



IPICYT
INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTIFICA Y TECNOLÓGICA, A.C

POSGRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES

“Evaluación de la función de los tricomas de
***Astrophytum myriostigma* (Cactaceae)”**

Tesis que presenta

Ana Laura Sepúlveda Cuéllar

Para obtener el grado de

Maestra en Ciencias Ambientales

Director de la Tesis:

Dr. Joel David Flores Rivas

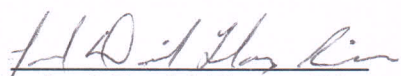
San Luis Potosí, S.L.P.

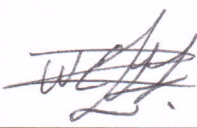
Agosto de 2013




Constancia de aprobación de la tesis

La tesis "*Evaluación de la función de los tricomas de *Astrophytum myriostigma* (Cactaceae)*" fue presentada para obtener el Grado de Maestra en Ciencias Ambientales elaborada por **Ana Laura Sepúlveda Cuéllar** y aprobada el **veintisiete de agosto del dos mil quince** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Ciencias Ambientales del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.


Dr. Joel David Flores Rivas
Director de la tesis


Dra. Nguyen Esmeralda López Lozano
Miembro del Comité Tutorial


Dr. Hugo Magdaleno Ramírez Tobías
Miembro del Comité Tutorial


Dra. Laura Yáñez Espinosa
Miembro del Comité Tutorial



Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en la División de Ciencias Ambientales del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección del Dr. Joel David Flores Rivas.

Durante la realización del trabajo, el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT- 296804).

Este proyecto fue financiado mediante el proyecto CB-2010-01-156205 cuyo responsable técnico es el Dr. Joel David Flores Rivas.



Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 022 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias Ambientales está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 27 días del mes de agosto del año 2015, se reunió a las 12:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dra. Laura Yáñez Espinosa	Presidenta	UASLP
Dra. Nguyen Esmeralda López Lozano	Secretaria	IPICYT
Dr. Hugo Magdaleno Ramírez Tobías	Sinodal externo	UASLP
Dr. Joel David Flores Rivas	Sinodal	IPICYT

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS AMBIENTALES

sustentó la C.

Ana Laura Sepúlveda Cuellar

sobre la Tesis intitulada:

*Evaluación de la función de los tricomas de *Astrophytum myriostigma* (Cactaceae)*

que se desarrolló bajo la dirección de

Dr. Joel David Flores Rivas

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 13:05 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 27 días del mes de agosto de 2015.

Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado

Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico



DEDICATORIA

A mi papá y mamá por todo su apoyo incondicional, por creer en mí, siempre han sido mi ejemplo a seguir. Soy y estoy donde estoy por ustedes.

A mis hermanos por acompañarme, apoyarme en mis locuras y ser mis amigos siempre.

Gracias por todos los sacrificios realizados para cumplir esta meta.

A Carlos por todo el apoyo, los consejos y el cariño, por formar parte de mi familia.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por la beca otorgada durante la maestría (CONACYT-296804).

Al proyecto CB-2010-01-156205 cuyo responsable técnico es el Dr. Joel David Flores Rivas, por financiar la presente tesis.

Al Instituto de Investigación de Zonas Desérticas (IIZD) de la UASLP, en cuyas instalaciones hice los cortes histológicos y los estudios anatómicos en general.

Al Dr. Joel Flores por haberme dado la oportunidad y la confianza de contribuir en este proyecto, por el tiempo, la dedicación y la paciencia que me dedicó a lo largo de la maestría y por esa amistad que me brindó.

A la Dra. Laura Yáñez por sus enseñanzas, buenos consejos y todas las pláticas, gracias no solo por aceptar ser mi asesora también por brindarme su amistad.

A la Dra. Esmeralda López por la enorme paciencia que me tuvo, por todos sus consejos y su amistad.

Al Dr. Hugo Ramírez por aceptar ser miembro de mi comité y por sus consejos.

A la Dra. Claudia González por toda la ayuda a lo largo de este proyecto, por tu tiempo, explicaciones y por todas las risas compartidas. Gracias por tu amistad.

A la técnico M.C Elizabeth Cortez por toda la paciencia, explicaciones y por todas tus atenciones, gracias por tu amistad.

A mis compañeros por toda la ayuda que me brindaron con las tareas cuando no las entendía. Gracias por su apoyo

CONTENIDO

	Pág.
Constancia de aprobación de tesis.....	II
Créditos institucionales.....	III
Acta de examen.....	IV
Dedicatorias.....	V
Agradecimientos.....	VI
Índice.....	VII
Lista de Figuras	X
Resumen.....	XIII
Abstract.....	XV

ÍNDICE

	Página
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Hipótesis.....	4
1.2 Objetivo general.....	4
1.3 Objetivos específicos.....	4
2. MATERIALES Y METODOS.....	5
2.1 Especie de estudio.....	5
2.2 Diseño experimental.....	5
2.3 Efecto de la remoción de los tricomas en la ecofisiología de las plantas de <i>Astrophytum myriostigma</i>	6
2.4 Efecto de la remoción de los tricomas en la anatomía de las plantas de <i>Astrophytum myriostigma</i>	9
2.5 Efecto de la remoción de los tricomas de <i>Astrophytum myriostigma</i> en la densidad de bacterias generales y bacterias fijadoras de nitrógeno de su rizósfera.....	10
2.5.1 Cultivo de bacterias generales y fijadoras de nitrógeno.....	10
2.5.2 Cuantificación de bacterias fijadoras de nitrógeno por métodos moleculares.....	12
2.6 Análisis estadísticos.....	13
3. RESULTADOS.....	14
3.1 Efecto de la remoción de los tricomas en la ecofisiología de las plantas de <i>Astrophytum myriostigma</i>	14
3.2 Efecto de la remoción de los tricomas en la anatomía de las plantas de <i>Astrophytum myriostigma</i>	24
3.3 Efecto de la remoción de los tricomas de <i>Astrophytum myriostigma</i> en la densidad de bacterias generales y bacterias fijadoras de nitrógeno de su rizósfera.....	34
4. DISCUSION.....	37

5. CONCLUSIONES.....	42
6. LITERATURA CITADA.....	44

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Síntomas de deshidratación después de la remoción de los tricomas de <i>A. myriostigma</i>	14
Figura 2. Efecto de la remoción de tricomas en la eficiencia cuántica efectiva del fotosistema II.	15
Figura 3. Efecto de la remoción de tricomas en la eficiencia cuántica efectiva del fotosistema II (Φ_{PSII}) a través del tiempo.	15
Figura 4. Efecto de la remoción de tricomas en la eficiencia cuántica máxima del fotosistema II (F_v/F_m).....	16
Figura 5. Efecto de la remoción de tricomas en la F_v/F_m a través del tiempo.....	16
Figura 6. Efecto de la remoción de tricomas en la tasa de transporte de electrones (ETR).....	17
Figura 7. Efecto de la remoción de tricomas en el ETR a través del tiempo.....	17
Figura 8. Efecto de la remoción de tricomas en la conductancia estomática al inicio del experimento.	18
Figura 9. Efecto de la remoción de tricomas en la conductancia estomática al final del experimento.....	19
Figura 10. Concentraciones de clorofila <i>a</i> en plantas de <i>A. myriostigma</i> con y sin tricomas.....	21
Figura 11. Concentraciones de clorofila <i>b</i> en plantas de <i>A. myriostigma</i> con y sin tricomas.	21
Figura 12. Concentraciones de clorofila <i>a+b</i> en plantas de <i>A. myriostigma</i> con y sin tricomas.	22
Figura 13. Concentraciones de clorofila <i>a/b</i> en plantas de <i>A. myriostigma</i> con y sin tricomas.	22
Figura 14. Concentraciones de clorofila <i>a+b</i> /carotenoides en plantas de <i>A. myriostigma</i> con y sin tricomas.	23

.....

Figura 15. Planta con tricomas y desaparición de la capa 24
frontera.....

Figura 16. Tricoma ubicado en la invaginación de la epidermis sobre la 24
cutícula y tricoma ausente donde se observa la cutícula intacta sobre la
invaginación.....

Figura 17. Estructuras anatómicas: Médula, colénquima e hipodermis, cilindro 25
vascular con haces vasculares y haces vasculares de la raíz.....

Figura 18. Sección longitudinal de cilindro vascular y médula intactos con 26
sistema radical en planta con tricomas y cilindro vascular y médula contraídos
con proliferación de raíces en planta sin tricomas.....

Figura 19. Sección transversal de la planta mostrando: Médula contraída de 27
plantas sin tricomas y médula intacta de plantas con
tricomas.....

Figura 20. Sección trasversal donde se aprecia la cutícula en planta con 28
tricomas y sin
tricomas.....

Figura 21. Sección transversal donde se aprecia la hipodermis con tricomas y 28
sin
tricomas.....

Figura 22. Sección trasversal donde se aprecia la hipodermis con los canales 29
de mucílago con tricomas y sin tricomas.....

Figura 23. Sección transversal donde se observa la distancia de los haces 29
vasculares a parénquima con tricomas y sin
tricomas.....

Figura 24. Efecto de la remoción de tricomas en el número de 30
cloroplastos.....

Figura 25. Formación de peridermis suberificada en los tallos en plantas sin 31
tricomas.....

Figura 26 Sección longitudinal donde se observa células de parénquima en 31
plantas con tricomas y plantas sin tricomas.....

Figura 27. Sistema vascular de plantas con tricomas, a) y b) cilindro vascular 32
de plantas con tricomas, c) y d) traqueidas de banda ancha, e) vasos del

cilindro= vasos vascular y f)	
vasos.....	
Figura 28. Sistema vascular de plantas sin tricomas. a) Cilindro vascular contraído con parénquima colapsado pierde la organización circular, b) detalle del xilema colapsado, c) haz vascular con TBA rodeando los vasos, d) detalle de las TBA rodeando los vasos, e) TBA contraídas f) detalle de la contracción del parénquima.....	33
Figura 29. Frecuencia de haces vasculares (flecha) en: a) planta con tricomas y b) planta sin tricomas.	33
Figura 30. Efecto de la remoción de tricomas en la abundancia de bacterias heterotróficas generales (UFC).	34
Figura 31. Efecto de la remoción de tricomas en la abundancia de bacterias fijadoras de nitrógeno.....	35
Figura 32. Amplificación de PCR para verificar la presencia del gen <i>NifH</i> :.....	35
Figura 33. Número de copias de bacterias fijadoras de nitrógeno entre tratamientos.	36
Figura 34. Raíces de <i>A. myriostigma</i> con nódulos de bacterias: apariencia externa y apariencia a detalle.....	36
Figura 35. Diagrama del efecto de la remoción de los tricomas en los tallos de <i>A. myriostigma</i> en las respuestas ecofisiológicas y anatómicas.....	42

RESUMEN

Los tricomas son protuberancias que se encuentran en diferentes partes de la epidermis de muchas especies de plantas, los cuales les permiten tolerar condiciones de estrés abiótico como alta radiación solar y sequía. En algunos casos, los tricomas cubren el tallo completo, como en el caso del cactus *Astrophytum myriostigma*. La presente investigación tiene como objetivo determinar la función de los tricomas de *A. myriostigma*, evaluando su efecto en la ecofisiología y anatomía de la planta, así como en la interacción bacterias-rizósfera. Se realizaron dos tratamientos: plantas con tricomas y plantas sin tricomas, a estas últimas les fueron removidos los tricomas con ayuda de una navaja de microtomo sin dañar la cutícula. Se evaluaron diversas respuestas relacionadas con la ecofisiología de la planta como la eficiencia cuántica máxima del fotosistema II (F_v/F_m), la eficiencia cuántica efectiva del PSII (Φ_{PSII}), la tasa de transporte de electrones (ETR, por sus siglas en inglés), los pigmentos fotosintéticos, el potencial osmótico (como estimador del potencial hídrico de la planta) y la conductancia estomática. Se determinaron modificaciones anatómicas en las plantas en respuesta al estrés ocasionado por la remoción de los tricomas. Por último, se realizó el estudio de densidad de bacterias mediante cultivo en placa y métodos moleculares mediante qPCR por la orientación del gen *nifH*, utilizando los primers FPGH19 y polr en las plantas con y sin tricomas. Al remover los tricomas la capa frontera estuvo ausente y se observó una deshidratación aparente. Se encontró también, al final del experimento, disminución de la eficiencia cuántica efectiva del fotosistema II (Φ_{PSII}), de la tasa de transporte de electrones, de las clorofilas *a*, *b* y totales, de la clorofila *a/b*, *a/b* y del número de cloroplastos, lo que nos indica que los fotosistemas se vieron afectados. Además, se observó un aumento de raíces adventicias y se encontró un aumento en el número de bacterias fijadoras de nitrógeno, lo cual indica que cuando las plantas están estresadas la abundancia de bacterias aumenta para ayudar a tolerar el estrés abiótico. Las plantas sufrieron modificaciones anatómicas como la disminución del número de cloroplastos, el aumento de la frecuencia de vasos en el tallo y el que éstos se encontraran más cercanos a parénquima, además de que

mostraron contracción del cilindro vascular sin colapsarse. Estos resultados ayudan a explicar el por qué no hubo diferencias en potencial osmótico y conductividad hidráulica. Al final del experimento tampoco se encontraron diferencias en conductancia estomática, lo cual podría explicarse por el hecho de que se formó una peridermis suberificada en las plantas sin tricomas. En síntesis, la función de los tricomas de *A. myriostigma* es tanto evitar la pérdida de agua como dar sombreado a las plantas, por lo que la remoción de tricomas afecta su fisiología y su anatomía. Sin embargo, cuando las plantas se encuentran estresadas el número de bacterias fijadoras de nitrógeno aumenta, con el fin de ayudar a tolerar el estrés.

Palabras clave: *Astrophytum myriostigma*, bacterias fijadoras de nitrógeno, contracción de médula, eficiencia fotosintética, haces vasculares, pigmentos, tricomas.

ABSTRACT

Trichomes are protuberances located in different parts of the epidermis of many plant species, which allow them to tolerate abiotic stress conditions such as high solar radiation and drought. In some cases, trichomes cover the entire stem, such as in the cactus *Astrophytum myriostigma*. This research aims to determine the role of trichomes of *A. myriostigma*, assessing their impact on the ecophysiology and anatomy of the plant as well as the bacteria-rhizosphere interaction. There were two treatments: plants with trichomes and plants without them. Trichomes were removed using a microtomo knife without damaging the cuticle. Several response variables related to plant ecophysiology were evaluated, like maximum quantum efficiency of photosystem II (F_v/F_m), effective quantum efficiency of PSII (ϕ PSII), electron transport rate (ETR), photosynthetic pigments, osmotic potential (as an estimator of water potential), and stomatal conductance. Anatomical changes in plants without trichomes were determined. Density of bacteria in plants with and without trichomes was performed by culture in Petri dishes and molecular methods through qPCR by the orientation of the gen *nifH*, using the primers FPGH19 and polr. In plants without trichomes the border layer was absent and an apparent dehydration was observed. At the end of the experiment, plants without trichomes had a decrease in Φ_{PSII} , ETR, chlorophylls *a* and *b*, *a/b*, total chlorophyll, and chloroplast number, indicating that the photosystems were affected. Plants without trichomes had also high roots and high number of nitrogen-fixing bacteria, which seem to indicate that when plants are stressed they increase bacteria density to help tolerate abiotic stress. Anatomical changes to protect the plant without trichomes were observed, such as low chloroplast number, low vessel number, vessels closer to the parenchyma, contraction of the pitch, and contraction of the vascular system but without collapsing. These findings help to explain the similar osmotic potential and hydraulic conductivity in plants with trichomes and without them. Similar stomatic conductance was also found, which could be explained by the fact that a suberificated peridermis was shaped in plants without trichomes. In conclusion, the function of the trichomes in *A. myriostigma* is to prevent water loss by shading the plant; thus, trichome removal negatively affects

plant physiology and anatomy. However, when plants are stressed (without trichomes) they increase the number of nitrogen-fixing bacteria in order to help tolerate stress.

Key words: *Astrophytum myriostigma*, contraction of the pitch, nitrogen-fixing bacteria, photosynthetic efficiency, pigments, trichomes, vascular system.

1. INTRODUCCIÓN

México posee la mayor riqueza de especies de la familia Cactaceae, con un índice alto de endemismo tanto a nivel genérico (73%) como a nivel específico (78%), por lo que estas especies son elementos importantes en la estructura y dinámica de las comunidades en las regiones áridas y semiáridas del país (Hernández y Godínez, 1994). Sin embargo muchas de estas plantas están sujetas a presiones de colecta y a la destrucción de su hábitat; en consecuencia, un número significativo de estas especies están dentro de los listados de plantas en categoría de riesgo (Hernández y Godínez, 1994; Guzmán *et al.*, 2003).

