

Estudios de los efectos del pH, densidad estomática, ácido-3-indolacético y ácido abscísico en cactáceas cultivadas in vitro y ex vitro

Study of effects in pH, stomatal density, índole-3-acetic acid and abscisic acid on cacti cultivated in vitro and ex vitro

José Francisco Morales-Domínguez^{1*}, Virginia Herrera-Martínez¹, Eugenio Martín Pérez-Molphe Balch¹, Cristina Garcidueñas-Piña¹

¹Departamento de Química, Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes. Av. Universidad #940, Ciudad Universitaria, C.P. 20100, Aguascalientes, Ags. México.

Correo electrónico: francisco.morales@edu.uaa.mx; herreraaviky7@gmail.com; eperezmb@gmail.com; cristina.garcidueñas@edu.uaa.mx

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3418-6416>; <https://orcid.org/>; <https://orcid.org/0000-0003-3394-2486>; <https://orcid.org/0000-0002-3567-7244>

*Autor para correspondencia

Recibido: 24 de agosto de 2022

Aceptado: 2 de diciembre de 2022

Publicado: 31 de enero de 2023

<https://doi.org/10.33064/iycuaa2023884089>
e4089

Resumen

El metabolismo ácido de las crasuláceas (MAC) generalmente se lleva a cabo en las plantas que viven en zonas áridas, con poca disponibilidad de agua. Estas plantas se caracterizan por ser suculentas, tener cutícula cerosa y llevar a cabo fotosíntesis en los tallos. En este trabajo se abordan varios aspectos de su metabolismo en cactáceas *in vitro* y *ex vitro*. Se analizó la variación del pH cada hora durante un día y se observó que en *Opuntia ficus-indica in vitro* bajo luz continua presenta un comportamiento C3. El estudio de los estomas permitió relacionar a los de tipo paralelocítico con la subfamilia Cactoideae, y a los de tipo opuntioide con las subfamilias Pereskioideae y Opuntioideae en las cactáceas cultivadas *in vitro*. Además, se observó una estimulación en la apertura estomática en *O. ficus-indica* y *P. sacharosa* con ácido indolacético, sólo a concentraciones elevadas (100 y 1000 μM).

Palabras clave: cactus; metabolismo; estomas; fotosíntesis; fitohormonas

Abstract

Crassulaceae acid metabolism (MAC or CAM) generally takes place in plants that live in arid areas with little water availability. These plants are characterized by being succulent, having a waxy cuticle and carrying out photosynthesis in the stems. In this work several aspects of its metabolism in cacti *in vitro* and *ex vitro* are addressed. The variation of the pH was analyzed every hour during a day and it was observed that *Opuntia ficus-indica in vitro*

under continuous light present a C3 behavior. The study of the stomata made it possible to relate the parallelocytic type with the Cactoideae subfamily, and the opuntoid type with the Pereskioideae and Opuntioideae subfamilies in cacti grown *in vitro*. Further, a stimulation in the stomatal opening was observed in *O. ficus-indica* and *P. sacharosa* with indoleacetic acid, only at high concentrations (100 and 1000 μM).

Keywords: cacti; Crassulacean Acid Metabolism; stomata; photosynthesis; phytohormones

Introducción

El cambio climático provocado por diversas actividades humanas, ha afectado a todo el planeta. En especial, las plantas han sufrido las consecuencias de la perturbación de su hábitat producidas por las intensas precipitaciones fluviales, inundaciones, aridez y sequías (Bertolino et al., 2019). Con respecto a la sequía, es preciso que la tecnología agrícola optimice sus procesos de cultivo para garantizar que el agua se utilice de manera eficiente, y de esta manera mantener la seguridad alimentaria de la población mundial. Algunas plantas han desarrollado mecanismo para lograr una mejor eficiencia del uso del agua (EUA o WUE por sus siglas en inglés) (Varshney et al., 2018). La EUA en la fisiología vegetal está relacionada con la cantidad de vapor de agua liberado a la atmósfera en la transpiración y a su vez, con la cantidad de CO_2 fijado para llevar a cabo la fotosíntesis. Las plantas que tienen una mayor EUA son la que llevan a cabo el metabolismo ácido de las crasuláceas (MAC) (Borland et al., 2014; Bertolino et al., 2019).

Las plantas pueden llevar a cabo la fotosíntesis mediante alguno de los tres mecanismos conocidos como C3, C4 y MAC. El MAC se lleva a cabo en fases que ocurren durante el día y la noche. En la noche, el CO_2 ingresa a la célula a través de los estomas y es transformado a ácido málico y almacenado en la vacuola. En el día, el ácido málico es liberado en forma de CO_2 que ingresa al ciclo de Calvin para producir carbohidratos de almacenaje (Winter, 2019; Gilman & Edwards, 2020; Tay et al., 2021; Winter & Smith, 2022).

Los estomas son estructuras localizadas en la parte aérea de las plantas, en la mayoría de las plantas en hojas y tallos. Están formados por dos células oclusivas o guarda, y por las células acompañantes que se ubican rodeando a las primeras. Están dispuestas de tal manera que dejan un espacio central llamado ostiolo o poro, que puede abrirse o cerrarse dependiendo de la turgencia de las células oclusivas. A través del ostiolo, la planta capta CO_2 y O_2 de la atmósfera, y libera agua por transpiración (Lígia et al., 2019). Algunos factores ambientales como humedad y movimiento del aire, intensidad de luz, temperatura, concentración de CO_2 atmosférico, y concentración de fitohormonas afectan la apertura o el cierre estomático (Gong et al., 2021).

