005). El término PNA fue usado originalmente para designar el extremo C-terminal (aa 99-126). Los receptores de PNA tienen un dominio de guanilato ciclasa que estimula la producción de GMPc. Según expone Gehring (1999), el PNA está codificado por un gen con tres exones y codifica para una prepro-PNA que contiene un péptido señal (24-mero) que es escindido y las dos argininas del C-terminal (no identificadas en PNA de humano) también son escindidas para formar pro-PNA (aa 1-126). La posterior proteólisis da lugar a PNA (1-98) y PNA (99-126). El extremo C-terminal (28-mero) forma una estructura circular debida a los puentes disulfuro entre cisteínas 7 y 23, y se piensa que es la que tiene la principal actividad biológica (debida a esta conformación). La función biológica de PNA 1-98 no había sido establecida hasta ese momento. Sin embargo ha sugerido que proPNA (1-98) es escindida posteriormente en PNA (1-30), PNA (31-67) y PNA (79-98) y se ha visto que tiene un efecto de acción prolongada en musculo liso y en la excreción de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> en vertebrados. Aunado a esto, Vesely y Giordano (1991) utilizando anticuerpos contra el extremo N-terminal (1-98), porción media (31-67) y C-terminal (99-126) identificaron péptidos en tallo y hoja. Estos autores también mencionan que por medio de técnicas como el Western

blot se ha encontrado evidencia de que el rango de peso molecular de la proPNA es de 10 kD y del extremo C-terminal es de 3 kD (Gehring, 1999).

Mediante técnicas moleculares se ha aislado y secuenciado parcialmente un PNP en papa, e identificado y aislado un transcripto en *A. thaliana* (AtPNPA) que codifica para un PNP. AtPNP-A es una pequeña proteína de 126 aminoácidos de longitud, la cual es codificada por un gen con un único intrón. El aminoácido 24 de dicha proteína, corresponde al péptido señal (Morse *et al.*, 2004).

Las moléculas más estrechamente relacionadas con los PNPs son las expansinas. Las expansinas a su vez están relacionadas con las glucanasas y celulasas, que presentan un dominio de unión a pared celular en el carbono terminal. Ya que las expansinas son los genes más cercanos de los PNP y los más distantes de las glucanasas y celulasas que contienen el C-terminal, se puede pensar que los PNP han perdido este dominio. La pérdida de dicho dominio podría resultar en la ausencia de unión a pared y con ello el incremento en la movilidad de la molécula. Además datos de localización *in situ* en papa también identifican PNP en tejido conductivo, que es un lugar poco probable para su síntesis pero no para su transporte (Ludidi *et al.*, 2002). Un estudio de tipo molecular en *A. thaliana* fue llevado a cabo por Irving y Gehring (2003) demostrando la presencia de transcriptos de AtPNP en tejido foliar, lo cual indica que probablemente los PNPs además de encontrarse en las hojas, también se pueden sintetizar ahí. También los han identificado en brotes y en la savia del xilema (indicando que su síntesis también se puede llevar a cabo en la raíz, pero su acción es sistémica).

Estudios han mostrado que la aplicación local de PNPs induce una señal móvil en el floema que tiene la capacidad de modificar la homeostasis de la planta en las partes distales en un tiempo de 15 min. Se piensa que la señal a larga distancia de los PNPs sea de tipo eléctrica en la forma de potenciales de acción o variación de potenciales. Los potenciales de acción son señales transmitidas mediante el floema e impulsadas por canales dependientes de voltaje que generan rápidas ondas autopropagables de la despolarización de la membrana con velocidad y amplitud constantes. La despolarización de la membrana se



debe probablemente a la entrada inicial de  $\text{Ca}^+$ , la salida intensa de  $\text{Cl}^-$ , seguido de la entrada de  $\text{K}^+$ , necesario para la repolarización. La hipótesis de "señal eléctrica" es soportada por estudios previos que estimulan la rápida despolarización de la membrana, induciendo un rápido flujo iónico (Ruzvidzo *et al.*, 2012).

Pharmawati *et al.*, (1998) mencionan que PNA causa la apertura estomática dependiente de la concentración. Se cree que es debido a que estimula la entrada de  $\text{K}^+$ , al igual que lo hacen las auxinas o la cinetina. Los PNPs inducen la toma de agua por la célula, y si las células que responden son células guarda, se produce la apertura estomática, aun en presencia de ABA. Los PNPs también inducen el incremento en la capacidad fotosintética a nivel distal y local, posiblemente por señales eléctricas. Pero el cómo modulan los cambios en la fotosíntesis todavía no está bien estudiado, pero podría ser directamente o a través de segundos mensajeros como el GMPc o el  $\text{Ca}^{2+}$  (aunque hay poca información al respecto). Sin embargo se tiene alguna evidencia de la asociación de PNPA con preparaciones crudas de cloroplasto. Tratamientos con luz producen cambios en GMPc, y esto regula el cloroplasto dependiente de fitocromos y el desarrollo de antocianinas (Gehring e Irving, 2012).

La expresión de PNPs es inducida por estímulos bióticos y abióticos, que resulta en el incremento de PNP en el apoplasto y puede actuar de forma paracrina y autocrina. A nivel local, en la hojas, los PNPs modulan su propia expresión para mantener los niveles de PNP en rangos definidos en parte para mantener la homeostasis. El PNPA de *A. thaliana* se expresa principalmente en el mesófilo de hojas. La expresión transitoria de PNPA es inducida por condiciones de sequía y salinidad a nivel de ARN y proteína. También PNPA regula su propia expresión sugiriendo que actúa de forma paracrina y autocrina para modular la cantidad de PNP presente en la hoja y potencialmente puede amplificar los niveles cuando la planta es sometida a estrés abiótico, produciendo en células vecinas la toma de agua y el incremento en GMPc. En estudios con microarreglos se ha visto que la transcripción se ve fuertemente inducida en respuesta a patógenos y correlaciona con genes de la vía de resistencia sistémica adquirida (Gehring e Irving, 2012).

#### 1.4. ESTRATEGIAS DE SUPERVIVENCIA EN CACTÁCEAS

Las cactáceas presentan algunas características morfológicas y fisiológicas para hacer frente a un medio ambiente árido (poca precipitación y temperaturas extremas). Entre los rasgos anatómicos, se puede mencionar la succulencia, que es la capacidad de los tejidos de la planta para almacenar agua (Moreira-Muñoz, 2011). El agua que entra al tallo es convertida en mucílago que no se evapora tan fácilmente. Las células mucilaginosas son células parenquimáticas rodeadas de una pared primaria delgada. A medida que el mucílago se acumula, los protoplastos se van encogiendo hasta casi desaparecer y finalmente mueren, entonces el espacio celular se satura de mucilago (Obeidy, 2008).

Otra característica de las cactáceas es su piel dura, que está cubierta por una cutícula cerosa que retiene el vapor de agua y en consecuencia reduce su pérdida. Las hojas están ausentes o reducidas a espinas para minimizar la transpiración. Las espinas crean un microclima alrededor del tallo, la sombra producida por ellas disminuye la velocidad de transpiración y la velocidad a la que incide el viento, permitiendo la condensación de aire, al mismo tiempo que reduce la tasa de evaporación sobre tallo u hoja (Sowell, 2001).

La forma del tallo segmentada en costillas, permite la expansión y contracción del tejido según los cambios en la disponibilidad de agua y le permite canalizarla a las raíces en épocas de lluvia. Tal mecanismo coadyuva a la conservación del agua y en general a la supervivencia de la planta en condiciones de sequía (Obeidy, 2008).

Una adaptación fisiológica y bioquímica de las cactáceas a su medio es el metabolismo CAM (metabolismo ácido de las crasuláceas), que es un proceso por el cual el estoma abre por la noche (cuando las tasas de evaporación son generalmente más bajas) y normalmente permanecen cerrados durante el día. En condiciones extremadamente áridas, los cactus pueden mantener los estomas cerrados noche y día (Obeidy, 2008).

En particular para opuntioideae, Pimienta-Barrios *et al.*, (2007) comenta que el desarrollo del tallo en forma de cladiodos semiverticales evita la incidencia directa de los

rayos solares sobre la epidermis, proyectando una sombra que disminuye los efectos de la sequía reduciendo la temperatura del aire y el déficit en la presión de vapor, así como la fotoinhibición. Otra adaptación para evitar la desecación la reporta Sang (2010), la cual consiste en que las células guarda de *Opuntia ficus-indica* se encuentran ligeramente hundidas debajo de la epidermis y suspendidas sobre grandes cámaras subestomáticas.

### 1.5. METABOLISMO ÁCIDO CRASULÁCEO (CAM)

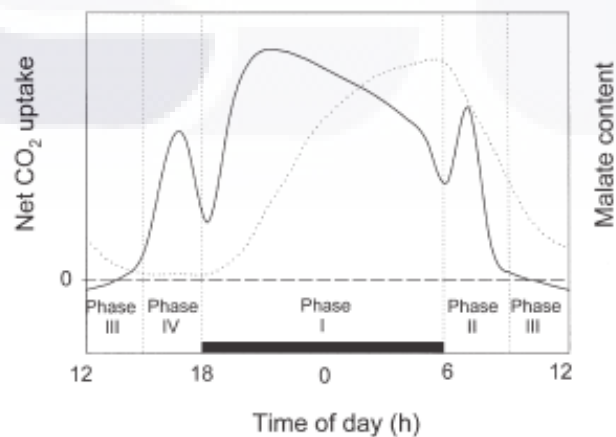
Este tipo de metabolismo se describió por primera vez en la familia de las crasuláceas y básicamente consiste en la fijación durante la noche del CO<sub>2</sub> circundante mediante  $\beta$ - carboxilación de fosfoenolpiruvato (PEP) via interacción de la PEPC (fosfoenolpiruvato carboxilasa) para la formación de malato que se acumula en forma de ácido málico por la noche y luego se rompe (descarboxila) durante el día para producir CO<sub>2</sub>, que es fijado por la rubisco con los estomas cerrados, para el cuidado del agua en la planta mediante el ciclo C3 (Hubbard *et al.*, 2007). Los principales periodos de la apertura estomática en estas plantas son por la noche y de cierre es al medio día, con periodos variables de apertura para la toma directa de CO<sub>2</sub> al inicio y final del día.

Winter *et al.*, (2011) señala que existe una fuerte vinculación entre estomas y fotosíntesis, ya que los estomas deben estar abiertos durante la noche y requiere una regulación precisa del metabolismo celular, pues se produce una integración de procesos como la interconversión de almidón y ácidos, gluconeogénesis y fotosíntesis además de la actividad enzimática y metabolitos a diferentes horas del día. Es importante mencionar que este tipo de metabolismo además de implicar una alternancia de patrones diurnos y nocturnos, también involucra una variación de los mismos a medida que pasan las estaciones del año o bajo condiciones de salinidad o estrés por escasez de agua. Ya existen reportes de que la eficiencia en el uso del agua es de tres y seis veces mayor en plantas CAM que en plantas C4 y C3 (Borland *et al.*, 2011). El metabolismo CAM no es una vía obligatoria ya que si los estomas abren durante el día puede absorberse CO<sub>2</sub> y fijarse de manera usual. El CAM es semejante al C4 con la diferencia que la  $\beta$ - carboxilación y la fotosíntesis C3 están separadas en tiempo, además que la C4 confiere altas tasas de

fotosíntesis. Bidwell (2002) menciona que se han hecho intentos de implantar la capacidad CAM para dirigir la fotosíntesis aún con estomas cerrados en plantas de cultivo, sin embargo es importante tener en cuenta que este metabolismo es energéticamente más costoso que un C3.

Los ecosistemas semiáridos de México se caracterizan por presentar una temporada larga y seca en primavera con poca o nula precipitación y una alta irradiación (Pimienta-Barrios *et al.*, 2007). El género *Opuntia* se ha podido encontrar en zonas muy áridas que presentan precipitaciones anuales menores a 600 mm, como ocurre en el desierto chihuahuense que se extiende desde Durango hasta Hidalgo incluyendo Aguascalientes. También se le puede encontrar en el desierto sonorense y en la depresión del Balsas (Jiménez, 2011).

La magnitud en la expresión del modo CAM depende de la especie, del estado de desarrollo de la planta y las condiciones ambientales (Borland *et al.*, 2011). En particular se considera que *Opuntia ficus-indica* es una especie CAM constitutiva, y a medida que la planta se va desarrollando, la toma de dióxido de carbono durante la noche aumenta de forma significativa como respuesta a cambios ambientales tales como la sequía (Borland *et al.*, 2011). Pero incluso aún en plantas con suficiente cantidad de agua, la fijación de CO<sub>2</sub> ocurre casi exclusivamente durante la noche, Fase I de la **Fig. 4** (Drennan y Nobel, 2000).



**Figura 4.** Ciclo diario de la toma de CO<sub>2</sub> (línea sólida) y acumulación de ácido málico (línea punteada) de una planta CAM (Drennan y Nobel, 2000).

Patishlán *et al.*, (2010) menciona que bajo condiciones severas de estrés hídrico *O. ficus indica* reduce la fase II y suprime la fase IV debido a que un aumento en la radiación y temperatura al final de la tarde favorecen la fotorrespiración. La acumulación de ABA en las células oclusivas provoca el cierre estomático.

### **1.6. COMPORTAMIENTO DE CACTÁCEAS *IN VITRO***

En un estudio realizado por Malda *et al.*, (1999) respecto a las alteraciones que sufrían las cactáceas cultivadas *in vitro*, se encontró que la alta humedad relativa presente en los frascos de cultivo permitía que los estomas permanecieran abiertos en presencia de luz, llevándose a cabo la fijación de CO<sub>2</sub> tanto de día como de noche, promoviendo el rápido crecimiento de las plantas y afectando el patrón normal CAM.

### **1.7. METABOLISMO C3**

Este tipo de metabolismo está presente en la mayoría de las plantas. Se le conoce como ciclo de Calvin-Benson o de asimilación del carbono. El proceso inicia con la etapa de carboxilación, es decir, la fijación de carbono a una molécula de ribulosa-1,5-bifosfato, por medio de la enzima RuBisCO (Ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa-oxidasa), dando lugar a dos moléculas de 3-fosfoglicerato. Una segunda etapa es la reducción del 3-fosfoglicerato a gliceraldehído-3-fosfato para la cual se requiere de ATP y NADPH (generados en la etapa fotoquímica de la fotosíntesis). La etapa final consiste en la regeneración de la ribulosa-1, 5-bifosfato y el desvío de fosfatos de triosa hacia el anabolismo para servir de precursores a otro tipo de moléculas (Pérez-Urria, 2009).

## 2. JUSTIFICACIÓN

La familia Cactaceae es un grupo de plantas que ha sido poco estudiado en su totalidad debido a que la mayoría son plantas endémicas del continente americano, su distribución salvo aquellas como *Opuntia ficus indica* que tiene importancia económica y se encuentra en varias regiones del mundo tienden a permanecer en su nicho, agregando que por ser cactáceas tienen ciclos de vida largos, baja tasa de crecimiento y sus poblaciones suelen estar restringidas a ciertas regiones, aunado a las variaciones que ha experimentado el clima global, la explotación de sus poblaciones, el cambio en uso del suelo, etc., se hace prioritario el estudio ecológico, molecular y fisiológico para determinar posibles propiedades y aplicaciones que este grupo de plantas pueda aportar a los seres humanos así como el rol que cumple en el ecosistema y como a través de su estudio se pueda llegar a una explotación sustentable y a la conservación de sus poblaciones. Los estomas son estructuras de suma importancia para la planta, ya que permiten el intercambio gaseoso entre esta y el exterior, evitando la excesiva pérdida de agua por evaporación y manteniendo una temperatura óptima para la planta.

Se han descrito diversas rutas de señalización que intervienen en la apertura y cierre de estomas en las cuales están involucrados diferentes genes. Por ejemplo en *Arabidopsis thaliana*, *Hedera hélix* y *Solanum tuberosum* se han identificado genes homólogos a péptido natriurético tipo A, que codifica para una proteína que interviene en la homeostasis de agua y iones, importantes para el cierre y apertura de los estomas. Por otra parte, se han encontrado secuencias homólogas a una  $\alpha$ -expansina que está involucrada en la expansión de la pared celular de las células oclusivas en *Arabidopsis thaliana*, *Vicia faba* y *Brassica juncea*. Estos estudios reflejan la importancia de seguir profundizando en el análisis genético en diferentes especies vegetales. En este trabajo de investigación se tiene especial interés en identificar y caracterizar el comportamiento de dichos genes en cactáceas y el tipo de estomas que presentan, dado lo particular de su metabolismo, aunado al hecho de que son endémicas de México y algunas de ellas están en peligro de extinción.

Por otro lado, la identificación y aislamiento de estos genes permitirá usarlos como marcadores moleculares y en un futuro utilizarlos en fitomejoramiento.

### 3. HIPÓTESIS

Los genomas de *Opuntia ficus-indica* y *Pereskia sacharosa* presentan secuencias homólogas a los genes que codifican para expansinas y PNPs.

### 4. OBJETIVOS

#### 4.1. OBJETIVO GENERAL

Identificar, caracterizar y determinar el perfil de expresión de genes que codifican para PNP's y expansinas, posiblemente implicados en la apertura y cierre de estomas en *Opuntia ficus-indica* y *Pereskia sacharosa*.

#### 4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aislar y caracterizar genes de PNP's y Expansinas en *Opuntia ficus-indica* y *Pereskia sacharosa*.
- Analizar a través de microscopía la apertura y cierre de los estomas en cactáceas y relacionar esto con el perfil de expresión de los genes estudiados.
- Determinar el perfil de expresión de los genes de PNPs y Expansinas.

## 5. METODOLOGÍA

### 5.1. MATERIALES

#### 5.1.1 MATERIAL VEGETAL

##### 5.1.1.2 Ejemplares *in vitro*

El material vegetal utilizado en este trabajo consistió de cactáceas propagadas *in vitro* en el banco de germoplasma de la Universidad Autónoma de Aguascalientes.

##### 5.1.1.3 Epidermis de cactáceas

La epidermis fue obtenida a partir de hojas de *Pereskia sacharosa* y de tallo de especies pertenecientes a las subfamilias Opuntioideae y Cactoideae. Dicha epidermis fue sometida a un tratamiento con acetona para remover la cutícula y obtener las impresiones en barniz de cada ejemplar y visualizarlas en el microscopio óptico.

### 5.2. MÉTODOS

#### 5.2.1 ESTUDIO DEL APARATO ESTOMÁTICO EN CACTÁCEAS

##### 5.2.1.1 Densidad y Tipos de estoma

Se tomaron nueve especies al azar de cactáceas del banco de germoplasma del edificio 207 ubicado en la Universidad Autónoma de Aguascalientes a cargo del Dr. Eugenio Pérez Molphe-Balch. Estas fueron: *Acharagma aguirreana*, *Pereskia sacharosa*, *Mammillaria pettersonii*, *Ferocactus histrix*, *Opuntia amyclaea*, *Hylocereus undatus*, *Escontria chiotilla*, *Opuntia ficus-indica* y *Leuchtenbergia principis*.



Para determinar una metodología adecuada para el estudio morfológico de los estomas en cactáceas se analizaron tres diferentes protocolos; el de Hernández *et al.*, (2007), Egli (1984) y Loza-Cornejo *et al.*, (2003). El protocolo que mejor se adaptó fue el propuesto por Hernández *et al.*, (2007), con algunas modificaciones en el laboratorio. El protocolo propuesto se basa en lo siguiente: se aplicó una ligera capa de barniz de uñas transparente (NK, Taiwan) sobre un portaobjetos de vidrio, dejando secar por 3 minutos (sin que seicara completamente). Posteriormente, se tomaron muestras de aproximadamente 1.5 cm de largo de las plantas a estudiar y con la ayuda de pinzas y bisturí se le retiraron las espinas y/o cualquier tipo de vellosidades que pudieran causar interferencia. Para la impresión, las muestras se presionaron con fuerza moderada sobre la capa de barniz de tal forma que se asegurara una impresión uniforme.

Posteriormente se observaron al microscopio (Leica DMLS), utilizando los objetivos de 4X, 10X y 20X. Las imágenes fueron capturadas con una cámara fotográfica (Infinity 1) montada sobre el microscopio y con la ayuda del software (Infinity Capture).

Para el conteo de estomas se tomaron 15 imágenes al azar de cada una de las 9 especies con el objetivo de 4X y así mismo, se obtuvo la imagen del cuadrículado de una cámara de Neubauer para obtener un área definida de 1mm<sup>2</sup> usando un procesador de textos (Microsoft Word 2010), y se llevó a cabo el conteo insertando la imagen de la impresión y utilizando el molde de la cámara de Neubauer.

Para estimar los promedios de los resultados se utilizaron intervalos de 95% de confianza calculados con la siguiente ecuación:

$$\bar{x} \pm t_{\frac{\alpha}{2}, n-1} \frac{s}{\sqrt{n}}$$

Donde:

$\bar{x}$  corresponde a la media de los conteos,  $s$  es la desviación estándar correspondiente,  $n$  es el número de repeticiones y  $t_{\frac{\alpha}{2}, n-1}$  es el valor del estadístico  $t$  de Student, con  $n-1$  grados de libertad.

Además, para cada una de las especies consideradas se verificó el supuesto de normalidad (los datos son simétricos respecto a la media) mediante una prueba de Anderson-Darling utilizando el software estadístico Minitab 15. Todas las especies presentaron patrones que se ajustan claramente a una distribución normal y las pruebas correspondientes arrojaron valores de significancia (Valores p) muy por encima de 0.05.

Finalmente, la información se procesó en el módulo de Análisis Multivariado de Minitab 15 para realizar un Análisis de Conglomerados, con el fin de utilizar criterios de similitud entre las características numéricas de las densidades de las diferentes especies. Se obtuvieron tres grupos distinguibles, que se detallan en el **Tabla 1**.

Para la representación gráfica se utilizaron diagramas de caja, que representan los valores literales de los datos (mínimo, cuartil inferior, mediana, cuartil superior y máximo) (Hildebrand *et al.*, 1997). Los asteriscos en la gráfica corresponden a los valores que no pueden ser explicados por la distribución de probabilidad asociada a los datos obtenidos. Generalmente se les conoce como valores aberantes ó extraños.

La caracterización del tipo de estoma se realizó en base a lo expuesto por Egli (1984) y Loza-Cornejo y Terrazas (2003).

#### **5.2.1.2 Apertura Estomática**

La influencia de reguladores de crecimiento como el ácido indolacético (AIA) y ácido abscísico (ABA) sobre los estomas de cactáceas se puede ver reflejada mediante la apertura estomática. En particular para AIA, el experimento consistió en poner en contacto fragmentos de epidermis de 1 x 0.5 cm<sup>2</sup> de *Opuntia ficus-indica* y *Pereskia sacharosa* bajo diferentes concentraciones en un buffer de inducción (KCl 50 mM, MES 10 Mm) pH 6.15 (Levitt *et al.*, (1987)) durante 3 horas, pasados los cuales se realizaba la medición de la apertura del poro estomático a través del software infinity capture ensamblado a un microscopio óptico de marca Leica DMLS. Las concentraciones de inicio de AIA fueron 100 nm, 1 µm, 10 µm y 100 µm, posteriormente se agregó una concentración mayor

(1mM) para observar si la apertura se seguía manteniendo. El análisis estadístico, tanto para la estimación de promedios como para las pruebas de significancia se realizó en Minitab 15.

En el experimento con ABA se obtuvieron tiras de epidermis de plántulas de *O. ficus-indica* y de *P. sacharosa*. A cada uno de los explantes se les retiró la mayor cantidad de espinas y mesófilo y la epidermis se puso a incubar por dos horas en un buffer de apertura (KCl 10 mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM, MES 10 mM, tween 20 0.01%, pH 6.5: Tanaka *et al.*, (2005)).

Se observaron un total de 45 aperturas estomáticas procedentes de tres diferentes tiras de epidermis para cada uno de los tratamientos que fueron 10 µm, 100 µm y 1mM.

### 5.2.1.3 Verificación de metabolismo CAM y C3 en cactáceas

Para verificar si las plantas de *O. ficus-indica in vitro* estaban funcionando con metabolismo CAM o C3 se realizó la determinación de pH, ya que una planta funcionando como CAM presentará oscilaciones de pH durante el día (Casierra y González, 2009). Para lo cual se tomó 1 gr de tejido vegetal ya sea tallo u hojas (en caso del limón) y se maceró en 10 mL de agua destilada, inmediatamente se tomó la lectura de pH con un potenciómetro marca Denver Instrument modelo UB-10. Este proceso se realizó por triplicado, cada hora por 24 h. Las especies utilizadas fueron: *O. ficus-indica in vitro*, tanto en luz continua como en fotoperiodo (12 h luz/12 h oscuridad), *O. ficus-indica* silvestre (en condiciones naturales) y las plantas silvestres: *Cylindropuntia imbricata* (cardenche), *Myrtillocactus geometrizans* (garambullo), *Aloe barbadensis* (sábila) y *Citrus aurantifolia*.

Los gráficos se construyeron con el software Minitab 15. Se utilizó un método de medias móviles (promedios de las medias de varios periodos) para suavizar las series de tiempo correspondientes, lo que permite eliminar las fluctuaciones aleatorias entre los datos (puntos de color rojo de las **Fig. 18 y 19**). Con este mismo software se realizó un estudio de correlación en base a los valores de pH de las diferentes especies.