Las cactáceas poseen características anatómicas, morfológicas y fisiológicas únicas que les permiten tolerar condiciones climáticas extremas y completar su ciclo de vida, como son succulencia de tallos, fotosíntesis CAM, cutícula gruesa, espinas y tricomas que aparentemente interceptan parte de la radiación solar (Gibson y Nobel, 1986). De todas las características mencionadas, los tricomas son de las menos estudiadas, pero se ha generalizado que estas estructuras son una adaptación que han adquirido algunas plantas para sobrevivir en ambientes extremos (Benzing, 1976; Tissier, 2012). Los tricomas son protuberancias en la epidermis de las plantas y son altamente variables en forma, citología y función (Uphof, 1962; Johnson, 1975; Spring, 2000; Wagner *et al.*, 2004). Según su función, se han reconocido dos grupos: i) como adaptaciones al medio ambiente, y ii) como mecanismo de defensa físico-químico contra patógenos o depredadores (Johnson, 1975).

Los tricomas pueden ser estructuras simples o multicelulares que se originan de células epidérmicas de los tejidos de las plantas (Fahn, 2000). Estas estructuras se encuentran en diferentes superficies de casi todas las angiospermas y pueden alterar la capa frontera por encima de la superficie de la hoja ó tallo fotosintético, teniendo una o varias funciones como la disminución de la transpiración; la regulación de la temperatura a través de la reducción de la absorción de energía radiante o por aumento de la disipación de energía; así como la interceptación de luz y la toma de agua del rocío (Fahn, 1986; Aschenbrenner *et al.*, 2013). Sin embargo, la efectividad de estas funciones

depende de las características morfológicas y mecánicas de los tricomas, como densidad, tamaño, forma, textura de su superficie y orientación (Ehleringer, 1984; Wagner *et al.*, 2004).

Diversas cactáceas están asociadas con microorganismos en su rizósfera, la simbiosis planta-rizósfera es benéfica para el desarrollo tanto de la planta como de los microorganismos ya que estas tienen un efecto a partir de las raíces de las plantas sobre el suelo circundante, afectando la biología y química del suelo. Se estima que las plantas liberan a través de sus exudados radicales entre un 20% y 48% de sus productos fotosintéticos entre ellos azúcares solubles, aminoácidos, hormonas, vitaminas, ácidos orgánicos entre otros; estos son factores claves en las tasas de crecimiento de los microorganismos (Uren, 2001). La densidad bacteriana de la rizósfera es generalmente mucho mayor que la densidad bacteriana del resto del suelo debido a la elevada concentración de nutrientes que aporta la planta en esta zona (Bais *et al.*, 2006) y los microorganismos que participan en la transformación de compuestos orgánicos e inorgánicos y en la movilidad de los macro y micronutrientes, producen hormonas promotoras del crecimiento, estimulan la germinación de las semillas y protegen a las plantas de estrés hídrico y abiótico (Wolfe y Klinomoros, 2005; Morell y Hernández, 2008).

En la rizósfera pueden existir diferentes tipos de bacterias, unas de las más importantes son las fijadoras de nitrógeno, debido a que pueden aprovechar directamente el nitrógeno del aire originando compuestos absorbibles y susceptibles de incorporarse a la composición del suelo (Calvo, 2004). Además de este tipo de bacterias, en la rizósfera de las cactáceas también puede haber bacterias que disuelven fósforo y hierro, e incluso que producen hormonas vegetales. Sin embargo, los estudios aún son pocos en comparación con el número de especies en la familia, alrededor de 1800 (Puente *et al.*, 2004a,b, 2009; López *et al.*, 2009, 2012).

Astrophytum myriostigma Lem. es una cactácea que está catalogada en riesgo de extinción según la NOM-059-SEMARNAT-2010, debido al saqueo sistemático de sus individuos en el campo (SEMARNAT, 2010). Esta especie se encuentra ampliamente distribuida en matorrales rosetófilos en los estados de San

Luis Potosí, Coahuila, Nuevo León y Tamaulipas; en San Luis Potosí se encuentra principalmente en los municipios de Guadalcázar y Matehuala (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991). El género *Astrophytum* surgió hace aproximadamente 11.5 millones de años (Hernández-Hernández *et al.*, 2014), todas las especies de este género presentan tricomas y alguna de ellas tienen espinas (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991; Anderson, 2001). *Astrophytum myriostigma* es una especie que se caracteriza por la presencia de tricomas en toda su superficie, sin presentar espinas (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991; Anderson, 2001).

Es probable que los tricomas de *Astrophytum myriostigma*, en conjunto con la acción de las bacterias de su rizósfera, le otorguen tolerancia a diferentes tipos de estrés abiótico. Lux y Kopunec (1992) estudiaron plantas de *Astrophytum myriostigma* y *Astrophytum ornatum* con y sin tricomas (a las últimas se les quitaron manualmente) y encontraron que sus tricomas están adaptados a tomar agua en fase gaseosa (neblina), al encontrar casi 10 veces mayor toma de agua en la fase gaseosa en superficies con tricomas que sin tricomas. Sin embargo, los autores no realizaron estudios sobre modificaciones anatómicas y efectos sobre su fisiología por la pérdida de tricomas. López *et al.* (2011) mencionan que existe una relación directa entre el correcto funcionamiento de los cactus y la biota del suelo, sin embargo se desconoce cuáles son los efectos de las modificaciones anatómicas y fisiológicas en las poblaciones bacterianas. Es necesario realizar estudios para determinar la función de los tricomas en la ecofisiología y anatomía de la planta, e inclusive conocer si los tricomas influyen en la abundancia de bacterias generales y específicas fijadoras de nitrógeno. Todos estos resultados pueden ayudar a comprender mejor las adaptaciones que han llevado a la supervivencia de *A. myriostigma* en los ambientes áridos y semiáridos.

1.1 Hipótesis

- Los tricomas de *Astrophytum myriostigma* le darán protección contra la alta radiación solar y la pérdida de humedad por transpiración, por lo tanto tendrán un mejor desarrollo tanto fisiológico como anatómico y, al no estar estresadas, no mostrarán alta abundancia de bacterias generales y bacterias fijadoras de nitrógeno en su rizósfera.

1.2 Objetivo general

- Determinar la función de los tricomas de *Astrophytum myriostigma*, evaluando su efecto en la ecofisiología y anatomía de la planta, así como en la interacción bacterias-rizósfera.

1.3 Objetivos específicos

- Determinar la función de los tricomas a partir de la remoción de éstos en la ecofisiología de las plantas de *Astrophytum myriostigma*.
- Evaluar el efecto de la remoción de los tricomas en la anatomía de las plantas de *Astrophytum myriostigma*.
- Determinar la abundancia de bacterias generales y fijadoras de nitrógeno en la rizósfera de *A. myriostigma* con y sin tricomas, por medio de métodos dependientes de cultivo y por métodos moleculares.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Especie de estudio

Astrophytum myriostigma es comúnmente llamada bonete o birrete de obispo. En esta especie una sección transversal del tallo revela una forma perfecta en forma de estrella con una altura de 10 a 60 cm y un diámetro de 10 a 20 cm, tallo simple o cespitoso, globoso hasta cilíndrico con aristas desde muy agudas a ligeramente redondeadas con surcos bien marcados, espinas ausentes. Presenta tricomas blancos de manera variable, a veces tupido, en otros glabros, unicelulares o multicelulares lo que le proporciona una textura aterciopelada al tacto y apariencia ceniza son considerados como estructuras que ayudan en la absorción de agua (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991).

2.2 Diseño experimental

Se colocaron plantas de *Astrophytum myriostigma* de aproximadamente 10 cm de alto en el invernadero de la División de Ciencias Ambientales del IPICYT, bajo riego semanal a capacidad de campo. El diseño experimental incluye plantas con tricomas (n = 60) y plantas sin tricomas (n = 60). Los tricomas fueron removidos mediante el raspado del tallo utilizando una navaja de microtomo y observando en un microscopio estereoscópico (Leica EZ4).

Se evaluaron semanalmente diversas respuestas relacionadas con la fisiología en plantas con y sin tricomas (n = 10 por tratamiento): la eficiencia cuántica máxima del fotosistema II (F_v/F_m), la eficiencia cuántica efectiva del PSII (ϕ_{PSII}) y la tasa de transporte de electrones. También se evaluaron otras variables al inicio y al final del experimento (n = 5): los pigmentos fotosintéticos, el potencial osmótico y la conductancia estomática. La conductividad hidráulica se evaluó únicamente al inicio del experimento. También se determinaron modificaciones anatómicas en las plantas sin tricomas en respuesta al estrés ocasionado por la remoción. Por último, se realizó el estudio de densidad de bacterias mediante cultivo en placa y métodos moleculares en las plantas con y sin tricomas.

2.3 Efecto de la remoción de los tricomas en la ecofisiología de las plantas de *Astrophytum myriostigma*

Se evaluó la eficiencia cuántica máxima del fotosistema II (F_v/F_m) y la eficiencia cuántica efectiva del PSII (Φ_{PSII}) durante dos meses y medio, utilizando un fluorómetro de pulso de amplitud modulada (MiniPaM, Walz) y realizando las mediciones en plantas con y sin tricomas.

Para estimar la eficiencia cuántica máxima del fotosistema II (F_v/F_m), previamente se aclimataron las plantas a la oscuridad por 30 minutos, con el fin de garantizar que todos los centros de reacción del PSII estuvieran abiertos. F_v/F_m se estimó como $F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$, donde F_v = fluorescencia variable determinada en oscuridad, F_m = nivel máximo de fluorescencia medido en oscuridad, y F_0 = nivel mínimo de fluorescencia medido en oscuridad (Maxwell y Johnson, 2000).

La eficiencia fotosintética efectiva del PSII o el rendimiento cuántico efectivo se estima como $\Phi_{PSII} = (F'_m - F_t)/F'_m$, donde F_t es la fluorescencia de la clorofila emitida por las plantas bajo iluminación de estado estable (i.e., las condiciones de luz en el campo) y F'_m es la fluorescencia máxima emitida por la clorofila cuando un pulso de saturación de luz actínica es sobrepuesto a los niveles de luz ambiental (Genty *et al.*, 1989; Aragón-Gastélum *et al.*, 2014).

Las dos variables anteriores son consideradas como indicadoras de pérdida de la función a nivel del aparato fotosintético, sus valores óptimos oscilan entre 0.80 y 0.83 si el estrés ambiental es mínimo en las plantas, pero estos valores disminuyen con el incremento del estrés (Maxwell y Johnson, 2000; Aragón-Gastélum *et al.*, 2014).

La tasa de transporte de electrones (ETR, por sus siglas en inglés) es calculada por la ecuación $ETR = \Phi_{PSII} \times FFF \times 0.84 \times 0.5$ (Genty *et al.*, 1989) donde el valor de 0.5 considera igual distribución de los fotones absorbidos por los dos fotosistemas; FFF es el flujo de fotones fotosintéticos registrado por el sensor en el clip de la hoja y 0.84 es la proporción media estimada de la luz incidente absorbida por los fotosistemas (Ehleringer, 1981). Debido a que la ETR está directa y positivamente relacionado con la generación de energía química (ATP y NADPH/H+) que será usada posteriormente en el Ciclo de Calvin, valores

menores de esta variable son indicadores de comportamiento fotosintético reducido (Ritchie y Bunthawin, 2010; Aragón-Gastélum *et al.*, 2014).

También se evaluaron los pigmentos fotosintéticos, los cuales son sustancias capaces de captar energía lumínica y de transformarla en energía química mediante la fotosíntesis. Los pigmentos principales son las clorofilas, las cuales son las responsables de la absorción energética, pero también existen otros pigmentos accesorios, los carotenoides, los cuales son los encargados de disipar de forma no dañina el exceso de energía absorbida (Manrique, 2003). La clorofila total es la suma de las clorofilas *a* y *b*, donde *a* clorofila *a* es el pigmento principal que transforma la energía lumínica en energía química, la cual se utiliza en el crecimiento de las plantas, por lo que se considera un pigmento activo. Por su parte, la clorofila *b* absorbe la luz en longitudes de onda diferentes que la clorofila *a*; la luz se transfiere después a la clorofila *a*, que la transforma en energía; por esto, a la clorofila *b* se le considera un pigmento accesorio y forma parte de las antenas colectoras. La disminución en la intensidad de la luz reduce la actividad fotosintética y la concentración de clorofila *b* tiende a ser mayor, afectando la relación de clorofilas *a/b* dentro de la planta (Cambrón-Sandoval *et al.*, 2011). La relación clorofila/carotenoides es un indicador del papel fotoprotector de los carotenoides en plantas aclimatadas a alta radiación solar, ya que valores altos de ésta se corresponden con un predominio de las coloraciones verdes sobre las amarillas, lo que generalmente implica que la planta se encuentra en buenas condiciones fisiológicas (Val *et al.*, 1986; Pandey *et al.*, 2003). En cambio, valores bajos de esta proporción indican que la planta tiene gran cantidad de carotenoides, lo que indica que está estresada (Klem *et al.*, 2015).

Se realizaron las extracciones de pigmentos al inicio y al final del experimento. Los pigmentos fueron extraídos mediante al procedimiento de Hendry y Price (1993). Se cortaron 50 mg del vértice de las costillas (peso fresco) y se maceraron en 2 ml de acetona al 80%. La absorbancia de los extractos se midió con un espectrofotómetro (Beckman Coulter DU650). Las lecturas se realizaron a 645 nm y 663 nm para clorofilas y a 470 nm para carotenoides totales.

La concentración de los pigmentos fue calculada de acuerdo a Henry y Price (1993) para clorofilas y a Wellburn (1994) para carotenoides.

Otra variable de respuesta evaluada es el potencial osmótico, el cual es uno de los componentes del potencial de agua y su determinación se basa principalmente en el cambio de las propiedades físicas y químicas de ésta debido a la presencia de solutos; al aumentar la concentración de la solución la presión osmótica también aumenta, el punto de congelación desciende, la presión de vapor disminuye y el punto de ebullición aumenta (Larqué-Saavedra y Trejo, 1990). En esta investigación se evaluó el potencial osmótico como una estimación del potencial hídrico de las plantas. Se cortaron dos costillas del tallo de 5 plantas con y sin tricomas y éstas se cortaron en trozos pequeños. El potencial osmótico se midió al inicio y al final del experimento con un potenciómetro de punto de rocío (WP4 C).

Una variable muy importante para evaluar el estado hídrico de la planta, el balance de energía y las relaciones fotosintéticas es la conductancia estomática. Este proceso comprende la evaporación del agua desde las células superficiales en el interior de los espacios intercelulares y su difusión fuera del tejido vegetal principalmente a través de los estomas y, junto al intercambio de dióxido de carbono, determina la eficiencia de uso del agua de una planta (Squeo y Leon, 2007). Esta variable se midió con un porómetro (SC-1) al inicio y al final del experimento en seis plantas con y seis plantas sin tricomas, con mediciones cada tres horas en un lapso de 24 horas.

Otra variable de respuesta evaluada es la conductividad hidráulica, que es el parámetro más utilizado para estudiar el transporte y la mecánica de los fluidos dentro de los vasos conductores de la planta, el cual depende de las dimensiones de los elementos de vaso y de las conexiones inter-conductos (Pire *et al.*, 2007). Se utilizó una cámara de presión para medir la conductancia, inyectando 3 ml de toluidina hacia los haces vasculares de plantas con y sin tricomas, midiendo la presión, el tiempo, la longitud y el diámetro.

2.4 Efecto de la remoción de los tricomas en la anatomía de las plantas de *Astrophytum myriostigma*

- 1) Se realizaron cortes en cinco plantas con tricomas y cinco sin tricomas para evaluar las respuestas anatómicas. Se cortó una parte de 0.5 del vértice de una costilla de cada planta y se colocaron en tubos Eppendorf. Las muestras fueron fijadas con glutaraldehído al 2%, posteriormente se deshidrataron en una serie etanólica 30-100% con recambios cada 24 horas y se infiltraron en una serie de solución etanol absoluto y glicometraclirato 30-100% en periodos de 24 horas, se incluyeron y se realizaron cortes de 5 μm de grosor mediante un micrótopo rotatorio (Leica RM2125RT). Por último, las muestras fueron teñidas con brilliant cresyl blue para posteriormente ser observadas en un microscopio óptico (Leica EZ4D). Se realizaron mediciones y/o conteos de grosor de la cutícula, longitud colénquima, distancia de haces vasculares, número y área de canales de mucílago y número de cloroplastos mediante el programa de Image J:

Posteriormente, se realizaron cortes de cinco plantas con tricomas y cinco sin ellos, previamente deshidratadas en serie etanólica 30-100%, y se tiñeron con rojo de safranina (30 minutos) y colorante verde rápido para observar si existían diferencias en haces vasculares, células de parénquima y contracción de médula.

2.5 Efecto de la remoción de los tricomas de *Astrophytum myriostigma* en la densidad de bacterias generales y bacterias fijadoras de nitrógeno de su rizósfera

2.5.1 Cultivo de bacterias generales y fijadoras de nitrógeno

Cuando se requiere investigar el contenido de microorganismos se utiliza la técnica de cultivo en placa, esta técnica no pretende detectar a todos los microorganismos presentes por el medio de cultivo pero permite seleccionar grupos de bacterias cuya presencia es importante (Camacho *et al.*, 2009). Se tomó suelo de alrededor de la raíz de plantas con tricomas y sin tricomas (n=10) al final del experimento para determinar las poblaciones de bacterias fijadoras de nitrógeno. La evaluación de la densidad de poblaciones bacterianas en el suelo rizosférico se realizó mediante el método de conteo de colonias (Miles y Misra, 1938), teniendo cuatro tratamientos: 1) Con tricomas, 2) Sin tricomas, 3) Muertas y 4) Suelo. Se utilizaron diluciones seriadas, para seleccionar las diluciones adecuadas; se realizó un cultivo en placa con cinco diferentes diluciones (10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 y 10^5). Las diluciones seleccionadas fueron 10^3 y 10^4 , donde se diluyeron 1 g de suelo en 9 ml de buffer de fosfato estéril y se sembraron en cajas de Petri (50 μ l) con medio de cultivos específicos por duplicado en cada dilución. Los medios se muestran en las Tabla 1 y 2.