El ácido abscísico (ABA) es una hormona vegetal o fitohormona que controla el cierre de los estomas, como una adaptación rápida a condiciones de estrés tanto biótico como abiótico (Assmann & Jegla, 2016). El ABA actúa sobre receptores que se encuentran en las membranas de las células guarda, lo que estimula la movilidad de iones calcio (Ca^{2+}) que conducen a la salida de K^+ y agua de las células y como consecuencia el cierre de los estomas (Brookbank et al., 2021). Otras fitohormonas como el ácido indol-3-acético (AIA) modulan por diferente vía el flujo de K^+ en la membrana plasmática de las células guarda propiciando la apertura de los estomas (Males & Griffiths, 2017).

En la actualidad se reconoce que unos 400 géneros de plantas vasculares llevan a cabo fotosíntesis MAC. Entre las que se encuentran los cactus, plantas que pertenece a la familia Cactaceae y que a su vez está dividida en las subfamilias Pereskioideae, Opuntioideae y Cactoideae (Hernández-Hernández et al., 2011). Los cactus son plantas suculentas, de lento crecimiento que se caracterizan porque se desarrollan sin problema en zonas con déficit de agua. La mayoría de las especies de los cactus ha sido poco estudiada debido a su largo ciclo de vida, a su poca disponibilidad y a que se han visto afectadas por factores como el cambio climático, la sobreexplotación y el cambio de uso de suelo.

En la Universidad Autónoma de Aguascalientes se cuenta con un banco de germoplasma de cactáceas completamente identificadas (Pérez-Molphe-Balch, 2015), lo cual es de gran ayuda para realizar estudios de propagación y moleculares sin perturbar aquellas que están en peligro de extinción o su hábitat. En este trabajo se estudiaron varias especies de cactus, de metabolismo CAM, cultivadas *in vitro* y *ex vitro*, y a *Citrus aurantifolia* (limón) como planta con metabolismo C3, con el fin de aportar conocimiento acerca de su metabolismo y de la regulación de la apertura de estomas. Se reporta un método sencillo de medición del pH a lo largo día para estudio del metabolismo CAM y C3, un análisis para el tipo de estomas y variaciones en densidad estomática, y la influencia del AIA y al ABA en el cierre y apertura de los estomas.

Materiales y métodos

Material biológico. Se tomaron las siguientes especies del banco de germoplasma *in vitro* de la Universidad Autónoma de Aguascalientes (UAA). *Opuntia ficus-indica*, *Acharagma aguirreana*, *Pereskia sacharosa*, *Ferocactus histrix*, *Opuntia amyclacea*, *Escontria chiotilla* y *Leuchtenbergia principis* (Pérez-Molphe-Balch et al., 2015). La propagación *in vitro* de las especies se realizó en medio MS basal (Murashige & Skoog, 1962) con 8 g/L de agar (Plant TC PhytoTechnology Laboratories) bajo luz fluorescente en lámparas con una intensidad de $54 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$, de manera continua o con fotoperiodo (12 h luz), a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, durante 6 meses.

Se analizaron otras plantas cultivadas *ex vitro* en los campos de la UAA (21°54'48.17" N, 102°18'54.09" W), tres cactáceas *O. ficus-indica* (nopal), *Cylindropuntia imbricata* (cardenche), *Myrtillocactus geometrizans* (garambullo); y una de la familia Rutaceae, *Citrus aurantifolia* (limón), utilizada para hacer comparación con esta planta C3. Estas plantas que se riegan de manera periódica, se analizaron en los meses de febrero y marzo, con aproximadamente 12 h de luz de día.

Determinación del pH. Se midió el pH en extractos de nopal cultivado *in vitro*, (bajo luz continua y en fotoperiodo) y *ex vitro*, y en cardenche, garambullo y limón cultivados *ex vitro*, cada hora durante 24 h. Se maceró 1 g de tejido fresco, de tallo en el caso de las cactáceas y de hoja en el caso del limón, en 10 ml de agua destilada e inmediatamente se midió el pH con ayuda de un potenciómetro (Denver Instrument modelo UB-10). Este proceso se realizó por triplicado. Se construyeron las gráficas en Microsoft Excel (2016) utilizando el promedio de los valores y la desviación estándar, y con el programa Minitab 15 se realizó un estudio de correlación entre las diferentes especies analizadas según la variación del pH observado.

Análisis de estomas. Se analizaron las siguientes especies cultivadas *in vitro* en MS bajo luz de tubo fluorescente con una intensidad de luz de 2000–2500 lux en fotoperiodo (12 h luz) durante 6 meses: *Acharagma aguirreana*, *Pereskia sacharosa*, *Ferocactus histrix*, *Opuntia amyclacea* y *Leuchtenbergia principis*. La morfología de los estomas se analizó siguiendo el protocolo de Herrera-Martínez et al., (2015); se tomaron muestras de tejido vegetal de aproximadamente 1.5 cm de largo, con ayuda de pinzas y bisturí se retiraron las espinas y vellosidades. Se aplicó una capa ligera de barniz de uñas transparente (NK, Taiwán) sobre un portaobjetos de vidrio, se dejó secar parcialmente por 3 min y las muestras se presionaron con fuerza moderada durante 15 min para dejar una impresión uniforme de los estomas. Se observaron al microscopio óptico (DM LS, Leica Microsystems GmbH) con los objetivos 4X, para determinar la densidad estomática (número de estomas/ mm²), y 20X para determinar el tipo de estoma. Las imágenes fueron capturadas con una cámara fotográfica (Infinity 1 Capture 4.6.0 Software, Lumenera Co.) acoplada al microscopio (DM LS, Leica Microsystems GmbH). Para el conteo de estomas se analizaron 15 imágenes con ayuda de una cámara de Neubauer (Paul Marienfeld GmbH & Co). Se realizó un análisis estadístico *t de Student*, para cada una de las especies, se verificó el supuesto de normalidad mediante una prueba de Anderson-Darling utilizando el programa Minitab 15. 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.