## 5.2.2 ESTUDIOS MOLÉCULARES

### 5.2.2.1 Aislamiento de ADN genómico (Lodhi *et al.*, 1994)

El tejido vegetal (4-6 g) se pulverizó con nitrógeno líquido, se distribuyó en microtubos y se resuspendió mediante agitación constante en 600 µl de buffer de lisis (Tris HCl 100 mM; NaCl 5 M; EDTA 0.5 M; CTAB 2% y β-mercaptoetanol 0.3%) a 65° C por 10 minutos, después las muestras se dejaron en hielo por 5 min y luego se les agregaron 300 µl de NaCl 5 M incubando por 10 minutos. Posteriormente se realizaron dos extracciones, una con fenol-cloroformo-isoamílico (24:24:1) y otra con cloroformo-isoamílico. Previa centrifugación se recogió la fase acuosa en la que se precipitaron los ácidos nucleicos por medio de un volumen de isopropanol. El precipitado obtenido se resuspendió en agua destilada estéril y se trató con ARNasa a 37°C por 30 min. Posteriormente se realizó otra extracción con fenol-cloroformo-isoamílico (24:24:1) y cloroformo isoamílico y se centrifugó para separar la fase acuosa, precipitándose el ADN con medio volumen de acetato de amonio 7.5 M y un volumen de isopropanol. El precipitado obtenido se lavó en dos ocasiones con 500 µl de etanol al 70% y se resuspendió en agua destilada estéril.

### 5.2.2.2 Aislamiento de ARN total (López-Gómez y Gómez-Lim, 1992)

El tejido vegetal (3 g) se pulverizó con nitrógeno líquido, se distribuyó en tubos para centrífuga de 30 mL y se homogenizó con tres volúmenes de buffer de lisis (Tris Borato 150 mM pH 7.5; EDTA 50 mM; SDS 2% y beta-mercaptoetanol 0.5 %), con agitación vigorosa por 1 minuto. Las muestras se dejaron en hielo y se adicionó ¼ de etanol absoluto (del volumen del buffer de lisis) y se mezclaron suavemente. Posteriormente se les agregó 1/9 de acetato de potasio 5M y se mezclaron vigorosamente y se dejaron en hielo por 2 minutos. Posteriormente se centrifugó por 5 minutos 12000 rpm, y se recuperó el sobrenadante. Se realizó una extracción con un volumen de Cloroformo-Alcohol-Isoamílico 49:1 y se centrifugó a 12000 rpm durante 5 minutos, recuperándose la fase acuosa. Se realizó una segunda extracción con un volumen de Fenol-Cloroformo 1:1 y se

centrifugó a 10000 rpm durante 5 minutos. Se recuperó la fase acuosa y se llevó a cabo una última extracción con un volumen de Cloroformo-Alcohol-Isoamílico 49:1 y se centrifugó a 10000 rpm durante 5 minutos y se volvió a recuperar la fase acuosa. El ARN se precipitó con cloruro de Litio a una concentración final de 3M y se dejó a -20°C toda la noche. El precipitado obtenido se lavó con 500 µl de etanol al 70% y se resuspendió en agua destilada estéril.

### 5.2.2.3 Cálculo de la concentración de Ácidos Nucleicos

La integridad de la molécula se analizó por electroforesis en geles de agarosa al 0.8% en TAE (Tris-base, Ácido Acético Glacial, EDTA a pH 8), teñidos con Gel Red™ 10,000X (Biotum). La concentración de ADN se determinó utilizando una densidad óptica de 260 nm y la pureza se valoró con la relación 260/280 nm, el espectrofotómetro utilizado fue el JENWAY 6305. La expresión para la concentración de ADN es la siguiente:

$$[\text{ADN}] = \frac{(\text{D.O. } 260)(50)(\text{factor de dilución})}{1000}$$

La concentración de ARN se analizó por densidad óptica a 260nm con la siguiente fórmula:

$$[\text{ARN}] = \frac{(\text{D.O. } 260)(40)(\text{factor de dilución})}{1000}$$

### 5.2.2.4 Identificación de los genes $\alpha$ -expansinas y PNPs en cactáceas mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

En cada reacción se añadieron una mezcla de los oligonucleótidos sentido y antisentido a una concentración de 10 µM para los genes PNP-A (Morales y Valle, 2011) y  $\alpha$ -Expansina (Morales, 2009) (**Tabla 1**). Para la amplificación se utilizó el kit comercial Paq5000 Hotstart PCR Master Mix de Stratagene (Analitek). Como molde se utilizaron hasta 500 ng de ADN genómico.

**Tabla 1.** Oligonucleótidos utilizados para amplificar los genes PNP-A y  $\alpha$ -Expansina en Cactáceas

Gen	Nombre	Secuencia	Tamaño esperado
PNP-A	PNP 3'	F- 5' GTCGGAGGTACAGGGTTCG 3' R-5' GTCGGAGGTACAGGGTTCG 3'	478 pb
$\alpha$ -Expansina (Degenerado)	ExD	F-5' GSNCAYGCNACNTTYTAYGGNG 3' R-5' YTGCCARTTYTGNCCCCARTT 3'	950 pb

#### 5.2.2.5 Purificación de los productos de amplificación obtenidos por PCR y RT-PCR

Una vez realizada la electroforesis, el producto de amplificación fue separado del resto del gel de agarosa con ayuda de un bisturí y se purificó mediante el paquete comercial el QIAquick Gel Extration kit (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### 5.2.2.6 Clonación de los fragmentos de PCR para actina y PNP de *Opuntia ficus-indica* y *Pereskia sacharosa*

Con los productos de PCR para actina y PNP obtenidos a partir de ADN de *P. sacharosa* y *O. ficus-indica* purificados con el QIAquick purification kit se realizaron ligaciones 1:3. La reacción de ligación se resume en la **Tabla 3**, el vector de clonación utilizado fue el pGEM-T Easy (Promega). La transformación se llevó a cabo por choque térmico y se utilizaron células DH5 $\alpha$  de *E. coli*, plaqueadas en cajas petri con medio Luria-Bertani conteniendo 100 mg/L de ampicilina para su selección. El escrutinio de clonas positivas se realizó por PCR y restricción (**Tabla 4**). Las clonas con el tamaño esperado se seleccionaron para ser usadas en el análisis del número de copias del gene por PCR en tiempo real.

**Tabla 2. Reacción de Ligación para la clonación de los genes actina y PNP en el vector p-GEM.**

Reactivo	Cantidad
Ligasa T4	1 µl
Buffer 2X	5 µl
Inserto	3 µl (150 ng)
Vector pGem	1 µl (50 ng)
<b>Vol. final</b>	<b>10 µl</b>

**Tabla 3. Reacción de restricción para el escrutinio de clonas positivas de Actina y PNP en pGem.**

Reactivo	Cantidad por reacción
TOTAL	10 µL
Agua	0.5 µL
Buffer 10x	1 µL
BSA	0.5 µL
ARNasa	2 µL
ADN	5 µL
EcoRI	1 µL

### 5.2.2.7 PCR en tiempo real para el número de copias del gen PNP

Los genes de actina y de PNP para *Opuntia* y *Pereskia* fueron clonados en el vector pGEM. Para su uso en la PCR en tiempo real se prepararon diluciones desde 100 ng/µl hasta 0.078 ng/µl (diluciones consecutivas 1:1). El ADN de *P. sacharosa* y *O. ficus-indica* fue llevado a una concentración de 100 ng/µl. Las reacciones con plásmido se hicieron por duplicado y las de ADN genómico por triplicado. La PCR se llevó a cabo en un termociclador de tiempo real con 48 pocillos (Applied Biosystems, Mulgrave, VIC, Australia), utilizando como cromóforo SYBRgreen. Cada reacción contenía 10 µl de master mix SyBR Green (Applied Biosystems, Mulgrave, VIC, Australia), 100 ng de ADN genómico y 0.5 pmol de los oligonucleótidos en sentido y antisentido de los genes de actina y PNP, en un volumen final de 20 µl. Las reacciones de amplificación fueron: 95 °C 10 m;

30 ciclos de 95 °C por 15 s, 50 °C por 50 s, 60 °C por 1 m; 1 ciclo of 95 °C por 15 s, 60 °C por 15 s, 95 °C for 15 s. Para la obtención del número de copias primeramente se determinó el porcentaje de eficiencia de la amplificación de la PCR, cuidando que fuera mayor al 90% en ambos genes. El ciclo umbral (Ct) determinado por el software incluido en el termociclador fue utilizado para la obtener del índice de número de copias (GCI) cuyo cociente es:  $\text{EffRefCt}$ , que es la eficiencia de la PCR del gen de referencia (actina) a la potencia del valor Ct generado a partir del gen de referencia para cada muestra, entre  $\text{effct}$ , que es la eficiencia de la PCR del gen del ensayo (PNP) a la potencia del valor Ct generado a partir del gen de ensayo para cada muestra.

#### **5.2.2.8 Secuenciación**

Los productos de PCR de los genes PNP y Expansina fueron enviados al Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental (LANBAMA) del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica y al Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO), CINVESTAV, unidad Guanajuato para su secuenciación.

#### **5.2.2.9 Análisis bioinformático de las secuencias *OfPNPA* (*O. ficus-indica*) y *PsPNPA* (*P. sacharosa*)**

Para identificar secuencias homólogas con la secuencia *OfPNPA* se realizó un alineamiento local (BLAST) en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). La traducción de la proteína hipotética se realizó mediante la herramienta Translate Tool del *Expert Protein Analysis System* (ExPASy) del Swiss Institute of Bioinformatics (SIB) (<http://expasy.org/tools/dna.html>). Esta proteína fue sometida a un alineamiento múltiple en el programa FASTA del Instituto Europeo de Bioinformática (EBI; <http://www.ebi.ac.uk/>) y se seleccionaron las 20 secuencias con mayor porcentaje de identidad para la construcción de un árbol filogenético con el software gratuito Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA; <http://www.megasoftware.net>).



### 5.2.3 Expresión de los genes de $\alpha$ -Expansina y PNP mediante RT-PCR

Las RT-PCR se realizaron en dos pasos, primero la síntesis de ADNc que se obtuvo con el kit SuperScript III First-Strand Synthesis (Invitrogen) según instrucciones del fabricante, agregándose aproximadamente 1  $\mu$ g de ARN a cada reacción. Segundo, la amplificación de los genes de interés por PCR utilizando el kit Phusion Flash (Thermo Scientific) con las siguientes condiciones de amplificación: 98 °C por 10 segundos (seg); 98 °C por 1 seg, 53 °C por 5 seg, 72 °C por 15 seg; 72 °C por 1 min para actina y expansina. 98 °C por 10 segundos (seg); 98 °C por 1 seg, 55 °C por 5 seg, 72 °C por 15 seg; 72 °C por 1 min para PNP.

#### 5.2.3.1 Hibridación *in situ* con ADN

La hibridación se realizó según lo describe Sun *et al.*, (2001); el marcaje de la sonda se procesó con el kit Alkphos de GE. Se detectó la reacción de hibridación con antidigoxigenina conjugada para fosfatasa alcalina y la reacción de color se desarrolló según las especificaciones del fabricante (Sigma). La sonda correspondió a una región del gen de PNP de *Opuntia ficus-indica* (*OfPNP*) que fue amplificada con oligonucleótidos específicos, clonada en el vector pGEM-T (Promega) y purificada con el kit QIAquick (Qiagen).

#### 5.2.3.2 Inmunolocalización de receptor para PNP con anticuerpo de PNA de humano (en conejo).

La preparación del tejido vegetal consistió en la obtención de tiras de epidermis de la zona apical de *O. ficus-indica* *in vitro* (aprox 1cm<sup>2</sup>), fijándolas en solución formaldehído-etanol-ácido acético (FAA) por 24 h. Posteriormente el tejido se colocó en un portaobjetos previamente cubierto con silicón (SISTA, Dow Corning Corporation) y se dejó secar por 24 h. Se almacenó a temperatura ambiente hasta su uso. Para permeabilizar la membrana, se sumergió la muestra en una solución de HCl 0.2 N (calentado 1 hora a 60° C), durante 20 min, en seguida, se hicieron dos lavados con agua destilada por 5 min. Luego se agregó

proteínasa K a 1  $\mu\text{g/ml}$  sobre la muestra dejándola por 10 min. Después se transfirió a una solución de SSC 2x a 37 °C durante 15 min y se deshidrató con etanol al 50 %, 70 % y 95 % por 5 min. Finalmente se lavó con PBS-Tritón X-100 0.2% por 30 min. El bloqueo se realizó incubando la muestra en una solución PBS-Tritón X-100 0.2% con 5% de leche en polvo (Svelty) y 1% de BSA por 1 hora. La hibridación con el primer anticuerpo se realizó utilizando el Anti-ANPA (C-term) (Sigma-Aldrich) producido en conejo, con fracción antisuero de IgC. La dilución con la que se trabajó fue de 1:1000. La muestra fue incubada con el anticuerpo en una cámara húmeda toda la noche con agitación constante a 70 rpm. Le siguieron tres lavados con PBS-Tritón X-100 0.2 % por 5 min; se añadió el segundo anticuerpo (Anti-rabbit, Sigma), el cual fue producido en cabra, con fracción de antisuero de conejo IgC y marcado con fosfatasa alcalina. La concentración de uso fue de 1:11000 dejándose actuar sobre el tejido 2 horas en agitación constante a 70 rpm, posteriormente se añadió la pastilla reveladora FastNitroblueTetrazolium/5-Bromo-4-cloro-3-indonil (BCIP/NBT–Sigma) previamente diluida en 10 ml.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 ESTUDIO DEL APARATO ESTOMÁTICO EN CACTÁCEAS

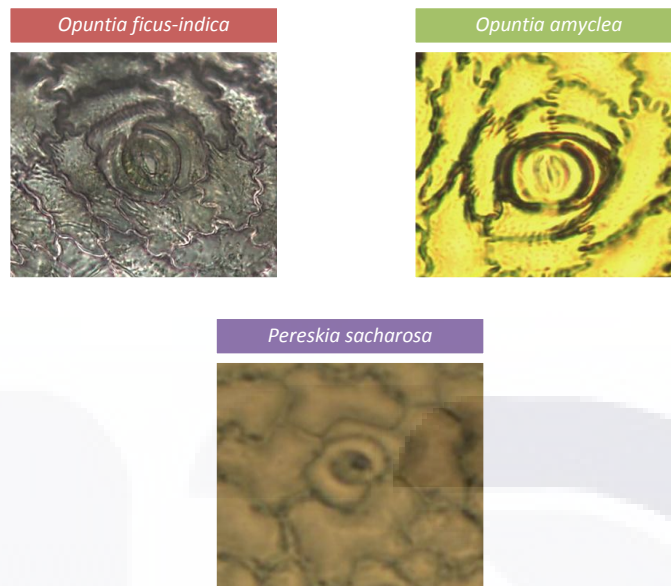
#### 6.1.1 Densidad y tipos de estomas

El protocolo que más se adecuó para el estudio de la morfología y densidad de estomas en cactáceas fue el propuesto por Hernández *et al.*, (2007) con algunas modificaciones hechas en el laboratorio. Con este protocolo, se lograron visualizar las impresiones de estomas para su caracterización, tal como se muestra en la **Fig. 6 A y B**. La densidad quedó registrada en la **Tabla 4**.

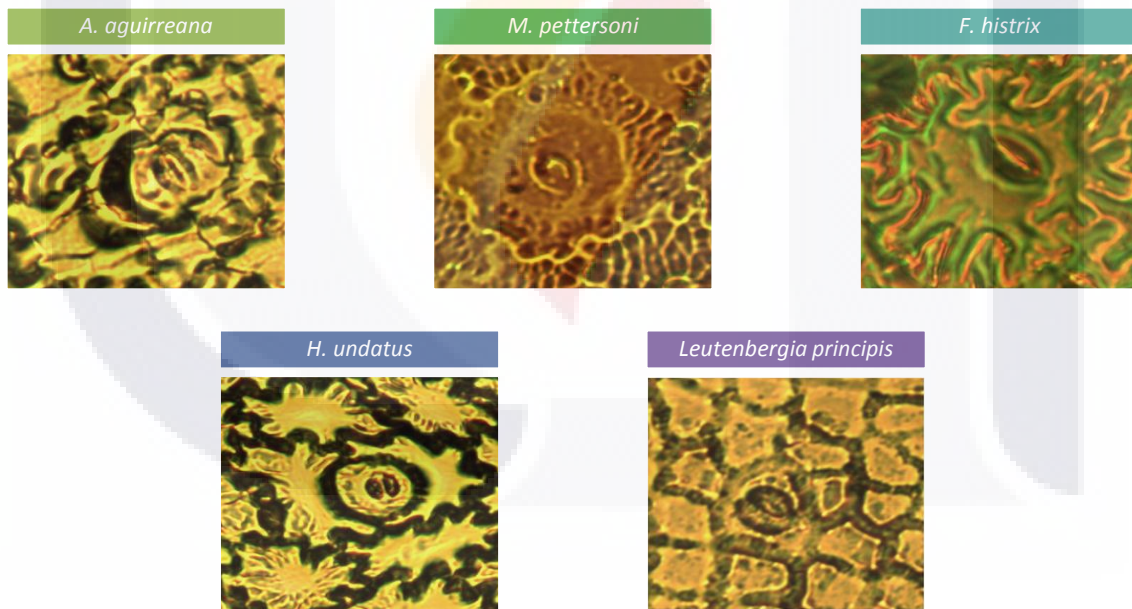
**Tabla 4.** Densidad estomática y tipo de estoma de los especímenes analizados.

Especímen	Tipo de estoma	Estomas / mm <sup>2</sup>	Grupo*
<i>A. aguirreana</i>	Paralelocítico	[20.32 - 24.48]	
<sup>c</sup> <i>P. sacharosa</i>	Opuntioide	[69.14 - 79.40]	1
<i>M. pettersoni</i>	Paralelocítico	[18.75 - 23.11]	
<i>F. histrix</i>	Paralelocítico	[13.91 - 16.09]	
<sup>c</sup> <i>O. amycleae</i>	Opuntioide	[28.33 - 32.20]	2
<sup>c</sup> <i>H. undatus</i>	Paralelocítico	[12.39 - 14.68]	
<i>E. chiotilla</i>	Paralelocítico	[17.24 - 22.36]	3
<sup>c</sup> <i>O. ficus- indica</i>	Opuntioide	[39.09 - 45.17]	
<sup>c</sup> <i>L. pincipis</i>	Paralelocítico	[18.71 - 21.30]	

\*Grupo en base a análisis de conglomeración, <sup>c</sup>Columnar



**Figura 5.** Impresiones epidérmicas de estomas tipo opuntioide de cactáceas cultivadas *in vitro* con vista 4X. Método adaptado en el laboratorio de biología molecular de plantas.



**Figura 6.** Impresiones epidérmicas de estomas tipo paralelocítico de cactáceas cultivadas *in vitro* con vista 4X. Método adaptado en el laboratorio de biología molecular de plantas.

Como se muestra en los resultados, las especies con estomas tipo opuntioide pertenecen a las subfamilias Pereskioideae: *P. sacharosa* y Opuntioideae: *O. ficus-indica* y *O. amycleae*. Las demás especies pertenecen a la subfamilia Cactoideae y todas presentan

estomas tipo paralelocítico. Eggli (1984) examinó 150 taxa de la familia Cactaceae y encontró que la mayoría de los ejemplares de la subfamilia Cactoideae poseía estomas paralelocíticos, mientras que en Pereskioideae y Opuntioideae fueron de tipo opuntioide.

Fraser *et al.*, (2008) señalan que la densidad estomática refleja la adaptación a su medio ambiente, pudiendo estar afectada por el agua del suelo, luz, CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, y fósforo en suelo. Un incremento en la cantidad de agua disponible puede producir el incremento en biomasa y el área de hoja, y producir un decremento en la densidad estomática. Una deficiencia ligera de agua tiende a aumentar la densidad, pero un déficit mayor induce la disminución del número de estomas. Por su parte Parés *et al.*, (2008) señalan que como respuesta al estrés por salinidad en agua de riego se encontró un decremento en la densidad estomática y en el espesor de la lámina foliar en *Carica papaya*, esto podría deberse a que en suelos salinos (altas concentraciones de sales solubles), se incrementa el potencial osmótico de la solución del suelo, causando estrés fisiológico. Este fenómeno se presenta también en suelos expuestos a déficit hídrico causado entre otras cosas, por la escasez de precipitación y una alta tasa de evaporación.

Hernández *et al.*, (2007) encontraron en *Myrtillocactus geometrizans* una correlación entre densidad y latitud y porcentaje de materia orgánica pero no así con altitud, temperatura y precipitación promedio anual, así como diferencias significativas para la densidad estomática entre la parte apical y media de la rama. Mencionan que en todas las poblaciones donde realizaron el estudio se mantenía constante el tipo de estoma paralelocítico, considerándola una característica estable. También menciona que las plantas C3 y C4 que habitan en zonas áridas tienen una densidad de 100 a 300 estomas/mm<sup>2</sup> (densidad alta), mientras que plantas CAM, como las cactáceas, presentan de 18 a 60 estomas/mm<sup>2</sup>. Con referencia a estos resultados cabe mencionar que en nuestro estudio de cactáceas *in vitro*, el número menor de estomas fue de 12.39/mm<sup>2</sup> (*H. undatus*) y el mayor fue de 79.40/mm<sup>2</sup> (*P. sacharosa*). Los investigadores mencionados reportan que las densidades para *Opuntia* oscilan de 9 a 38 estomas/mm<sup>2</sup> y para Pereskioideae en más de 51 estomas/mm<sup>2</sup> en hojas. Por nuestra parte, la densidad obtenida para *O. ficus-indica* fue un poco mayor que la de Hernández *et al.*, (2007) (39.09 a 45.17 estomas/mm<sup>2</sup>) y para *P.*

*sacharosa* la densidad fue mayor a 51 estomas/mm<sup>2</sup>. La densidad reportada para *M. geometrizzans* fue de 18 a 30 estomas/mm<sup>2</sup> (considerada como promedio). Normalmente la densidad es más alta en plantas expuestas a luz directa del sol, así como en las que se desarrollan en suelos secos y con baja humedad.

Debido a las características morfológicas de cada especie se obtuvieron variaciones con respecto a la calidad de las impresiones obtenidas, ya que algunas presentaron tejidos externos planos, mientras que en otros, como la especie *F. histrix*, cuya epidermis es rugosa, fue difícil la obtención de una buena impresión. Comparando estos resultados con los obtenidos por Hernández *et al.*, (2007), se pudo verificar la eficacia de la técnica, aunque este grupo sólo trabajó con *M. geometrizzans* en condiciones naturales, además observó estomas paralelocíticos en todas las poblaciones analizadas y sin diferencia para el tamaño y número de estomas. En este estudio sólo *H. undatus* (columnar) presenta estomas paralelocíticos, aunque otras columnares en este estudio presentaron estomas opuntioides. Los intervalos de 95% de confianza para la media poblacional de la densidad estomática muestran por este método una amplitud más grande que los obtenidos para una misma especie estudiada en campo, pero con diferente método de estimación.

En *Opuntia*, Silva *et al.*, (2001), demuestran la relación estrecha que existe entre la radiación solar y el grosor de la cutícula y las características epidérmicas y cómo determinan los cambios en las dimensiones celulares del tejido fotosintético. También obtienen una densidad estomática para *O. ficus-indica* de 13 a 54 estomas por mm<sup>2</sup> y diferencias significativas por efecto de la exposición a la radiación sobre la densidad estomática. La densidad estomática influye directamente sobre la resistencia al flujo gaseoso de CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O. Por lo tanto la combinación del metabolismo CAM y la densidad baja de estomas es parte de la estrategia de estas plantas para generar un balance positivo en la economía hídrica, de aquí se explicaría la elevada producción de biomasa aun en condiciones de déficit hídrico.

Juárez (2011) reporta para *H. undatus* estomas de tipo paralelocítico y un rango de densidad de 5.7 a 11.5 estomas/mm<sup>2</sup>. Por su parte Tel-Zur *et al.*, (2011) reportan de 3.3 a

20.3 estomas/mm<sup>2</sup>. Nuestros resultados concuerdan con Juárez en que los estomas son de tipo paralelocítico y el número de estomas/mm<sup>2</sup> (*in vitro*) de 12.39 a 14.68 no excede el número de estomas de esta especie en condiciones naturales. Juárez (2011), también reporta que los estomas de la subfamilia Cactoideae son de tipo paralelocítico, y su densidad fluctúa entre 15 y 60 estomas/mm<sup>2</sup>. Nuestros resultados para las especies de esta subfamilia concuerdan con lo expuesto por este autor.

En otros estudios, se determinó la densidad estomática en presencia de CO<sub>2</sub> atmosférico y se encontraron resultados contradictorios. Por una parte, en plantas C3, el aumento del CO<sub>2</sub> ocasionaba disminución en el número de estomas; en *Phaseolus vulgaris* no se observó tal respuesta y en *A. thaliana*, una alta concentración de CO<sub>2</sub> atmosférico producía un aumento en la densidad estomática a corto plazo (12 días). Estos resultados sugieren la influencia de factores ambientales y los propios de cada especie (Verdugo *et al.*, 1999).

### 6.1.2 Apertura Estomática

#### *Opuntia ficus-indica* - AIA

El modelo lineal para la evaluación de la apertura estomática en *O. ficus-indica* tuvo una R<sup>2</sup> de 64.23% (los datos se ajustan en un 64% al modelo). Haciendo una prueba de comparación de Tukey se puede observar que el único tratamiento diferente es la concentración 100 μM (**Fig. 7**). Dicho efecto se puede verificar en la figura siguiente:

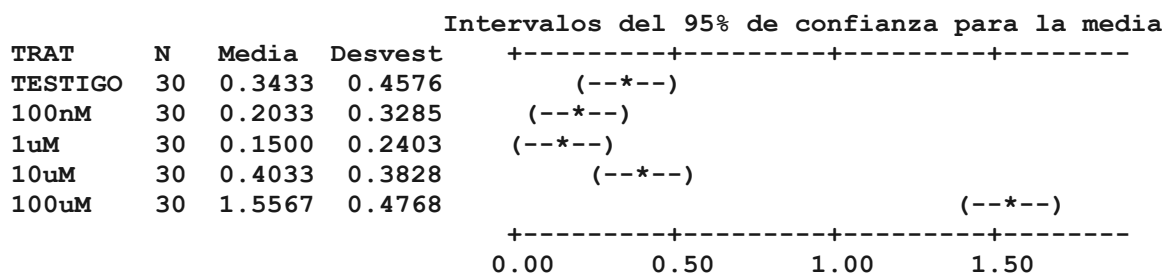


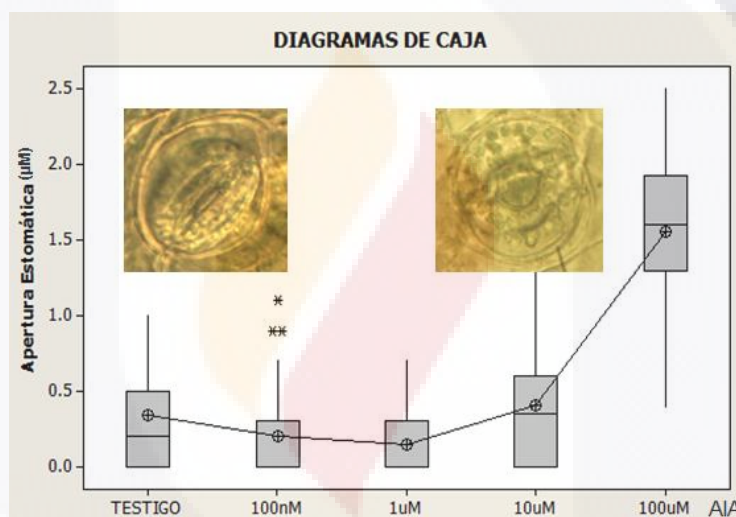
Figura 7. Intervalos de confianza de Tukey para AIA en *O. ficus-indica*.