Tabla 1. Medio TSA para conteo de bacterias heterotróficas generales

Medio de cultivo TSA	(g)/L
Extracto de levadura	10.0
Peptona de caseína	15.0
Agar bacteriológico	13.5
Sodio de sulfito	1.0
Hierro (III) citrato	0.5
Polimixina B sulfato	0.05
pH final	7.0

Tabla 2. Medio Rennie para crecimiento de bacterias cultivables fijadoras de nitrógeno

Medio de cultivo Rennie (1981) BFNA		Medio de cultivo Rennie (1981) BFNA	
		Solución A	(g)
Medio de cultivo Rennie (1981) BFNA	Solución A		(g)
	K₂HPO₄		0.8
	KH₂PO₄		0.2
	NaCl₂		0.1
	NaFeEDTA		0.028
	Na₂MoO₄•2H₂O		0.025
	Extracto de levadura		0.025
	Manitol		5.0
	Sacarosa		5.0
	Lactato de sodio (60% v/v)		0.5
Agua destilada		900	
Agar		15	
Solución B	(g)		
MgSO₄H₂O	0.2		
CaCl₂	0.06		
Agua destilada	100ml		

Las cajas de Petri fueron incubadas dependiendo de las diluciones, 10^{-3} durante 48 horas y 10^{-4} durante 72 horas. Posteriormente se realizó el conteo de las unidades formadoras de colonias (UFC) que lograron crecer en los medios de cultivo y se realizaron los cálculos para saber el número de colonias por gramo de suelo.

2.5.2 Cuantificación de las comunidades microbianas fijadoras de nitrógeno

Dado que en los métodos de cultivo de bacterias no se logra obtener la cantidad real de los microorganismos, los métodos moleculares ayudan a obtener resultados más exactos utilizando un análisis de la secuencia de gen *NifH* a partir de ADN proveniente de las muestras. La reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real es la técnica más sensible para la detección de número ácidos nucleicos (Mullis, 1990), es una técnica que combina la amplificación y la detección en un mismo paso, al correlacionar el producto de la PCR de cada uno de los ciclos con una señal de intensidad de fluorescencia (Brechtbuehl *et al.*, 2001).

Se tomó suelo circundante de la raíz de diez plantas teniendo tres tratamientos: 1) plantas con tricomas, 2) plantas sin tricomas y 3) plantas muertas, teniendo suelo como control. Se realizó la extracción del ADN del suelo mediante el kit Powersoil® DNA Isolation de MOBIO.

La abundancia de las fijadoras de nitrógeno se cuantificó mediante qPCR por la orientación del gen *nifH*, utilizando los primers FPGH19 (Simonet *et al.*, 1991) y *polr* (Poli *et al.*, 2001). Se realizó la cuantificación absoluta de cada muestra de suelo utilizando un PCR en tiempo real System StepOne (4376600, Applied Biosystems, Carlsbad, CA) con las siguientes temperaturas: 1) 94 °C 10 min, 2) 94 °C 1 min, 3) 59 °C 1min y 4) 72 °C 2 min, los pasos 1, 2 y 3 se repitieron por 40 ciclos, finalmente 5) 72 °C 3 min y 6) 12 °C. Se prepararon tres reacciones por repetición utilizando SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). La especificidad de los productos de amplificación se confirmó por análisis de la curva de fusión y el tamaño esperado (~ 400 pb) de los fragmentos amplificados se comprobó en un gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio. Las curvas estándar se obtuvieron usando diluciones seriadas de un fragmento del vector del plásmido el cual contiene un fragmento clonado del gen de *Geobacter sulfurreducens* (pGEM-T Vector Systems, Promega, Madison, WI). Las concentraciones del primer se optimizaron con cerca de 100% de eficiencia. La inhibición en las reacciones de PCR se ensayó mediante la mezcla de diluciones seriadas de ADN extraído de suelo contra una cantidad conocida de ADN estándar

antes de qPCR. Los valores de Ct del DNA estándar no cambiaron en presencia de la ADN suelo diluido, indicando la ausencia de inhibición severa.

2.6 Análisis estadísticos

Se realizaron ANOVAS de medidas repetidas para todas las variables ecofisiológicas que se midieron al inicio y al final (pigmentos y potencial osmótico) y las dos que se midieron semanalmente (eficiencia cuántica máxima del fotosistema II (F_v/F_m) y eficiencia fotosintética efectiva del PSII (Φ_{PSII})). Las variables ecofisiológicas, las anatómicas y la abundancia de bacterias, las cuales se evaluaron una sola vez al final del experimento, se evaluaron con ANOVAs de una vía. Los datos de abundancia de bacterias cultivables fueron transformados usando el logaritmo natural, con el fin de cumplir con los requisitos de homogeneidad de varianzas y homocedasticidad para realizar las ANOVAS. En los casos en que se encontraron efectos significativos, se realizaron pruebas de Tukey para encontrar diferencias entre los tratamientos. Para realizar los análisis se utilizó el programa STATISTICA 8.

3. RESULTADOS

3.1 Efecto visual de la remoción de los tricomas

Las plantas tuvieron un cambio de coloración a rojo, naranja o verde oscuro media hora después de la remoción. Transcurridos dos días y medio, las plantas sufrieron aparente deshidratación como resultado de la remoción de los tricomas (Fig. 1).

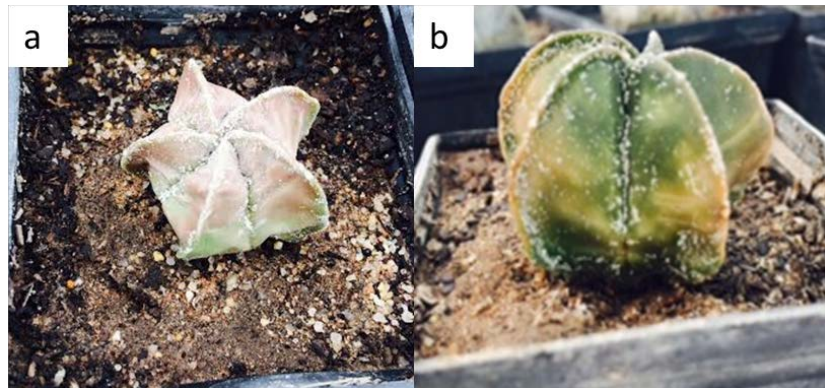


Figura 1. Síntomas de deshidratación después de la remoción de los tricomas de *A. myriostigma*.

3.2 Efecto de la remoción de los tricomas en la ecofisiología de las plantas de *Astrophytum myriostigma*

Para el potencial osmótico, no hubo efectos significativos de la remoción de tricomas ($F = 0.72$; $P = 0.42$), de la fecha de medición ($F = 2.51$; $P = 0.15$), ni de la interacción entre ambos factores ($F = 2.38$; $P = 0.16$). Se encontraron promedios de -1.13 ± 0.10 MPa al inicio y -1.11 ± 0.080 MPa al final en plantas con tricomas y -1.50 ± 0.24 MPa al inicio y -1.21 ± 0.11 MPa al final en plantas sin tricomas. En cuanto a conductividad hidráulica, la cual se hizo solamente al inicio del experimento, tampoco se encontraron diferencias entre las plantas con y sin tricomas ($F = 3.96$; $P = 0.081$), teniendo promedios de 0.003 ± 0.001 mmol/m².seg con tricomas y 0.008649 ± 0.0016 mmol/m².seg sin tricomas.

La eficiencia cuántica efectiva del fotosistema II (Φ_{PSII}) fue significativamente afectada por la remoción de los tricomas ($F = 20.449$; $P = 0.0002$; Fig. 2), por las fechas de medición ($F = 4.150$; $P < 0.0001$; Fig. 2) y por la interacción tratamiento x fecha ($F = 4.15$; $P = 0.00007$). En las plantas sin tricomas se fue observando una disminución semana a semana por debajo de los niveles óptimos (0.8), lo que nos indica que la Φ_{PSII} se vio afectada por el estrés causado por la remoción de los tricomas (Fig. 3).

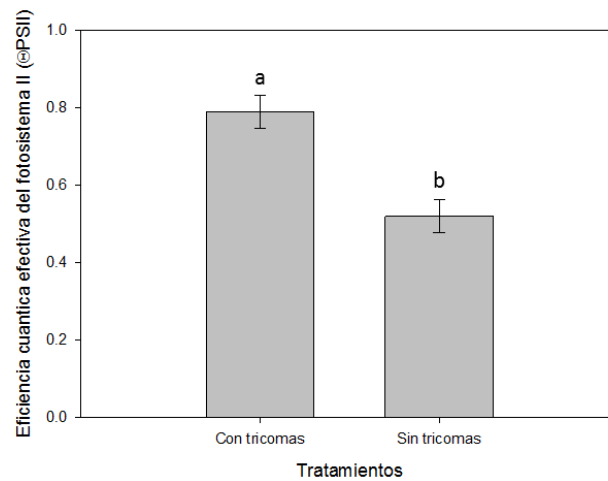


Figura 2. Efecto de la remoción de tricomas en la eficiencia cuántica efectiva del fotosistema II.

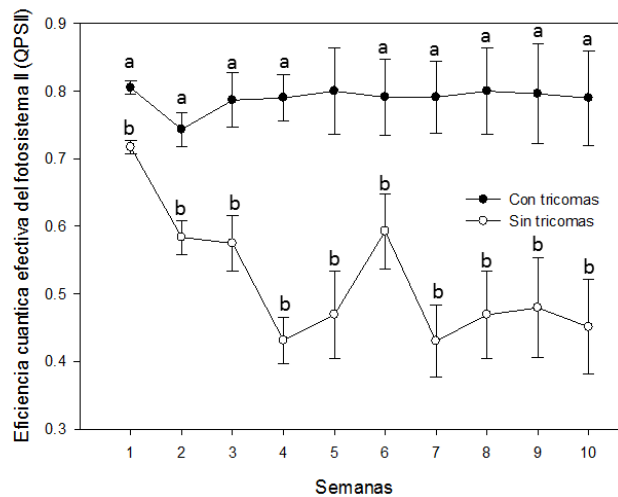


Figura 3. Efecto de la remoción de tricomas en la eficiencia cuántica efectiva del fotosistema II (Φ_{PSII}) a través del tiempo.

La eficiencia cuántica máxima del fotosistema II (F_v/F_m) fue afectada por los tratamientos ($F = 10.84$; $P = 0.004$; Fig. 4), estando por debajo del nivel óptimo en las plantas sin tricomas. Con el paso de las semanas hubo una disminución de F_v/F_m en las plantas sin tricomas, pero no fue estadísticamente significativa ($F = 1.89$; $P = 0.056$; Fig. 5), sin embargo no hubo diferencias significativas entre la interacción fecha X tratamiento ($F = 1.795$; $P = 0.072$).

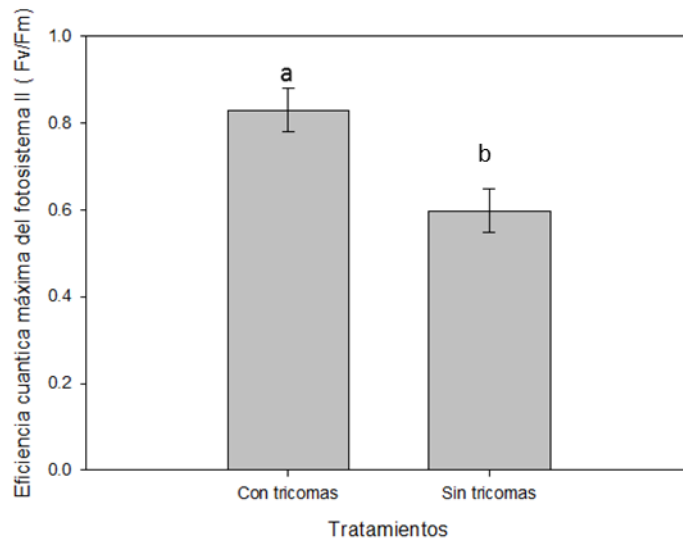


Figura 4. Efecto de la remoción de tricomas en la eficiencia cuántica máxima del fotosistema II (F_v/F_m).

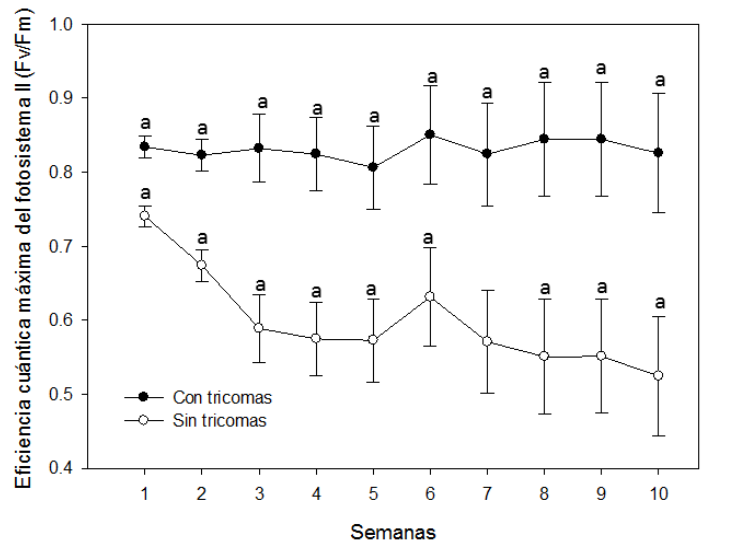


Figura 5. Efecto de la remoción de tricomas en la F_v/F_m a través del tiempo.

En cuanto a la tasa de transporte de electrones (ETR), solamente se encontraron diferencias significativas entre tratamientos ($F = 12.958$; $P = 0.002$; Fig. 6) y en las mediciones semanales ($F = 16.85$; $P < 0.0001$; Fig. 7), siendo menor la ETR en las plantas sin tricomas. En las mediciones de interacción semana X tratamiento la ETR también fue menor en las plantas sin tricomas, no obstante las diferencias no fueron estadísticamente significativas ($F = 1.459$; $P = 0.167$).

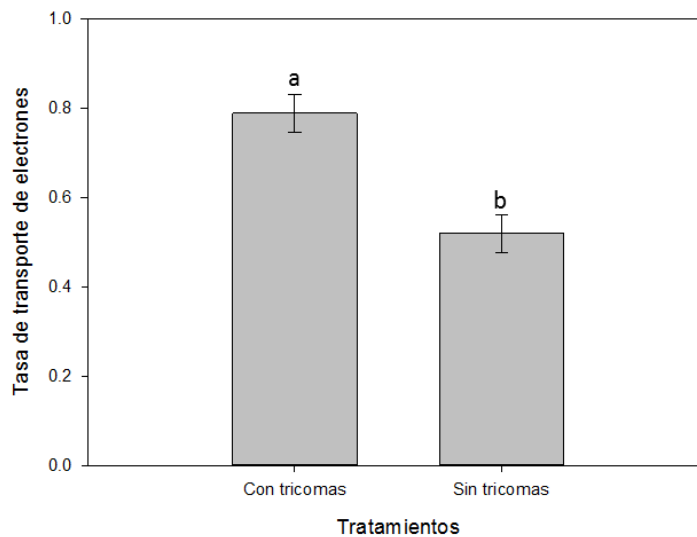


Figura 6. Efecto de la remoción de tricomas en la tasa de transporte de electrones (ETR).

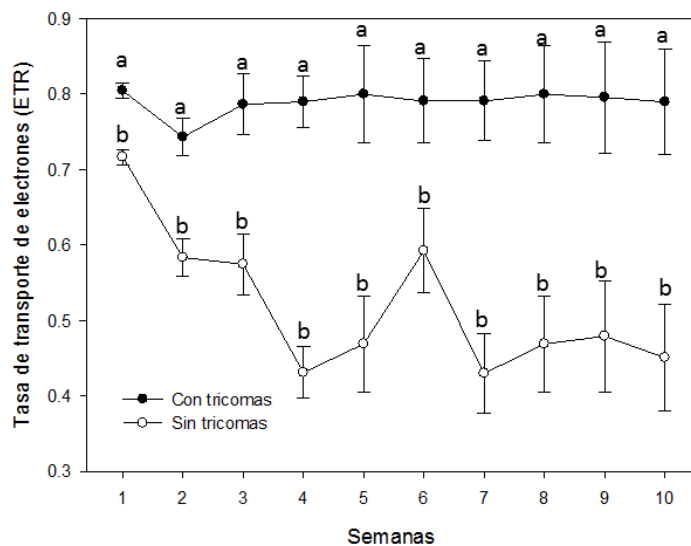


Figura 7. Efecto de la remoción de tricomas en la ETR a través del tiempo.