Análisis del efecto del ABA y AIA en los estomas. La apertura estomática por influencia de los reguladores de crecimiento se analizó en *O. ficus-indica* y *P. sacharosa* cultivadas *in vitro* en fotoperiodo (12 h luz), siguiendo el protocolo de Eisele et al. (2016), con ligeras modificaciones: fragmentos de epidermis de 1 x 0.5 cm² se colocaron en un buffer [50 mM KCl, 10 mM MES (ácido 2-N-morfolino-etanosulfónico)] pH 6.15 con 0.1, 1, 10, 100 y 1000 µM de AIA durante 3 h, y con 10, 100 y 1000 µM de ABA por 2 h. Las concentraciones de 0.1, 1 y 10 µM de AIA y la de 10 µM de ABA están en el rango de lo que se utiliza en los medios de cultivo, mientras que las de 100 y 1000 µM de ambas fitohormonas exceden lo recomendado. Las muestras de epidermis se procesaron como en el apartado anterior (Análisis de estomas), se observaron al microscopio óptico (Leica DMLS) y se midió la apertura del poro estomático con ayuda del programa Infinity 1 (Capture 4.6.0 Software, Lumenera Co.). Se analizaron 45 estomas procedentes de tres diferentes tiras de epidermis para cada uno de los tratamientos. Los datos se analizaron estadísticamente mediante ANOVA seguido de una prueba de Tukey con el programa Minitab 15. Las representaciones gráficas se elaboraron en Microsoft Excel (2016) utilizando el promedio y la desviación estándar.

Resultados

Fotosíntesis MAC y C3. Se analizó y comparó la variación de pH a lo largo del día en muestras de nopal, cardenche, garambullo y limón (figura 1). Las cactáceas cultivadas *ex vitro* (figura 1A, 1B, 1C) y en fotoperiodo (figura 1D) mostraron una disminución gradual del pH durante la noche hasta alcanzar un mínimo para después ir en aumento hasta llegar a un máximo. En nopal *ex vitro* se registró el menor pH: de 4.1 (figura 1A), en cardenche de 4.2 (figura 1B), en garambullo de 3.9 (figura 1C), y en nopal en fotoperiodo de 4.5 (figura 1D), entre las 7 y 11 h. Posteriormente, alrededor de las 19 h presentaron un pH máximo: de 5.2 (nopal *ex vitro*) hasta 6.3 (nopal fotoperiodo). En cambio, en nopal cultivado bajo luz continua (figura 1E) y en limón (figura 1F), no se observó una variación tan evidente del pH. Se realizó un análisis estadístico para determinar la correlación entre las muestras evaluadas en cuanto a la variación del pH (prueba altamente significativa con un valor p menor a 0.01). Se obtuvo una correlación, entre las cactáceas cultivadas *ex vitro*, y también entre el nopal cultivado en fotoperiodo y *ex vitro* (Tabla 1). Por su parte, nopal cultivado bajo luz no mostró correlación con los cultivados *ex vitro* y en fotoperiodo, pero sí con el limón (Tabla 1).