El ANOVA correspondiente para valorar la significancia de los resultados arroja un valor  $p$  menor de 0.01, por lo que las diferencias observadas se consideran altamente significativas (Hildebrand *et al.*, 1997).

**Tabla 5. Análisis de Varianza para AIA en *O. ficus-indica*.**

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados Medios	F	Valor P
Factor	4	40.681	3.9391	67.89	0.000
Error	145	21.722	0.0565		
Total	149	62.403			

Un diagrama múltiple de caja, expresa de manera objetiva los resultados obtenidos.



**Figura 8.** Apertura estomática de *Opuntia ficus-indica* en presencia de AIA. Los asteriscos representan valores aberrantes.

Dada la tendencia observada en estos resultados, se realizó un trabajo complementario, utilizando concentraciones mayores de la fitohormona AIA. Las concentraciones a evaluar fueron: 10  $\mu$ M, 100  $\mu$ M y 1mM.

Los resultados de la comparación de Tukey obtenidos muestran nuevamente que el único tratamiento diferente fue la concentración de 1 mM (**Fig. 9**).



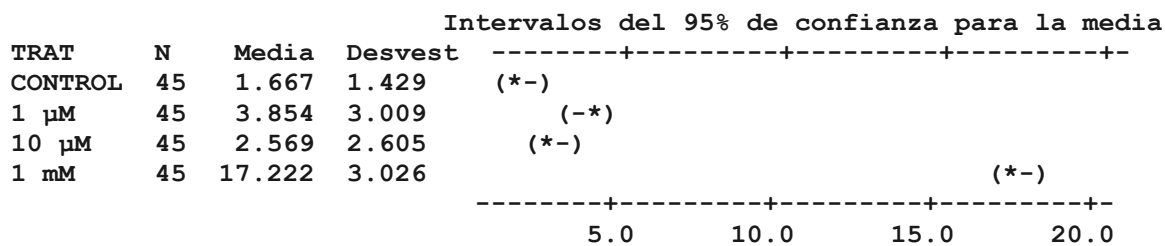


Figura 9. Intervalos de confianza de Tukey para AIA en *O. ficus-indica*.

Por otra parte, el ANOVA correspondiente a los nuevos datos, arroja una mejoría en el ajuste de los mismos al modelo lineal, con una explicación de la variación del 85.63%, y la significancia se mantiene por debajo de 0.01. **Tabla 6.**

Tabla 6. Análisis de Varianza para nuevas concentraciones de AIA en *O. ficus-indica*.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados Medios	F	Valor P
Factor	3	7229.64	2409.88	356.52	0.000
Error	176	1189.67	6.76		
Total	179	8419.31			

Un nuevo diagrama múltiple de caja expresa de manera objetiva los resultados obtenidos.

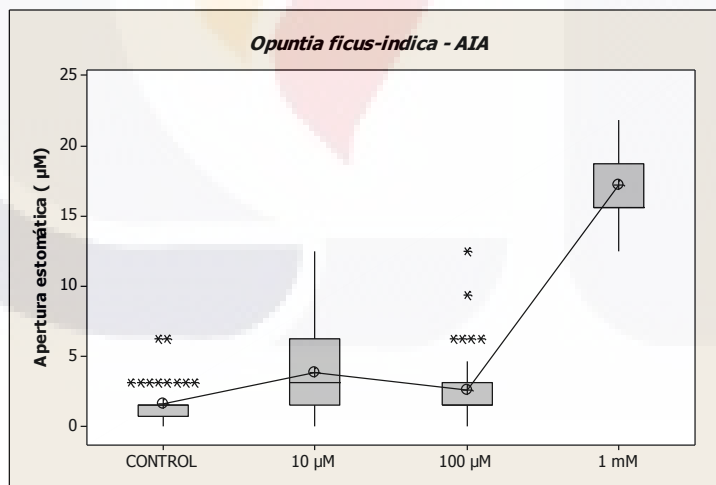
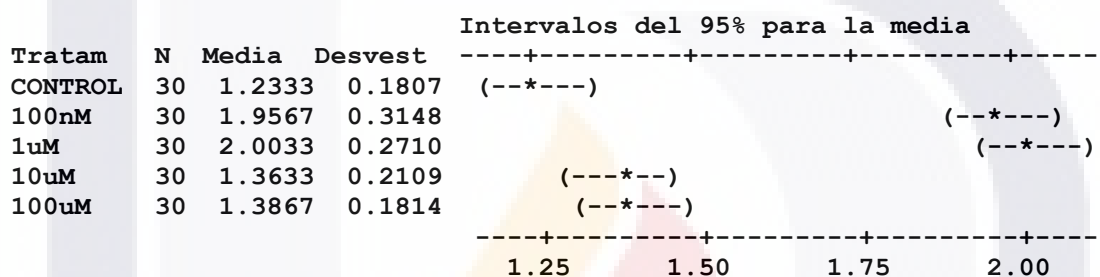


Figura 10. Diagramas de caja para nuevas concentraciones de AIA en *O. ficus-indica*. Los asteriscos representan valores aberrantes.

***Pereskia sacharosa* – AIA**

De igual manera el análisis estadístico para *P. sacharosa* arrojó los siguientes resultados.

La prueba de comparación de medias de Tukey marca diferencias significativas entre la pareja de concentraciones 10µM y 100 µM y la pareja 100 nM y 1µM, siendo éstas las que presentan mayor apertura (**Fig. 10**).



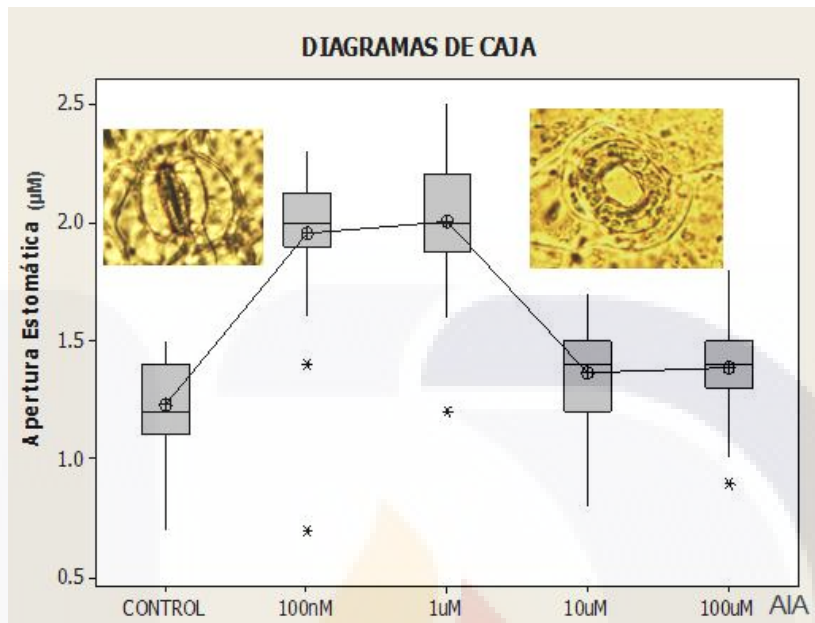
**Figura 11.** Intervalos del 95% de confianza para AIA en *P. sacharosa*.

El ANOVA correspondiente arroja un valor *p* menor de 0.01, por lo que las diferencias observadas se consideran altamente significativas. El ajuste de los datos arroja una R<sup>2</sup> de 64.84%.

**Tabla 7.** Análisis de Varianza para AIA en *P. sacharosa*.

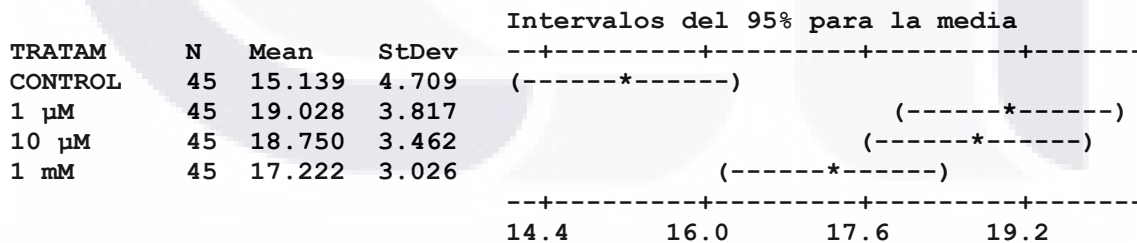
Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados Medios	F	Valor P
Factor	4	15.7564	3.9391	69.70	0.000
Error	145	8.1943	0.0565		
Total	149	23.9507			

El correspondiente diagrama múltiple de caja es el siguiente:



**Figura 12.** Apertura estomática de *P. sacharosa* en presencia de AIA. Los asteriscos representan valores aberrantes.

Nuevamente se amplió el rango de trabajo, con una concentración mayor de 1 mM, para contrastar con los resultados previos. Los intervalos de Tukey muestran que existe un efecto de la fitohormona en el proceso de apertura, pero que no hay diferencias significativas entre los tratamientos.



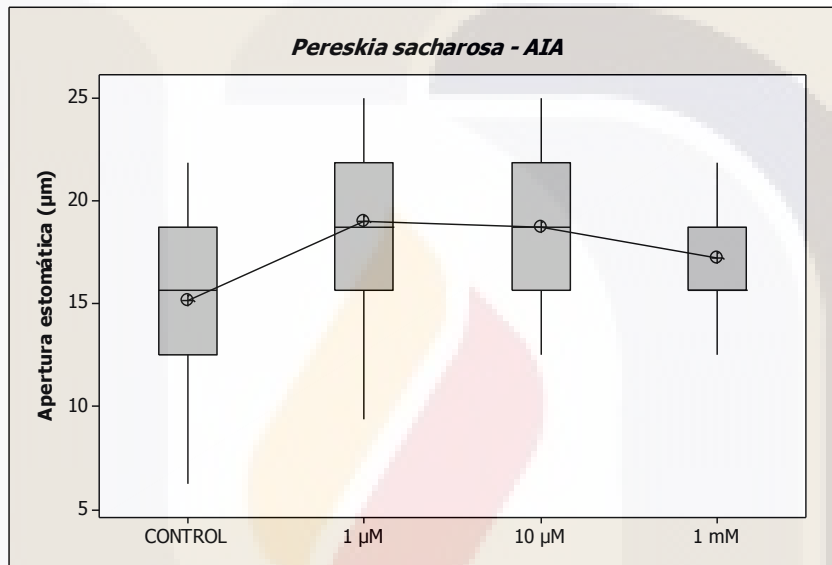
**Figura 13.** Intervalos del 95% de confianza para nuevas concentraciones de AIA en *P. sacharosa*.

El ANOVA correspondiente indica que con la inclusión de la nueva concentración de AIA (1 mM) se obtiene un ajuste muy pobre de los datos obtenidos al modelo lineal, con una R<sup>2</sup> de 12.97.

**Tabla 8.** Análisis de Varianza para nuevas concentraciones de AIA en *P. sacharosa*.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados Medios	F	Valor P
Factor	3	429.5	143.2	9.89	0.000
Error	176	2546.9	14.5		
Total	179	2976.3			

El diagrama correspondiente se muestra a continuación:



**Figura 14.** Apertura estomática de *P. sacharosa* en presencia de AIA.

***Pereskia sacharosa* – ABA**

Por otra parte, para valorar la respuesta de *P. sacharosa* a ABA, se consideraron las siguientes concentraciones: 10 µM, 100 µM y 1 mM. El análisis de Tukey muestra ligeras diferencias en el cierre de estomas. Se puede verificar que las mayores diferencias ocurren entre 100 µM y 1 mM. La menor apertura ocurre en 100 µM.

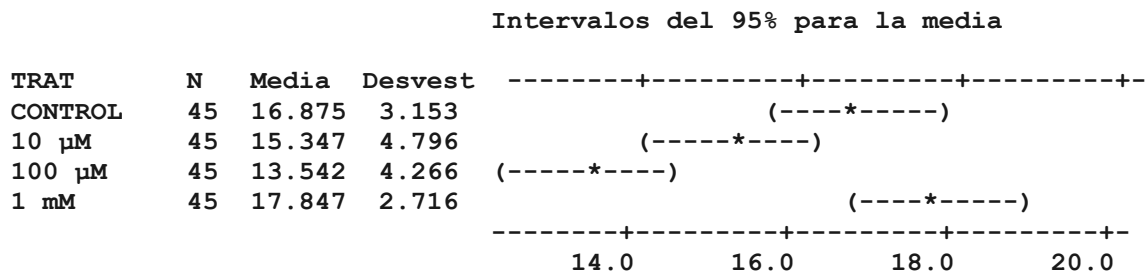


Figura 15. Intervalos del 95% de confianza para ABA en *P. sacharosa*.

El ANOVA muestra que los datos se ajustan a un modelo lineal tan sólo en un 14.2%.

Tabla 9. Análisis de Varianza de ABA en *P. sacharosa*.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados Medios	F	Valor P
Factor	3	477.4	159.1	10.88	0.000
Error	176	2575.1	14.6		
Total	179	3052.5			

El diagrama muestra objetivamente los resultados obtenidos.

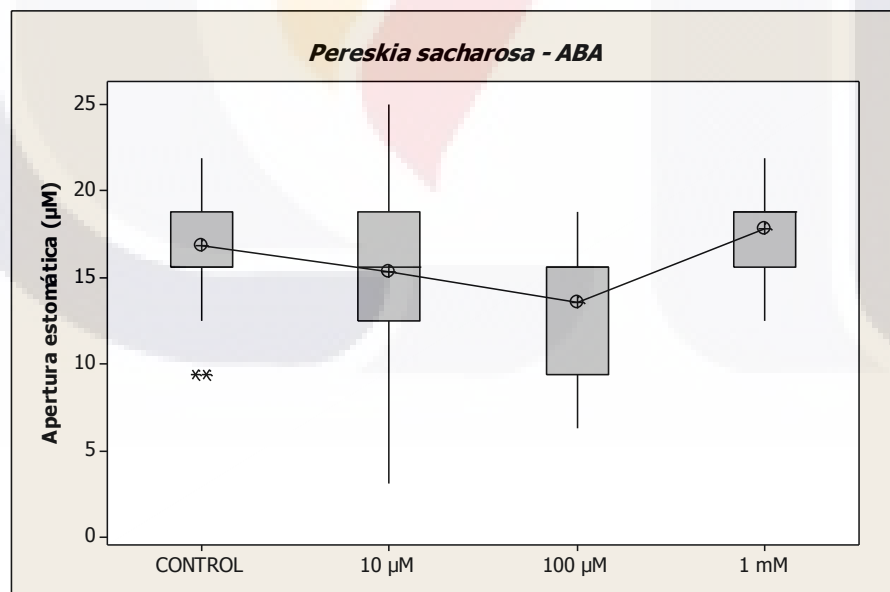


Figura 16. Apertura estomática de *P. sacharosa* en presencia de ABA. Los asteriscos representan valores aberrantes.

**Opuntia ficus-indica - ABA**

El comportamiento de la respuesta a las diferentes concentraciones de la fitohormona ABA se aprecia en los intervalos de Tukey. Se aprecia que la apertura inducida en el control, contrasta con las aperturas de los demás tratamientos. En particular, la menor apertura ocurre en 100  $\mu$ M.

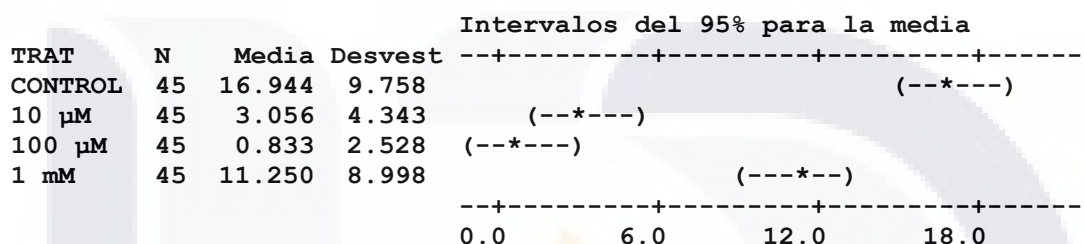


Figura 17. Intervalos del 95% de confianza para ABA en *Opuntia ficus-indica*.

Por otra parte el ANOVA confirma que con una alta significancia los tratamientos se comportan de diferente manera, ya comentada en el apartado anterior. El ajuste de los datos a un modelo lineal es aceptable (44.9%).

Tabla 10. Análisis de Varianza de ABA en *O. ficus-indica*.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados Medios	F	Valor P
Factor	3	7486.8	2495.6	49.56	0.000
Error	176	8862.8	50.4		
Total	179	16349.6			

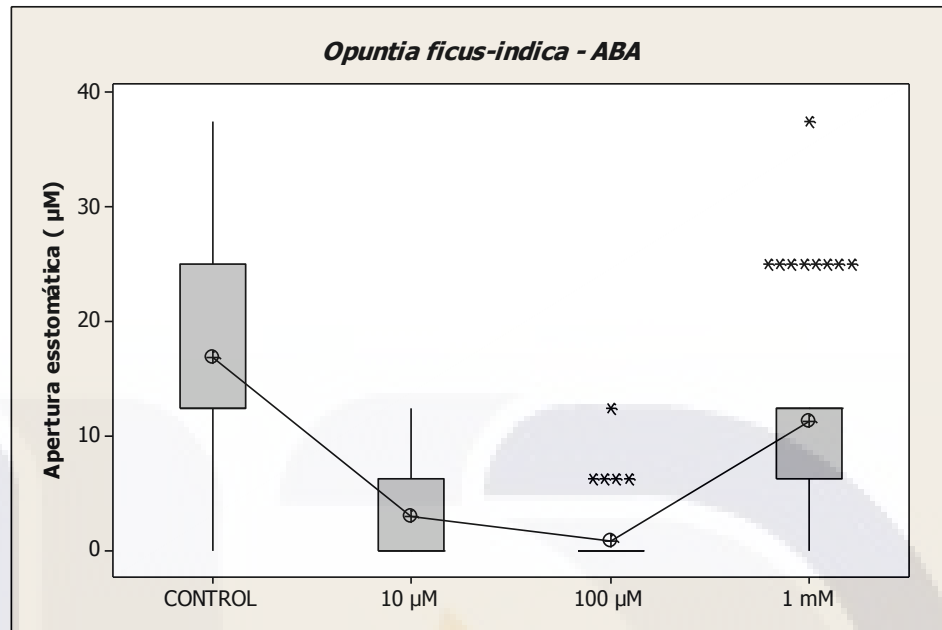


Figura 18. Apertura estomática de *O. ficus-indica* en presencia de ABA. Los asteriscos representan valores aberrantes.

Con respecto al análisis estadístico, un ANOVA aplicado a los resultados de apertura en las concentraciones del trabajo inicial en *O. ficus-indica* arrojó una  $R^2$  de 64.23% (los datos se ajustan en un 64% al modelo lineal). Con una prueba de comparación de Tukey se puede observar que el único tratamiento diferente es a la concentración de 100 µM de AIA, donde ocurre la mayor apertura. Sin embargo, cuando se agrega una mayor concentración (1 mM), se observa que la mayor apertura se presenta precisamente en dicha concentración. En este caso, esta amplitud del rango ofrece mayor información del proceso. Esto se verifica con los ANOVAS correspondientes, pues la explicación de varianza es mayor en el rango ampliado que crece de 64.23% a 85.63%.

Por otra parte, para valorar la influencia del ABA en el cierre de estomas, los análisis correspondientes indican que la mayoría de los estomas se cerraron a una concentración de 100 µM. Cuando se amplió el rango de los valores de concentración de la fitohormona, en 1 mM, el proceso se invierte, es decir vuelve a ocurrir una apertura.

Con respecto a *P. sacharosa*, su respuesta a las fitohormonas es muy semejante. En ambos casos se presentaron pocas diferencias entre los tratamientos. Cuando se incorpora

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

una concentración mayor (1 mM), se invierte el proceso de apertura cierre. En el caso de AIA, se aprecia un comportamiento ligeramente convexo, es decir, las aperturas son ligeramente menores a medida que es mayor la concentración. En cambio en ABA, la tendencia es ligeramente cóncava, es decir, la apertura es ligeramente menor a medida que la concentración es mayor, excepto a 1 mM. Los ANOVAS muestran que en ambos casos, el ajuste es pobre, 12.97% en AIA y 14.2% en ABA.

Ricanek y Virchecova (1992) encontraron que en estomas de *Vicia faba* cultivada en invernadero, el ABA producía cierre estomático a concentraciones de 10  $\mu\text{M}$  tanto en presencia o ausencia de  $\text{CO}_2$  como en luz u oscuridad. En *O. ficus-indica* y en *P. sacharosa* la inducción del cierre de la mayoría de los estomas fue a una concentración más alta (100  $\mu\text{M}$ ). Al respecto Pospisilová (2003) señala que la sensibilidad al ABA varía según la especie, la edad de la hoja, temperatura, irradiación, humedad del aire, estatus nutricional y particularmente la cantidad de agua disponible para la planta.

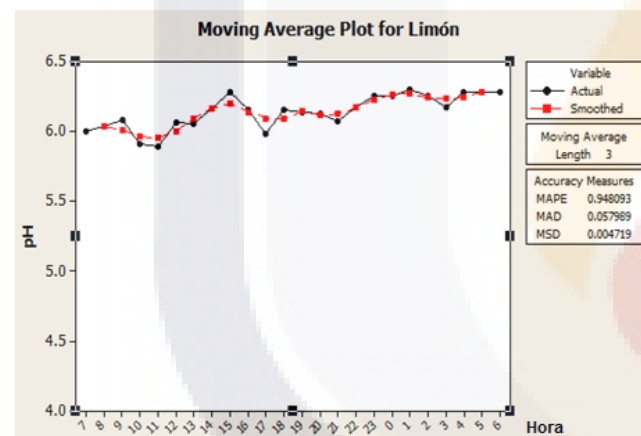
Por otra parte, concentraciones bajas de auxina promueven la actividad de los canales que introducen  $\text{K}^+$  a la célula guarda durante la apertura. A mayores concentraciones de AIA se inhibe el funcionamiento de estos y se promueve la actividad de los canales que expulsan  $\text{K}^+$  de la célula (Acharya y Assmann, 2009). Nuestros resultados en *P. sacharosa* concuerdan con lo anterior, ya que a 1 mM se aprecia este efecto.

En *O. ficus-indica* la concentración de AIA a la cual se produce mayor apertura es a 1 mM, dicho resultado concuerda con Ricanek y Virchecova (1992) que encontraron que desde 100  $\mu\text{M}$  hasta 1 mM se podía conseguir una apertura estomática considerable en la epidermis abaxial de *V. faba* inhibiendo el efecto de cerrado inducido por oscuridad,  $\text{CO}_2$  y ABA.

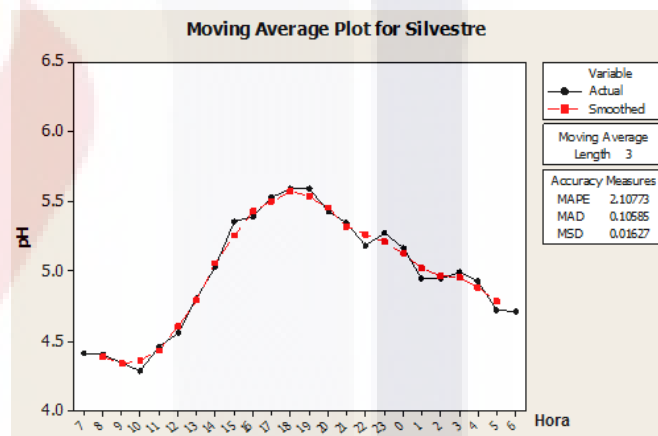


### 6.1.3 Verificación de metabolismo CAM y C3 en cactáceas

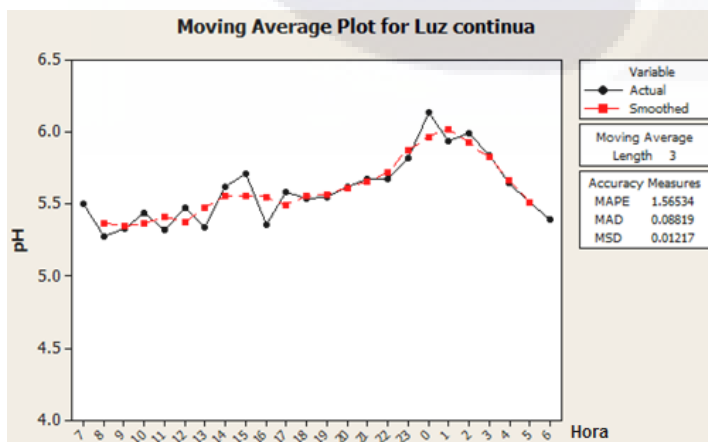
Las series de tiempo en las que no se detecta una evidente disminución del pH en un lapso de 24 horas son las correspondientes a *C. Aurantifolia* (limón) (A) cuyo pH oscila entre 6 y 6.4 y *O. ficus-indica* (nopal) bajo luz continua (C) cuyo pH lo hace entre 5.3 y 6. Los ejemplares que presentan un aumento evidente en la acidez en algún momento del día son: el nopal silvestre (B) en el cual el pH disminuye hasta 4.3 y luego aumenta hasta 5.5; el nopal bajo fotoperiodo (D) con valores de pH desde 4.5 hasta 6.4, *C. imbricata* (cardenche) (E) cuyos valores de pH se extienden desde 4.2 hasta 6; *M. geometrizans* (garambullo) (F) el cual presenta valores desde 4 hasta 5.5 y *Aloe barbadensis* (sábila) cuyo rango varía desde 4.6 hasta 5.7 (Fig. 19 y 20).