Las mediciones de la conductancia estomática se midieron al principio y a final del experimento. En las mediciones del inicio se encontraron diferencias entre tratamientos ($F = 14.201$; $P = 0.0037$; Fig. 8) y entre horas ($F = 15.782$; $P < 0.0001$; Fig. 8), las horas donde se encontraron diferencias fueron durante la madrugada, cuando las plantas CAM abren sus estomas.

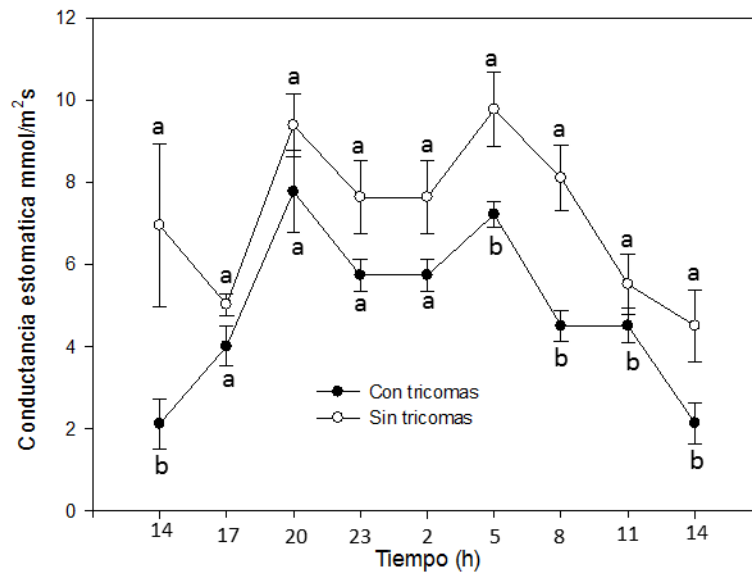


Figura 8. Efecto de la remoción de tricomas en la conductancia estomática al inicio del experimento.

Sin embargo, en las mediciones realizadas al final, a pesar de que los valores fueron menores en plantas sin tricomas no hubo diferencias entre los tratamientos ($P = 0.062$; $F = 4.393$; Fig. 9) ni entre las horas ($P = 0.555$; $F = 0.844$; Fig. 9).

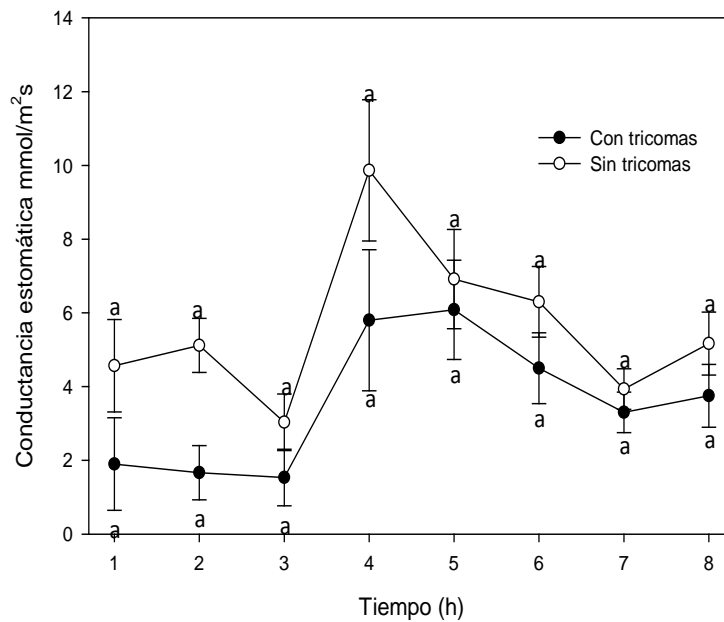


Figura 9. Efecto de la remoción de tricomas en la conductancia estomática al final del experimento.

En cuanto a los pigmentos, se encontraron efectos significativos de la interacción Tiempo X Tricomas para clorofila *a*, clorofila *b*, clorofila *a+b*, clorofila *a/b* y clorofila *a+b*/carotenoides (Tabla 3).

Tabla 3. Valores estadísticos para los pigmentos evaluados. El asterisco indica diferencias significativas.

Pigmentos	Valores estadísticos	Factores		
		Tricomas	Tiempo	Tiempo*Tricomas
Clorofila <i>a</i>	<i>F</i>	2.676	20.1964	11.2215
	<i>P</i>	0.0005	0.004*	0.015*
Clorofila <i>b</i>	<i>F</i>	0.551	93.837	6.963
	<i>P</i>	0.485	0.000069*	0.038*
Clorofila <i>a + b</i>	<i>F</i>	3.5456	31.523	11.495
	<i>P</i>	0.108	0.001*	0.014*
Clorofila <i>a/b</i>	<i>F</i>	5.7744	27.837	6.570
	<i>P</i>	0.053	0.001*	0.042*
Carotenoides	<i>F</i>	3.3377	22.017	1.220
	<i>P</i>	0.117	0.003*	0.311
Clorofila <i>a + b/</i> Carotenoides	<i>F</i>	2.3480	4.597	15.875
	<i>P</i>	0.176	0.075708	0.007*

En general, las clorofilas *a*, *b* y *a+b* fueron menores en plantas sin tricomas que con ellos al final del experimento, pero no al inicio (Figs. 10, 11 y 12, respectivamente). En cambio, los carotenoides no fueron afectados por la interacción, sino por el factor tiempo solamente (Tabla 3). La concentración de carotenoides fue menor al inicio ($0.42 \pm 0.078 \mu\text{mol.gps}$) del experimento que al final ($0.84 \pm 0.059 \mu\text{mol.gps}$).

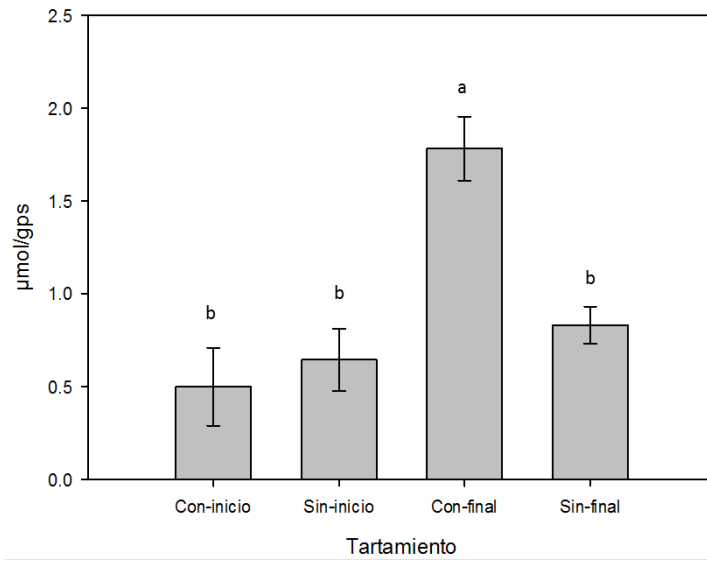


Figura 10. Concentraciones de clorofila *a* en plantas de *A. myriostigma* con y sin tricomas.

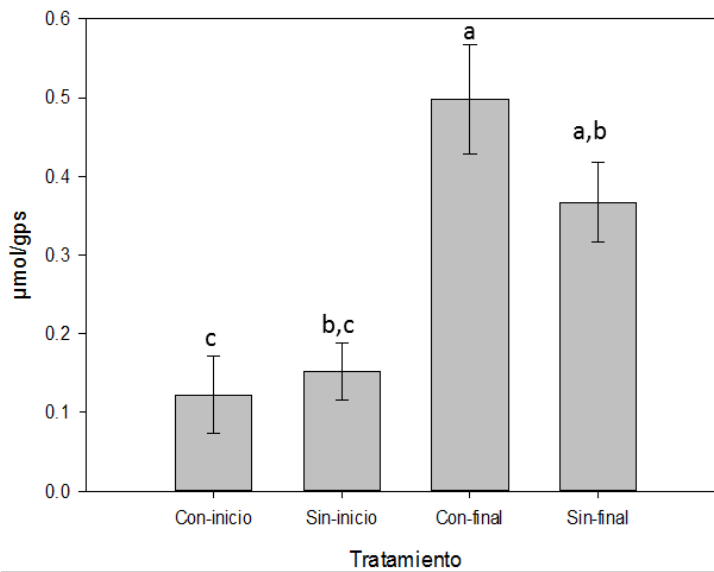


Figura 11. Concentraciones de clorofila *b* en plantas de *A. myriostigma* con y sin tricomas.

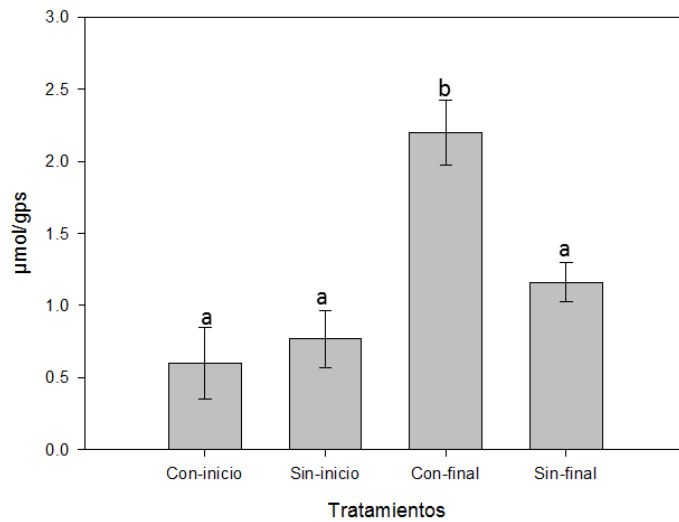


Figura 12. Concentraciones de clorofilas *a+b* en plantas de *A. myriostigma* con y sin tricomas.

La concentración de la proporción clorofila *a/b* no fue afectada por los tricomas al inicio del experimento, pero al final disminuyó en las plantas sin tricomas (Figura 13).

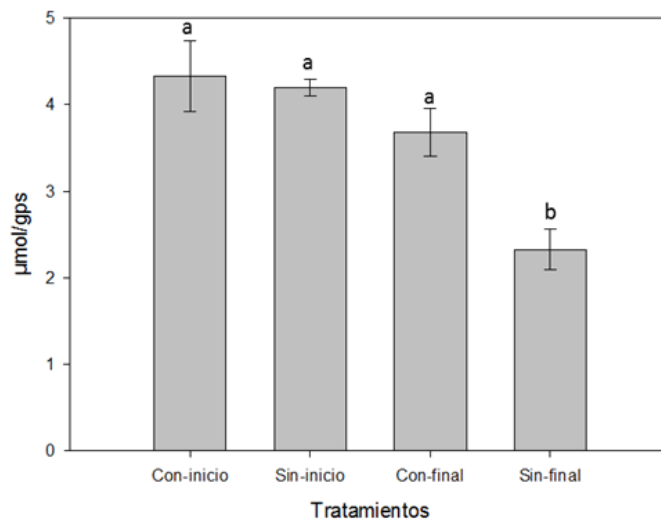


Figura 13. Concentraciones de clorofilas *a/b* en plantas de *A. myriostigma* con y sin tricomas.

La concentración de clorofila a+b/carotenoides fue mayor sin tricomas que con ellos al inicio del experimento, sin embargo al final no hubo diferencias entre tratamientos (Figura 14).

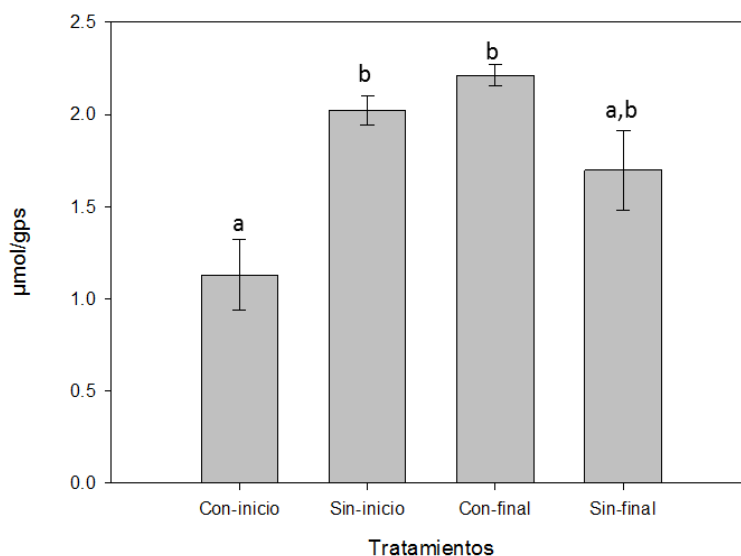


Figura 14. Concentraciones de la proporción clorofila a+b/carotenoides en plantas de *A. myriostigma* con y sin tricomas.

3.3 Efecto de la remoción de los tricomas en la anatomía de las plantas de *Astrophytum myriostigma*

Se encontró una capa frontera entre los tricomas y la epidermis del tallo (Fig. 15a), la cual desapareció al remover los tricomas (Fig. 15b).

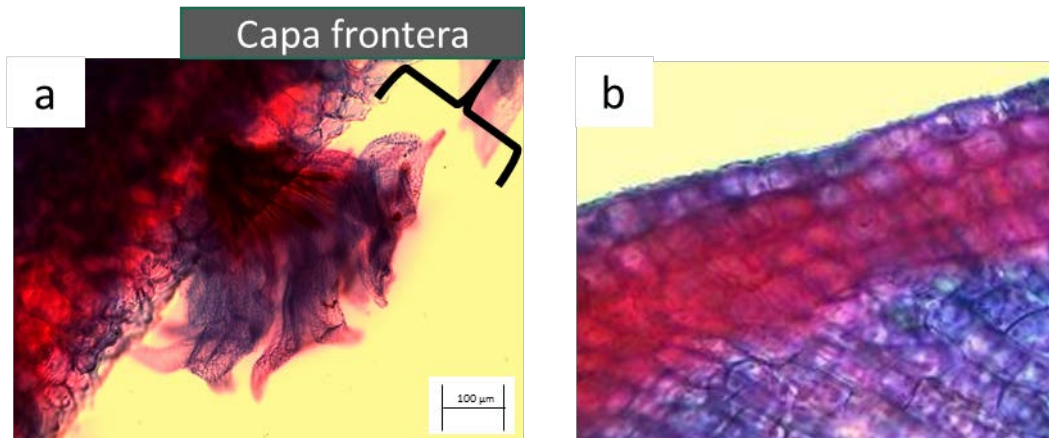


Figura 15. a) Planta con tricomas, el corchete indica la capa frontera y b) desaparición de la capa frontera.

Es importante mencionar que al retirar los tricomas no se ocasionó ningún daño en la cutícula del tallo. En la Fig. 16a se observa un tricoma de *A. myriostigma* y en la Fig. 16b se observa una de las hendiduras donde se encontraba el tricoma, sin daño.

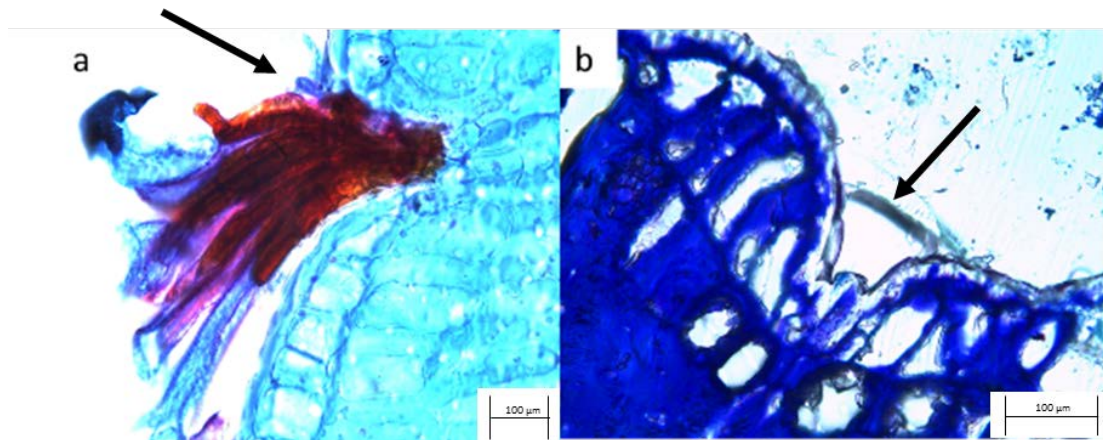


Figura 16. a) Tricoma ubicado en la invaginación de la epidermis sobre la cutícula (flecha) y b) Tricoma ausente donde se observa la cutícula intacta sobre la invaginación (flecha).

Al realizar cortes longitudinales del tallo completo de *A. myriostigma* con tricomas, observaron diferentes estructuras anatómicas, como médula, colénquima y haces vasculares (Fig. 17).