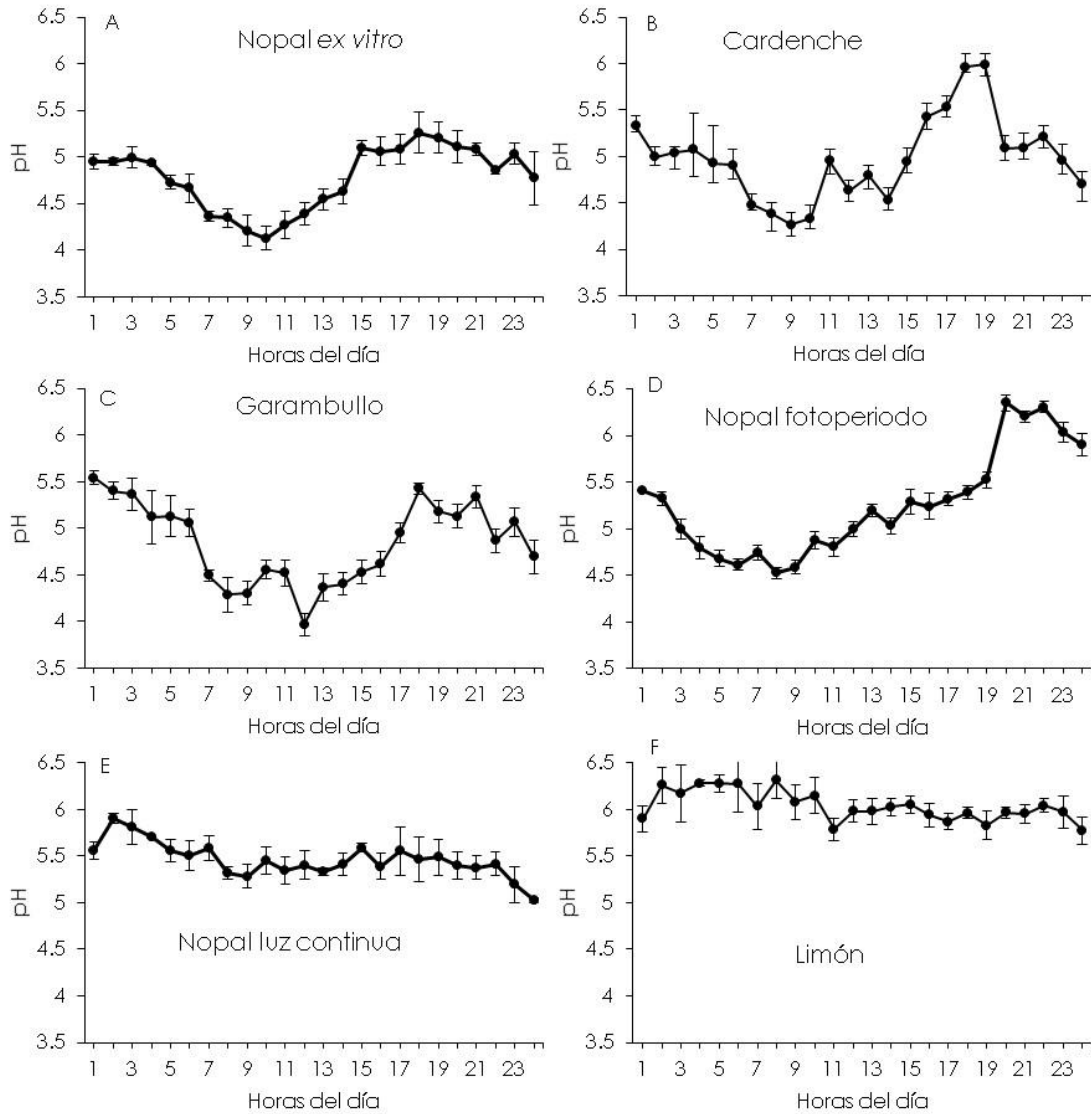


Figura 1. Variaciones de pH durante un día. Análisis de tres cactáceas cultivadas *ex vitro* (A) nopal, (B) cardenche y (C) garambullo, de nopal cultivado *in vitro* en (D) fotoperiodo y (E) luz continua, y de (F) limón. Elaboración propia.

Tabla 1. Correlación de pH entre especies con diferentes condiciones de cultivo

	Nopal Silvestre	Nopal Fotoperiodo	Nopal Luz continua	Limón	Cardenche
Nopal <i>in vitro</i> fotoperiodo	0.173 0.000*				
Nopal <i>in vitro</i> luz continua	0.419 0.042	0.611 0.002*			
Limón	0.377 0.069	0.339 0.106	0.587 0.003*		
Cardenche	0.806 0.000*	0.452 0.027	0.188 0.38	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*

Renglón superior: correlación entre factores. Renglón inferior: Nivel de significancia
*Prueba altamente significativa $p \leq 0.01$. Elaboración propia.

Tipos de estomas y densidad estomática. En la figura 2 se muestran las cinco especies de cactáceas *in vitro* que se utilizaron para el análisis de los estomas, en la figura 3 el tipo de estomas de cada especie, y en la tabla 2, los resultados de densidad estomática. Las especies *P. sacharosa* y *O. amyoclea* tienen estomas tipo opuntioide, mientras que en *A. aguirreana*, *F. histrix* y *L. principis*, los estomas son paralelocíticos (figura 3). En cuanto a la densidad estomática, en las cactáceas analizadas se encontraron valores que van desde 12.39 estomas/mm² en *H. undatus* hasta 79.4 estomas/mm² en *P. sacharosa* (Tabla 2).



Figura 2. Ejemplares de cactáceas *in vitro* tomadas del banco de germoplasma de la UAA para análisis de estomas. (A) *A. aguirreana*, (B) *P. sacharosa*, (C) *F. histrix*, (D) *O. amyoclea* y (E) *L. principis*.

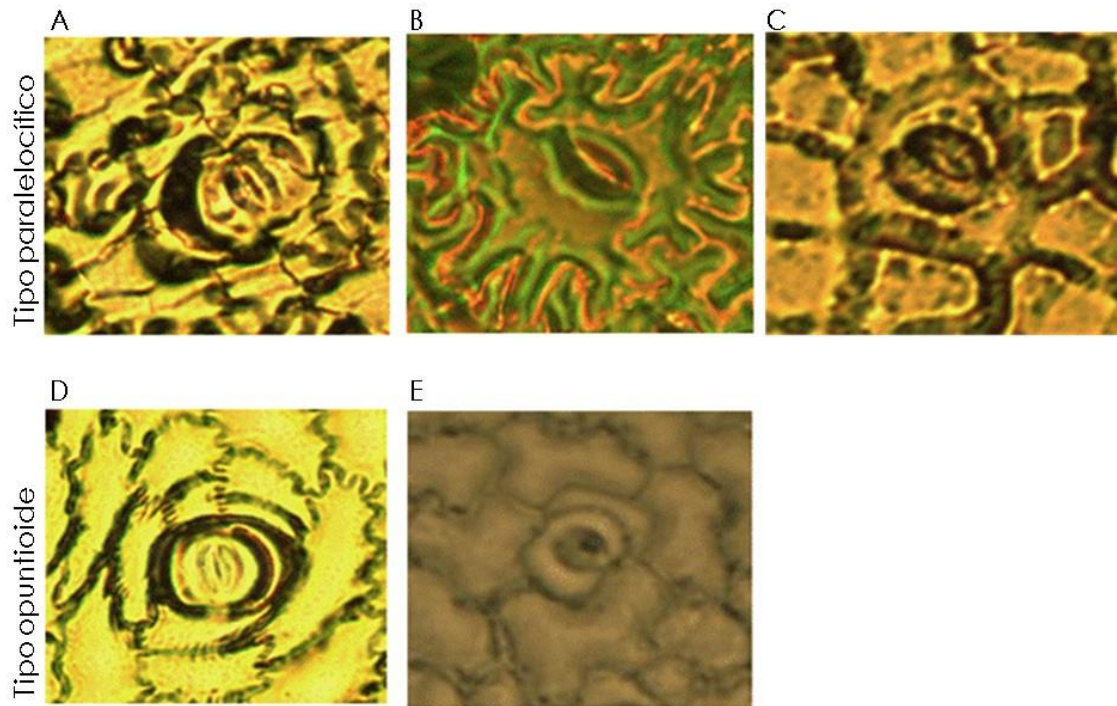


Figura 3. Impresiones epidérmicas de estomas de diferentes cactáceas cultivadas *in vitro*. (A) *A. aguirreana*, (B) *F. histrix*, (C) *L. principis*, (D) *Opuntia amyloclea* y (E) *P. sacharosa*. Elaboración propia.