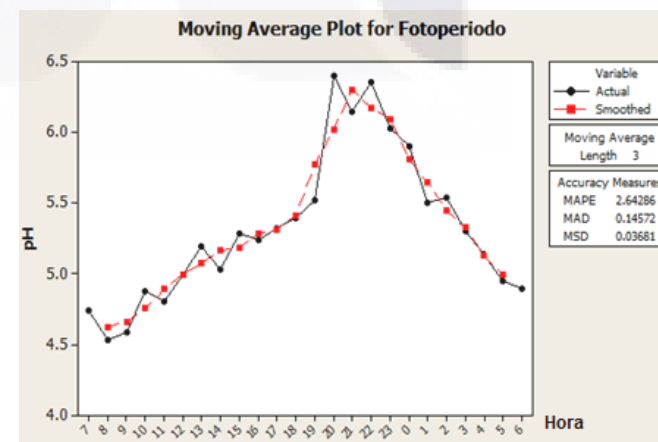
A



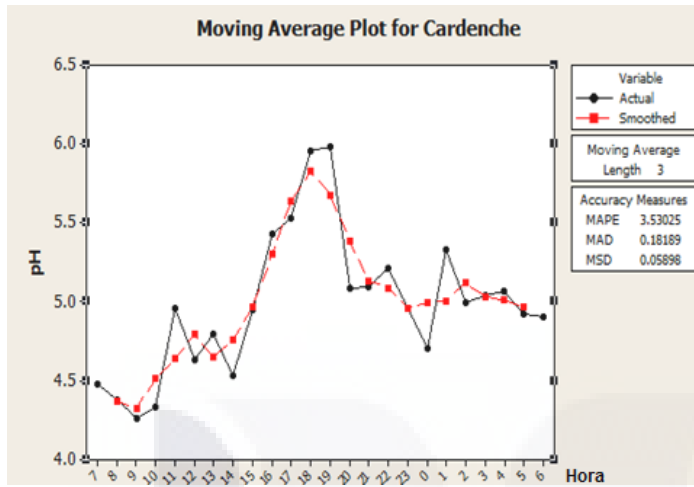
B



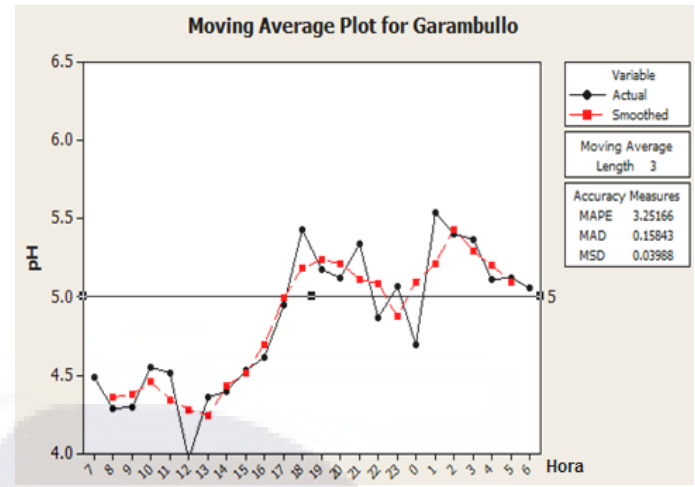
C



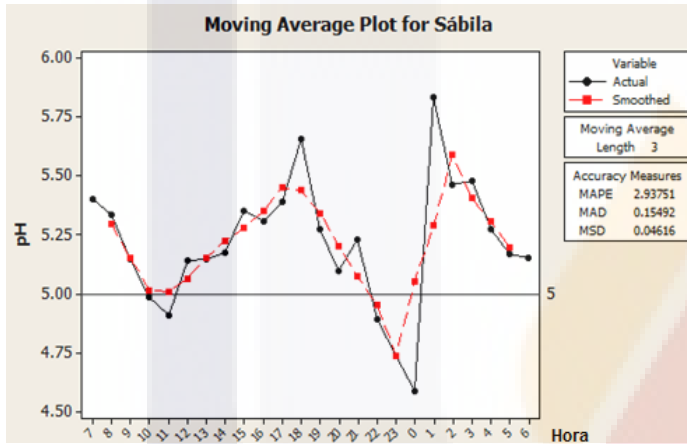
D



E



F



G

**Figura 19.** Series de tiempo de pH (negro: serie original y rojo: serie suavizada por medias móviles) para A) *C. Aurantifolia* (limón), B) *O. ficus-indica* (nopál) silvestre, C) *O. ficus-indica* bajo luz continua, D) *O. ficus-indica* bajo fotoperiodo, E) *C. imbricata* (cardenche), F) *M. geometrízans* (garambullo), G) *A. barbadensis* (sábila). El patrón de pH es similar en limón (planta C3) al de nopál bajo luz continua. El patrón en nopál silvestre (planta CAM) es similar al nopál bajo periodo.

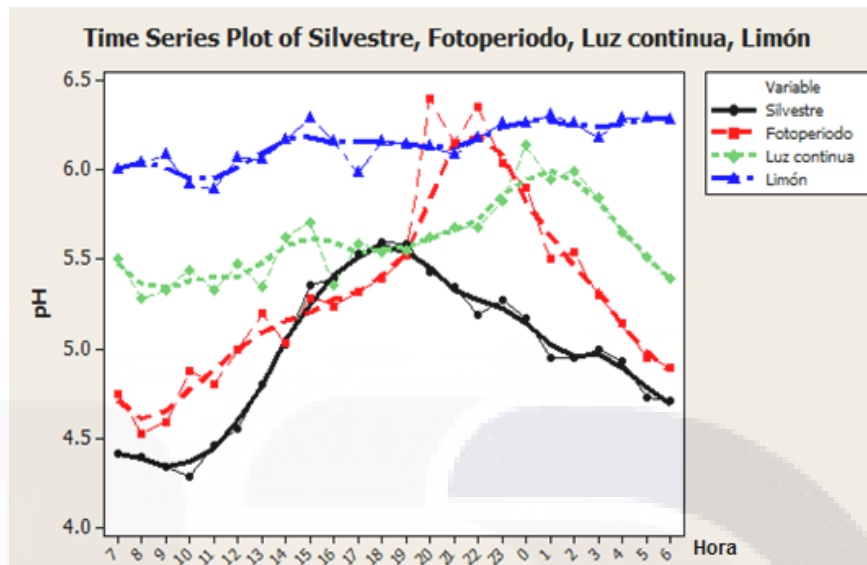


Figura 20. Serie de tiempo de pH para nopal y limón silvestre y para nopal bajo fotoperiodo y bajo luz continua (ambas *in vitro*).

Además, el análisis de correlación arrojó los siguientes resultados: el nopal silvestre mostró mayor relación con cardenche, con nopal *in vitro* bajo fotoperiodo y con el garambullo (prueba altamente significativa con un valor p menor a 0.01).

El nopal *in vitro* bajo fotoperiodo tuvo una mayor relación con nopal silvestre, aunque también la hubo con el nopal *in vitro* bajo luz continua y con el garambullo.

El nopal *in vitro* bajo luz continua presentó una mayor relación con el nopal *in vitro* bajo fotoperiodo, aunque también resultó estar muy relacionado con el limón y con el garambullo (Tabla 11).

Tabla 11. Correlaciones entre Condición y Especie.

	Nopal Silvestre	Nopal Fotoperiodo	Nopal Luz continua	Limón	Cardenche	Garambullo
Nopal Fotoperiodo	0.713 0.000					
Nopal Luz continua	0.419 0.042	0.611 0.002				
Limón	0.377 0.069	0.338 0.106	0.587 0.003			
Cardenche	0.806 0.000	0.452 0.027	0.188 0.380	0.246 0.247		
Garambullo	0.537 0.007	0.519 0.009	0.541 0.006	0.495 0.014	0.655 0.001	
Sábila	0.135 0.530	-0.232 0.275	-0.004 0.985	0.128 0.551	0.376 0.070	0.388 0.061

Renglón superior: correlación entre factores. Renglón inferior: Nivel de significancia.

En la **Fig. 20** se presentan los resultados del tipo de metabolismo para nopal. Se aprecia que esta especie *in vitro* bajo luz continua se comporta como una planta C3, ya que los cambios de pH a lo largo del día no son tan extremos, en cambio cuando es sometida a fotoperiodo se puede observar un pico de mayor acidez durante la noche (pH 6.4) hasta su caída a las 8 am (pH 4.5), este comportamiento es más parecido a una planta CAM en condiciones naturales. Malda *et al.*, (1999) encontró algo similar, ya que la acidez titulable en *Coryphanta minima* mostró que los picos para el ácido málico durante la noche fueron mayores en plantas *in vitro* (fotoperiodo de 16 h) que en *ex vitro*. Indicando que la fijación de carbono durante periodo oscuro es mayor en especies CAM *in vitro*.

Casierra y González, (2009) en un estudio de acidez titulable en *Furcraea spp.* encontraron que presentaba un ritmo de acidificación y desacidificación propio de plantas CAM, el contenido de ácidos orgánicos en las hojas disminuyó a partir de las 8:00 hasta cerca de las 19:00 h luego la acidez se incrementó de nuevo a consecuencia de la producción de ácidos orgánicos como el malato.

## 6.2 ESTUDIOS MOLECULARES

### 6.2.1 Aislamiento de ADN genómico y ARN total

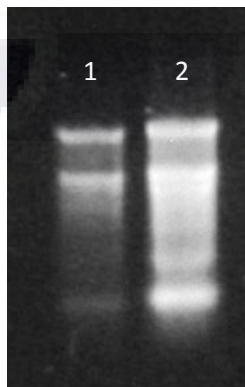
El ADN de alto peso molecular aislado de once especies de cactáceas pertenecientes a las subfamilias Pereskioideae, Opuntioideae y Cactoideae por medio del método con CTAB (Lodhi *et al.*, 1994) presentó variación en concentración y pureza, como puede observarse en la **Tabla 12** construida en Excel y por medio de la fotografía del gel de agarosa al 0.8% (**Fig. 21**). En la **Fig. 22** se puede apreciar el ARN total extraído de *O. ficus-indica* y *H. undatus*.

**Tabla 12. Cuantificación y determinación de pureza de ADN de 11 especies de cactáceas.**

	A	B	C	D	E
1	MUESTRA	260	280	260/280	CONC. ADN µg/µl
2	<i>Mammillaria pettersonii</i>	0.022	0.014	1.57	0.22
3	<i>Ferucactus histrix</i>	0.056	0.033	1.70	0.56
4	<i>Leuchtenbergia principis</i>	0.013	0.008	1.63	0.13
5	<i>Pilocereus chrysacanthus</i>	0.087	0.05	1.74	0.87
6	<i>Mammillaria carmenae</i>	0.014	0.009	1.56	0.14
7	<i>Acharagma aguirreana</i>	0.013	0.009	1.44	0.13
8	<i>Opuntia amyckea</i>	0.011	0.008	1.38	0.11
9	<i>Opuntia ficus-indica</i>	0.012	0.01	1.20	0.12
10	<i>Escontria chiotilla</i>	0.06	0.036	1.67	0.6
11	<i>Pereskia sacharosa</i>	0.022	0.013	1.69	0.22
12	<i>Hylocereus undatus</i>	0.023	0.014	1.64	0.23



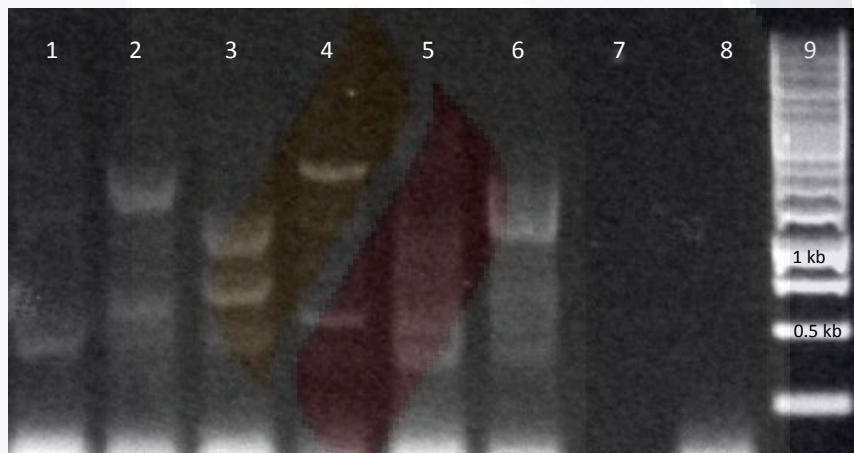
**Figura 21.** Imagen representativa de ADN genómico extraído de tres diferentes especies de cactáceas por medio del método modificado de CTAB (Lodhi *et al.*, 1994). 1) *Opuntia ficus-indica*, 2) *Pereskia sacharosa*, y 3) *Hylocereus undatus*.



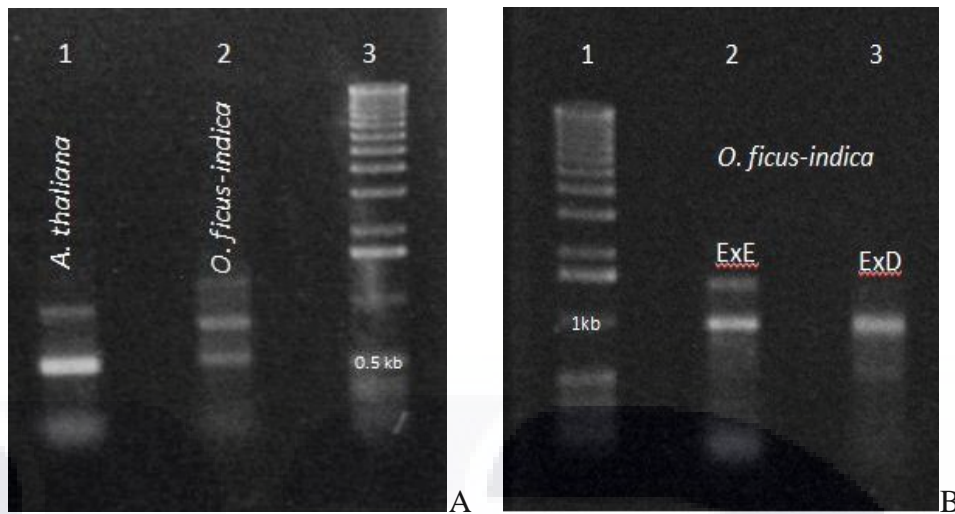
**Figura 22.** Imagen representativa de ARN total extraído con el método de López-Gómez y Gómez-Lim (1992. Carriles: 1) *Opuntia ficus-indica*, 2) *Hylocereus undatus*.

### 6.2.2 Identificación de los genes de $\alpha$ -Expansina y PNP mediante la PCR

La identificación de los genes de interés ( $\alpha$ -expansina y PNP) se llevó a cabo mediante la técnica de PCR, utilizando el ADN aislado de once especies de cactáceas. Las especies que dieron positivo para PNP son *P. chrysacanthus*, *M. carmenae*, *A. aguirreana*, *O. amyctea*, *O. ficus-indica* y *P. sacharosa*, para todas ellas amplificó una banda aproximada de 500 pb (**Fig. 22**). Las especies que dieron negativo para PNP fueron *M. pettersoni*, *F. histrix*, *L. principis*, *E. chiotilla* e *H. undatus*. Para el gen de  $\alpha$ -expansina *O. ficus-indica* y *P. sacharosa* fueron positivas. Es importante mencionar que estos genes no habían sido identificados en cactáceas (**Fig. 23**).



**Figura 23.** Productos de PCR para la amplificación de Péptido Natriurético. Carril 1) *Pilosocereus chrysacanthus*; Carril 2) *Mammillaria carmenae*; Carril 3) *Escontria chiotilla*, Carril 4) *Opuntia amyctea*; Carril 5) *Opuntia ficus-indica*; Carril 6) *Pereskia sacharosa*; Carril 8) control negativo (reacción sin ADN), Carril 9) marcador de peso molecular de 1 kb.

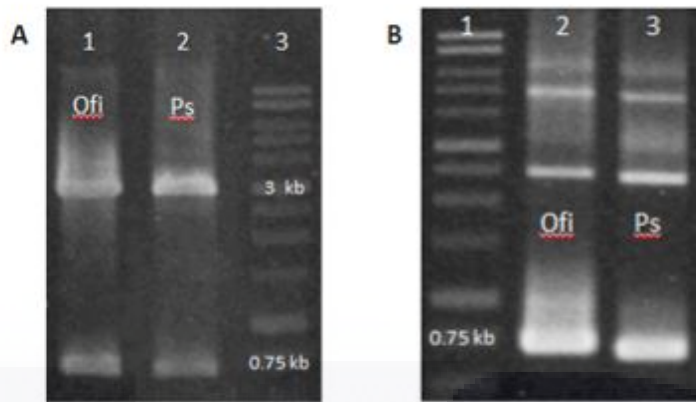


**Figura 24.** Productos de PCR para la amplificación de: A) Péptido Natriurético: carril 1) *A. thaliana*, carril 2) *O. ficus-indica*, carril 3) marcador de peso molecular de 1 kb, B)  $\alpha$ -Expansina en *Opuntia ficus-indica*: carril 1) marcador de peso molecular de 1 kb, carril 2) Expansina amplificada con el oligonucleótido específico (ExE), carril 3) Expansina amplificada con el oligonucleótido degenerado (ExD).

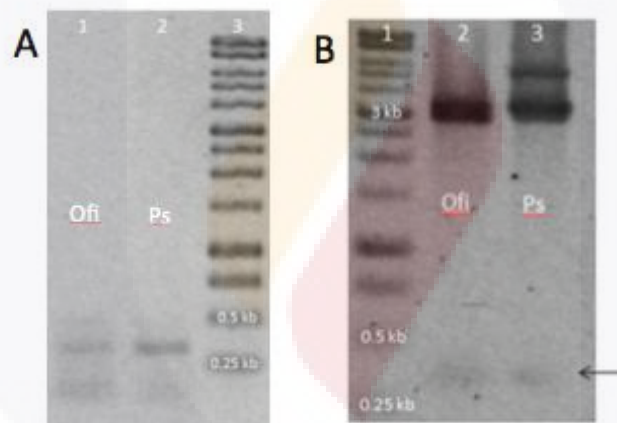
### 6.2.3 Clonación de los fragmentos de PCR para Actina y PNP en *Opuntia ficus-indica* y *Pereskia sacharosa*

Se efectuó la clonación de los productos de PCR del gen PNP en el vector pGem (Promega), como se indica en la metodología. De igual forma, el gen de actina fue clonado y utilizado como gen de referencia para la determinación del número de copias de PNP.

Las clonas positivas de *O. ficus-indica* y *P. sacharosa* presentaron un inserto de 0.7 kb para actina y de 0.35 kb para PNP, su presencia fue confirmada por restricción y por PCR (Fig. 25).



**Figura 25.** Perfil de Restricción y PCR para el gen Actina. A) Por restricción: 1) *O. ficus-indica*, 2) *P. sacharosa*, vector (3 kb) e inserto (0.75 kb); 3) MPM. B) Por PCR: 1) MPM, 2) *O. ficus-indica* (0.7 pb); 3) *P. sacharosa*.



**Figura 26.** Electroforesis de PCR y Perfil de restricción para el gen PNP. A) Por PCR: 1) *O. ficus-indica* (0.35 pb); 2) *P. sacharosa*; 3) MPM. B) Por restricción: 1) MPM; 2) *O. ficus-indica*, vector (3 kb) e inserto (0.35 kb); 3) *P. sacharosa*.

#### 6.2.4 PCR en tiempo real para el número de copias del gen PNP

La estimación del número de copias del gen PNP para *O. ficus-indica* y *P. sacharosa* se realizó por PCR en tiempo real, utilizando el gen de actina como gen de referencia por ser constitutivo. El porcentaje de eficiencia en la amplificación fue mayor al 95% en ambos genes y el número estimado de copias fue de 1 (**Tabla 13**). Este resultado es



consistente con lo encontrado por Ludidi *et al.*, (2002), los cuales mencionan que sólo existe un gen de PNP en *A. thaliana* (*AtPNPA*) y un gen parecido denominado *AtPNPB* pero que sólo guarda el 37 % de similitud con *AtPNPA*.

**Tabla 13. PCR en tiempo real para la estimación del número de copias del gen PNP en *O. ficus-indica* y *P. sacharosa*.**

Clonas	<i>O. ficus-indica</i>	<i>P. sacharosa</i>
Eficiencia de la PCR para el gen de Actina	95.7 %	96.9%
Eficiencia de la PCR para el gen de PNP	96.1 %	97.3%
Ct del gen de Actina	21.90	21.68
Ct del gen de PNP	21.74	21.69
$GCI = \text{Eff}^{\text{Refct}} / \text{Eff}^{\text{ct}}$	1.1	0.98
Número estimado de copias	1	1

El cociente muestra que el número de copias en el genoma de estas especies es de 1.

### 6.2.5 Análisis Bioinformático

Se realizó el análisis bioinformático de la secuencia de 289 pb de un PNP de *O. ficus – indica* (*OfPNPA*), obtenido a partir de un producto de PCR amplificado con oligonucleótidos específicos, cuyo diseño se basó en el gen *At-EXPA1* de *A. thaliana*, el cual tiene como nombre AT2G18660.1, el número de acceso que le corresponde en la base de datos de *A. thaliana* (TAIR) es 2053982. Esta secuencia es homóloga a los péptidos natriuréticos atriales de humano ( $\alpha$ -hANP) (Ludidi *et al.*, 2002).

La secuencia *OfPNPA* obtenida fue:

>OfPNPA\_ 289 bp

```
GAGTTGTCTAAACTTTGAAGAGCATGCACCGGGCGTACCGTAGACGTGAAGGT
AGTTGATTTCTGCCGGGAGCCTTGCAACGGTGACCTTAATCTCTCTCGTGACGC
TTTTCGGGTTATCGCTAATACTGATGCCGGTAACATTCGTGTCGTATAACACACC
GTAAGTTTCATTCTTTCATCTTTTCATCGTATCCAAAGTTTAATATTGTCTTGAT
```

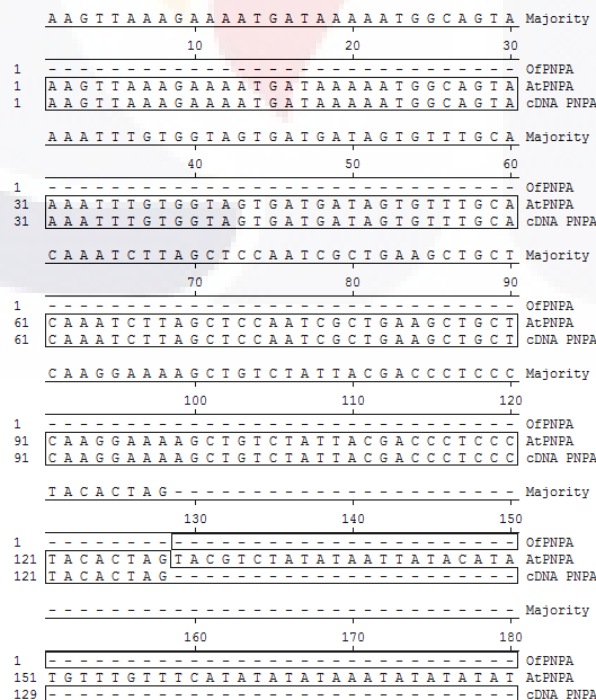
TTTTTCAAAAATAAATTGCCATTTAATATTGTCTAGATAAAATTTGACAATTCTT  
 TTCTTCTGCAGGATATGA

La traducción de dicha secuencia es:

>OfPNPA1\_1 96 bp  
 ELSKLRACTGRTVDVKVVDVDFCREPCNGDLNLSRDAFRVIANTDAGNIRVVYTPVSF  
 FHLFIVSKVYCLDFFKNKFAIYCLDKFDNSFLLQDM

El gen AT2G18660.1 presenta dos exones y dos intrones. Los exones se extienden del nucleótido 1 hasta el 128 y del 228 al 500. Los intrones se encuentran del nucleótido 129 hasta el 227 y del 501 hasta el 624. OfPNPA se extiende del nucleótido 356 hasta el 625, es decir comprende una parte del segundo exón y otra del segundo intrón.

La secuencia OfPNPA fue alineada con el genómico y el ADNc de la secuencia AT2G18660.1 de *A. thaliana* mediante el programa DNASTar (**Fig. 27**).