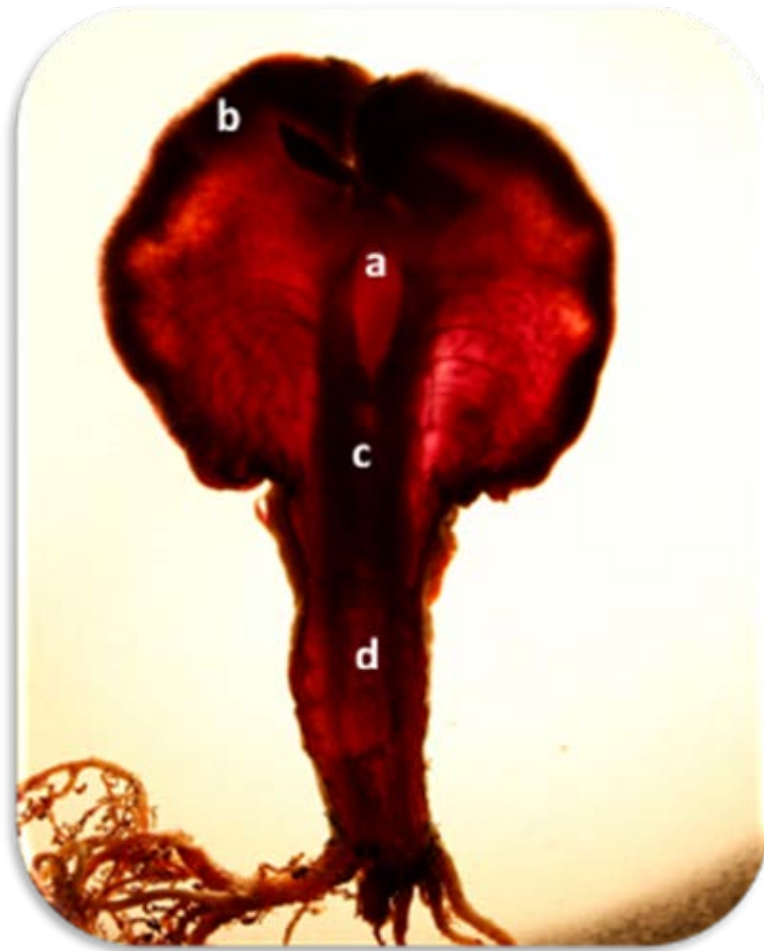


Figura 17. Estructuras anatómicas: a) Médula, b) colénquima e hipodermis, c) cilindro vascular con haces vasculares y d) haces vasculares de la raíz.

En las plantas sin tricomas hubo contracción de médula y pérdida de parénquima (Figs. 18 y 19).

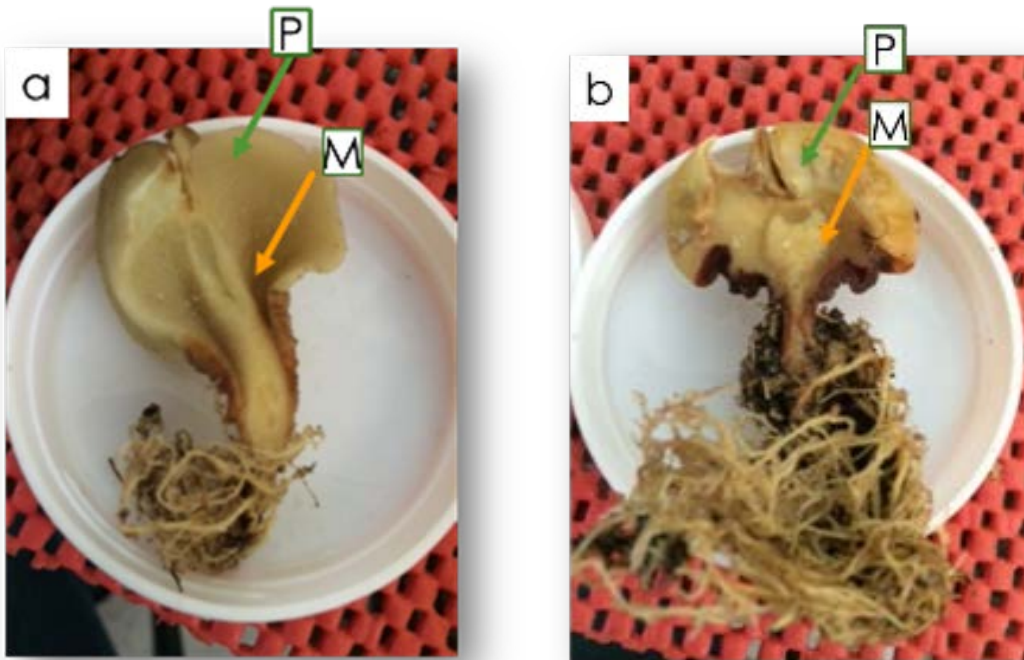


Figura 18. Sección longitudinal de a) Cilindro vascular y médula intactos con sistema radical en planta con tricomas y b) Cilindro vascular y médula contraídos con proliferación de raíces en planta sin tricomas, p = parénquima y m = contracción de la médula.

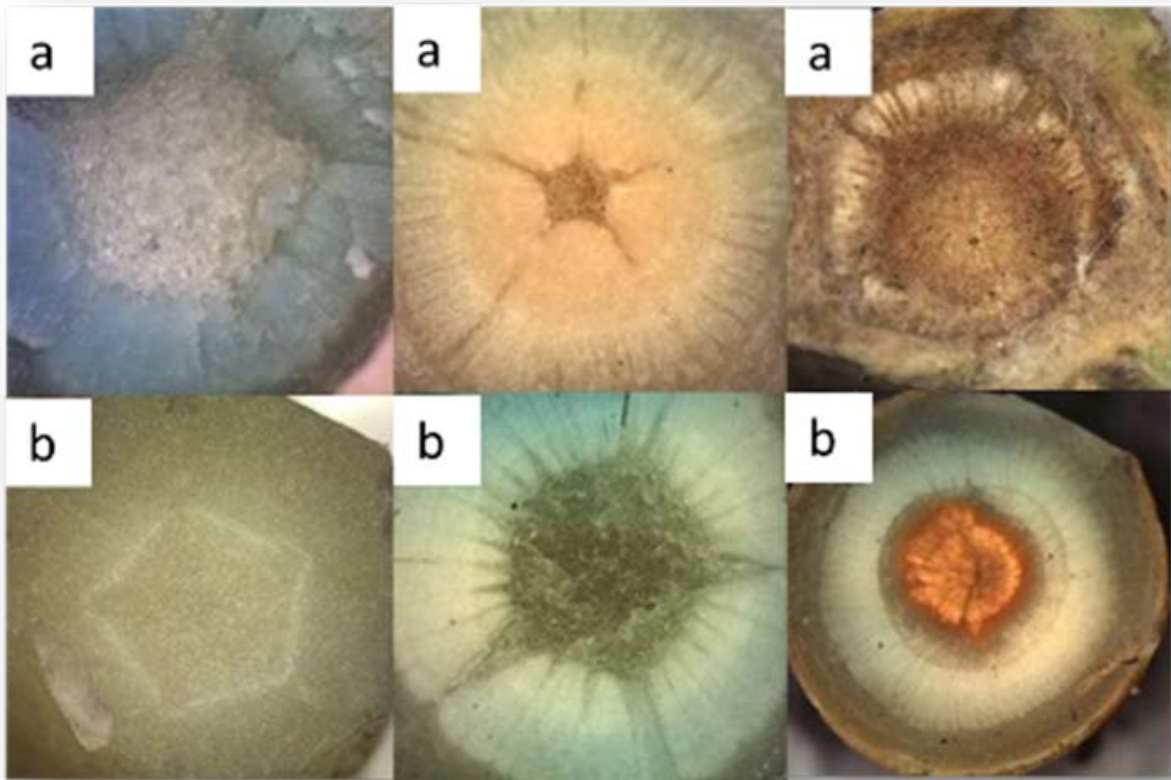


Figura 19. Sección transversal de la planta mostrando a) Médula contraída de plantas sin tricomas, b) médula intacta de plantas con tricomas.

No se encontró diferencia significativa en el grosor de la cutícula entre plantas con tricomas ($8.39 \pm 0.71 \mu\text{m}$) y sin ellos ($6.66 \pm 0.47 \mu\text{m}$; $F = 4.01$, $P = 0.058$; Fig. 20).

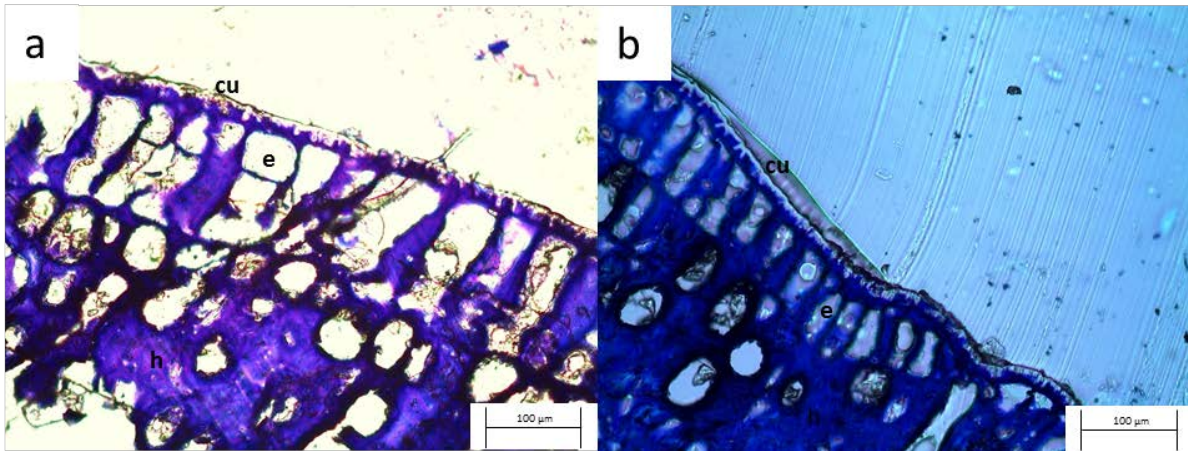


Figura 20 Sección transversal donde se aprecia la cutícula en planta a) con tricomas, b) sin tricomas. Cu = cutícula, e = epidermis, h = hipodermis.

Tampoco hubo diferencias en longitud de hipodermis ó colénquima (con tricomas = $400.18 \mu\text{m} \pm 29.16 \mu\text{m}$; sin tricomas = $426.89 \pm 20.92 \mu\text{m}$; $F = 0.55$, $P = 0.46$; Fig. 21).

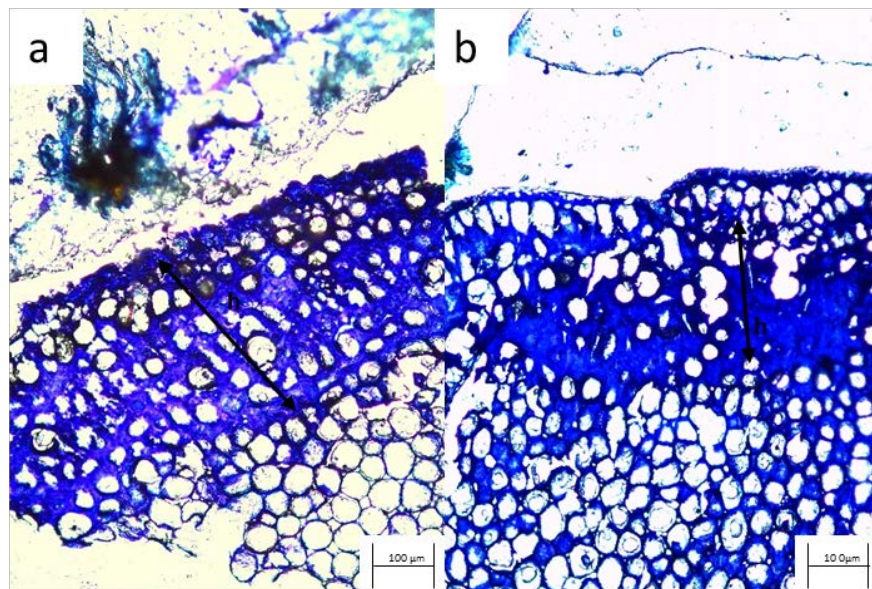


Figura 21. Sección transversal donde se aprecia la hipodermis (flecha) en: a) con tricomas, b) sin tricomas; h=hipodermis.

No hubo diferencias en número de canales de mucílago (con tricomas = $33.31 \pm 4.11 \mu\text{m}$; sin tricomas = $27.87 \pm 2.03 \mu\text{m}$; $F = 1.4$, $P = 0.24$; Fig. 22), ni en área de canales de mucílago (con tricomas = $1053.81 \pm 109.62 \mu\text{m}$; sin tricomas = $1092.59 \pm 69.52 \mu\text{m}$; $F = 0.08$, $p = 0.76$; Fig. 22).

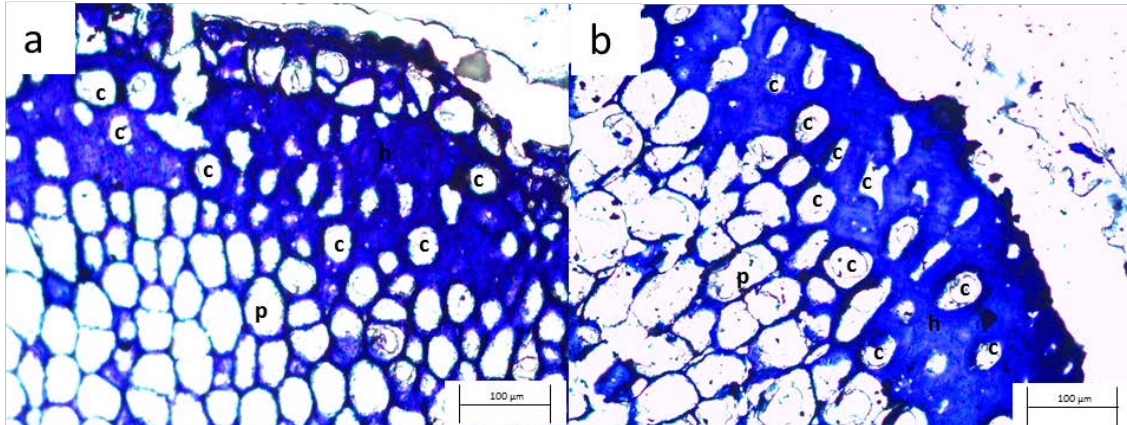


Figura 22. Sección transversal donde se aprecia la hipodermis con los canales de mucílago en: a) con tricomas, b) sin tricomas. c = canales de mucílago, h = hipodermis y p = células de parénquima.

Sin embargo, sí hubo diferencias significativas ($F = 10.66$, $p = 0.004$) en la distancia de los haces vasculares a parénquima entre plantas con tricomas ($993.61 \pm 89.56 \mu\text{m}$) y sin ellos ($631.66 \pm 65.29 \mu\text{m}$), siendo las segundas las más cercanas a parénquima (Fig. 23).

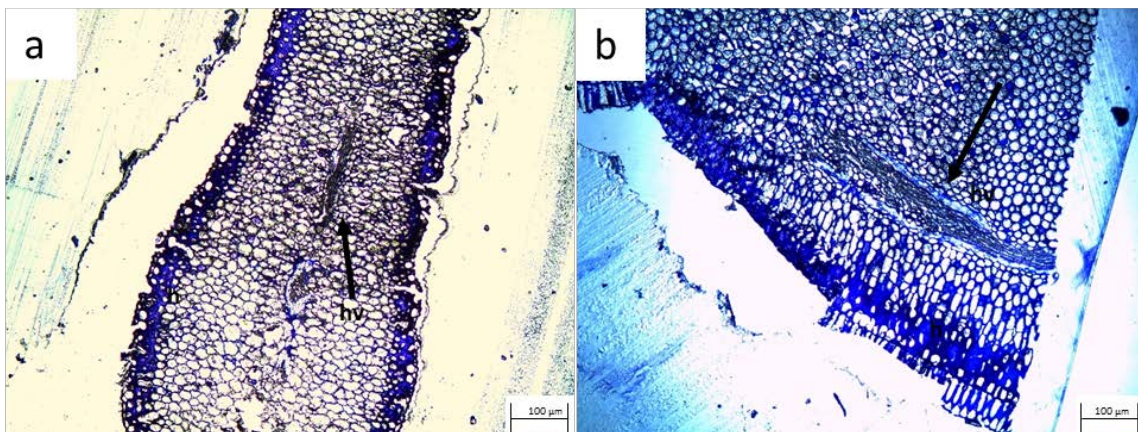


Figura 23. Sección transversal donde se observa la distancia de los haces vasculares (flecha) a parénquima en a) con tricomas, b) sin tricomas; hv = haces vasculares, h = hipodermis.

El número de cloroplastos fue estadísticamente distinto entre plantas con y sin tricomas ($F = 283.18$, $p = 0.007$), siendo menor la densidad de éstos en las plantas sin tricomas (Fig. 24).

