

00346
4



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS

Caracterización histoquímica de la albura y el duramen de dos
especies de angiospermas: *Haematoxylum brasiletto* Karts. y
Lysiloma tergemina Benth.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRA EN CIENCIAS (BIOLOGÍA CELULAR)

P R E S E N T A:

DARÍA RAZO BALCÁZAR

DIRECTORES DE TESIS:

Dr. Alfonso Miguel Torre Blanco

M. en C. Paz Alejandra Quintanar Isaías

MÉXICO, D. F.

ABRIL, 2003

A



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

PAGINACIÓN DISCONTINUA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

A todos mis maestros y en especial a Ale.

A mis padres por todo lo que me han dado, mil gracias.

A mis hermanos por su apoyo incondicional, cariño y comprensión.

A Pepe y a mi pequeña Daniela a quienes les dedicó todo.

B

AGRADECIMIENTOS

A mis asesores: Dr. Alfonso Torre Blanco por su infinita paciencia. A mi gran maestra, amiga y compañera de trabajo: Alejandra quien me brindó su confianza y apoyo durante la realización de esta tesis, por sus siempre acertados consejos y por hacerme participe sus conocimientos y con quien he compartido por más de 10 años las tristezas y las alegrías de esta vida.

Agradezco a las Dras. Judith Márquez y Carmelita de la Paz, así como a la M en C. Ma. Eugenia Fraile por haber aceptado a ser parte de mi comité tutorial. De manera muy especial quiero agradecer a la Dra. Carmelita de la Paz quien desinteresadamente revisó esta tesis y cuyos comentarios y sugerencias me permitieron hacer una mejor presentación de la misma.

A los miembros del jurado les agradezco de manera muy especial por todas las observaciones y sugerencias realizadas a esta tesis: Dr. Alfonso Torre Blanco, Dra. Judith Márquez Guzmán, Dra. Luisa Alvarina Alba Lois, Dr. Guillermo Ángeles Álvarez y M en C. Alejandra Quintanar Isaías.

Fue la Dra. Rosaura Grether quien amablemente realizó la identificación de las dos especies. Así mismo quiero agradecer a los Sres. Carpinteros de la UAM quienes siempre me han brindaron las facilidades para el procesamiento y elaboración de cubos y de tablillas para la xiloteca. Agradezco a Jorge Lodigiani su amistad y su apoyo con material fotográfico. A las maestras: Mary, Angélica, Maru, Sara, Rosaura, Silvia y Carmelita muchas gracias por todo su apoyo y buenos deseos.

A mis amigos y compañeros: Gaby, Andrea Elizabeth, Saúl, Isabel, Javier, Remedios, Jorge, Lizy, Luis, Mary Carmen, Mariana, Laura y al Sr. José Luis les agradezco su paciencia y cariño por los años que hemos compartido juntos.

A todos aquellos que han puesto algún obstáculo en mi camino pues la lección que de ellos he aprendido es a no ser así, sino cada día mejor.

C

CONTENIDO

	Pag. i
RESUMEN	
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	
2. 1. Histoquímica	7
2. 2. Carbohidratos estructurales y no estructurales	8
2. 3. Lípidos	9
2. 4. Proteínas	10
2. 5. Extractivos	11
3. HIPÓTESIS	12
4. OBJETIVOS	
4. 1. General	12
4. 2. Particulares	12
5. MATERIALES Y MÉTODOS	
5. 1. Colecta	13
5. 2. Muestreo	13
5. 3. Procesamiento	13
5. 4. Estudio anatómico	14
5. 5. Estudio histoquímico no enzimático	14
5. 6. Estudio histoquímico enzimático	16
5. 7. Estudio de proteínas del parénquima radial	17
6. RESULTADOS	
6. 1. Estudio anatómico	19
6. 2. Estudio histoquímico no enzimático	24
6. 3. Estudio histoquímico enzimático	28
6. 4. Estudio de proteínas del parénquima radial	32
7. DISCUSIÓN	
7.1. Anatomía	34
7.2. Histoquímica	37
7.3. Proteínas	44
8. CONCLUSIÓN	47
BIBLIOGRAFÍA	48
ANEXO 1: Abreviaturas	56
ANEXO 2: Clasificación de los valores anatómicos	57
ANEXO 3: Soluciones	59