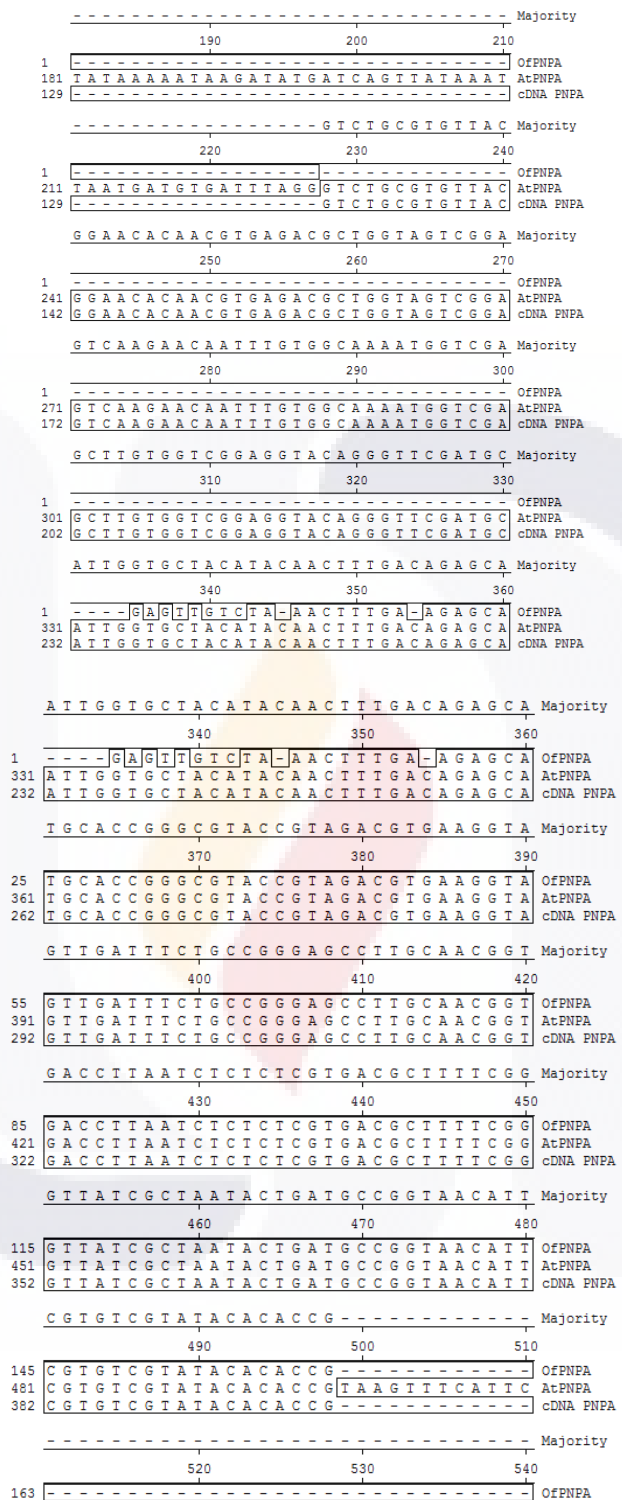


Figura 27. Alineamiento de la secuencia genómica y ADNc de *A. thaliana* con *OfPNPA* (gen de PNP en *O. ficus-indica*).

Posteriormente se realizó un alineamiento local múltiple (BLAST) en las bases de datos del NCBI (**Fig. 28**). OfPNPA mostró homología con el cromosoma 2 de *A. thaliana*, con PNPs de *Hedera helix* y *Erucastrum strigosum*, con una proteína de *A. thaliana* que presenta un dominio parecido al EG45 de las endoglucanasas y con las proteínas hipotéticas de *A. lyrata* y At2g18660 de *A. thaliana*.

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
CP002685.1	Arabidopsis thaliana chromosome 2, complete sequence	510	510	96%	2e-141	99%
AC005724.3	Arabidopsis thaliana chromosome 2 clone MSF3 map CIC06E	510	510	96%	2e-141	99%
AY243474.1	Hedera helix immuno-reactant natriuretic peptide-like protei	281	281	53%	2e-72	99%
NM_179648.1	Arabidopsis thaliana EG45-like domain-containing protein 2 (	276	276	52%	8e-71	99%
AY142603.1	Arabidopsis thaliana unknown protein (At2g18660) mRNA, co	276	276	52%	8e-71	99%
AY065269.1	Arabidopsis thaliana unknown protein (At2g18660) mRNA, co	276	276	52%	8e-71	99%
AY093582.1	Erucastrum strigosum immuno-reactant natriuretic peptide-li	270	270	53%	4e-69	98%
XM_002886143.1	Arabidopsis lyrata subsp. lyrata hypothetical protein, mRNA	231	231	50%	2e-57	95%

**Figura 28.** BLAST realizado en la base de datos del NCBI donde se puede ver el porcentaje de identidad de la secuencia problema (*OfPNPA*) con otras secuencias de la base de datos.

La búsqueda de los dominios consevados mediante el software ProDom de la base de datos de UniProt arrojó que la secuencia OfPNPA presenta dominios de péptido natriurético.

```

>PD783517 (Closest domain: EGC2_ARATH 4-129)
Number of domains in family: 11
Commentary (automatic):
SUBNAME: UNCHARACTERIZED FULL=PUTATIVE FULL=PREDICTED NATRIURETIC A FLAGS: RECNAME: FULL=PLANT GLYCOPROTEIN
Length = 126
Score = 253 (102.1 bits), Expect = 1e-20
Identities = 48/48 (100%), Positives = 48/48 (100%)

Query:      6 RACTGRTVDVKVDFCREPCNGDLNLSRDAFRVIANIDAGNIRVVYTP 53
            RACTGRTVDVKVDFCREPCNGDLNLSRDAFRVIANIDAGNIRVVYTP
Sbjct:     82 RACTGRTVDVKVDFCREPCNGDLNLSRDAFRVIANIDAGNIRVVYTP 129

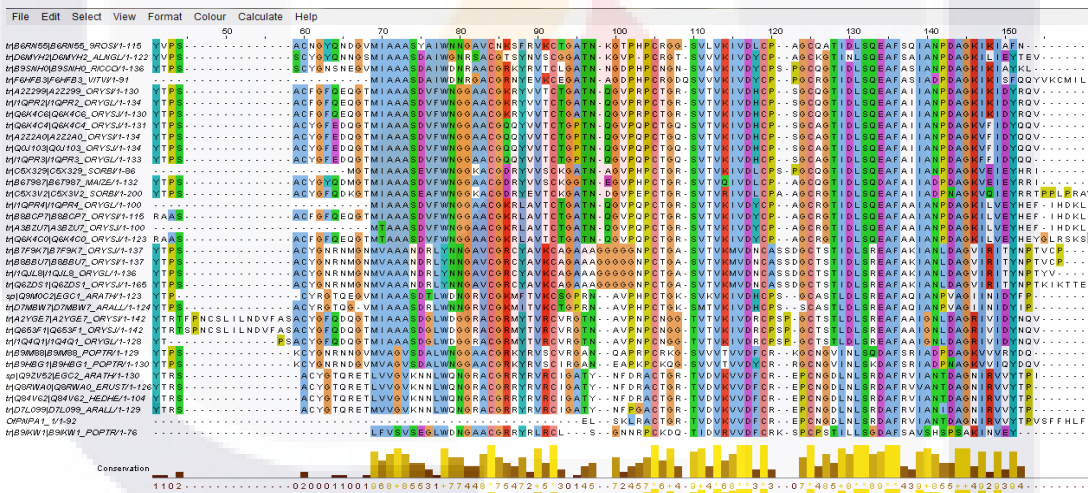
>PD002515 (Closest domain: Q6K4C6_ORYSJ 25-130)
Number of domains in family: 778
Commentary (automatic):
SUBNAME: MEMBRANE FULL=PUTATIVE UNCHARACTERIZED ALTNAM: WALL CELL PRECURSOR FLAGS: FULL=EXPANSIN
Length = 106
Score = 142 (59.3 bits), Expect = 7e-08
Identities = 25/46 (54%), Positives = 34/46 (73%)

Query:      6 RACTGRTVDVKVDFCREPCNGDLNLSRDAFRVIANIDAGNIRVVY 51
            R CTGR+V VK+VD C C G ++LS++AF +IAN DAG I++ Y
Sbjct:     82 RPCTGRSVTVKIVDHCPSGCQGTIDLSQEAFAIANFDAGKIKIDY 127
    
```

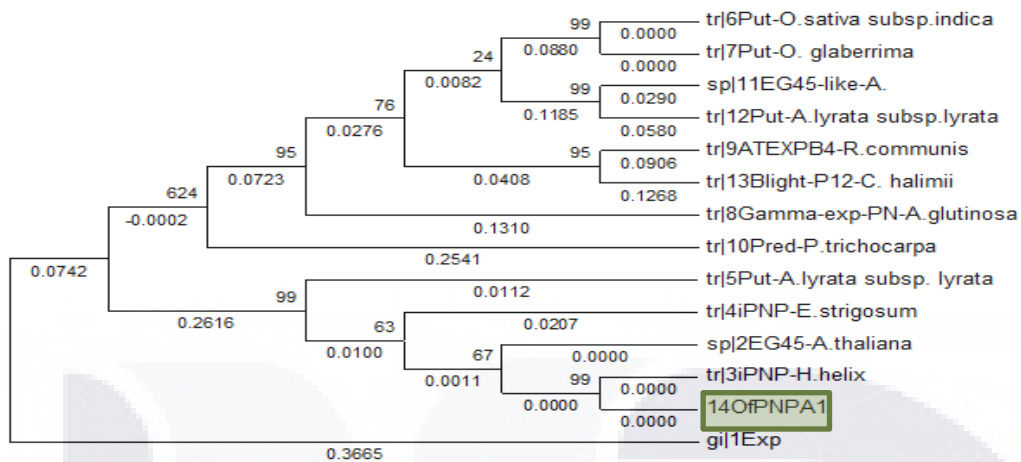
**Figura 29.** Dominios conservados de *OfPNPA*.

Para visualizar las regiones consenso de varias secuencias, entre ellas la de *OfPNPA* se realizó un alineamiento múltiple con el programa en línea Clustal W2 (Fig. 30). Dichas secuencias fueron obtenidas mediante la aplicación FASTA que es una herramienta del EBI. Para obtener una visión gráfica de las relaciones entre estas secuencias, se construyó un árbol filogenético con el algoritmo del Vecino Más Cercano (Fig. 31) mediante el cual se pudo confirmar que *OfPNPA* tiene mayor similitud con un PNP tipo A aislado de *Hedera helix*.

Ludidi *et al.*, (2002) identificaron y aislaron en *A. thaliana* un gen y un transcrito (AtPNPA) que codificaba para un análogo de PNA. La proteína codificada mostró similitud con una proteína de citrus (CjBAP12) que se inducía en respuesta a la infección por plaga. Reportan que la secuencia genómica de 478 pb contiene un intrón de 100 pb y dos exones, uno de 105 pb y otro de 273 pb que codifican para una proteína de 126 aa.



**Figura 30.** Alineamiento múltiple realizado en Clustal W2 entre *OfPNPA* y B6RN55 proteína P12 en *Citrus japonica*; D6MYH2 péptido natriurético en *Alnus glutinosa*; B9SNH0 ATEXPB4 en *Ricinus communis*; F6HZQ9 proteína hipotética *Vitis vinifera*; A2Z299 proteína hipotética en *Oryza sativa*; Q6K4C6 proteína Os09g0472700 *Oryza sativa*; Q6K4C4 proteína P12 en *Oryza sativa*; A2Z2A0 proteína hipotética en *Oryza sativa*; Q0J103 proteína hipotética en *Oryza sativa*; C5X329 proteína no caracterizada en *Sorghum bicolor*; B6SZY2 proteína P12 en *Zea mays*; C5X3V2 proteína no caracterizada en *Sorghum bicolor*; B8BCP7 proteína no caracterizada en *Oryza sativa*; A3BZU7 proteína no caracterizada en *Oryza sativa*; Q6ZDS1 proteína P12 *Oryza sativa*; EGC1 dominio putativo EG45 en *Arabidopsis thaliana*; D7MBW7 proteína no caracterizada en *Arabidopsis lyrata*; A2YGE7 proteína hipotética *Oryza sativa*; Q653F1 proteína P12 *Oryza sativa*; B9IM88 proteína hipotética en *Populus trichocarpa*; B9HBG1 proteína hipotética en *Populus trichocarpa*; EGC2 dominio putativo EG45 en *Arabidopsis thaliana*; Q8RWA0 PNP-like en *Erucastrum strigosum*; HEDHE PNP like en *Hedera helix*; D7L099 proteína no caracterizada en *Arabidopsis lyrata*; B9IKW1 proteína hipotética en *Populus trichocarpa*. Las secuencias fueron obtenidas de las bases de datos del EBI mediante la herramienta FASTA.



**Figura 31.** Árbol filogenético construido con el algoritmo del Vecino más cercano mediante el software MEGA3.1.

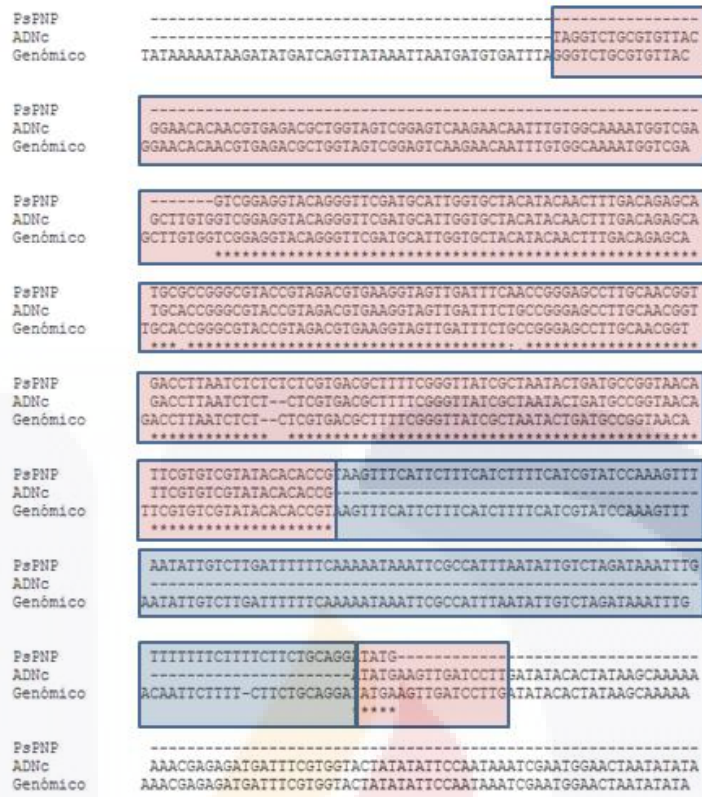
El fragmento de PCR para PNP de 350 pb fue clonado en el vector pGEM (Promega) y mandado a secuenciar. La secuencia resultante tuvo un tamaño de 320 pb y fue nombrada *PsPNP* (**Fig. 32**).

>*PsPNP*, 320 bp

GTCGGAGGTACAGGGTTTCGATGCATTGGTGCTACATACAACCTTTGACAGAGCATG  
 CGCCGGGCGTACCGTAGACGTGAAGGTAGTTGATTTCAACCGGGAGCCTTGCAAC  
 GGTGACCTTAATCTCTCTCTCGTGACGCTTTTCGGGTTATCGCTAATACTGATGCCG  
 GTAACATTCGTGTCGTATACACACCGTAAGTTTCATTCTTTCATCTTTTCATCGTATC  
 CAAAGTTTAATATTGTCTTGATTTTTTCAAATAAATTTCGCCATTTAATATTGTCTA  
 GATAAATTTGTTTTTTCTTTTCTTCTGCAGGATATG

**Figura 32.** Secuencia de PNP en *P. sacharosa* (*PsPNP*). La extensión de 320 pb está flanqueada por los oligonucleótidos en sentido y antisentido marcados en amarillo.

La secuencia de nucleótidos de *PsPNP* fue comparada con las homólogas de *A. thaliana* (genómico y ADNc) en el programa Clustal Omega para verificar el grado de identidad entre estas secuencias. Obteniéndose que *PsPNP* se extiende a lo largo del exón II y del intrón III de *A. thaliana* (**Fig. 32**).



**Figura 33.** Alineamiento de *PsPNP* con el ADNc y genómico de *A. thaliana*. En rosa se muestra el exón II y en azul el intrón III de *A. thaliana*, la coincidencia de las bases entre las tres secuencias se señala con \*. Como se observa *PsPNP* se extiende casi en la totalidad de ambas regiones.

Con la finalidad de verificar la homología de *PsPNP* con otras secuencias en la base de datos del NCBI se realizó un alineamiento BLASTX, en el cual se observa que las secuencias con mayor porcentaje de identidad son las correspondientes a PNP (> al 93%), entre ellas la de *O. ficus-indica* (Fig. 34).



**Figura 34.** Alineamiento BLASTX de PsPNP en las bases de datos del NCBI. El mayor porcentaje de identidad lo tiene con otras secuencias de PNP, entre ellas la de *O. ficus-indica*. El dominio estructural DPBB está presente en esta secuencia en dos marcos de lectura.

La traducción de *PsPNP* en la plataforma ExpASy mostró que tiene dos marcos de lectura abierta que constan de los siguientes residuos:

El marco 2 que incluye NLSRD AFRVIANTDAGNIRVVYTP y el marco 3 que le corresponden RRYRVRCIGATYNFDRACTGRITVDVKVVDVDFCREPCNGDLNLS, ambos corresponden al dominio estructural DPBB. Ya que el marco de lectura 3 fue el más completo, se comparó con la proteína *AtPNPA*, observándose que ambas secuencias son idénticas (**Fig. 35**).

```

PsPNP -----
AtPNPA MIKMAVKFVVMIVFAQILAPIAEAAQGKAVYYDPPYTRSACYGTQRETLVVGKKNLWQ

PsPNP -----RRYRVRCIGATYNFDRACTGRITVDVKVVDVDFCREPCNGDLNLS-----
AtPNPA NGRACGRRYRVRCIGATYNFDRACTGRITVDVKVVDVDFCREPCNGDLNLSRD AFRVIANTDA
*****

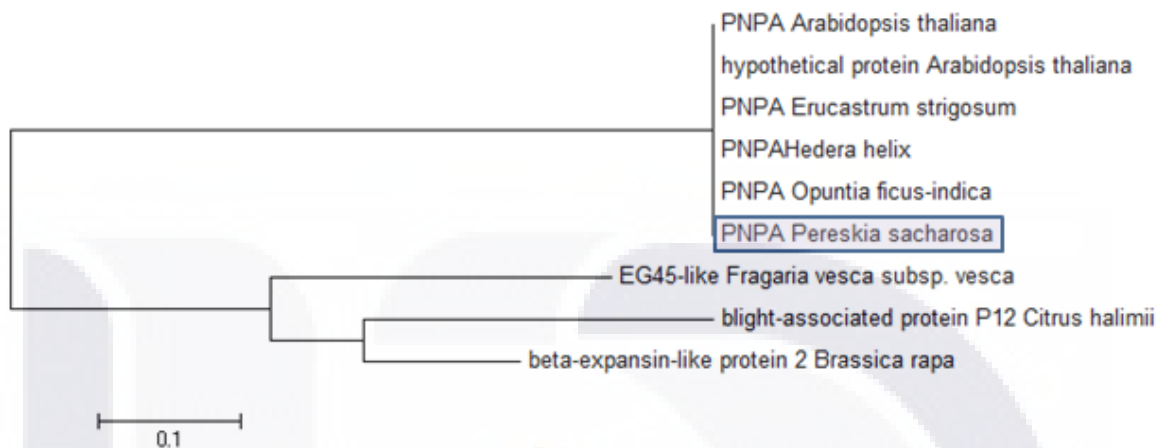
PsPNP -----
AtPNPA GNIRVVYTP
    
```

**Figura 35.** Alineamiento en aminoácidos de *AtPNPA* y *PsPNP* mediante el software Clustal Omega. Como se puede observar estas secuencias presentan el 100% de identidad en el dominio estructural DPBB.

Finalmente se construyó un dendograma con MegAling del software ADNstar para mostrar las relaciones filogenéticas entre las secuencias (**Fig. 23**), observándose que se



forman dos ramas, una de las cuales agrupa a los PNPA, mientras que el dominio EG45 de las endoglucanasas queda formando la segunda rama junto a la proteína P12 de *Citrus halimii* y a una beta expansina de *Brassica rapa* (**Fig. 35**).



**Figura 36.** Hipótesis filogenética de la secuencia *PsPNP* de *P. sacharosa* (PNPA *P. sacharosa*) construida con MegAlign del software DNASTar.

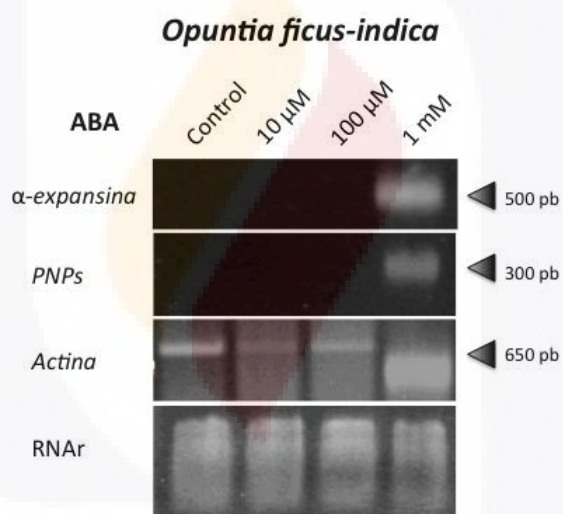
Los resultados anteriormente presentados sugieren fuertemente que *PsPNP* es un gen de PNP presente en el ADN de *P. sacharosa*.

### 6.2.6 Expresión de los genes de $\alpha$ -Expansina y PNPs

El análisis del perfil de expresión de los genes de  $\alpha$ -expansina y PNPs se llevó a cabo por RT-PCR semicuantitativa, las condiciones de estudio fueron las diferentes concentraciones de las fitohormonas ABA y AIA en *O. ficus-indica* y *P. sacharosa*. A reserva de realizar repeticiones de estos experimentos, se observó que en *Opuntia* en respuesta al ABA la expresión de los genes PNPs y  $\alpha$ -expansina se produjo a 1mM, este efecto puede ser atribuido a la posible saturación con fitohormona, misma que se ve reflejada en el aumento de la apertura estomática (**Fig. 36**). A este respecto, Cho y Cosgrove (2004), afirman que la aplicación directa de ABA en plantas bien hidratadas, como es el caso de las plantas *in vitro* que se utilizaron para este trabajo, no causa un incremento tan elevado en el nivel de transcritos de expansina como lo haría la sequía y que esto podría implicar que la expresión génica de la expansina sea vía independiente al ABA. De manera similar, Zhao *et al.*, (2012), afirman que hay evidencia de que los

cambios en la expresión de los genes de expansina no son mediados por ABA. Mencionan que en *Rumex palustris* encontraron que la expresión de *RpEXPA1* no requiere del declive de ABA. Sin embargo, no compartimos este punto de vista, ya que obtuvimos expresión a concentraciones importantes de esta fitohormona (1mM) y coincidimos con Zhang *et al.*, (2011) que mencionan que *AtEXPA4* se expresa bajo inducción de ABA en células guarda.

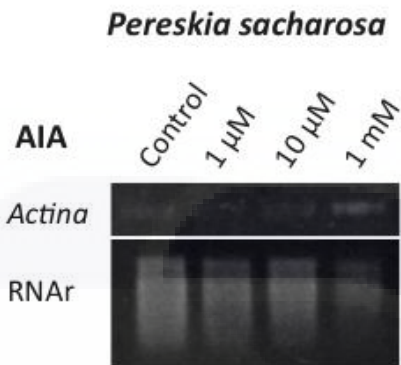
Por otra parte, el hecho de que los PNPs se hayan expresado en presencia de 1 mM de ABA, puede estar sugiriendo un efecto de antagonismo entre ellos. Wang *et al.*, (2007) observaron que *AtPNP* disminuía el cierre de los estomas inducido por ABA al igual que Pharmawati *et al.*, (1998) con PNPs aislados de *Hedera helix*.



**Figura 37.** Perfil de expresión de los genes  $\alpha$  expansinas y PNPs bajo inducción de ABA. La Actina se utilizó como gen de referencia y el RNA ribosomal (RNAr) como control de concentración en cada condición.

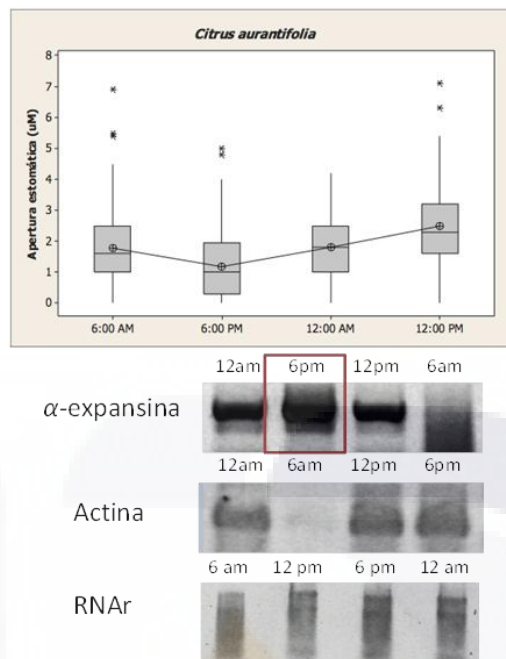
En *Pereskia* solo amplificó la actina para AIA (**Figura 36**), no así para PNP y  $\alpha$ -expansina. De acuerdo con Cho y Cosgrove (2004), que afirman que la actividad de extensión de la pared celular por medio de expansinas se lleva a cabo en un medio óptimo ácido (pH 3 a 5.5), es posible que una de las causas para que no se haya obtenido expresión de este gen, es que se utilizó un buffer de incubación a un pH de 6.15, de acuerdo con lo sugerido por Levitt *et al.*, (1987).

Aunque se obtuvieron cantidades de 100 a 600 ng de ARN, en los experimentos de *O. ficus-indica* en respuesta a AIA y *P. sacharosa* en respuesta a ABA las reacciones de ADNc no amplificaron.



**Figura 38.** Amplificación de actina en *P. sacharosa*, bajo inducción de AIA y el RNA ribosomal (RNAr) como control de concentración en cada condición.