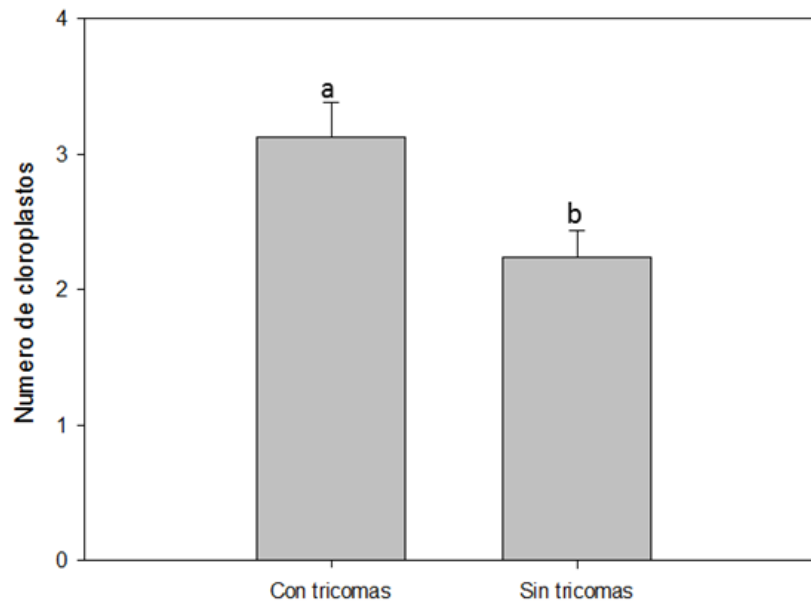


Figura 24. Efecto de la remoción de tricomas en el número de cloroplastos.

En las plantas sin tricomas se observó suberificación en la epidermis como medio de protección, que consiste en la superposición por intercalación de láminas de suberina y que puede conferir impermeabilidad al tallo (Fig. 25).

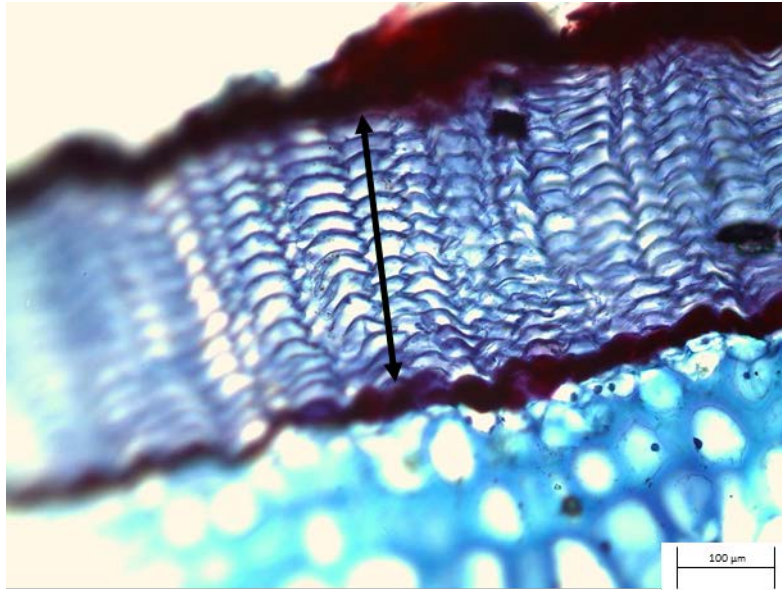


Figura 25. Formación de peridermis suberificada (flecha) en los tallos en plantas sin tricomas.

En las plantas con tricomas las células son de forma regular y redondeadas, conforme las células se van centrado van aumentando de tamaño. En las plantas sin tricomas las células se contrajeron mostrando ondulaciones en las paredes, también se deformaron y se agrandaron hacia el centro (Fig. 26).

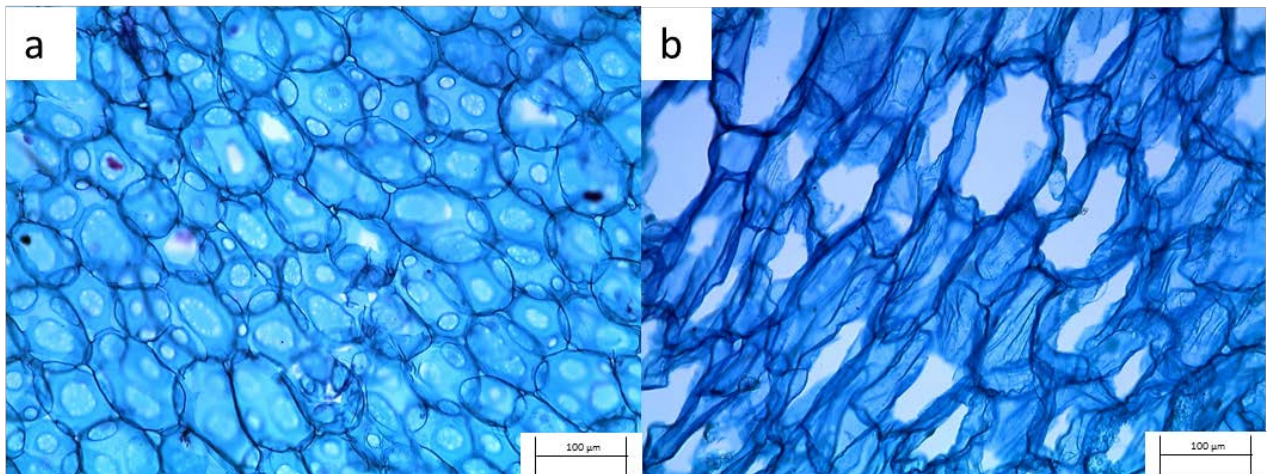


Figura 26. Sección longitudinal donde se observan células de parénquima en a) plantas con tricomas y b) plantas sin tricomas.

En cuanto a los haces vasculares, constan de traqueidas de banda ancha (TBA) y vasos. En el caso de las plantas con tricomas, las traqueidas y los vasos se observan organizados en forma redondeada (Fig. 27a, b y e), siendo muy abundantes estando más cerca del cambium vascular y disminuyendo la abundancia conforme se van alejando de este (Fig. 27 c y d), ubicando el meristemo en el centro. En las plantas sin tricomas, las traqueidas y los vasos perdieron la organización circular (Fig. 28 a y b), además de que se colapsaron (Fig. 28 c, e y f).

Las traqueidas y los vasos fueron más abundante conforme se acercaron al cambium y no se observaron en el meristemo. También se observó que las TBA cerca del cambium están rodeando a los vasos (Fig. 28 d).

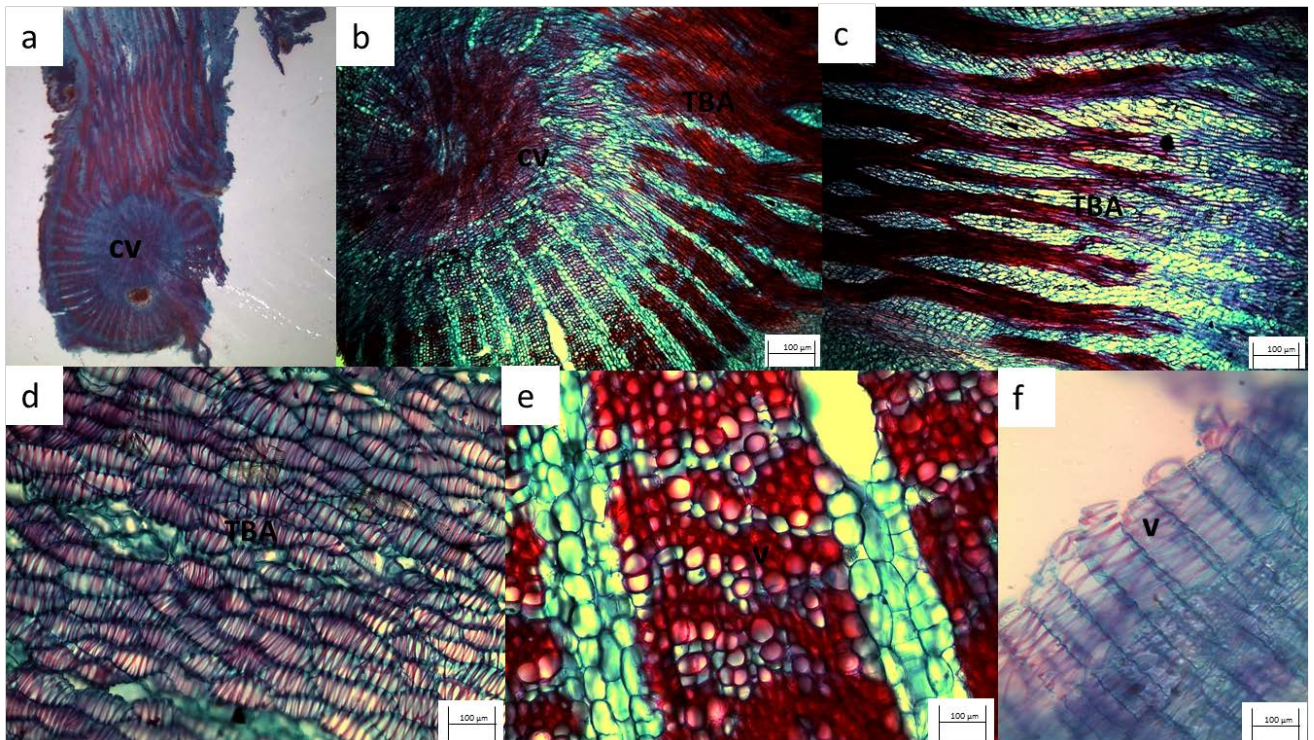


Figura 27. Sistema vascular de plantas con tricomas, a) y b) cilindro vascular de plantas con tricomas, c) y d) traqueidas de banda ancha, e) vasos del cilindro= vasos vascular y f) vasos. CV= cilindro vascular, TBA= traqueada de banda ancha y v= vasos.

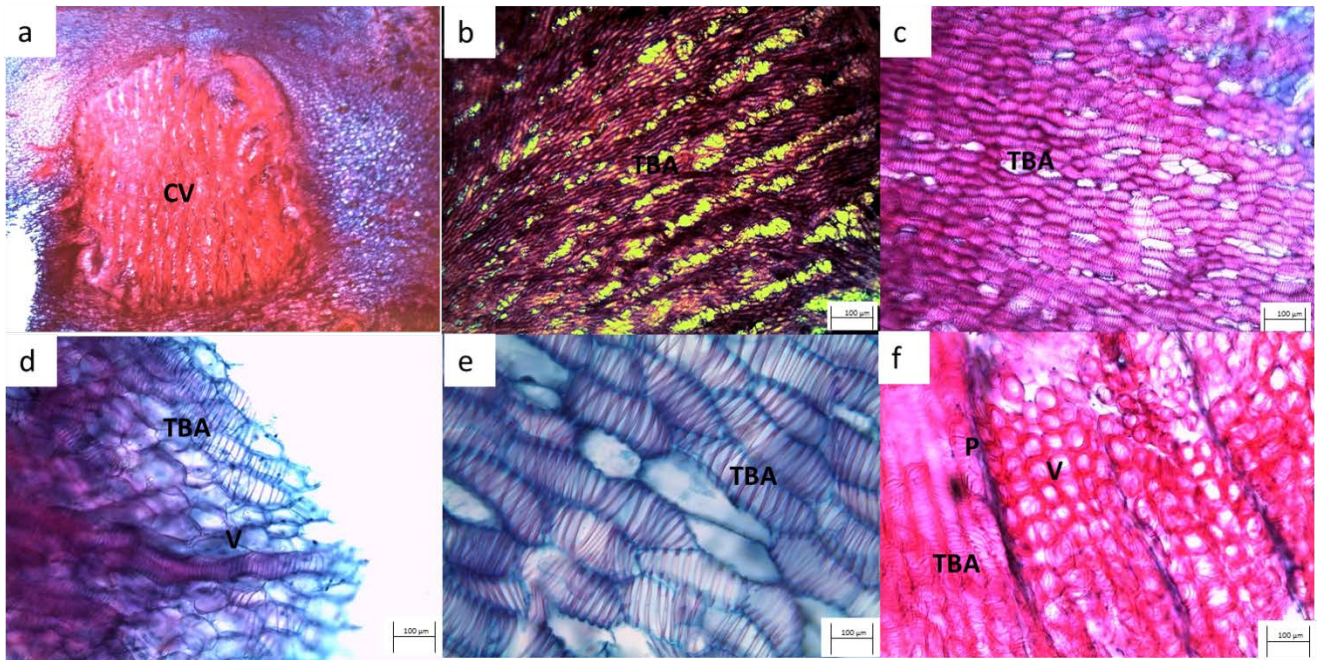


Figura 28. Sistema vascular de plantas sin tricomas. a) Cilindro vascular contraído con parénquima colapsado pierde la organización circular, b) detalle del xilema colapsado, c) haz vascular con TBA rodeando los vasos, d) detalle de las TBA rodeando los vasos, e) TBA contraídas f) detalle de la contracción del parénquima. CV = cilindro vascular, V = vaso, P = parénquima, TBA = traqueidas de banda ancha.

Los haces vasculares fueron más frecuentes en las plantas sin tricomas que con tricomas (Fig. 29).

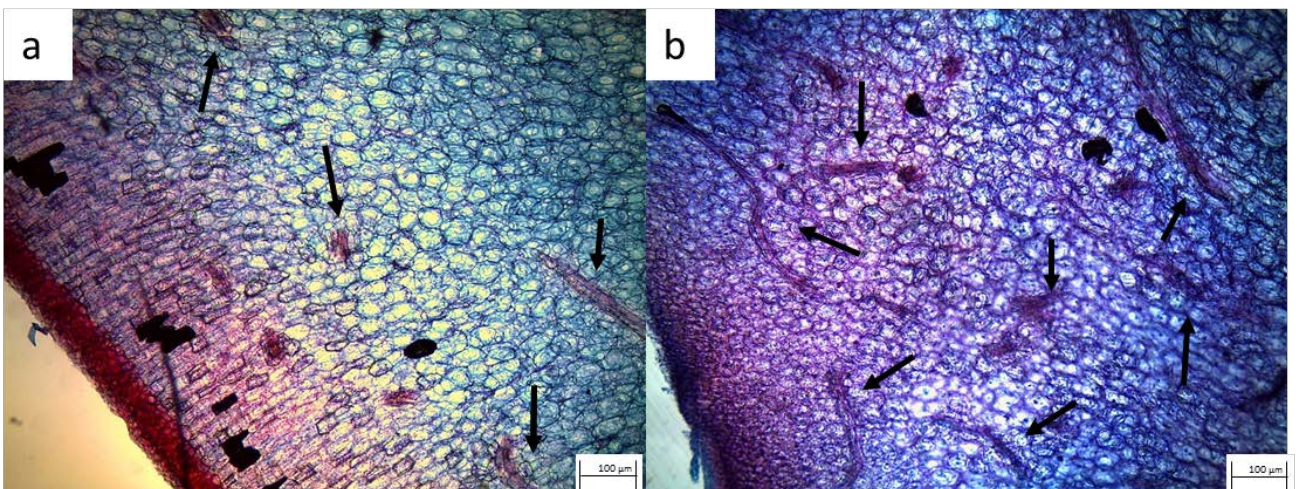


Figura 29. Frecuencia de haces vasculares (flecha) en: a) planta con tricomas y b) planta sin tricomas.

3.4 Efecto de la remoción de los tricomas de *Astrophytum myriostigma* en la densidad de bacterias generales y bacterias fijadoras de nitrógeno de su rizósfera

En los cultivos en placa no se encontraron diferencias significativas en bacterias heterotróficas generales ($F= 0.471$, $P= 0.71$; Fig. 30) ni en las bacterias fijadoras de nitrógeno ($F=1.872$, $P= 0.21$, Fig. 31), sin embargo se encontró mucha variación en las UFC de las diferentes placas tanto de medio TSA como Rennie.

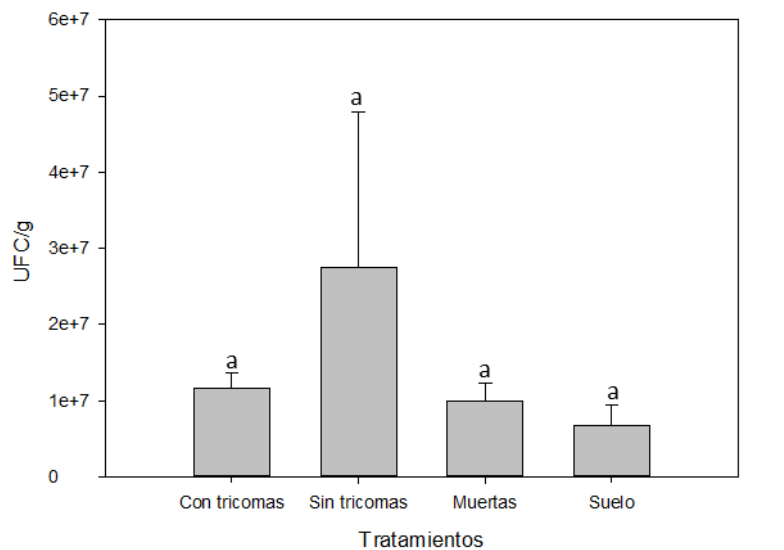


Figura 30. Efecto de la remoción de tricomas en la abundancia de bacterias heterotróficas generales (UFC).