D

RESUMEN

En este trabajo se estudió cualitativamente la actividad enzimática de la catalasa, la fosfatasa ácida, la fenol-oxidasa y la succinato deshidrogenasa de la albura y del duramen de la madera de *Haematoxylum brasiletto* Karst y *Lysiloma tergemina* Benth, en dos épocas del año (lluvia y sequía). También se estudió la presencia de ácidos grasos, almidón, catequinas, celulosa, hemicelulosa, leucocatequinas, lignina, lípidos, lipoproteínas, pectinas, proteínas, polifenoles y taninos en ambas regiones del xilema secundario. En la albura, la actividad de las enzimas catalasa, fenol-oxidasa y succinato deshidrogenasa fue alta en la época de lluvia y baja en la de sequía. La actividad de la fosfatasa ácida fue baja en sequía y en lluvia no se detectó. No hubo actividad enzimática en el duramen. Los resultados indican que en ambas épocas del año, la cantidad de carbohidratos estructurales (pectinas, hemicelulosas y celulosa) y no estructurales (almidón), así como lípidos (triglicéridos) y proteínas, es mayor en la parte externa de la albura y menor en el duramen y la cantidad de extractivos (lignina, polifenoles, catequinas, leucocatequinas y taninos) es mayor en el duramen.

La microscopia de luz reveló la presencia de proteínas intravacuolares en el parénquima radial durante la época de sequía que podrían realizar funciones de almacenamiento. En secciones transversales de 5-7 μm de grosor, estas proteínas se observaron como cuerpos proteicos. Se observaron diferencias en ambas épocas con respecto al contenido de proteínas en la albura de ramas delgadas y gruesas. Para *H. brasiletto* el contenido de proteínas fue de 2.07-2.41 $\mu\text{g}/\text{mg}$ en la época de sequía y de 0.60-0.64 $\mu\text{g}/\text{mg}$ en la época de lluvia. Para *L. tergemina* el contenido fue de 1.52 - 1.80 $\mu\text{g}/\text{mg}$ para la época de sequía y de 0.38-0.40 $\mu\text{g}/\text{mg}$ en época de lluvias. El análisis por electroforesis de los extractos de proteínas totales mostró la presencia de proteínas con masas moleculares aproximadas de 129, 82 y 61 KDa en ambas especies, tanto en época de lluvia como en la de sequía. Por otra parte, este análisis reveló que existe un patrón diferencial de proteínas para ambas especies, cuya presencia o ausencia depende de la época de crecimiento. Para *H. brasiletto* se observaron proteínas de ~ 38 y 21 KDa en sequía. La presencia de estas dos proteínas disminuye considerablemente en época de lluvia en la que se detectó otra banda de ~ 16 KDa. Para *L. tergemina* se observó una proteína de ~ 34 KDa en época de sequía la cual desaparece en la época de lluvia.

1. INTRODUCCIÓN

La albura es la porción recién formada del xilema secundario que se caracteriza por presentar células especializadas para: conducir agua y minerales; células vivas de parénquima axial y radial que almacenan materiales de reserva en forma de carbohidratos (como la sacarosa y el almidón), lípidos y proteínas y células de sostén. Esta zona tiene una menor resistencia al ataque de patógenos pues tiene un bajo contenido de extractivos¹ (taninos, polifenoles, etc.) (Roth, 1966; Panshin y De Zeeuw, 1980; Bamber y Fukazawa, 1985). La cantidad de albura que un árbol puede formar varía en función de la edad, la pendiente y el tipo de suelo; de la tasa de crecimiento (diámetro), la disponibilidad de agua en el subsuelo, el contenido de humedad, la masa foliar, la variación climática, el tratamiento silvícola y la cantidad de extractivos, entre otros factores (Craib, 1923; Kort, 1993; Hazenberg & Yang, 1991; Hillis, 1977; Wilkes, 1991; Wilkins, 1991; Yang *et al.* 1994).