Tabla 2. Densidad estomática y tipo de estoma de las Cactaceae analizadas

Especie	Subfamilia	Tipo de estoma	Estomas/mm ²
<i>A. aguirreana</i>	Cactoideae	Paralelocítico	22.4 ± 2.94
<i>F. histrix</i>			15 ± 1.54
<i>L. principis</i>			20 ± 1.83
<i>O. amyloclea</i>	Pereskioideae	Opuntioide	30.76 ± 2.02
<i>P. sacharosa</i>	Opuntioideae		74.27 ± 7.25

Efecto del AIA y ABA sobre los estomas. En la figura 4 se representan los resultados de la exposición de muestras de *O. ficus-indica* y *P. sacharosa* al AIA y ABA. En *O. ficus-indica* con AIA a concentraciones de 0.1, 1 y 10 μM no se observaron diferencias significativas con respecto del control (figura 4A). A las concentraciones de 100 y 1000 μM de AIA, la apertura estomática fue significativamente mayor que la del control ($p = 0.000$) (figura 4A). En *P. sacharosa* expuesta a 0.1 y 1 μM se indujo una apertura estomática significativamente mayor que la observada en el control ($p = 0.000$) (figura 4B). Mientras que con 10, 100 y 1000 μM de AIA, no se encontraron diferencias significativas con respecto del control (figura 4B). En las muestras de *O. ficus-indica* expuestas a 100 y 1000 μM de ABA se observó un diámetro estomático significativamente menor que en las del control ($p = 0.000$) (figura 4C). A la concentración de 10 μM de ABA no se observó una diferencia significativa con respecto al

control (figura 4C). En cambio, en el tejido de *P. sacharosa* no se observaron diferencias significativas en la apertura estomática de ninguna de las concentraciones de ABA evaluadas con respecto a su control (figura 4D).

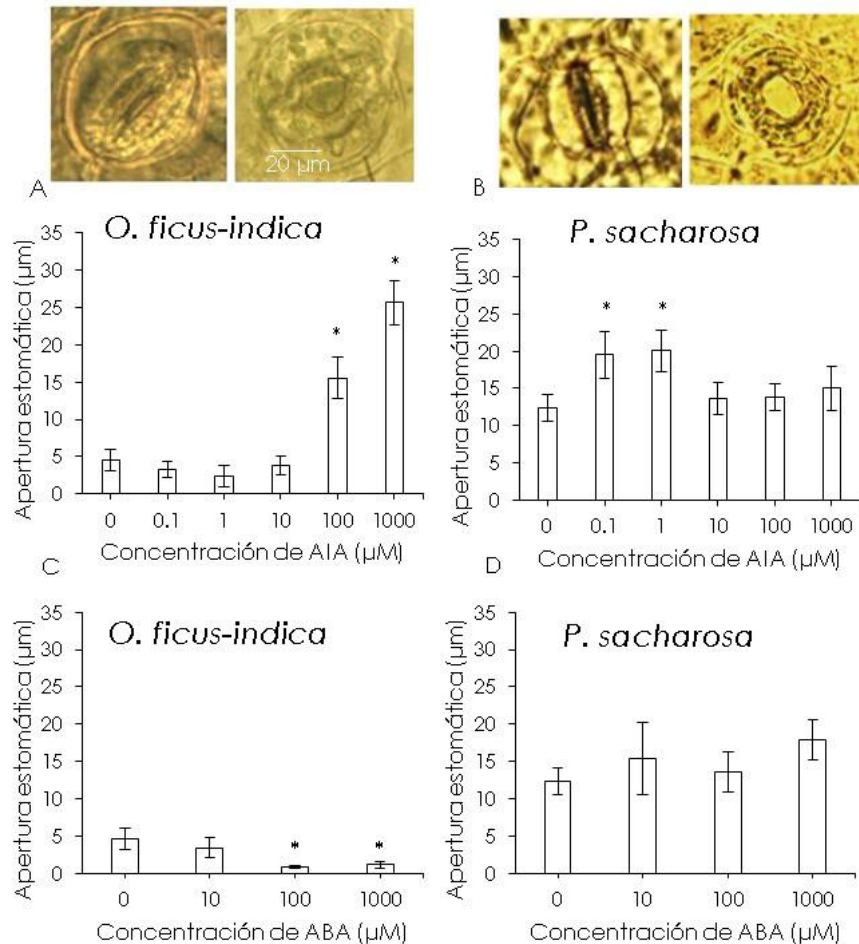


Figura 4. Apertura estomática en tejido expuesto a fitohormonas. (A) *O. ficus-indica* y (B) *P. sacharosa* con AIA, y (C) *O. ficus-indica* y (D) *P. sacharosa* con ABA. Las columnas representan la media y las barras la desviación estándar; el asterisco señala los grupos que son significativamente diferentes al control ($p < 0.05$). Elaboración propia.

Discusión

El MAC es una ruta biosintética vegetal que provee a las plantas de una mejor EUA, esto se lleva a cabo mediante un mecanismo que le permite fijar carbono y limitando la transpiración por los estomas durante la parte más calurosa del día (Tay et al., 2021). El incremento acelerado de la población humana y el cambio climático han complicado la producción de alimentos agrícolas. Una alternativa para solucionar este problema sería el

uso de los cultivos MAC. Sin embargo, para explotar el potencial de los cultivos MAC es necesario conocer las características básicas de su metabolismo y de estudios avanzados de su evolución, características genómicas y sus mecanismos reguladores. Esto facilitaría la introducción de cultivos MAC para mejorar la resiliencia de los cultivos a estrés por sequía (Yang et al., 2015; Schiller & Bräutigam, 2021).