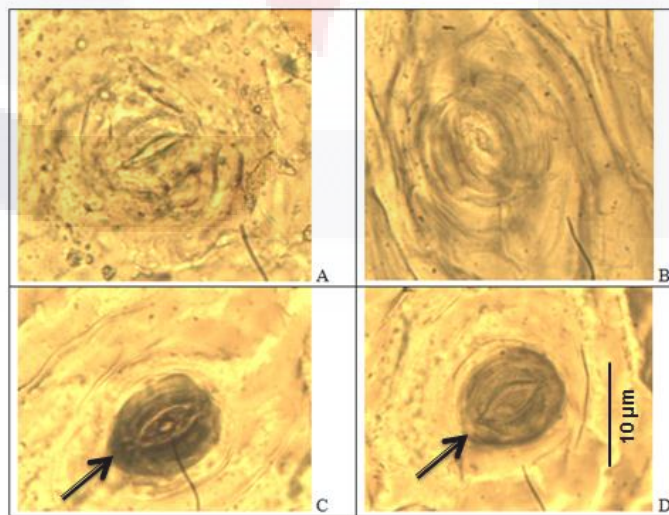
Adicionalmente se realizó un perfil de expresión para relacionar la apertura estomática con la hora del día utilizando ambos genes (*expansina* y *PNPs*) en *C. aurantifolia ex vitro* que es una planta con metabolismo C3. La mayor expresión se observó en  $\alpha$ -*expansina* a las 6 pm, que es la hora del día en que se presenta la menor apertura estomática (**Fig. 39**).



**Figura 39.** Perfil de expresión del gen de  $\alpha$  expansina en periodos de 6 horas. El gen de referencia fue actina y como control de concentración en cada condición se utilizó el RNA ribosomal (RNAr).

### 6.2.8 Hibridación *in situ* con sonda de ADN

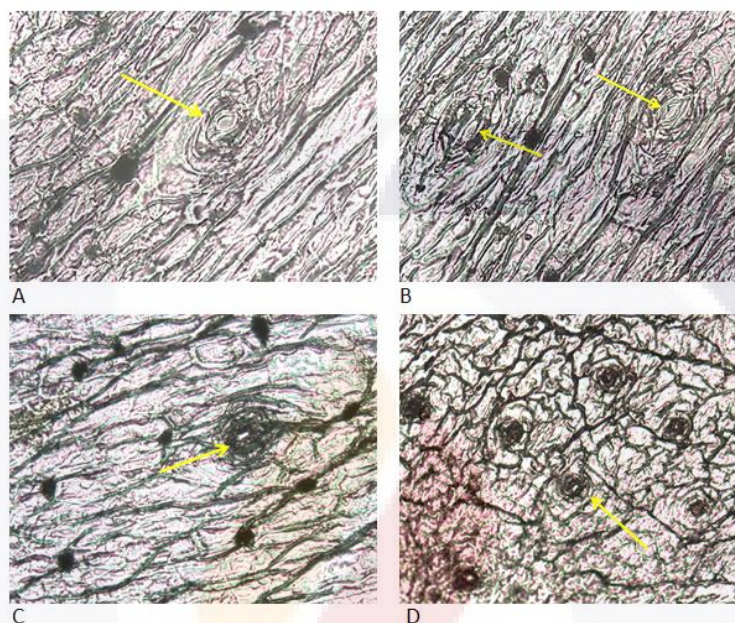
Por medio de esta técnica se pudo corroborar la presencia y acción de PNPs en estomas de *Opuntia ficus-indica* (**Fig. 40**).



**Figura 40.** Hibridación *in situ* en estomas de *O. ficus-indica* con una sonda de ADN. A y B son muestras testigo y C y D son los estomas luego de la hibridación (las flechas indican la señal de hibridación).

### 6.2.9 Inmunolocalización de receptor para PNPs con anticuerpo de PNA de humano

Como resultado de la hibridación in situ con anticuerpo PNA realizada en epidermis de tallo de *O. ficus-indica*, se detectó una tinción oscura en las células guarda producto de la reacción anti-PNA en células estomáticas (**Fig. 41**).



**Figura 41.** Inmunolocalización en estomas de *O. ficus-indica* con anti-ANP. A y B son muestras testigo. C y D son muestras después de la hibridación.

Se ha demostrado que los PNA y los PNP afectan el transporte de agua y solutos a través de la membrana celular vegetal (Pharmawati *et al.*, 1998). Ya que los estomas son estructuras que intervienen en la homeostasis de la planta permitiendo el paso de agua hacia la atmósfera se esperaría que esta clase de péptidos estuvieran presentes en las células guarda. Una metodología utilizada para la identificación de proteínas en regiones específicas de la planta es la inmunolocalización, dicha técnica permitió constatar la presencia de PN en las células oclusivas de *O. ficus-indica* usando un anticuerpo de PNA de humano producido en conejo.

Ya que epítopes de anti-PNA de humano fueron reconocidos a nivel de epidermis, se hacía necesario probar si en este mismo tejido el reconocimiento se daría a nivel de ácidos nucleicos, para lo cual se construyó una sonda a partir de ADN genómico de *O.*

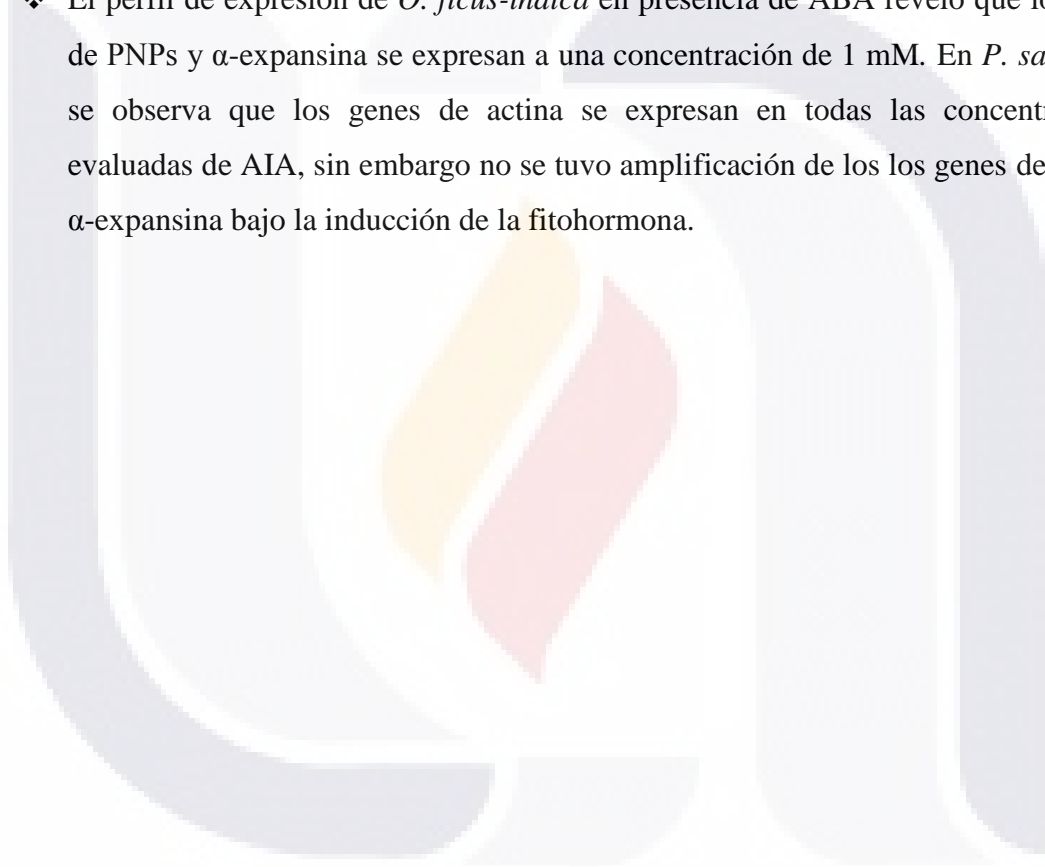
*ficus-indica* y específica para PNP, obtenida por PCR. La hibridación se realizó según lo indicado por Sun *et al.*, (2001) (con modificaciones), obteniendo señal en células guarda de estomas de *O. ficus-indica*.

El modelo experimental se justifica por el hecho de que las moléculas de PNP están altamente conservadas en todas las plantas vasculares estudiadas hasta la fecha (Maryani *et al.*, 2003). Los PNs identificados por inmunolocalización se encontraron en raíz, tallo y hoja, aunque su concentración fue 10 veces mayor en el xilema que en los extractos de hoja. Este autor menciona que al ser moléculas móviles, los PNs se deberían estar sintetizando en las células de la raíz y deberían ser liberadas al tejido conductivo y viajar incluso hasta las células guarda. La evidencia que mostró fue que los PN provenientes de extractos de xilema de *Plectranthus ciliatus* inducían apertura estomática. También hace mención que la cantidad relativa de PN aumenta significativamente cuando la planta se ve sometida a condiciones de disturbio homeostático, por lo que el autor sugiere que estos péptidos pudieran estar relacionados con la respuesta a estrés, soportando la hipótesis de una posible acción sistémica, aunada al hecho de que dos moléculas (AtPNPA y AtPNPB) relacionadas con un PN purificado de *Solanum tuberosum* y aisladas de *A. thaliana* ya han sido caracterizadas. Asimismo, se encontró que tienen similitud con las expansinas y que al igual que estas tienen un péptido señal N-terminal que las dirige al espacio extracelular, predisponiéndolas a una acción sistémica.

Gehring *et al.*, (2003) reporta que la función homeostática del PNA está mediada por receptores NP (NPR-A y NPR-B debido a esto se utilizó el anticuerpo para receptor de PNA de humano para la inmunolocalización. De igual forma, reconocieron péptidos en hojas y tallos de *Dracena godseffiana* con anticuerpos en contra del extremo N-terminal (PNA 1-98), la porción media (PNA 31-67) y el extremo C-terminal (PNA 99-126).

## 7. CONCLUSIONES

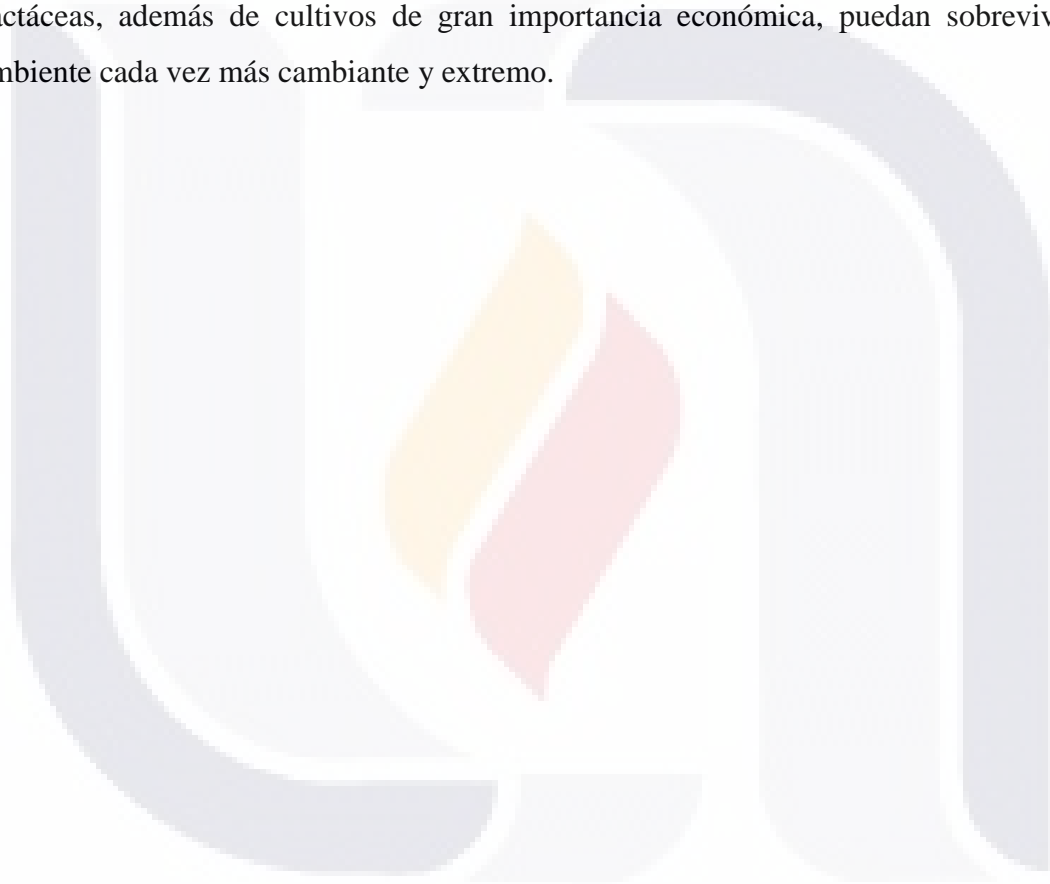
- ❖ Mediante PCR, se identificó la presencia de los genes de  $\alpha$ -expansinas y PNP<sub>s</sub> indica que estos genes están presentes en *Opuntia ficus-indica* y *Pereskia sacharosa*. Las secuencias nombradas *OfPNPA* en *O. ficus-indica* y *PsPNP* en *P. sacharosa* presentan un porcentaje de identidad del 97% con otras secuencias de PNP<sub>s</sub> como las de *Arabidopsis thaliana*, *Hedera helix* y *Erucastrum strigosum* y un porcentaje de similitud del 97% con el exón II de *A. thaliana*.
- ❖ Mediante PCR en tiempo real se identificó una posible copia de *OfPNPA* y *PsPNPA* en los genomas de *P. sacharosa* y *O. ficus-indica*.
- ❖ Los estomas de *O. ficus-indica* contienen receptores para PNP<sub>s</sub> que fueron identificados por inmunodetección utilizando anticuerpos para el receptor de PN de humano (ANPh).
- ❖ Los estomas que presentan las especies de *Leuchtenbergia principis*, *Escontria chiotilla*, *Hylocereus undatus*, *Mammillaria petterssonii* y *Pereskia sacharosa* son de tipo paralelocítico, mientras que en *Opuntia ficus-indica* son tipo opuntioide. De acuerdo con los resultados del estudio de la densidad estomática (DE), de las especies anteriormente mencionadas, la DE es menor en condiciones *ex vitro* que *in vitro* excepto para *H. undatus* y la región apical de los explantes en ambas condiciones presenta la mayor densidad de estomas.
- ❖ La determinación por pH del ritmo de acidificación y desacidificación confirma que las especies *ex vitro* estudiadas *O. ficus-indica*, *Cylindropuntia imbricata*, *Myrtillocactus geometrizans* y *Aloe barbadensis*, presentan un metabolismo tipo CAM, exceptuando *Citrus aurantifolia* y *O. ficus-indica* bajo luz continua que tienen un comportamiento tipo C3, debido a que las variaciones en pH a lo largo del día no fueron importantes. Después de exponer a *O. ficus-indica* en fotoperiodo por dos semanas se observa un patrón de pH perteneciente a una CAM *ex vitro*.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- ❖ Las fitohormonas AIA y ABA influyen en la apertura y cierre estomáticos de *O. ficus-indica* y *P. sacharosa*. La concentración de AIA que produce mayor apertura de estomas en *O. ficus-indica* es la de 1 mM y en *P. sacharosa* la de 1 μM. A 100 μM de ABA se induce el mayor cierre de estomas tanto en *P. sacharosa* como en *O. ficus-indica*. Los resultados de las pruebas estadísticas realizadas muestran que *O. ficus-indica* es más sensible a las fitohormonas.
  - ❖ El perfil de expresión de *O. ficus-indica* en presencia de ABA reveló que los genes de PNPs y α-expansina se expresan a una concentración de 1 mM. En *P. sacharosa* se observa que los genes de actina se expresan en todas las concentraciones evaluadas de AIA, sin embargo no se tuvo amplificación de los los genes de PNPs y α-expansina bajo la inducción de la fitohormona.
- 



## 8. PERSPECTIVAS

Los estudios a nivel genético, bioquímico y fisiológico de los estomas han podido esclarecer algunas vías metabólicas que intervienen en su funcionamiento. Con esta información se podrá eventualmente llevar a cabo la implementación de la capacidad CAM en plantas de cultivo o mejorar el tiempo de adaptación de especímenes generados *in vitro* al medio ambiente, lo cual permitirá que en un futuro, plantas susceptibles como las cactáceas, además de cultivos de gran importancia económica, puedan sobrevivir a un ambiente cada vez más cambiante y extremo.



## 9. BIBLIOGRAFÍA

- Acharya, B. y Assman, S. 2009. Hormone interactions in stomatal function. *Plant Mol. Biol.* 69:451–462.
- Anderson, E. 2001. *The Cactus Family*. Timber Press. Hong Kong. Pág. 93, 100 y 101.
- Azcón-Bieto, J., Talón, M. y colaboradores. 2008. *Fisiología Vegetal*. 2da. Edición. McGraw- Hill y Universitat de Barcelona. China. 15, 16, 415-59.
- Borland, A., Barrera, A., Zambrano, J. y Shorrocks, K. 2011. The photosynthetic plasticity of crassulacean acid metabolism: an evolutionary innovation for sustainable productivity in a changing world. *New Phytol.* 191: 619–633.
- Bravo-Hollis, H. y Sánchez-Mejorada, H. 1978. *Las cactáceas de México*. UNAM. México. 21-24.
- Bidwell, R. 2002. *Fisiología Vegetal*. AGT editor. México. pp. 784.
- Casierra, F. y González, D. 2009. Cambio circadiano de pH y acidez titulable en la savia de fique (*Furcraea castilla* y *F. macrophylla*). *Orinoquia*. 13(1): 5-13.
- Chaerle, L. y Van Der Straeten, D. 2007. Regulating plant water status by stomatal control. En Jenks, M.A. (ed.). *Advances in Molecular Breeding Toward Drought and Salt Tolerant Crops*. Springer. 73–90.
- Cho, H. y Cosgrove, D. J. 2004. Expansins as agents in hormone action. En Davies, P.J. (ed.). *Plant hormones: biosynthesis, signal transduction, action*. Kluwer. 262-281

- Cosgrove, D. 1998. Cell wall loosening by expansins. *Plant physiol.* 118: 333-339.
- Cosgrove, D. 2012. Expansin Home Page. <https://homes.bio.psu.edu/expansins/>
- Cousson, A. y Vavasseur, A. 1998. Putative involvement of cytosolic Ca<sup>2+</sup> and GTP-binding proteins in cyclic-GMP-mediated induction of stomatal opening by auxin in *Commelina communis* L. *Planta* 206: 308-314.
- Drennan, P. y Nobel, P. 2000. Responses of CAM species to increasing atmospheric CO<sub>2</sub> concentrations. *Plant Cell Environ.* 23: 767-781.
- Durán, R. y Méndez, M. 2010. Cactáceas. Biodiversidad y Desarrollo Humano en Yucatán. CICY. (En línea). <http://www.cicy.mx/Sitios/Biodiversidad/pdfs/Cap4/17%20Cactaceas.pdf>.
- Eggli, U. 1984. Stomatal types of Cactaceae. *Pl. Sist. Evol.* 146: 197-214.
- Fraser, L., Grenall, A., Carlyle, C., Turkington, R. y Ross, C. 2008. Adaptive phenotypic plasticity of *Pseudoroegneria spicata*: responses of stomatal density, leaf area and biomass to changes in water supply and increased temperature. *Ann. Bot.* 103: 769-775.
- Gehring, C. A. 1999. Natriuretic Peptides-A new class of plant hormone?. *Ann. Bot.* 83: 329-334.
- Gehring, C. A., Irving, H. 2003. Natriuretic peptides- a class of heterologous molecules in plants. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 35: 1318-1322.

- Gehring, C. A., Irving, H. 2012. Peptides and the regulation of plant homeostasis. *Plant Signaling Peptides*. Springer-Verlag Heidelberg. 183-197.
- George, E. F., Hall, M. A. y De Klerk, G. J. (eds.). 2008. Plant propagation by tissue culture. *Plant Cell Tiss. Org.* Vol. 1. Springer Netherlands. 227-280.
- Hernández, M., Terrazas, T. Delgado, A. y Cavazos, M. 2007. Los estomas de *Myrtillocactus geometrizans*: variación en su área de distribución. *Rev. Fitotec. Mex.* 30(3): 235-240.
- Hildebrand, D. K., Ott, L., y Torres, C. 1997. Estadística aplicada a la administración y a la economía. México: Addison-Wesley.
- Hopkins, W. 1999. *Introduction to Plant Physiology*. 2<sup>nd</sup> Ed. John Wiley & Sons, Inc. USA. Pág. 147-157.
- Hubbard, K., Hotta, C., Gardner, M., Baek, S., Dalchau, N. y Dontamala, S. 2007. Circadian rhythms in stomata: physiological and molecular aspects. En Mancuso, S. y Shabala, S. (eds). *Rhythms in plants: phenomenology, mechanisms, and adaptive significance*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Hubbard, K. E., Nishimura, N., Hitomi, K., Getzoff, E. D. y Schroeder, J. I. 2010. Early abscisic acid signal transduction mechanisms: newly discovered components and newly emerging questions. *Gene Dev.* 24: 1695-1708.
- Irving, H., Gerhing, C. A. y Parish, R. 1991. Changes in cytosolic pH and calcium of guard cells precede stomatal movements. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89: 1790-1794.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- Jimenez, C. 2011. Las cactáceas mexicanas y los riesgos que enfrentan. Revista Digital Universitaria [en línea]. 1 de enero de 2011, Vol. 12, No. 1 Disponible en internet: [www.revista.unam.mx/vol.12/num1/art04/art04.pdf]
  - Juárez, C. 2011. Caracterización química y estomática y crecimiento de tallos de *Acanthocereus tetragonus*, *A. subinermis*, *Hylocereus undatus*. Tesis (Maestría en Ciencias). Colegio de Postgraduados. Edo. de México. México. pp. 44.
  - Levitt, L. K., Stein, D. B. y Rubinstein, B. 1987. Promotion of stomatal opening by indolacetic acid and ethrel in epidermal strips of *Vicia faba* L. Plant Physiol. 85: 318-321.
  - Lodhi, M., Ye, G., Weeden, N., y Reisch, B. 1994. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars, *Vitis* species and *Ampelopsis*. Plant Mol. Biol. Rep. 12: 6-13.
  - López-Gómez, R., y Gómez-Lim, M. 1992. A method for extracting intact RNA from fruits rich in polysaccharides using ripe mango mesocarp. HortScience 27(5): 440-442.
  - Loza-Cornejo, S. y Terrazas, T. 2003. Epidermal and hypodermal characteristics in North American Cactoideae (Cactaceae). J. Plant Res. 116: 27-35.
  - Ludidi, N., Heazlewood, J. Seoghe, C., Irving, H. y Gehring, C. 2002. Expansin-like molecules. Novel functions derived from common domains. J. Mol. Evol. 54: 587-594.
  - Ludidi, N., Morse, M., Sabed, M., Wherrett, T., Zavala, S., Gehring, C. 2004. A recombinant plant natriuretic peptide causes rapid and spatially differentiated  $K^+$ ,

Na<sup>+</sup> and H<sup>+</sup> flux changes in *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell Physiol. 45(8):1093-1098.

- Malda, G., Backhaus, R. y Martin, Ch. 1999. Alterations in growth and crassulacean acid metabolism (CAM) activity of *in vitro* cultured cactus. Plant Cell Tiss. Org. 58: 1-9.
- Maqungo, M. 2005. Physiological and Cellular characterization of a Plant Natriuretic Peptide. Submitted in partial fulfilment of the requirement for the degree of Magister Scientiae (M.Sc.) in Biotechnology in the Department of Biotechnology, University of the Western Cape. South Africa. Pp 61.
- Maryani, M., Morse, M., Bradley, M., Irving, H., Cahill, D. y Gehring, C. 2003. *In situ* localization associates biologically active plant natriuretic peptide immunologues with conductive tissue and stomata. J. Exp. Bot. 387:1553-1564.
- Morales, F., Garcidueñas, C., Soria, R. and Alpuche, A. 2009. *Psidium guajava* fruit ripening-related alpha-expansin-like mRNA, partial sequence. Accession FJ744120. NCBI Database.
- Morales, F. y Valle, C. 2011. Comunicación Personal.
- Moreira-Muñoz, A. 2011. Cactaceae, a weird family and postmodern evolution. En Plant geography of Chile, Plant and Vegetation 5. Springer. 197-220.
- Morse, M., Pironcheva, G., Gehring, C. 2004. AtPNP-A is a systemically mobile natriuretic peptide immunologue with a role in *Arabidopsis thaliana* cell volume regulation. FEBS Letters 556: 99-103.