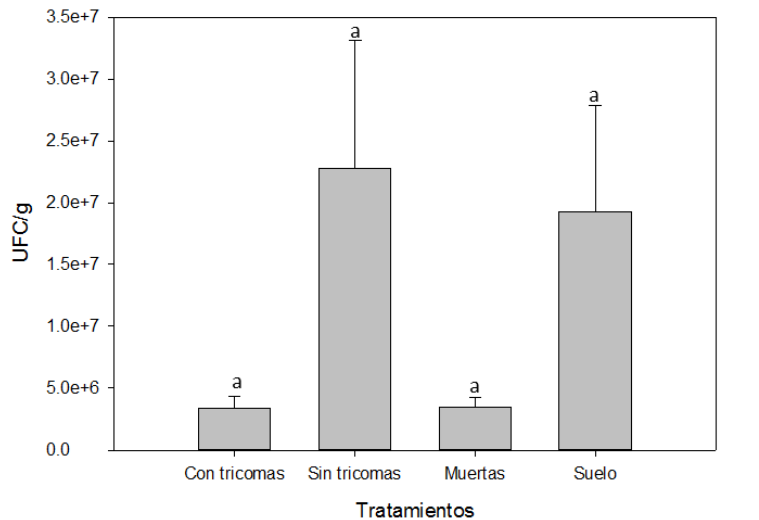


Figura 31. Efecto de la remoción de tricomas en la abundancia de bacterias fijadoras de nitrógeno.

En la Fig. 32 se muestra la amplificación en gel de agarosa del producto de PCR, en donde se observa las bandas que nos indican que el gen *NifH* está presente (~400 bp).

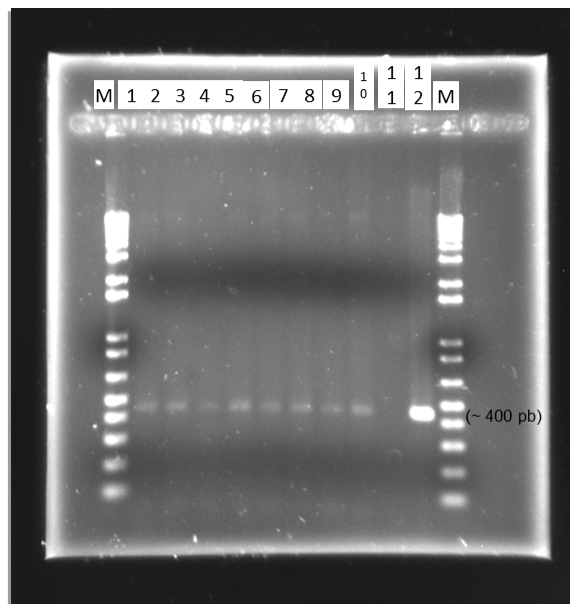


Figura 32. Amplificación de PCR para verificar la presencia del gen *NifH*: las M indican los marcadores, carriles 1, 2 y 3 plantas con tricomas; 4, 5 y 6 plantas sin tricomas; 7,8 y 9 muertas; 11 marcador negativo y 12 marcador positivo.

En el conteo por métodos moleculares se encontraron diferencias en bacterias fijadoras de nitrógeno entre los tratamientos ($F=11.55$, $P=0.002$), siendo las plantas sin tricomas las que tienen un mayor número de copias por gramo de suelo (Figura 33).

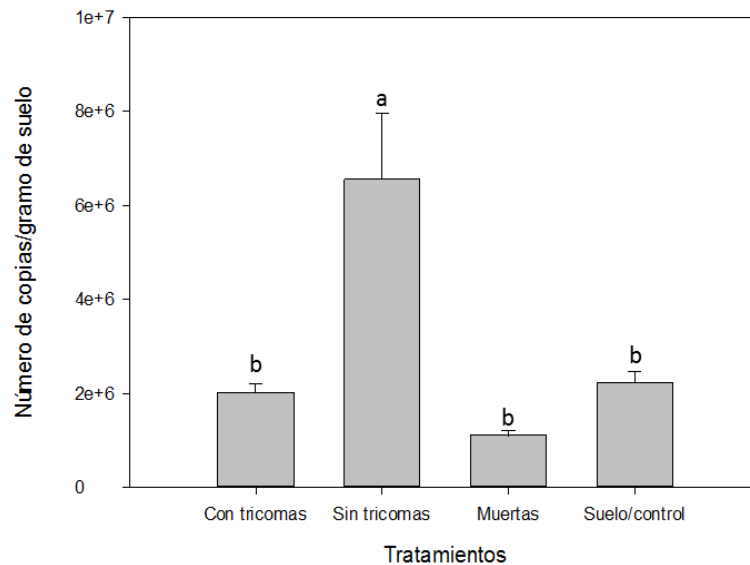


Figura 33. Número de copias de bacterias fijadoras de nitrógeno entre tratamientos.

También se encontraron lo que parecieran nódulos en las raíces, tanto en las plantas con tricomas como sin ellos (Fig. 34).

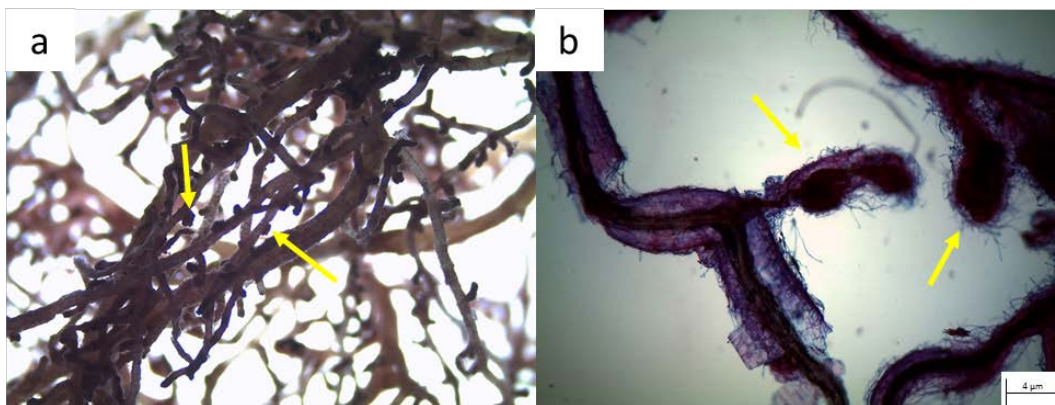


Figura 34. Raíces de *A. myriostigma* con nódulos de bacterias a) apariencia externa y b) apariencia a detalle.

4. DISCUSIÓN

Se considera que los tricomas son un medio adaptativo de protección a las plantas (Ehleringer, 1984; Karabourniotis y Bornman, 1999), incluyendo plantas de ambientes áridos y semiáridos (Billings y Morris, 1951). En el caso de *A. myrostigma*, cuyo hábitat es semiárido, los tricomas cubren y protegen el tallo. Al removerlos las plantas sufrieron por el estrés de la radiación y por pérdida de agua.

Los tricomas de *A. myristigma* lo cubren y protegen del exceso de luz, por lo que la energía absorbida por la planta es menor que la que recibirían sin tricomas. Al remover los tricomas de *A. myristigma* las plantas recibieron la radiación solar de manera directa en sus tallos y uno de los principales efectos de esta remoción fue la disminución de la eficiencia cuántica efectiva del fotosistema II (Φ_{PSII}) y de la tasa de transporte de electrones, lo cual indica que las plantas estaban estresadas por exceso de luz (Maxwell y Johnson, 2000). Sin embargo, la eficiencia cuántica máxima del fotosistema II (F_v/F_m) no se vio afectada estadísticamente por la remoción de los tricomas, lo que indica que a pesar del estrés las plantas se recuperan en la noche, pues esta variable de respuesta se evalúa en oscuridad (Maxwell y Johnson, 2000).

Experimentos similares de remoción de tricomas en especies de diversas familias sugieren que los resultados dependen de la especie. Por ejemplo, Morales (2002) realizó remoción mecánica de tricomas en hojas de *Quercus ilex* (familia Fagaceae) y encontró disminución de la eficiencia fotoquímica del PSII cuando los tricomas fueron removidos. Manetas (2003) realizó un estudio en tallos de *Verbascum speciosum* (familia Scrophulariaceae), encontrando disminución en eficiencia cuántica máxima, pero no hubo diferencia en la eficiencia fotosintética efectiva del PSII ni en ETR.

Las clorofilas son los mayores componentes de los cloroplastos para la fotosíntesis y el contenido relativo de clorofilas tiene una relación positiva con la tasa de fotosíntesis (Anjum *et al.*, 2011). La disminución en el contenido de clorofilas bajo sequía ha sido considerada como un síntoma típico de estrés oxidativo y puede ser el resultado de fotooxidación de pigmentos y degradación de

las clorofilas (Kpyoarissis *et al.*, 1995; Farooq *et al.*, 2009; Anjum *et al.*, 2011). En esta investigación, la remoción de los tricomas afectó negativamente la concentración de clorofila *a*, clorofila *b* y clorofilas totales ($a + b$), siendo menores en plantas sin tricomas al final del experimento. Este resultado pudiera relacionarse con el menor número de cloroplastos encontrado en las plantas sin tricomas al final del experimento. De manera similar, la concentración de la proporción clorofila a/b no fue afectada por los tricomas al inicio del experimento, pero al final esta proporción disminuyó en las plantas sin tricomas, lo cual significa que el estrés ocasionó aumento de la clorofila *b* en comparación con la clorofila *a* y por eso disminuyó la proporción clorofila a/b (Cambrón-Sandoval *et al.*, 2011). En cambio, la concentración de clorofila $a+b$ /carotenoides no fue afectada al final del experimento, pero sí al inicio ya que fue mayor sin tricomas que con ellos. Morales (2002) realizó una remoción mecánica de tricomas en hojas de *Quercus ilex* y no encontró diferencias significativas en clorofila *a* y *b* pero sí en carotenoides, siendo éstos mayores en las hojas sin tricomas, por lo que se sugiere que el efecto de la remoción de los tricomas en los pigmentos depende de la especie de estudio y del pigmento evaluado.

No se encontraron diferencias en el número de UFC/g de suelo entre plantas con y sin tricomas, sin embargo la variación entre estos fue muy amplia además de que no todas las especies de bacterias en la rizosfera son cultivables. Sin embargo, al hacer un estudio de abundancia por métodos moleculares mediante el gen *NifH*, se encontró mayor abundancia en las plantas sin tricomas que con tricomas. Este resultado indica que cuando la planta se encuentra estresada el número de bacterias aumenta. También se observó un aumento en el número de raíces adventicias y de nódulos en las plantas sin tricomas (aunque no se cuantificaron), lo cual pudiera estar relacionado con el aumento de bacterias; es decir, que a mayor cantidad de raíces adventicias mayor es el número de nódulos y con ello el número de bacterias fijadoras de nitrógeno también aumenta. Además, este resultado combinado con la disminución de la eficiencia fotosintética (estimada como la eficiencia cuántica efectiva del fotosistema II (Φ_{PSII})), apoya la hipótesis de López *et al.* (2012) quienes al encontrar en el cactus *Mammillaria*

fraileana que las bacterias endofíticas fijadoras de nitrógeno en las raíces aumentaron el contenido de nitrógeno en el suelo, sugirieron que tales bacterias promueven el incremento de la actividad fotosintética de la planta. Con este resultado, se comprueba que las bacterias asociadas a la rizósfera de *A. myriostigma* le confieren tolerancia a estrés abiótico.

Se han realizado diversos estudios sobre los tricomas en especies de diferentes ambientes, para especies como *Olea europaea* y *Quercus ilex* se ha sugerido que el papel de los tricomas en la conservación del agua es menos importante que su función contra la radiación excesiva de rayos UV-B (Grammatikopoulos, 1994; Karabourniotis y Borman, 1999). En el caso de *A. myriostigma* los tricomas protegen contra alta radiación solar, pero también se encontró que al remover los tricomas de *A. myriostigma* las plantas tuvieron una deshidratación aparente a los 2 y $\frac{1}{2}$ días de la remoción y un aumento de la conductancia estomática con remoción de tricomas al inicio del experimento, con mayores diferencias durante la madrugada, cuando las plantas con fotosíntesis CAM abren sus estomas. Así, se puede decir que los tricomas, además de proteger contra la alta radiación, protegen contra la pérdida de humedad por transpiración.

A pesar de lo anterior, la remoción de los tricomas no afectó el potencial osmótico ni la conductividad hidráulica. No se conocen antecedentes sobre relaciones hídricas como tal en especies del género *Astrophytum*, pero Lux y Kopunec (1992) realizaron un estudio en *A. myriostigma* y encontraron que los tricomas son importantes en la conservación de agua, ya que tienen la capacidad de retener más agua en fase gaseosa que en fase líquida para su posterior condensación y absorción.

Anatómicamente, también se encontraron efectos por la remoción de los tricomas, como pérdida de células de parénquima en la parte más externa de las costillas, disminución en número de cloroplastos y suberificación, dado que este último es una capa impermeable nos ayuda a explicar por qué al final del experimento no se observaron cambios en la conductancia estomática, ya que esta capa al ser impermeable no permite que la planta siga perdiendo agua por

medio de la transpiración. Existen caracteres anatómicos adaptativos en las plantas, dependiendo de sus condiciones ecológicas particulares. Muchos cactus globosos presentan traqueidas de banda ancha (TBA), las cuales están acomodadas en una matriz llamada haz vascular; las TBA pueden contraerse o expandirse debido a que el volumen de cada célula se retrae para que coincida con el volumen de agua restante dentro de ella y con ello reducir el riesgo de cavitación (Mauseth, 1993). Además, las cactáceas poseen xilema secundario asociado a la succulencia de los tallos, con lo cual se proporciona un transporte de agua eficiente y almacenamiento a largo plazo de la misma, así como una gran resistencia mecánica (Bayley, 1962; Gibson, 1973). La presencia de traqueidas de banda ancha es más frecuente en cactáceas pequeñas como las del género *Astrophytum* (Bayley, 1962; Gibson, 1973).

En el caso de *A. myriostigma* con tricomas se encontró que posee un cilindro vascular bien organizado, con traqueidas de banda ancha y vasos más abundantes cerca del cambium vascular. En la parte más alejada de las costillas no hay TBA, sino únicamente vasos. Estos resultados son similares a los reportados para *Astrophytum asterias* por Reyes (2010). En las plantas sin tricomas, se encontró una desorganización del haz vascular, ya que las TBA y los vasos perdieron la simetría y presentaron contracción, sin embargo el sistema vascular no se colapsó. También se encontró un mayor número de vasos en las costillas de las plantas sin tricomas que con tricomas y la distancia de vasos a parénquima es más cercana en plantas sin tricomas. En la parte central del cilindro se encontró una densidad grande de TBA y vasos, lo cual indica un sistema eficiente de transporte de agua y nos puede ayudar a explicar porque en las variables potencial osmótico y conductividad hidráulica no se encontraron diferencias significativas, a pesar del estrés provocado por la remoción de los tricomas.

Mauseth (1999) realizó un estudio sobre adaptaciones anatómicas de plantas de *Maihuenia* y *Pereskia*, dos géneros de la familia Cactaceae, encontrando que *Pereskia* tuvo contracción de su corteza como medio de defensa para dañar menos a sus células y proteger a su médula pequeña, ya que esta es

difícil de contraer. Además menciona que la cantidad de tejidos de almacenamiento y la capacidad de éstos para alternativamente encogerse o hincharse son factores importantes para un buen almacenamiento de agua en tejidos. En el caso de *A. myriostigma*, al contrario de *Maihuenia* y *Pereskia*, se encontró una contracción de médula como medio de protección para la zona meristemática en las plantas sin tricomas, además de contracción y pérdida de parénquima en la zona de las costillas.

Todo lo anterior nos indica que las plantas sin tricomas se vieron afectadas tanto por la pérdida de agua como por la alta radiación, corroborando la importancia de los tricomas para el correcto funcionamiento de la planta.

Con estos resultados, se comprueba que la remoción de tricomas en *A. myriostigma* afecta negativamente su fisiología y anatomía; además, con el estrés provocado por la remoción de tricomas aumenta el número de bacterias fijadoras de nitrógeno con el fin de ayudar a tolerar el estrés.

5. CONCLUSIONES

Los tricomas son muy importantes para el buen funcionamiento de *A. myriostigma*, ya que proporcionan una capa frontera entre la planta y la epidermis del tallo y, con ello, protegen a los tallos de la alta radiación al mismo tiempo que los mantienen hidratados. Al remover los tricomas de los tallos de *A. myriostigma*, desapareció la capa frontera y las plantas se vieron afectadas. En la Fig. 35 se muestra un diagrama de las respuestas de la planta ante el estrés que le ocasiona tanto la alta radiación solar como la pérdida de agua, al serle removidos los tricomas.