Fotosíntesis MAC y C3. El ácido málico que acumulan las plantas MAC es cuantificable mediante la técnica conocida como acidez titulable y ha sido utilizada para distinguir plantas MAC de las C3 (Tay et al., 2021; Winter & Smith, 2022). En este trabajo, mediante un procedimiento sencillo de medición de pH, se realizó el análisis de extractos de diferentes plantas, cada hora durante 24 h. Este análisis permitió hacer una comparación de la variación del pH a lo largo del día entre los extractos de tallo de nopal, garambullo y cardenche, y de los de hojas de limón, una planta con metabolismo C3. La variación de pH mostró una correlación entre las cactáceas cultivadas *ex vitro* (Tabla 1). La tendencia en nopal *ex vitro* (figura 1A), cardenche (figura 1B) y garambullo (1C) fue la esperada para plantas MAC con oscilaciones de pH marcadas a lo largo del día. Estos resultados son comparables con los que reportan que, un aumento de acidez titulable que se detecta en las primeras horas de la mañana en plantas de diferentes familias está relacionado con el MAC (Winter & Smith, 2022). *Furcraea spp* es una planta MAC de la familia Agavaceae, donde el contenido de ácidos orgánicos en las hojas disminuyó a partir de las 8 de la mañana hasta cerca de las 7 de la noche y luego se incrementó de nuevo (Casierra & González, 2009).

También se comparó la variación de pH entre plantas de nopal cultivadas en condiciones, *in vitro* y *ex vitro*, y bajo fotoperiodo y luz continua. Los resultados mostraron que hay correlación en la variación de pH entre las plantas cultivadas *ex vitro* y en fotoperiodo, y que no hay correlación con la cultivada bajo luz continua (Tabla 1). Se observó un comportamiento típicamente MAC en las plantas cultivadas *ex vitro* (figura 1A) y en fotoperiodo (figura 1D). En nopal cultivado bajo luz continua, se observó que los valores de pH no variaron de manera significativa a lo largo del día (figura 1E), al igual que en limón (figura 1F). Entre nopal cultivado bajo luz continua y limón se encontró una correlación en la variación del pH (Tabla 1). Se ha propuesto que la fotosíntesis MAC es un descendiente evolutivo de la fotosíntesis C3, y que hay plantas que tienen la habilidad de cambiar de MAC a C3 o de C3 a MAC dependiendo de las condiciones ambientales (Tay et al., 2021). En resultados obtenidos del análisis de acidez titulable en *Mammillaria gracilis* Pfeiff se observó una diferencia significativa en la acidez entre la noche y el día en plantas

cultivadas en maceta y en brotes normales cultivados *in vitro* en fotoperiodo (16 h luz), no así en tejido calloso, tejido tumoral y brotes hiperhídricos de cultivos *in vitro* bajo fotoperiodo (16 h luz) (Balén et al., 2012). Aunque hay varias especies de plantas en las que la luz continua produce efectos adversos, como son clorosis y necrosis foliar y reducción de la capacidad fotosintética (Velez-Ramírez et al., 2011), en las plantas de nopal no hubo ninguna manifestación negativa en su desarrollo. Sin embargo, es posible que después de 6 meses de estar en estas condiciones, la planta haya modificado su metabolismo. En la fase oscura del MAC, hay una alta actividad de la enzima fosfoenol piruvato (FEP) carboxilasa (FEPC) que se requiere para fijar el CO₂, producir oxalacetato (OAA), transformarlo en malato y almacenarlo como ácido málico en la vacuola (Winter & Smith, 2022). En la fase de luz, el malato sale de la vacuola y en el citoplasma es descarboxilado enzimáticamente para liberar CO₂ que ingresa al ciclo de Calvin donde se producen carbohidratos de almacenaje. Sin embargo, cuando las condiciones son bajo luz continua, la planta debe abrir los estomas para capturar el CO₂ aunque no haya fase oscura. Esto podría implicar que el CO₂ capturado por la célula ingresa directamente al ciclo de Calvin, sin necesidad de ser almacenado en forma de ácido málico, por lo que la actividad de la FEPC podría estar disminuida. En orquídeas (*Phalaenopsis*), plantas que al parecer pasan de C3 a MAC a lo largo de su desarrollo, se ha observado una mayor actividad de la FEPC cuando el contenido de ácido málico aumenta (Ping et al., 2018). Estos investigadores observaron que la activación de la FEPC está relacionada con la expresión del gen de la FEPC cinasa (FEPC_{CK}), que ocurre durante la oscuridad (Ping et al., 2018). En las plantas de nopal, la luz continua puede estar inhibiendo la expresión de FEPC_{CK}, y por tanto la activación de la FEPC y la producción de ácido málico. Razón por la que no se aprecian variaciones notorias en el pH a lo largo del día, como ocurre en las plantas MAC, y hace que el nopal cultivado bajo luz continua parezca tener un metabolismo C3.

Tipos de estomas y densidad estomática. Se clasificó a los estomas de cinco cactáceas (figura 2) en dos tipos: paralelocítico y opuntioide (figura 3 y tabla 2). Los estomas tipo paralelocítico se caracterizan por presentar tres o más células acompañantes dispuestas en paralelo a las células guarda. Las especies de la subfamilia Cactoideae (*A. aguirreana*, *F. histrix*, y *L. principis*) mostraron estomas tipo paralelocítico (figuras 3A, 3B y 3C). Los estomas tipo opuntioide tienen varias células acompañantes, situadas en uno o dos círculos alrededor de las células guarda. Las especies de las subfamilias Pereskioideae (*P. sacharosa*) y Opuntioideae (*O. amycleae*) presentaron estomas tipo opuntioide (figura 3D y 3E). Esta disposición de los estomas en las subfamilias de cactus ya había sido observada

previamente (Eggl, 1984, Herrera-Martínez et al., 2015). El acomodo de las células guarda y acompañantes puede ser útil para establecer la relación de taxonómica entre las especies. En nuestra observación, también encontramos una correlación entre la densidad estomática y el tipo de estomas, siendo las plantas con estomas tipo opuntioide las de mayor densidad (Tabla 2). En plantas C3 y C4 que habitan en zonas áridas la densidad estomática está entre 100 300 estomas/mm², mientras que plantas MAC de 18 a 60 estomas/mm² (Hernández et al., 2007). La densidad estomática influye directamente no sólo en la capacidad de captación de CO₂, sino también en la pérdida de H₂O. Aparte de la fotosíntesis CAM, la baja densidad estomática es una estrategia que le permite a las cactáceas tener una mejor EUA.