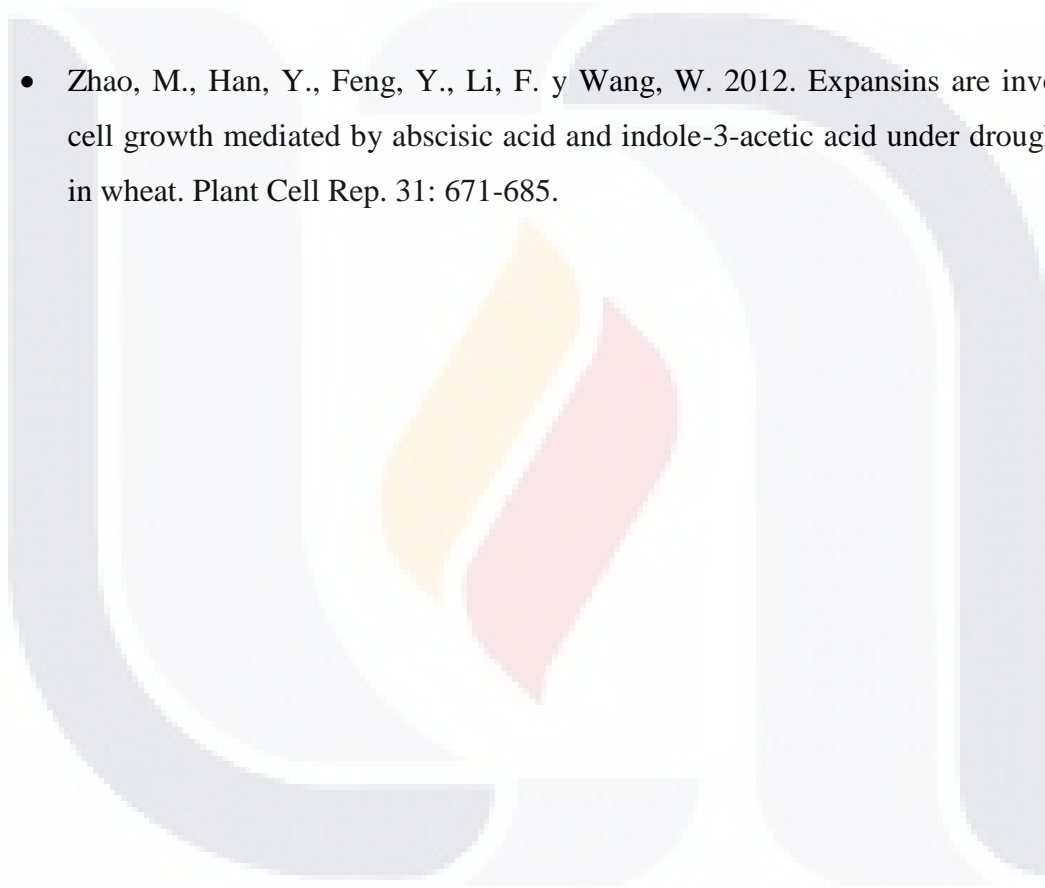
- Nadeau, J. y Sack, F. 2002. Stomatal Development in Arabidopsis. The Arabidopsis Book. ASPB. No. 1.
- Nobel, P. 1988. Environmental biology of Agaves and Cacti. Cambridge University Press. Pp. 270.
- Obeidy, A. 2008. Introducing New Crops with high water-use efficiency in the Middle East and North Africa. En: Lee, C. y Schaaf, T. Eds. The future of Drylands. UNESCO. 659-673.
- Ortega-Baes, P., Sühring, S., Sajama, J., Sotola, E., Alonso-Pedano, M., Bravo, S. y Godínez-Álvarez, H. 2010. Diversity and conservation in the cactus family. En Ramawat, K. G. Ed. Desert Plants. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. Pág. 157-173.
- Patishtán, J., Rodríguez, R., Zavala, F., y Jasso, D. 2010. Conductancia estomática y asimilación neta de CO<sub>2</sub> en sábila (*Aloe vera* tournefortii) bajo sequía. Rev. Fitotec. Mex. Vol. 33 (4): 305 – 314.
- Parés, J., Arizaleta, M., Sanabria, M. E. y García, G. 2008. Efecto de los niveles de salinidad sobre la densidad estomática, índice estomático y el grosor foliar en plantas de *Carica papaya*. Acta Bot. Venez. 31(1): 27-34.
- Pérez-Urria, E. 2009. Fotosíntesis: aspectos básicos. Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal. 2(3): 1-47.
- Petrásek, J., Malínská, K. y Zazimalová, E. 2011. Auxin transporters controlling plant development. En Geisler, M. y Venema, K. (eds.). Transporters and Pumps in Plant Signaling, Signaling and Communication in Plants 7. Springer-Verlag Berlín.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- Pharmawati, M., Billington, T. y Gehring, C. 1998. Stomatal guard cell responses to kinetin and Natriuretic peptides are cGMP-dependent. *Cell Mol. Life Sci.* 54: 272-276.
  - Pimienta-Barrios, E., Castillo-Cruz, I., Zañudo-Hernández, J., Méndez-Morán, L. y Nobel, P. 2007. Effects of shade, drought and daughter cladodes on the CO<sub>2</sub> uptake by cladodes of *Opuntia ficus-indica*. *Ann. Appl. Biol.* 151: 137–144.
  - Pimienta-Barrios, E., Loza, S. y Del Castillo-Aranda, M. 2003. Caracterización anatómica y conductividad hidráulica teórica de los elementos de vaso de variedades silvestres y cultivadas del nopal tunero (*Opuntia*). *Acta Bot. Mex.* 62: 21-30.
  - Pospisilová, J. 2003. Participation of phytohormones in the stomatal regulation of gas exchange during water stress. *Biol. Plantarum.* 46(4): 491-506.
  - Prabhakar, M. 2004. Structure, delimitation, nomenclature and classification of stomata. *Acta Bot. Sinica* 46(2): 242-252.
  - Raghavendra, A., Gonugunta, V. K., Christmann, A. y Grill, E. 2010. ABA perception and signalling. *Trends Plant Sci.* 7(15): 395–401.
  - Requejo, O., Delgado, O., Barrero, L., Sánchez, J. y Cruz, J. 2008. Péptidos Natriuréticos: ¿Una nueva era en el manejo de la insuficiencia cardiaca? *Rev. Cub. Med. Int. Emerg.* 7: 1273-1287.
  - Ricanek, M. y Vicherkova, M. 1992. Stomatal responses to ABA and IAA in isolated epidermal strips of *Vicia faba* L. *Biol. Plantarum.* 34(3-4): 259-265.



- Roelfsema, R. G. y Hedrich, R. 2005. In the light of stomatal opening: new insights into “the Watergate”. *New Phytol.* 167: 665-691.
- Royer, D. L. 2001. Stomatal density and stomatal index as indicators of paleoatmospheric CO<sub>2</sub> concentration. *Rev. Palaeobot. Palyno.* 114: 1-28
- Russell, Ch. y Felker, P. (1987). The prickly-pears (*Opuntia* spp., Cactaceae) a source of human and animal food in semiarid regions. *Econ. Bot.* 41(3): 433—445.
- Ruzvidzo, O., Donaldson, L., Valentine, A., y Gehring, C. A. 2012. The *Arabidopsis thaliana* natriuretic peptide AtPNP-A is a systemic regulator of leaf dark respiration and signals via the phloem. *J. Plant Physiol.* 168: 1710– 1714.
- Sang, J. 2010. Stomatal Opening Mechanism of CAM Plants. *J. Plant. Biol.* 53: 19–23.
- Sowell, J. 2001. *Desert Ecology: An Introduction to Life in the Arid Southwest.* Universidad de Utah. Pp. 193.
- Silva, H., Acevedo, E. y Silva, P. 2001. Anatomía del tejido fotosintético de diez taxa de *Opuntia* establecidos en el secano árido mediterráneo de Chile. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 74: 341-351.
- Sun, Mei-Hao., Xu, W., Zhu, Y., Su, W. y Tang, Z. 2001. A simple method *in situ* hybridization to RNA in guard cells of *Vicia faba* L.: the expression of aquaporins in guard cells. *Plant Mol. Biol. Rep.* 19: 129-135.
- Tanaka, Y., Sano, T., Tamaolki, M., Nakajima, N., Kondo, N. y Hasezawa, S. 2005. Ethylene inhibits abscisic acid-induced stomatal closure in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 138: 2337-2343.

- Taiz, L. y Zeiger, E. 2002. Plant Physiology. 3th Edition. Sinauer Associates, Inc. USA. 440-530.
- Tel-Zur, N., Mizrahi, Y., Cisneros, A., Mouyal, J., Schneider, B., Doyle, J. J. 2011. Phenotypic and genomic characterization of vine cactus collection (Cactaceae). Genet. Resour. Crop Evol. 58: 1075-1085.
- Terrazas, T. y Arias, S. 2003. Comparative stem anatomy in the subfamily Cactoideae. Bot. Rev. 68(4): 444-473.
- Vavasseur, A. y Raghavendra, A. 2005. Guard cell metabolism and CO<sub>2</sub> sensing. New Phytol. 165: 665–682.
- Verdugo, V., Rojas, A., De León, A., Zambrano, B., Barrios, S., León, E., Ríos, B. y Benavides, A. 1999. Estimación del Índice Estomático y la Frecuencia Estomática en 4 variedades de ajo (*Allium sativum* L.). UAAAN-Maestría en Horticultura. México. Sin paginar.
- Vesely, D. L. y Giordano, A. T. 1991. Atrial natriuretic peptide hormonal system in plants. Biochem. Bioph. Res. Co. 179(1): 695-700.
- Wang, Y., Gehring, C., Cahill, D. M. e Irving, H. 2007. Plant natriuretic peptide active site determination and effects on cGMP and cell volume regulation. Funct. Plant Biol. 34: 645-653.
- Wei, P., Chen, S., Zhang, X., Zhao, P., Xiong, Y., Wang, W., Chen, J. y Wang, X. 2011. An  $\alpha$ -expansin, *VfEXPA1*, is involved in regulation of stomatal movement in *Vicia faba* L. Chinese Bulletin. 56(33): 3531-3537.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- Winter, K., Garcia, M. y Holtum, J. 2011. Drought-stress-induced up-regulation of CAM in seedlings of a tropical cactus, *Opuntia elatior*, operating predominantly in the C3 mode. *J. Exp. Bot.* 11: 4037–4042.
  - Zhang, X., Wei, P., Xiong, Y., Yang, Y, Chen, J. y Wang, X. 2011. Overexpression of the *Arabidopsis*  $\alpha$ -expansin gene *AtEXPA1* accelerates stomatal opening by decreasing the volumetric elastic modulus. *Plant Cell Rep.* 30: 27–36.
  - Zhao, M., Han, Y., Feng, Y., Li, F. y Wang, W. 2012. Expansins are involved in cell growth mediated by abscisic acid and indole-3-acetic acid under drought stress in wheat. *Plant Cell Rep.* 31: 671-685.
- 

## **ANEXOS**

**Anexo A. Carta de aceptación de artículo**


**Anexo B. Publicación de artículo**



## Anexo A. Carta de aceptación de artículo

Final Editorial Decision (Haseltonia) Stomatal density & index     
  Recibidos 

 **Root Gorelick** 11:57 (hace 1 hora)     
 para mí, Tim, Gunnar 

 inglés  > español  [Traducir mensaje](#) [Desactivar para: inglés](#) 

Dear Viki Herrera and co-authors:

Your paper on stomatal density and index in four cactus species is now formally accepted for publication in the upcoming issue of *Haseltonia*, with the only caveat that I changed “CV%” to “CV” throughout your paper, i.e. dividing your numerical values by 100. Thank you very much for both your patience and persistence! We will probably send you page proofs in approximately a month.

Sincerely,  
Root Gorelick  
*Haseltonia* editor

**Anexo B. Publicación de artículo**



## EFFECT OF CULTURE CONDITIONS ON STOMATAL DENSITY AND STOMATAL INDEX IN FOUR CACTUS SPECIES

VIRGINIA HERRERA-MARTÍNEZ<sup>1</sup>

LUIS RIOS-HERNÁNDEZ

CRISTINA GARCIDUEÑAS-PIÑA<sup>1</sup>

ALDO LARA-IBARRA<sup>1</sup>

ARACELI ADABACHE-ORTIZ<sup>3</sup>

RUTH ELENA SORIA-GUERRA<sup>4</sup>

EUGENIO PÉREZ-MOLPHE-BALCH<sup>1</sup>

JOSÉ FRANCISCO MORALES-DOMÍNGUEZ<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Química, <sup>2</sup> Departamento de Estadística, <sup>3</sup> Departamento de Biología, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Av. Universidad #940, CP 20131. Aguascalientes, México.

<sup>4</sup> Laboratorio de Ingeniería de Biorreactores, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Av. Dr. Nava #6 Zona Universitaria, CP 78200 San Luis Potosí, SLP, México.

\*email: jfmoral@correo.uaa.mx

**Abstract:** We evaluated type of stomata, as well as differences in stomatal frequency in three areas of the plant (apical, middle and basal) under two culture conditions (*in vitro* and *ex vitro*), in four cactus species (*Opuntia ficus-indica*, *Hylocereus undatus*, *Escontria chiotilla* and *Mammillaria petterssonii*). We measured stomatal density (SD) and the stomata index (SI) for both factors, plant area and culture condition. Stomata typology were cyclocytic, tetracytic or opuntioide type in *O. ficus-indica* and parallelocytic type in *E. chiotilla*, *H. undatus* and *M. petterssonii*. It was observed that SD was higher *ex vitro* than *in vitro* in *H. undatus* and *M. petterssonii*, but the opposite was true for *O. ficus-indica* and *E. chiotilla*. The apical region had the highest SD both in *in vitro* and *ex vitro*, and the interaction between culture condition and explant areas was highly significant, implying that the impact of culture type is different for each distinct stem area.

**Keywords:** tetracytic, parallelocytic, cacti, stomatal density, stomatal index

## INTRODUCTION

The family Cactaceae is a group of mostly succulent plants distributed throughout the Americas, belonging to the Caryophyllales order (Angiosperm Phylogeny Group III, 2009) and includes nearly 1,500 species and 100 genera. To date, four subfamilies: Pereskioideae, Opuntioideae, Cactoideae and Maihuenioideae (García et al. 2010), are recognized. México is the country that harbors the largest cactus population: 586 species in 63 genera (Ortega-Baes et al. 2010).

Cacti have evolved to cope with environmental conditions that many other plants could not withstand. Normally they are subjected, at some stage of

their development, to drought stress and/or extreme temperatures. Their survival strategy lies in a number of morphological adaptations and having CAM (Crassulacean Acid Metabolism) photosynthesis, which allows for the uptake of atmospheric CO<sub>2</sub> at night, its storage in the form of malic acid and its fixation by the enzyme ribulose 1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RuBisCO) during daylight. Stomata allow plants to have adequate CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> supplies. CAM plants are up to six times more efficient in water use than those with C<sub>3</sub> or C<sub>4</sub> photosynthesis, at least in certain environments (Borland et al. 2011).

Stomata are considered important regulators of the plant's relationship with the atmosphere and are linked to a series of environmental changes (Araújo

\*Corresponding author

et al. 2011). Regulation of gas exchange is accomplished by adjusting the opening level and stomatal frequencies according to environmental requirements (Finsinger et al. 2013). Pandey et al. (2007) point out that some of the factors affecting stomatal density (SD) and the stomatal index (SI) are intensity and quality of light, ultraviolet B (shortwave) rays (UVB), humidity, drought and temperature. Some species have higher stomatal density (SD) at lower CO<sub>2</sub> concentrations or higher altitude (Finsinger et al. 2013). Variation in sun exposure in *Opuntia* influences stomatal size and density, and in epiphytic cacti SD is similar to that of mesomorphic plants (Padrón 2012). Hernández et al. (2007) found in *Myrtillocactus geometrizans* (Mart. ex Pfeiff.) Console a correlation between stomatal density, latitude and percentage of organic matter.

Culture conditions affect both SD (Nava et al. 2011) and stomata functionality. Malda et al. (1999) indicated that factors such as high relative humidity, growth regulators, and high sugar concentrations added to *in vitro* culture medium affect stomata by stimulating opening during the day, causing continuous CO<sub>2</sub> fixation and increasing growth rate and stomatal movements. It should be noted that cactus development is faster *in vitro* than in *ex vitro* conditions (Pérez-Molphe-Balch & Dávila-Figueroa 2002). This is important because, under natural conditions, cacti have low growth rates, long life cycles, limited distribution and small population sizes (Mandujano et al. 2010). Therefore, biotechnological tools, such as *in vitro* propagation, have been used for the potential restoration of natural populations since these techniques have the potential to produce a large number of plants in short times and in small spaces (Dávila-Figueroa et al. 2005; Pérez-Molphe-Balch et al. 2012).

Therefore, the importance of SD reflects the ability of the plant to manage water and regulate photosynthetic efficiency, and because stomata *in vitro* tend to alter their frequency and behavior, it becomes relevant to check whether SD varies between cactus species grown *in vitro* and *ex vitro*. There are very few studies in this respect. Therefore, our objective was to compare SD and SI in the basal, middle and apical stem regions of shoots in four species of cacti grown *in vitro* and *ex vitro*.

## MATERIALS AND METHODS

**Plant material, basal medium and culture conditions:** *Escontria chiotilla* (F.A.C Weber) Rose, *Hyllocereus undatus* (Haw.) Britt. & Rose, *Mammillaria petterssonii* Hildm., *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill., cultured *in vitro* and *ex vitro* (Fig. 1A, A'-D, D'), were donated by the germplasm bank of the Universidad Autónoma de Aguascalientes. The 6 month-old seedlings grown *in vitro* were maintained on Murashige & Skoog (MS) (1962) culture medium, pH 5.7, supplemented with 1 mg L<sup>-1</sup> BA for *O. ficus-indica* and *M. petterssonii*, 1.5 mg L<sup>-1</sup> BA for *H. undatus* and 2 mg L<sup>-1</sup> BA for *E. chiotilla* (Retes-Pruneda

et al. 2007). 1 L flasks were used with 100 ml of medium and kept at 25 °C under continuous light (54 μM m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>). The *ex vitro* plants were maintained under greenhouse conditions and grown in pots with sand and a mixture of perlite peat and vermiculite (Pro-mix, Home Depot), with watering once a week for *H. undatus* and *M. petterssonii* and every 10 days for *O. ficus-indica* and *E. chiotilla*.

**Observation and quantification of stomata by optical microscopy:** Six month-old stem samples obtained under *in vitro* and three year-old stems obtained under *ex vitro* conditions from *E. chiotilla*, *H. undatus*, *M. petterssonii* and *O. ficus-indica* were used for this study. Each stem was divided into three regions: basal, middle and apical; three observation fields were analyzed from each region, for a total of 18 fields. Measurements were made in triplicate and counts were repeated four times. Spines were removed from each epidermal sample, and a light coat of clear nail polish (NK, Taiwan) was applied for 15 min. Afterwards the imprint was removed with transparent adhesive tape and placed on a glass slide under an optical microscope (Leica DMLS) for observation at 4x magnification to determine SD and SI, 20x to determine stomata type, and 40x to determine stomatal size. A 0.5 mm<sup>2</sup> acetate template was employed for counting stomata, and epidermal cells. The parameters to be evaluated were stomatal density (SD; number of stomata mm<sup>-2</sup>), density of epidermal cells per mm<sup>2</sup> (EC), and stomatal size (SS). These parameters were used to compute a stomatal index SI

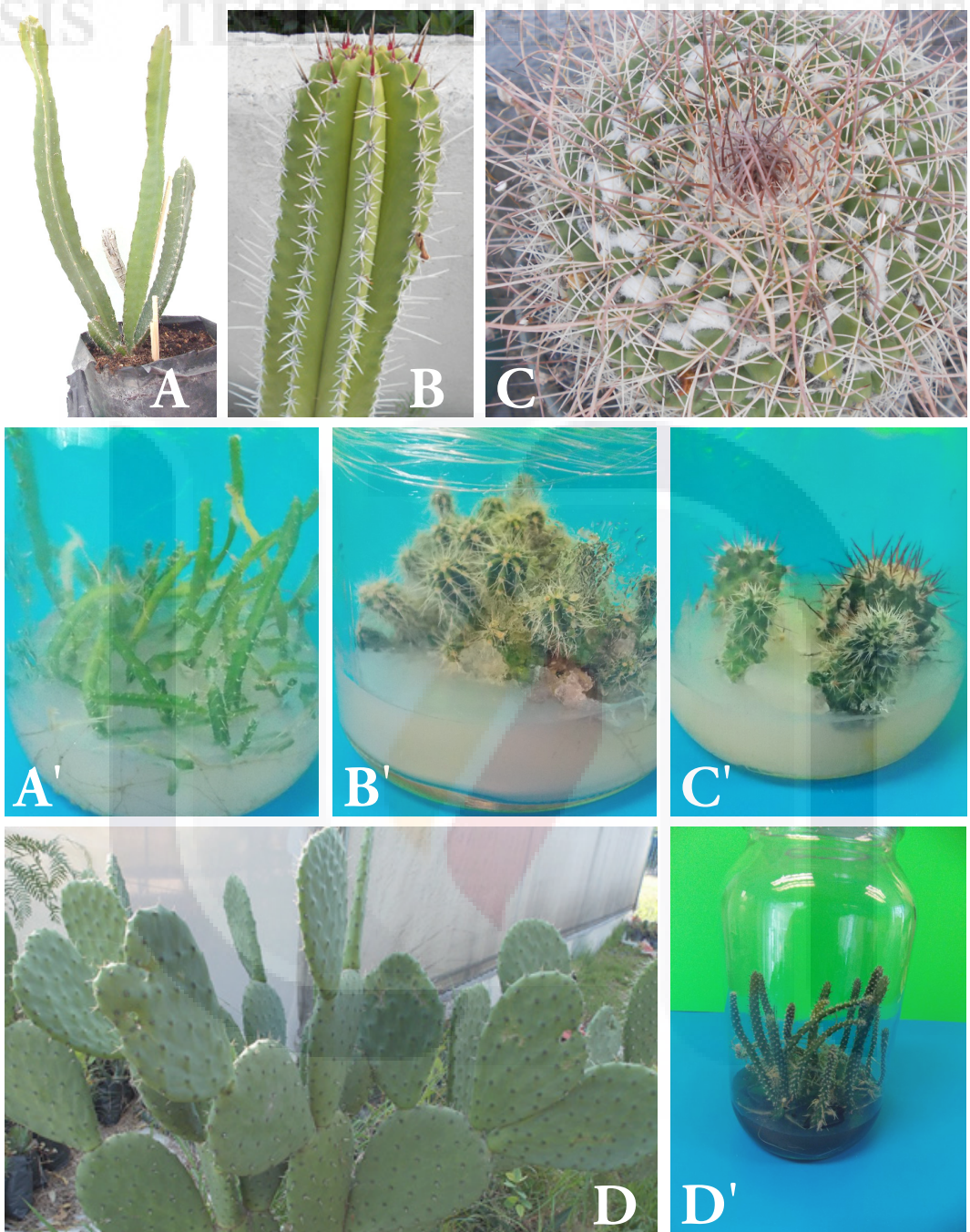
$$= \left[ \frac{SD}{SD+EC} \right] * 100 \text{ (Martin \& Stimart 2005).}$$

Images for each sample were captured with a camera (Infinity 1, Lumenera) mounted on the microscope and analyzed with Infinity Capture software. Stomatal types were categorized per Egli (1984) and Loza-Cornejo & Terrazas (2003).

**Observation of stomata by scanning electron microscopy:** 0.5 mm<sup>2</sup> tissue sections were fixed in 2% glutaraldehyde for 24 h. The samples were dehydrated in a graded alcohol series (60, 70, 80, 90, 96 and 100%) for 15 min. We used a critical point drying apparatus to remove remaining moisture (Smadri Tousimis). Drying time was 1.5 h. The critical point was reached at a temperature of 31.1°C and a pressure of 1072 psi for 4 min. Dried samples were placed in 1 cm x 1 cm graphite tapes and adhered to an aluminum cylinder. They were then gold-coated with a Denton Vacuum Desk II apparatus for 260 s to obtain 100 Å thickness. The stem samples of the specimens were observed by electron microscopy (Jeol JSM-5900lv) under optimal conditions of 10 kV at a 10 mm distance and 1500x magnification for *M. petterssonii*, *H. undatus*, *E. chiotilla* and 650x for *O. ficus-indica*.

**Statistical Analysis:** To assess the behavior of SD and SI, we used an experimental design involving two factors and six replicates (Zar 2010). The first factor was culture condition: either *in vitro* or *ex vitro*. The second factor was region the shoot: ei-

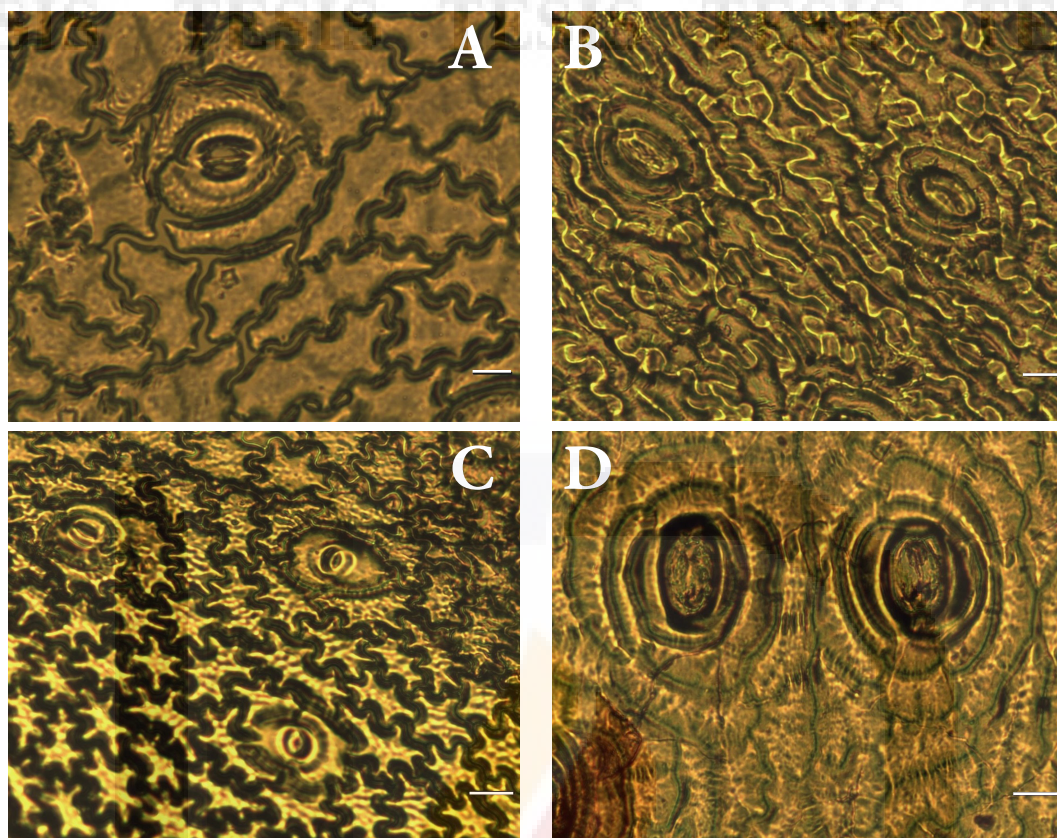




**Figure 1.** Ex vitro and in vitro plants: A-A') *Hylocereus undatus*; B-B') *Escontria chiotilla*; C-C') *Mammillaria petterssonii*; D-D') *Opuntia ficus-indica*.

ther apical, middle or basal. The criteria used to assess differences between factor levels as well as their corresponding interactions was the  $p$ -value, where  $p$ -values less than 0.05 indicated statistically significant differences and  $p$ -values less than 0.01 indicated highly significant statistical differences (Whitlock & Schluter 2009). To compare standard deviations between samples with different means and to evaluate relative dispersion, we calculated coefficient of vari-

ation, defined as  $CV = \frac{s}{\bar{x}}$ , where  $s$  is the standard deviation and  $\bar{x}$  is the mean (Zar 2010). In the corresponding analyses, a complete linear model with a two-way variance analysis was used with an interaction term between culture condition and stem region. This reduced the estimation error of the models, avoiding possible validation errors in the contrasts on the main effects (Quinn & Keough 2002). The variance explained by stomatal parameters was calcu-



**Figure 2.** Epidermal impressions of four cactus species (20x). Parallelocytic type stomata: A) *Hylocereus undatus*; B) *Escontria chiotilla* and C) *Mammillaria petterssonii*. Cyclocytic tetracytic or opuntoid type stomata: D) *Opuntia ficus-indica* (bar = 35  $\mu$ m).