El duramen ocupa la porción central del xilema secundario, con frecuencia es de un color más oscuro que la albura; usualmente el contenido de humedad es muy bajo, tiene gran concentración de extractivos (Rudman, 1966) y carece de actividad metabólica. Esta región proporciona resistencia, durabilidad y rigidez al tallo (Stewart, 1966). Bamber y Fukazawa (1985) señalan que el duramen, además de contribuir con el soporte mecánico, también ejerce un control fisiológico al regular la cantidad de albura que se forma de acuerdo al tipo de extractivos que se van a sintetizar.

Autores como Hillis (1968), Higuchi (1970) y Panshin y De Zeeuw (1980), sostienen que puede existir una zona de transición o intermedia, que todavía cuenta con células de parénquima con actividad bioquímica y fisiológica y se localiza entre albura y duramen. Esta es una región de gran actividad metabólica, pues enzimas como la catalasa, la fosfatasa ácida, la fenol-oxidasa, la succinato deshidrogenasa entre otras están involucradas en la transformación del material de reserva, el cual es utilizado en la síntesis de los extractivos que formarán al duramen. El contenido de humedad de esta zona es mayor que la del duramen y menor que la de la albura. La zona de transición tiene un color similar al del duramen.

El *cambium* vascular es el responsable de la formación de los diferentes tipos celulares que forman tanto a la albura como al duramen. Estos tipos celulares forman vasos, fibras y parénquima axial y radial. Los vasos y las fibras viven unas cuantas semanas o meses y se especializan en la conducción y sostén respectivamente. Las células del parénquima axial pueden permanecer vivas por varios años y las del radial hasta que ocurre la transformación de albura a duramen (Label *et al.*

2000). Las células del parénquima axial y radial tienen la capacidad de almacenar sustancias orgánicas, como son: carbohidratos no estructurales (glucosa, sacarosa, fructuosa y almidón), lípidos y proteínas, y sustancias inorgánicas como sales minerales y iones. Asimismo, estas células están involucradas en las rutas de traslocación y distribución (simplástica² y/o apoplástica³) de los productos de la fotosíntesis (Sauter y Kloth, 1986; Hansen y Beck, 1990) y también se especializan en la recesión⁴ de diferentes compuestos y participan en la defensa, la respiración y en los mecanismos de cierre de estomas.

Se conoce poco acerca de los factores que controlan el patrón de almacenamiento de los materiales de reserva, pero se sabe que el depósito de dichas sustancias no se realiza al mismo tiempo sino que está controlado por diversos factores como el fotoperíodo, los niveles de compuestos nitrogenados, el número de anillos, la estacionalidad y la temperatura. Estudios realizados por Fischer y Höll (1991, 1992), Sauter y van Cleve (1990, 1992), Harms y Sauter (1992), observaron que la concentración del almidón y azúcares solubles (sacarosa, fructosa, etc.) es baja en primavera-verano (época de lluvia) y elevada en otoño-invierno (época de sequía), mientras que la presencia de grasas aumenta en verano y disminuye en otoño. La disminución de estas sustancias de reserva ocurre durante la formación y el crecimiento de todos los órganos, brotes, y también con un aumento en la actividad del *cambium* vascular. La acumulación de proteínas ocurre en otoño y simultáneamente con la senescencia de la hoja (Kang y Titus 1980a, 1980b; Canut *et al.* 1985; Wu y Hao 1991; Hao y Wu 1993). Este patrón de almacenamiento se puede alterar por condiciones adversas cuando hay ataque fúngico, pérdida de hojas por algún mecanismo distinto a la senescencia, daño mecánico y variaciones climáticas (Sauter y van Cleve, 1994).

Los materiales de reserva como el almidón, los lípidos y las proteínas que usualmente se almacenan en la albura, son transportados a través de las células del parénquima radial hacia el duramen, principalmente por la vía apoplástica (Salisbury y Ross 1999; van Bel y Ehlers, 2000). Estos materiales de reserva se mueven de acuerdo a la demanda de otros órganos en crecimiento tales como hojas, tallos y raíces. Hansen y Beck (1994), proponen que en la albura ocurre la conversión de sacarosa en almidón y sugieren que esto sucede cuando la cantidad de sacarosa es mayor a las

¹ Los extractivos se definen como todas aquellas moléculas producto del metabolismo secundario. También son considerados como sustancias de desecho como taninos, catequinas, leucoantocianinas, resinas, gomas o ácidos grasos, etc. (Stewart, 1966).