Efecto del AIA y ABA en los estomas. Se realizó este estudio para observar el comportamiento de los estomas de cactáceas en presencia de las fitohormonas AIA y ABA, por lo que se analizaron *O. ficus-indica* y *P. sacharosa*. Se observó que el AIA estimuló la apertura estomática en *O. ficus-indica* sólo a concentraciones elevadas (de 100 µM y 1 mM) (figura 4A). Por su parte, en *P. sacharosa* se observó una estimulación de la apertura estomática a las concentraciones más bajas evaluadas (100 nM y 1 µM) (figura 4B). Las auxinas estimulan la actividad de los canales que introducen K⁺ a la célula guarda, lo que a su vez facilita el ingreso de agua para propiciar la apertura de los estomas (Levitt et al., 1987; Sun et al., 2020; Brookbank et al., 2021). La concentración con que esto sucede, como indica nuestros resultados, depende de la especie de que se trate. En *Vicia faba* se observó que se podía conseguir una apertura estomática considerable, aún en la oscuridad, dependiendo de la concentración de AIA (Ricanek & Virchecova, 1992).

El ABA produjo un efecto inhibitorio de la apertura estomática en ambas especies a una concentración de 100 µM (figuras 4C y 4D). En otras especies ya se había observado el cierre estomático provocado por la exposición a ABA (Ricanek & Virchecova, 1992; Chater et al., 2015). Aunque en este caso se observó ese efecto a la misma concentración, la sensibilidad al ABA varía según la especie (Müller & Munné-Bosch, 2021).

Conclusiones

La medición del pH de las muestras vegetales mostró que el garambullo, cardenche y nopal cultivado ex vitro e in vitro en fotoperiodo tienen MAC, y el limón C3, además, el nopal in vitro bajo luz continua, modificó su metabolismo a C3. El tipo de estomas de la subfamilia Cactoideae son del tipo paralelocítico, mientras que las especies de las subfamilias Pereskioideae y Opuntioideae tienen estomas tipo opuntioide. En el análisis de correlación

entre la densidad estomática y el tipo de estomas, se observó que las plantas con estomas tipo opuntioide tienen mayor densidad. La aplicación directa del AIA y ABA sobre los estomas induce el movimiento de los estomas, aunque la sensibilidad parece depender de la especie tal es el caso de *O. ficus-indica* que es más sensible al AIA y ABA que *P. sacharosa*.

Agradecimientos

A la UAA por el apoyo brindado en este proyecto. A Luis Ríos Hernández por su apoyo en el análisis estadístico.

Referencias

- Assmann, S. M., & Jegla, T. (2016). Guard cell sensory systems: recent insights on stomatal responses to light, abscisic acid, and CO₂. *Current Opinion in Plant Biology*, 33, 15-167. [doi:10.1016/j.pbi.2016.07.003](https://doi.org/10.1016/j.pbi.2016.07.003).
- Balen, B., Tkalec, M., Peharec Štefanić, P. et al. (2012). *In vitro* conditions affect photosynthetic performance and crassulacean acid metabolism in *Mammillaria gracilis* Pfeiff. tissues. *Acta Physiol Plant*, 34, 1883-1893. [doi:10.1007/s11738-012-0986-y](https://doi.org/10.1007/s11738-012-0986-y).
- Bertolino, L. T., Caine, R. S., & Gray, J. E. (2019). Impact of Stomatal Density and Morphology on Water-Use Efficiency in a Changing World. *Front Plant Sci*, 6(10), 225. [doi:10.3389/fpls.2019.00225](https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00225).
- Borland, A. M., Hartwell, J., Weston, D. J., Schlauch, K. A., Tschaplinski, T. J., Tuskan, G. A., & Cushman, J. C. (2014). Engineering crassulacean acid metabolism to improve water-use efficiency. *Trends in plant science*, 19(5), 327-338. [doi:10.1016/j.tplants.2014.01.006](https://doi.org/10.1016/j.tplants.2014.01.006).
- Brookbank, B. P., Patel, J., Gazzarrini, S., & Nambara, E. (2021). Role of Basal ABA in Plant Growth and Development. *Genes*, 12(12), 1936. [doi:10.3390/genes12121936](https://doi.org/10.3390/genes12121936).
- Casierra, F. & 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.
- Chater C., Peng K., Movahedi M., Dunn J.A., Walker H.J., Liang Y.-K., McLachlan D.H., Hetherington A.M. (2015). Elevated CO₂-induced responses in stomata require ABA and ABA signaling. *Current Biology*, 25 (20), 2709-2716. [doi:10.1016/j.cub.2015.09.013](https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.09.013).
- Eggli, U. (1984). Stomatal types of Cactaceae. *Pl. Sist. Evol*, 146, 197-214.
- Eisele JF, Fäßler F, Bürgel PF, Chaban C. A (2016). Rapid and simple method for microscopy-based stomata analyses. *PLoS One*, 11(10):e0164576. [doi:10.1371/journal.pone.0164576](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164576).