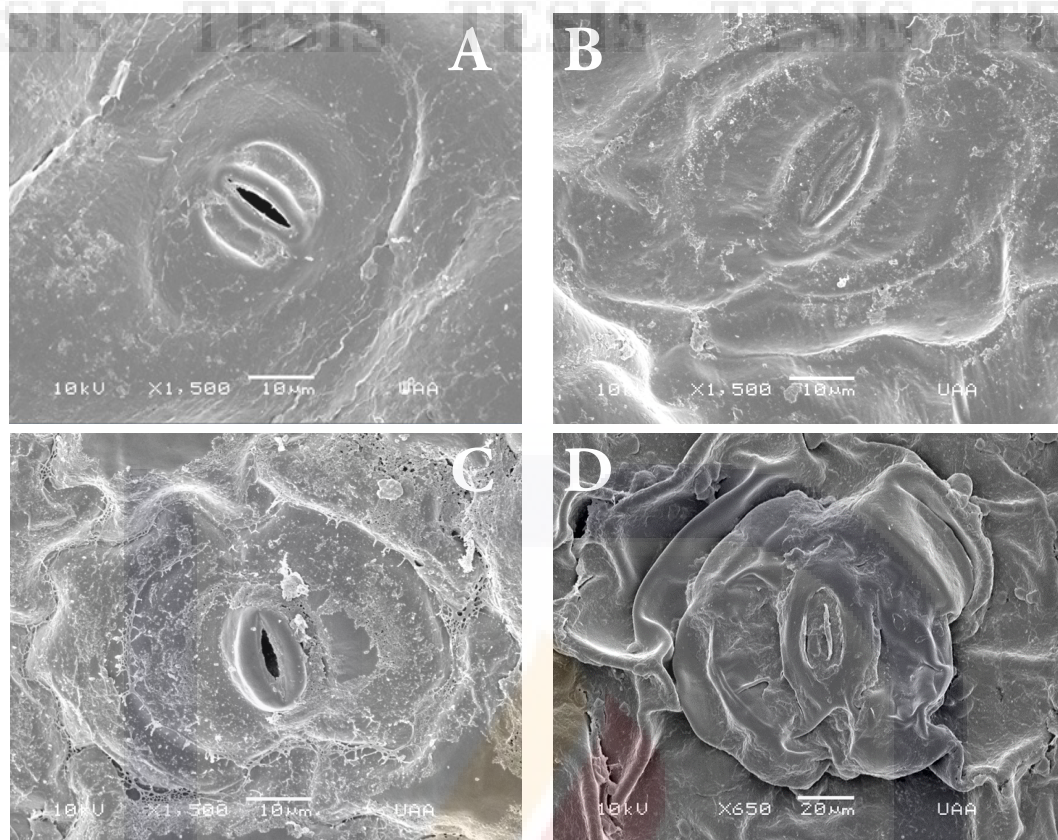
lated as adjusted coefficient of determination ( $R^2$ -adjusted). Tests were run with MINITAB 15 statistical software.

## RESULTS AND DISCUSSION

*Escontria chiotilla*, *Hylocereus undatus* and *Mammillaria petterssonii* had parallelocytic stomata while *Opuntia ficus-indica* had cyclocytic tetracytic or opuntoid stomata. The stomatal complexes of the four species were randomly distributed in the epidermis, and the epidermal cells showed sinuous anticlinal walls in the three study regions (apical, middle, basal) (Figures 2A-D and 3A-D). These characteristics were the same in both *in vitro* and *ex vitro* specimens. Stability in the morphology of the stoma at the subfamily level has already been reported in cacti (Eggli 1984; Loza-Cornejo & Terrazas 2003; Hernández et al. 2007). Our results corroborate these studies since no changes were observed in the type of stoma in both *in vitro* and *ex vitro* specimens. As previously reported, the anticlinal walls of epidermal cells can be straight or sinuous, however it is unknown if there is some selective advantage provided by sinuous walls since this characteristic is the result of environmental conditions that occur during the development of the epidermis in some species. Sinuous anticlinal walls in the Cactaceae allows epidermal

cells to expand and contract when the plant loses or absorbs water. The difference between straight and sinuous forms could be more related to the maturity of the plant because young tissues most commonly have sinuous walls (Loza-Cornejo & Terrazas 2003). Hernández et al. (2007) observed that anticlinal walls of epidermal cells were sinuous in the apical position of branches in *Myrtillocactus geometrizans*; and that in the middle region, where cells were more mature, the anticlinal walls were mostly straight. However, in our study we observed only cells with sinuous anticlinal walls in *M. geometrizans*.

There is a statistically significant difference in stomatal size (SS) between *ex vitro* and *in vitro* conditions in *Opuntia ficus-indica*, *Hylocereus undatus*, and *Escontria chiotilla*, but not in *Mammillaria petterssonii* (Table 1). Malda et al. (1999) reported alterations in CAM physiology that occur *in vitro* culture conditions, which may explain the differences we saw in *O. ficus-indica*, *H. undatus*, and *E. chiotilla*. Low values of coefficient of variation in Table 1 suggest that there is no difference by zone (apical, middle, basal). This accords with Hernández et al. (2007), who claim that lack of significance between zone and stomatal size depends on the branch morphology and maturation of epidermal cells, variables we did not include in our experiments. SS in *H. undatus* cultured *ex vitro* ranges from 50.3 to 69.9  $\mu$ m



**Figure 3.** Scanning electron micrographs of stomata (1500x): A) *Hylocereus undatus*; B) *Escontria chiotilla*; C) *Mammillaria petterssonii* and D) *Opuntia ficus-indica* (650x).

(Tel-Zur et al. 2011) to 72.99 and 74.15  $\mu\text{m}$  (Juárez 2011), which is greater than our SS data for *H. undatus* (40.6 to 50.0  $\mu\text{m}$ ). Janu and Raghuvanshi (2011), in a comparative study of epidermal characters of *Mammillaria* spp., found a range of SS from 34.27 to 51.98  $\mu\text{m}$ . Our SS data for *M. petterssonii* values ranged from 21.9 to 34.4  $\mu\text{m}$  for *ex vitro* conditions, which barely falls into the range of the last authors. In both cases our results seem to be lower than those of other authors, but we are dealing with greenhouse specimens. For *Escontria chiotilla*, we obtained ranges of SS from 37.5 – 53.1  $\mu\text{m}$  (*in vitro*)

and 43.8 – 53.1  $\mu\text{m}$  (*ex vitro*), but found no literature to compare this with. Conde (1975) reported SS values between 43 and 57  $\mu\text{m}$  for *Opuntia* spp. Silva et al. (2001) reported SS average values for *Opuntia ficus-indica* of 82.2 and 95.6  $\mu\text{m}$  for southern and northern exposures, respectively. Our results (62.5 to 93.8  $\mu\text{m}$ ) for this species are similar.

SD was lower *ex vitro* in *Escontria chiotilla* and *Opuntia ficus-indica* than *in vitro*, whereas the opposite was true in *Hylocereus undatus* and *Mammillaria petterssonii* (Table 2). In similar studies conducted by Pospíšilová et al. (1999) in C3 plant acclimation,

Species	Condition	Mean ( $\mu\text{m}$ )	Range ( $\mu\text{m}$ )	CV	<i>p</i> -value	R <sup>2</sup>
<i>H. undatus</i>	<i>in vitro</i>	33.64	31.2 – 40.6	0.0959	0.000	0.7759
	<i>ex vitro</i>	44.67	40.6 – 50.0	0.0643		
<i>E. chiotilla</i>	<i>in vitro</i>	43.75	37.5 – 53.1	0.1101	0.001	0.2849
	<i>ex vitro</i>	48.90	43.8 – 53.1	0.0712		
<i>M. petterssonii</i>	<i>in vitro</i>	28.49	18.8 – 40.6	0.1934	0.392	0.0230
	<i>ex vitro</i>	29.96	21.9 – 34.4	0.1431		
<i>O. ficus-indica</i>	<i>in vitro</i>	39.52	31.2 – 56.2	0.2146	0.000	0.8337
	<i>ex vitro</i>	74.08	62.5 – 93.8	0.0998		

**Table 1.** The *p*-value is for the observed significance in the one-way ANOVA for condition.

SPECIES	AREA	STOMATAL DENSITY		STOMATAL INDEX	
		<i>IN VITRO</i>	<i>EX VITRO</i>	<i>IN VITRO</i>	<i>EX VITRO</i>
<i>H. undatus</i>	Apical	10.1 ± 0.55	9.6 ± 0.74	3.6 ± 0.29	3.2 ± 0.38
	Middle	10.6 ± 1.03	12.1 ± 0.50	3.0 ± 0.26	4.6 ± 0.26
	Basal	4.7 ± 0.59	10.4 ± 0.94	2.0 ± 0.28	4.1 ± 0.29
	mean	8.4 ± 0.77 [0.39]	10.7 ± 0.48 [0.19]	2.9 ± 0.22 [0.32]	3.9 ± 0.22 [0.24]
<i>E. chiotilla</i>	Apical	29.8 ± 0.68	12.8 ± 0.78	6.2 ± 0.28	2.1 ± 0.15
	Middle	27.1 ± 0.75	11.7 ± 0.84	6.6 ± 0.48	1.8 ± 0.16
	Basal	18.2 ± 0.80	11.1 ± 0.63	5.6 ± 0.25	1.9 ± 0.17
	mean	24.7 ± 1.34 [0.23]	11.9 ± 0.45 [0.16]	6.1 ± 0.22 [0.15]	1.9 ± 0.09 [0.20]
<i>M. petterssonii</i>	Apical	20.0 ± 0.91	33.8 ± 0.37	5.1 ± 0.44	10.7 ± 0.41
	Middle	14.4 ± 0.89	27.8 ± 1.50	5.1 ± 0.34	7.5 ± 0.50
	Basal	12.9 ± 1.28	20.3 ± 1.88	4.4 ± 0.40	6.8 ± 0.77
	mean	15.8 ± 0.93 [0.25]	27.3 ± 1.54 [0.24]	4.9 ± 0.23 [0.20]	8.3 ± 0.52 [0.26]
<i>O. ficus-indica</i>	Apical	28.4 ± 0.48	20.5 ± 0.72	6.7 ± 0.29	10.7 ± 0.42
	Middle	24.4 ± 1.74	18.8 ± 0.88	7.6 ± 0.60	8.6 ± 0.22
	Basal	11.7 ± 1.05	15.9 ± 0.90	4.1 ± 0.18	6.8 ± 0.48
	mean I	21.5 ± 1.85 [0.37]	18.4 ± 0.65 [0.15]	6.1 ± 0.42 [0.29]	8.7 ± 0.44 [0.22]

**Table 2.** Mean ± standard error, coefficient of variation is in brackets [CV].

such as *Liquidambar styraciflua* L., *Vaccinium corymbosum* L. and *Nicotiana tabacum* L., it was observed that SD decreased after being transplanted from *in vitro* to *ex vitro* culture conditions. Instead, in *Prunus serotina* Ehrh. and *Rhododendron* L. spp. SD increased after transplantation. Some authors report that a relationship exists between SD and type of photosynthesis (C3, C4, or CAM). Hernández et al. (2007) report that C3 and C4 plants living in arid areas have an SD of 100-300 stomata mm<sup>-2</sup>, whereas CAM plants (like the Cactoideae) have 18-60 stomata mm<sup>-2</sup>. In our study, *E. chiotilla*, *H. undatus* and *M. petterssonii*, which belong to the Cactoideae, had an *ex vitro* range of 10.7 to 27.3 stomata mm<sup>-2</sup>. Silva et al. (2001) describe that CAM photosynthesis combined with low stomatal density generates a positive water balance in the plant, favoring efficiency in water use and biomass production even under conditions of water deficit. Silva et al. (2001) reported significant differences in SD between CAM plants (a mean of 27 stomata mm<sup>-2</sup>), and C4 plants, such as *Atriplex triangularis* Willd. and *A. repanda* Phil. which had between 115 and 380 stomata mm<sup>-2</sup>. By contrast, *Eucalyptus globulus* Labill. and *E. camaldulensis* Dehnh. (C3) have about 300 stomata mm<sup>-2</sup> (Silva et al. 2001).

Differences in distribution of stomata in the three analyzed regions (apical, middle, basal) were statistically significant in *Opuntia ficus-indica*, *Escontria chiotilla*, and *Mammillaria petterssonii*, but not in *Hylo-*

*cereus undatus* (Table 3). The observed trend, both in *in vitro* and *ex vitro* conditions, was that basal portions of shoots had the lowest SD (Table 3).

*Hylocereus undatus* had mean stomatal densities of 8.4 and 10.7 mm<sup>-2</sup> for *in vitro* and *ex vitro* conditions, respectively (Table 2). Tel-Zur et al. (2011) mentioned that the development and distribution of stomata is regulated by genetic, hormonal and environmental factors; and reported for *H. undatus* an *ex vitro* SD in a range of 5.7-11.5 stomata mm<sup>-2</sup>, which is similar to our results. Juárez (2011) mentioned that plants growing exposed to direct sunlight usually have a higher SD and that *Hylocereus* is an epiphytic plants, which normally is not exposed to direct sunlight.

*Opuntia ficus-indica* had mean stomatal densities of 21.5 and 18.4 mm<sup>-2</sup> for the *in vitro* and *ex vitro* conditions, respectively. The corresponding SI values were of 6.1 and 8.7 (Table 2). Pimienta-Barrios & Nobel (1998) estimated the SD of *Opuntia* spp. in a range of 10 to 40 mm<sup>-2</sup>. They considered these relatively low values of SD and therefore an adaptation to arid environments. Pimienta-Barrios et al. (2003) mentioned that the anatomical characteristics of the epidermis, as well as the low SD and thick cuticle, have played an important role in *Opuntia* adaptation to arid climates. However, our results did not match those from Silva et al. (2001) who reported that stomata density in *O. ficus-indica* cultivated in the southern hemisphere and exposed to the north

SPECIES		p-value SD	R <sup>2</sup> -adj SD	p-value SI	R <sup>2</sup> -adj SI
<i>H. undatus</i>	CONDITION	0.001	0.5968	0.000	0.5303
	AREA	0.000		0.077	
	INTERACTION	0.001		0.001	
<i>E. chiotilla</i>	CONDITION	0.000	0.9536	0.000	0.9183
	AREA	0.000		0.070	
	INTERACTION	0.000		0.059	
<i>M. petterssonii</i>	CONDITION	0.000	0.8529	0.000	0.7463
	AREA	0.000		0.000	
	INTERACTION	0.025		0.004	
<i>O. ficus-indica</i>	CONDITION	0.001	0.8213	0.000	0.8148
	AREA	0.000		0.000	
	INTERACTION	0.000		0.002	

**Table 3.** Analysis of variance (two-way ANOVA) for stomatal parameters

(higher light intensity) averaged 54 stomata mm<sup>-2</sup>, whereas their south-facing surface averaged 62 stomata mm<sup>-2</sup>.

*Mammillaria petterssonii* had mean stomatal densities of 15.8 and 27.3 mm<sup>-2</sup> for *in vitro* and *ex vitro* conditions, respectively. The corresponding SI values were of 4.9 and 8.3 (Table 2). Janu & Raghuvansi (2011) in their study of stomatal characters in five species of *Mammillaria* found an SD ranging between 13 and 24 stomata mm<sup>-2</sup> and an SI between 7.8 and 13.1. Our results for this species did not differ significantly from theirs.

*Econtria chiotilla* had mean stomatal densities of 24.7 and 11.9 mm<sup>-2</sup> for *in vitro* and *ex vitro* conditions, respectively, and average SI of 6.1 and 1.9. However, the differences in stem regions (apical, middle, basal), and the interaction between culture medium and the area of the stem were not statistically significant (Table 3). This suggests that the influence of the growing conditions was the same for the three regions considered for *E. chiotilla*.

Phenotypic plasticity conferred by characters such as SD is essential for the plant's adaptation to the environment. We observed that in all considered species the culture condition, *in vitro* or *ex vitro*, had an impact on stomatal index and stomatal density, although each species responded in different idiosyncratic ways. Relative humidity and CO<sub>2</sub> concentration influence development and functioning of stomata. The role of these two factors differs between *in vitro* versus *ex vitro*. Relative humidity is lower *ex vitro* than *in vitro*, albeit with significant variations between day and night. CO<sub>2</sub> concentration is higher *ex vitro* than *in vitro*, with almost no variation between day and night. For *in vitro* culture, the availability of CO<sub>2</sub> is lower and can be affected by the light conditions. Under continuous light conditions,

as used in this study, CO<sub>2</sub> remains almost constant at a low concentration. However, when incubated under a photoperiod (alternating light and dark), CO<sub>2</sub> concentrations decrease during light conditions due to photosynthesis and increase during dark conditions due to respiration (Buddendorf-Joosten and Woltering 1994). These differences in relative humidity and availability of CO<sub>2</sub> could cause different effects among the species analyzed. In *Hylocereus undatus* and *Mammillaria petterssonii*, SD decreased after acclimation, but in *Econtria chiotilla* and *Opuntia ficus-indica* SD increased after being transplanted. We also noted that in highly adaptable and cultivated species, like *H. undatus* and *O. ficus-indica*, the difference between *in vitro* and *ex vitro* SD was less than three stomata per mm<sup>2</sup>, while *E. chiotilla* and *M. petterssonii*, which are species more susceptible to the process of acclimatization, showed differences of more than ten stomata per mm<sup>2</sup>. Perhaps this plays an important role in the viability of plants generated *in vitro* when transferred to *ex vitro* conditions since a significant increase or decrease in SD may cause desiccation or affect CO<sub>2</sub> uptake and productivity in these plants.

### ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank the Universidad Autónoma de Aguascalientes, CONACyT for doctoral scholarship No. 217981 granted to Virginia Herrera Martínez, Margarita De la Cerda Lemus for her support in the identification of plant material, Isaac Reyes Silva for the facilities provided for the management of greenhouse plants. Thanks to Roberto Rico Martínez and reviewers for their comments on the final version of this manuscript.

## REFERENCES

- Angiosperm Phylogeny Group (APG) III. 2009. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society* 161: 105-121.
- Araújo WL, Fernie AR, Nunes-Nesi A. 2011. Control of stomatal aperture a renaissance of the old guard. *Plant Signaling and Behavior* 6: 1305-1311.
- Borland AM, Barrera VA, Ceusters J, Shorrocks K. 2011. The photosynthetic plasticity of Crassulacean Acid Metabolism: an evolutionary innovation for sustainable productivity in a changing world. *New Phytologist* 191: 619-633.
- Buddendorf-Joosten, J. M. C., Woltering, E. J. 1994. Components of the gaseous environment and their effects on plant growth and development *in vitro*. *Plant Growth Regulation* 15:1-16.
- Dávila-Figueroa CA, De la Rosa-Carrillo ML, Pérez-Molphe-Balch E. 2005. *In vitro* propagation of eight species or subspecies of *Turbinicarpus* (Cactaceae). *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant* 41: 540-545.
- Eggl U. 1984. Stomatal types of Cactaceae. *Plant Systematics and Evolution* 146: 197-214.
- Finsinger W, Dos Santos T, McKey, D. 2013. Estimating variation in stomatal frequency at intra-individual, intra-site, and inter-taxonomic levels in populations of the *Leonardoxa africana* (Fabaceae) complex over environmental gradients in Cameroon. *Geoscience* 345: 350-359.
- García J, Sartori-Paoli AA, De Souza LA. 2010. Flower morpho-anatomy in *Epiphyllum phyllanthus* (Cactaceae). *Revista Mexicana de Biodiversidad* 81: 65-80.
- Hernández M, Terrazas T, Delgado A, Luna M. 2007. *Myrtillocactus geometrizans* (Mart. ex Pfeiff.) Console (Cactaceae) stomata: variation along its distribution range. *Revista Fitotecnia Mexicana* 30: 235-240.
- Janu V, Raghuvanshi RK. 2011. Microscopic studies on epidermal cells and stomatal behavior of some globular cacti (*Mammillaria* spp.). *Insight Botany* 1: 1-4.
- Juárez C. 2011. Caracterización química y estomática y crecimiento de tallos de *Acanthocereus tetragonus*, *A. subinermis* e *Hylocereus undatus*. Tesis, Maestría en Ciencias (Master of Science thesis). Colegio de Postgraduados. Edo. de México. México. pp. 44.
- Loza-Cornejo S, Terrazas T. 2003. Epidermal and hypodermal characteristics in North American Cactoideae (Cactaceae). *Journal of Plant Research* 116: 27-35.
- Malda G, Backhaus R, Martin C. 1999. Alterations in growth and Crassulacean Acid Metabolism (CAM) activity of *in vitro* cultured cactus. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 58:1-9.
- Mandujano MC, Carrillo-Angeles I, Martínez-Peralta C, Golubov J. 2010. Reproductive biology of Cactaceae. In: *Desert plants* (Ramawat KJ, ed.). Pp. 197-230. Springer-Verlag, Berlin & Heidelberg.
- Martin WJ, Stimart DP. 2005. Stomatal density in *Antirrhinum majus* L.: inheritance and trends with development. *HortScience* 40: 1252-1258.
- Murashige T, Skoog F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-97.
- Nava JF, Jiménez-Aparicio AR, De Jesús-Sánchez A, Arenas-Ocampo ML, Ventura-Zapata E, Evangelista-Lozano S. 2011. Estudio de la morfología y aclimatación de plantas de *Laelia eyermaniana* Rchb. f. generadas *in vitro*. *Polibotánica* 32: 107-117.
- Ortega-Baes P, Sührling S, Sajama J, Sotola E, Alonso-Pedano M, Bravo S, Godínez-Álvarez H. 2010. Diversity and conservation in the cactus family. In: *Desert plants* (Ramawat KJ, ed.). Pp. 157-173. Springer-Verlag, Berlin & Heidelberg.
- Padrón CA. 2012. Innovaciones en el agrodesarrollo de las cactáceas. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos* 3: 38-79.
- Pandey R, Chacko P, Choudhary ML, Prasad KV, Pal M. 2007. Higher than optimum temperature under CO<sub>2</sub> enrichment influences stomata anatomical characters in rose (*Rosa hybrida*). *Scientia Horticulturae* 113: 74-81.
- Pérez-Molphe-Balch E, Pérez-Reyes ME, De La Rosa-Carrillo ML. 2012. *In vitro* conservation of *Turbinicarpus* (Cactaceae) under slow growth conditions. *Haseltonia* 17:51-57.
- Pérez-Molphe-Balch E, Dávila-Figueroa CA. 2002. *In vitro* propagation of *Pelecyphora aselliformis* Ehrenberg and *P. strobiliformis* Werdermann (Cactaceae). *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant* 38: 73-78.
- Pimienta-Barríos E, Nobel P. 1998. Vegetative, reproductive and physiological adaptations to aridity of pitayo (*Stenocereus queretaroensis*, Cactaceae). *Economic Botany* 52: 401-411.
- Pimienta-Barríos E, Loza S, Del Castillo-Aranda ME. 2003. Caracterización anatómica y conductividad hidráulica teórica de los elementos de vaso de variedades silvestres y cultivadas de nopal tunero (*Opuntia*). *Acta Botánica Mexicana* 62: 21-30.
- Pospišilová J, Tichá I, Kadleček P, Haisel D, Plzáková Š. 1999. Aclimatization of micropropagated plants to *in vitro* conditions. *Biologia Plantarum* 42: 481-497.
- Quinn GP, Keough MJ. 2002. *Experimental design and data analysis for biologists*. Cambridge University Press, Cambridge. 537p.
- Retes-Pruneda JL, Valadez-Aguilar ML, Pérez-Reyes ME, Pérez-Molphe-Balch E. 2007. *In vitro* propagation of species of *Echinocereus*, *Escontria*, *Mammillaria*, *Melocactus* y *Polaskia* (Cactaceae). *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 81: 7-16.
- Silva H, Acevedo E, Silva P. 2001. Anatomía del tejido fotosintético de diez taxa de *Opuntia* establecidos en el secano árido mediterráneo de Chile. *Revista Chilena de Historia Natural* 74: 341-351.
- Tel-Zur N, Mizrahi Y, Cisneros A, Mouyal J, Schneider B, Doyle JJ. Phenotypic and genomic characterization of vine cactus collection (Cactaceae). *Genetic Resources and Crop Evolution* 58: 1075-1085.
- Whitlock ME, Schluter D. 2009. *The analysis of biological data*. Roberts Publishers, Greenwood Village, Colorado. 700p.
- Zar JH. 2010. *Biostatistical analysis*. 5<sup>th</sup> edition. Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ. 940p.