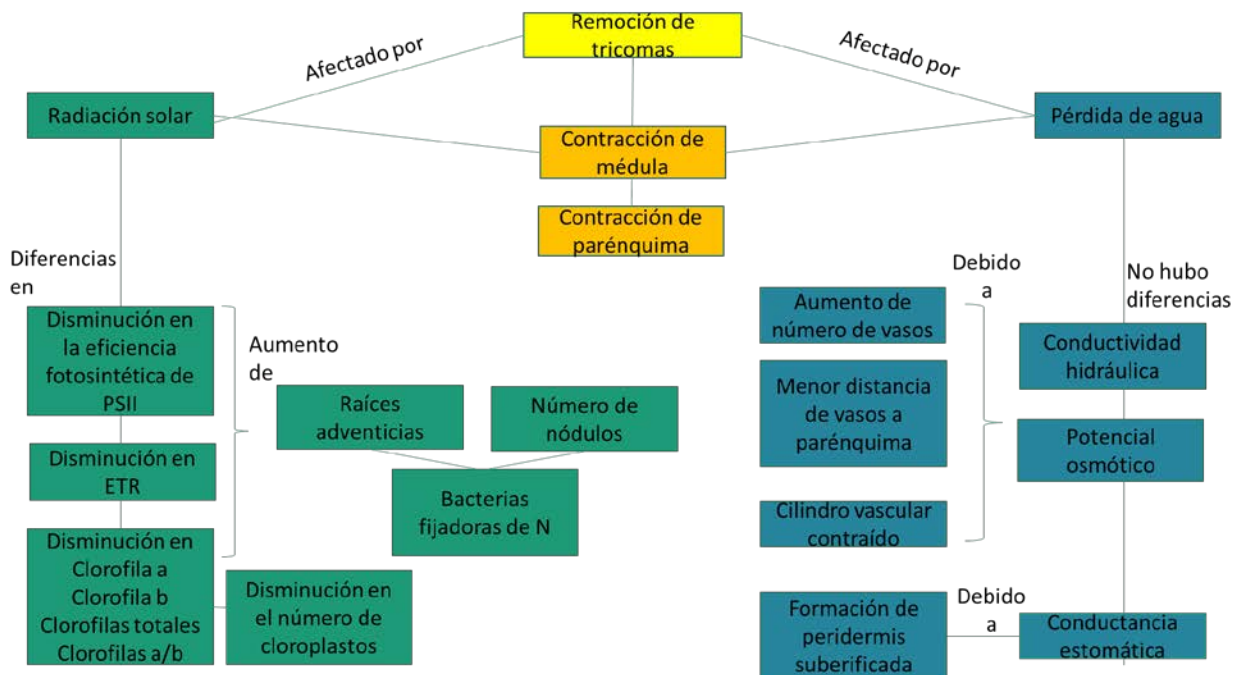


Figura 35. Diagrama del efecto de la remoción de los tricomas en los tallos de *A. myriostigma* en las respuestas ecofisiológicas y anatómicas.

Después de ser removidos los tricomas, las plantas se vieron afectadas tanto por la radiación solar como por la pérdida de agua, por ello se observaron modificaciones anatómicas como la contracción de la médula y la contracción de células de parénquima, como medio de protección contra el estrés.

En cuanto al efecto de la radiación solar, al remover los tricomas se encontró al final del experimento disminución de la eficiencia cuántica efectiva del

fotosistema II (Φ_{PSII}), de la tasa de transporte de electrones, de las clorofilas *a*, *b* y totales, de la clorofila *a/b* y del número de cloroplastos, lo que nos indica que los fotosistemas se vieron afectados. Además, se observó un aumento de raíces adventicias y un se encontró un aumento en el número de bacterias fijadoras de nitrógeno, lo cual indica que cuando las plantas están estresadas la abundancia de bacterias aumenta para ayudar a tolerar el estrés abiótico.

En cuanto al estrés por pérdida de agua, las plantas sufrieron modificaciones anatómicas como el aumento de la frecuencia de vasos en el tallo y el que éstos se encontraran más cercanos a parénquima, además de que mostraron contracción del cilindro vascular sin colapsarse. Estos resultados ayudan a explicar el por qué no hubo diferencias en potencial osmótico y conductividad hidráulica. Al final del experimento tampoco se encontraron diferencias en conductancia estomática, lo cual podría explicarse por el hecho de que se formó una peridermis suberificada en las plantas sin tricomas.

En síntesis, la función de los tricomas de *A. myriostigma* es tanto evitar la pérdida de agua como dar sombreado a las plantas, por lo que la remoción de tricomas afecta su fisiología y su anatomía. Sin embargo, cuando la planta se encuentra estresada el número de bacterias fijadoras de nitrógeno aumenta, con el fin de ayudar a tolerar el estrés.

6. LITERATURA CITADA

- Aguirre-Garrido JF, Montiel-Lugo D, Hernández-Rodríguez C, Torres-Cortés G, Millán V, Toro N, Martínez-Abarca F, Ramírez-Saad HC.** 2012. Bacterial community structure in the rhizosphere of three cactus species from semi-arid highlands in central Mexico. *Antonie van Leeuwenhoek* **101**: 891–904.
- Anderson EF.** 2001. The Cactus Family. Timber Press, Portland, Or., 776 pp.
- Anjum SA, Xie XY, Wang LC, Saleem MF, Man C, Lei W.** 2011. Morphological, physiological and biochemical responses of plants to drought stress. *African Journal of Agricultural Research* **6**: 2026–2032.
- Aragón-Gastelum JL, Flores J, Yañez-Espinosa L, Badano E, Ramírez-Tobías H, Rodas-Ortiz JP, González-Salvatierra C.** 2014. Induced climate change impairs photosynthetic performance in *Echinocactus platyacanthus*, an especially protected Mexican cactus species. *Flora* **209**: 499–503
- Aschenbrenner AK, Horakh S, Spring O.** 2013. Linear glandular trichomes of *Helianthus* (Asteraceae): morphology, localization, metabolite activity and occurrence. *AoB Plants* **5**: plt028.
- Bailey IW.** 1962. Comparative anatomy of the leaf-bearing Cactaceae, VI. The xylem of *Pereskia sacharosa* and *Pereskia aculeata*. *Journal of the Arnold Arboretum* **43**: 376–383.
- Bais HP, Well TL, Perry LG, Golroy S, Vivanco JM.** 2006. The role of root exudates in rhizosphere interaction with plants and other organisms. *Annual Review of Plant Biology* **57**: 233–66.
- Benzing DH.** 1976. Bromeliad trichomes: structure, function, and ecological significance. *Selbyana* **1**: 330–348.
- Berg G, Smalla K.** 2009. Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. *FEMS Microbiology Ecology* **68**: 1–13.
- Billings WD, Morris RJ.** 1951. Reflection of visible and infrared radiation from leaves of different ecological groups. *American Journal of Botany* **38**: 327–331.

- Bravo-Hollis H, Sánchez-Mejorada H.** 1978. Las Cactáceas de México. Volumen I. Segunda edición, UNAM, México D. F.
- Brechtbuehl K, Whalley SA, Dusheiko GM, Saunders NA.** 2001. A rapid realtime quantitative polymerase chain reaction for hepatitis B virus. *Journal of Virological Methods* **93**: 105–113.
- Calvo-García S.** 2011. Bacterias fijadoras de nitrógeno. *Cuadernos del Tomás* **3**: 173–186.
- Camacho A, Giles M, Ortegón A, Palao M, Serrano B, Velázquez O.** 2009. Técnicas para el Análisis Microbiológico de Alimentos. 2ª ed. Facultad de Química, UNAM. México.
- Cambrón-Sandoval VH, España-Boquera ML, Sánchez-Vargas NM, Sáenz-Romero C, Vargas-Hernández JJ, Herrerías-Diego Y.** 2011. Producción de clorofila en *Pinus pseudostrobus* en etapas juveniles bajo diferentes ambientes de desarrollo. *Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* **17**: 253-260.
- Ehleringer J.** 1982. The influence of water stress and temperature on leaf pubescence development in *Encelia farinosa*. *American Journal of Botany* **69**: 670–675.
- Ehleringer JR.** 1984. Ecology and ecophysiology of leaf pubescence in North American desert plants. In: Rodriguez E, Healy PL, Mehta I, eds. *Biology and Chemistry of Plant Trichomes*. Plenum, New York.
- Fahn A.** 2000. Structure and function of secretory cells. In: Hallahan DL, Gray JC, Callow JA, eds. *Advances in Botanical Research, Incorporating Advances in Plant Pathology, Volume 31: Plant Trichomes*. Academic Press, London.
- Farooq M, Wahid A, Kobayashi N, Fujita D, Basra SMA.** 2009. Plant drought stress: effects, mechanisms and management. *Agronomy for Sustainable Development* **29**: 185–212.
- Genty B, Briantais JM, Baker NR.** 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta* **990**: 87–92.

- Gibson AC, Nobel PS.** 1986. *The Cactus Primer*. Harvard University Press, Cambridge, 286 pp.
- Gibson AC.** 1973. Comparative anatomy of secondary xylem in Cactoideae (Cactaceae). *Biotropica* **5**: 29–65.
- Grammatikopoulos G, Karabourniotis G, Kyparissis A, Petropoulou Y, Manetas Y.** 1994. Leaf hairs of olive (*Olea europaea*) prevent stomatal closure by ultraviolet-B radiation. *Australian Journal of Plant Physiology* **21**: 293–301
- Guzmán, CU, Arias MS, Dávila P.** 2003. *Catálogo de las Cactáceas Mexicanas*. UNAM, México, 315 pp.
- Hendry GA, Price AH.** 1993. Stress indicators: chlorophylls and carotenoids. In: Hendry GAF, Grime JP (eds), *Methods in Comparative Plant Ecology*, pp. 148-152. Chapman and Hall, London.
- Hernández MH, Godínez AH.** 1994. Contribución al conocimiento de las cactáceas mexicanas amenazadas. *Acta Botánica Mexicana* **26**: 33–52.
- Hernández-Hernández T, Brown JW, Schlumpberger BO, Eguiarte LE, Magallón S.** 2014. Beyond aridification: multiple explanations for the elevated diversification of cacti in the New World Succulent Biome. *New Phytologist* **202**: 1382–1397.
- Johnson BH.** 1975. Plant pubescence: an ecological perspective. *Botanical Review* **41**: 233–258.
- Karabourniotis G, Bornman JF.** 1999. Penetration of UV-A, UV-B and blue light through the leaf trichome layers of two xeromorphic plants, olive and oak, measured by optical fibre micro- probes. *Physiologia Plantarum* **105**: 655–661.
- Klem K, Holub P, Štroch M, Nezval J, Špunda V, Tříška J, Jansen MAK, Robson TM, Urban O.** 2015. Ultraviolet and photosynthetically active radiation can both induce photoprotective capacity allowing barley to overcome high radiation stress. *Plant Physiology and Biochemistry* **93**: 74-83.

- Kyparissis A, Petropoulun Y, Manetas Y.** 1995. Summer survival of leaves in a soft-leaved shrub (*Phlomis fruticosa* L., Labiatae) under Mediterranean field conditions: avoidance of photoinhibitory damage through decreased chlorophyll contents. *Journal of Experimental Botany* **46**: 1825–1831.
- Larqué-Saavedra A, C Trejo L.** 1990. El Agua en las Plantas. Edit. Trillas. México. 88 pp.
- López BR, Bashan Y, Bacilio M, De la Cruz-Agüero G.** 2009. Rock-colonizing plants: abundance of the endemic cactus *Mammillaria fraileana* related to rock type in the southern Sonoran Desert. *Plant Ecology* **201**: 575-588.
- López BR, Bashan Y, Bacilio M.** 2011. Endophytic bacteria of *Mammillaria fraileana*, an endemic rock-colonizing cactus of the southern Sonoran Desert. *Archives of Microbiology* **193**: 527–541.
- López BR, Tinoco-Ojanguren C, Bacilio M, Mendoza A, Bashan Y.** 2012. Endophytic bacteria of the rock-dwelling cactus *Mammillaria fraileana* affect plant growth and mobilization of elements from rocks. *Environmental and Experimental Botany* **81**: 26–36.
- Lux A, Kopunec R.** 1992 Gaseous and liquid phase water uptake by the stem surface of *Astrophytum* (Cactaceae). *Environmental and Experimental Botany* **32**: 75–81.
- Lynch JM, Whipps JM.** 1990. Substrate flow in the rhizosphere. *Plant and Soil* **129**: 1–10.
- Manetas Y.** 2003. The importance of being hairy: the adverse effects of hair removal on stem photosynthesis of *Verbascum speciosum* are due to solar UV-B radiation. *New Phytologist* **158**: 503–50.
- Manrique E.** 2003. Los pigmentos fotosintéticos, algo más que la captación de luz para la fotosíntesis. *Ecosistemas* **2003/1** (URL: <http://www.aeet.org/ecosistemas/031/informe4.htm>).
- Mauseth JD, Plemons-Rodríguez BJ.** 1998. Evolution of extreme xeromorphic characters in wood: a study of nine evolutionary lines in cactaceae. *American Journal of Botany* **85**: 209–218.

- Mauseth JD.** 1993. Water-storing and cavitation-preventing adaptations in wood of cacti. *Annals of Botany* **72**: 81–89
- Mauseth JS.** 1999. Anatomical adaptations to xeric conditions in *Maihuenia* (Cactaceae), a reticular, leaf-bearing cactus. *Journal of Plant Research* **112**: 307–315.
- Maxwell K, Johnson G.** 2000. Chlorophyll fluorescence- a practical guide. *Journal of Experimental Botany* **345**: 659–668.
- Morell PF, Jiménez HA.** 2008. Degradación de las propiedades agrobiológicas de los suelos ferralíticos rojos lixiviados por la influencia antrópica y su respuesta agroproductiva al mejoramiento. *Agronomía Tropical* **58**: 335–343.
- Mullis KB.** 1990. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American* **262**: 56–61.
- Pire R, Sanabria MA, Pereira A, Díez J.** 2007. Conductividad hidráulica y grosor de los vasos del xilema en cinco materiales de vid sometidos a déficit hídrico. *Interciencia* **32**: 35-40.
- Poly F, Monrozier LJ, Bally R.** 2001. Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of *nifH* genes in communities of nitrogen fixers in soil. *Research in Microbiology* **152**: 95–103.
- Puente ME, Bashan Y, Li CY, Lebsky VK.** 2004a. Microbial populations and activities in the rhizoplane of rock-weathering desert plants, I. Root colonization and weathering of igneous rocks. *Plant Biology* **6**: 629–642.
- Puente ME, Li CY, Bashan Y.** 2004b. Microbial populations and activities in the rhizoplane of rock-weathering desert plants. II. Growth promotion of cactus seedlings. *Plant Biology* **6**: 643-650.
- Puente ME, Li CY, Bashan Y.** 2009. Endophytic bacteria in cacti seeds can improve the development of cactus seedlings. *Environmental and Experimental Botany* **66**: 402-408.
- SEMARNAT.** 2010. Norma Oficial Mexicana 059 Protección ambiental especies nativas de México de flora y fauna silvestres – Categorías de riesgo y especiaciones para su inclusión, exclusión o cambio – Lista de especies en

riesgo. Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Diario Oficial de la Federación. Jueves 30 de diciembre de 2010. Distrito Federal, México.

- Simonet P, Grosjean MC, Misra AK, Nazaret S, Cournoyer B, Normand P.** 1991. *Frankia* genus-specific characterization by polymerase chain reaction. *Applied and Environmental Microbiology* **57**: 3278–3286.
- Spring O.** 2000. Chemotaxonomy based on metabolites from glandular trichomes. *Advances in Botanical Research* **31**: 153–174.
- Squeo FA, León MA.** 2007. Transpiración. *Fisiología Vegetal*. Ediciones Universidad de La Serena, La Serena, Chile. **3**: 67–84.
- Tissier A.** 2012. Glandular trichomes: what comes after expressed sequence tags? *Plant Journal* **70**: 51–68.
- Uphof JCT.** 1962. Plant hairs. *Encyclopedia of Plant Anatomy IV*, 5:1–206.
- Uren NC.** 2001. Types, amounts, and possible functions of compounds released into the rhizosphere by soil-grown plants. pp. 19–40. In: R. Pinton, Z. Varanini, and P. Nannipieri (eds.). *The Rhizosphere. Biochemistry and organic substances at the soil-plant interface*. Marcel Dekker. New York.
- Val J, Abadia J, Heras L, Monge E.** 1986. Higher plant photosynthetic pigment analysis. Determination of carotenoids and chlorophylls by HPLC. *Journal of Micronutrient Analysis* **2**: 305–312.
- Wagner GJ, Wang E, Shepherd RW.** 2004. New approaches for studying and exploiting an old protuberance, the plant trichome. *Annals of Botany* **93**: 3–11.
- Wagner GJ.** 1991. Secreting glandular trichomes: more than just hairs. *Plant Physiology* **96**: 675–679.
- Wellburn AR.** 1994. The spectral determination of chlorophylls *a* and *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology* **144**: 307–313.
- Wolfe BE, Klinomoros JN.** 2005. Breaking new ground: Soil communities and exotic plant invasion. *Bioscience* **55**: 477–487.

Yasumura Y, Hikosaka K, Hirose T. 2006. Seasonal changes in photosynthesis, nitrogen content and nitrogen partitioning in *Lindera umbellata* leaves grown in high or low irradiance. *Tree Physiology* **26**: 1315–132.