- Gilman, I. S. & Edwards, E. J. (2020). Crassulacean Acid Metabolism. *Current Biology*, 30(2), R57-R62. [doi:10.1016/j.cub.2019.11.073](https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.11.073).
- Gong, L., Liu, X.D., Zeng, Y.Y., Tian, X.Q., Li, Y.L., Turner, N.C., & Fang, X.W. (2021). Stomatal morphology and physiology explain varied sensitivity to abscisic acid across vascular plant lineages. *Plant Physiol*, 186(1), 782-797. [doi:10.1093/plphys/kiab090](https://doi.org/10.1093/plphys/kiab090).
- Hernández-Hernández, T.P., Hernández, H.M., De-Nova, J.A., Puente, R., Eguarte, L.E., & Magallón, S. (2011). Phylogenetic relationships and evolution of growth form in Cactaceae (Caryophyllales, Eudicotyledoneae). *American journal of botany*, 98(1), 44-61. [doi:10.3732/ajb.1000129](https://doi.org/10.3732/ajb.1000129).
- Hernández, M., Terrazas, T. Delgado, A. & Cavazos, M. (2007). Los estomas de *Myrtillocactus geometrizans*: variación en su área de distribución. *Rev Fitotec Mex*. 30(3): 235-240.
- Herrera-Martínez, V., Rios-Hernández, L. Garcidueñas-Piña, C. Lara-Ibarra, A., Adabache-Ortíz, A., Soria-Guerra, R. Balch, E. & Morales-Domínguez, J.F. (2015). Effect of culture conditions on stomatal density and stomatal index in four cactus species. *Haseltonia*, 20, 43-50. [doi:10.2985/026.020.0108](https://doi.org/10.2985/026.020.0108).
- Levitt, L. K., Stein, D. B., & Rubinstein, B. (1987). Promotion of stomatal opening by indolacetic acid and ethrel in epidermal strips of *Vicia faba* L. *Plant Physiol*, 85, 318-321.
- Lígia, B.T., Caine, R. S., & Gray, J. E. (2019). Impact of Stomatal Density and Morphology on Water-Use Efficiency in a Changing World. *Frontiers in Plant Science*, 10, 157-167. [doi:10.3389/fpls.2019.00225](https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00225).
- Males, J., & Griffiths, H. (2017). Stomatal Biology of CAM Plants. *Plant Physiology*, 174(2), 550-560. [doi:10.1104/pp.17.00114](https://doi.org/10.1104/pp.17.00114).
- Müller M., & Munné-Bosch S. (2021). Hormonal impact on photosynthesis and photoprotection in plants. *Plant Physiol*, 185(4), 1500-1522. [doi:10.1093/plphys/kiab119](https://doi.org/10.1093/plphys/kiab119).
- Murashige, T. & Skoog, F. K. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiology Plantarum*, 15, 473-497.
- Pérez-Molphe-Balch, E., Santos-Díaz, S., Ramírez-Malagón, R., & Ochoa-Alejo, N. (2015). Tissue culture of ornamental cacti. *Scientia Agricola* [online], 72 (6), 540-561. [Doi:10.1590/0103-9016-2015-0012](https://doi.org/10.1590/0103-9016-2015-0012).
- Ping, C.Y., Chen, F.C., Cheng, T.C., Lin, H.L., Lin, T.S., Yang, W.J., & Lee, Y.I. (2018). Expression profiles of phosphoenolpyruvate carboxylase and phosphoenolpyruvate carboxylase kinase genes in phalaenopsis, implications for regulating the

performance of crassulacean acid metabolism. *Front. Plant Sci.* 9:1587. doi: 10.3389/fpls.2018.01587.

- Ricanek, M. & Vicherkova, M. (1992). Stomatal responses to ABA and IAA in isolated epidermal strips of *Vicia faba* L. *Biol. Plantarum*, 34(3-4), 259-265.
- Schiller, K. & Bräutigam, A. (2021) Engineering of crassulacean acid metabolism. *Annu Rev Plant Biol*, 72:77-103. doi:10.1146/annurev-arplant-071720-104814.
- Sun, Y., Pri-Tal, O., Michaeli, D., Mosquna, A. (2020). Evolution of abscisic acid signaling module and its perception. *Frontiers in Plant Science*, 11, 934. doi:10.3389/fpls.2020.00934.
- Tay, I., Y. Y., Odang, K. B., & Cheung, C. Y. (2021). Metabolic Modeling of the C3-CAM Continuum Revealed the Establishment of a Starch/Sugar-Malate Cycle in CAM Evolution. *Frontiers in Plant Science*, 11, 573197. doi:10.3389/fpls.2020.573197.
- Varshney, R. K., Singh, V. K., Kumar, A., Powell, W., & Sorrells, M. E. (2018). Can genomics deliver climate-change ready crops? *Curr Opin Plant Biol*, 45, 205-211. doi:10.1016/J.PBI.2018.03.007.
- Velez-Ramirez, A. I., van Leperen, W., Vreugdenhil, D., Millenaar, F. F. (2011). Plants under continuous light. *Trends in Plant Science*, 16, (6): 310-318,SSN 1360-1385. doi:10.1016/j.tplants.2011.02.003.
- Winter K. (2019). Ecophysiology of constitutive and facultative CAM photosynthesis. *J Exp. Bot.* 70(22):6495-6508. doi: 10.1093/jxb/erz002. PMID: 30810162.
- Winter, K., & Smith, J. A. C. (2022). CAM photosynthesis: the acid test. *New Phytologist*. 233(2), 599-609. doi:10.1111/nph.17790.
- Yang, X., et al., (2015). A roadmap for research on crassulacean acid metabolism (CAM) to enhance sustainable food and bioenergy production in a hotter, drier world. *New Phytol*, 207: 491-504. doi:10.1111/nph.13393.