² Simplasto es la parte viva y forma una unidad, ya que los protoplastos de las células adyacentes están comunicados por los plasmadesmos (Salisbury y Ross 1999).

³ Apoplasto está conformado por las paredes celulares y los espacios intercelulares. Se considera como la parte muerta porque no forma parte del protoplasto (Lira, 1994; Salisbury y Ross 1999).

⁴ La recesión es la eliminación de sustancias que no intervienen en los procesos metabólicos de las plantas (Fahn, 1990).

necesidades de consumo, lo cual usualmente ocurre en la época de sequía, por otro lado parte de ese almidón se transforma en sacarosa cuando la temperatura disminuye durante el invierno.

En el proceso de transformación de albura a duramen, la sacarosa y el almidón se pueden hidrolizar en moléculas más sencillas (maltosa o glucosa) y parte de estas moléculas se pueden utilizar para la síntesis de lípidos, flavonoides y estilbenos utilizando la vía del malonil CoA, o bien se pueden sintetizar terpenos a través del ciclo del ácido mevalónico (Higuchi, 1997). Parte de esas moléculas se pueden utilizar como fuentes de carbono para sintetizar otros azúcares de 3-7 carbonos a través de la vía de las pentosas-fosfato, así como para la síntesis de ácidos nucleicos y aminoácidos, mientras que el resto pueden entrar a la vía del shiquimato (Higuchi, 1997) para ser transformados en ácido hidroxicinámico (Nair y Shah, 1983) (Fig. 1). Este ácido es un intermediario de la síntesis de metabolitos secundarios como la lignina, flavonoides, catequinas, leucacatequinas, polifenoles y taninos hidrolizables (Wardrop y Cronshaw 1962; Magel *et al.* 1991, 1994).

La degradación de los lípidos o triacilglicéridos de la albura conduce a la formación de ácidos grasos y glicerol mediante la acción de la lipasa y la fosfolipasa (Saranpää y Nyberg, 1987a, 1987b; Hillinger *et al.*; 1996b). Estos ácidos grasos pueden entrar a la vía de la β -oxidación donde se produce Acetil-CoA, el que se convierte en succinato para luego transformarse en oxalacetato (OAA) que posteriormente se transforma en fosfoenolpiruvato (PEP). Este último se utiliza en dos rutas metabólicas diferentes: en la gluconeogénesis, cuyo producto final es la glucosa y en la vía del shiquimato (Figura 1), a partir de la cual se realiza la síntesis de algunos metabolitos secundarios (Baquí *et al.* 1979; Higuchi, 1997).

El almacenamiento temporal del nitrógeno se realiza en forma de cuerpos proteicos (Greenwood, 1986) y ocurre durante la senescencia de las hojas. Antes de que las hojas mueran, sus proteínas son degradadas y los aminoácidos resultantes son transportados a través de la ruta simplástica (Salisbury y Ross, 1999; Van Bel y Ehlers, 2000) hacia las células del parénquima del floema secundario del tallo y finalmente hacia las del xilema secundario donde se realiza la síntesis de *novo*, pero ahora como proteínas de almacenamiento que quedan depositadas en el parénquima radial (Wetzel *et al.* 1989b).

El catabolismo de las proteínas de reserva es poco conocido, pero se sabe que algunas endopeptidasas específicas inician la ruptura (Harris y Chrispeels, 1975; Kang y Titus, 1980c; Canut *et al.* 1985) y los péptidos resultantes son hidrolizados como aminoácidos libres por la acción de múltiples exopeptidasas y/o endopeptidasas de menor especificidad. De este modo, las proteínas de reserva suministran aminoácidos y/o fuentes de carbono que son utilizados durante el periodo de

crecimiento de los órganos nuevos (Kang y Titus, 1980a, 1980b; Viestra, 1993; van Cleve y Apel, 1993; Sauter, 2000).

La albura funciona entonces como un gran órgano de almacenamiento de sustancias muy importantes para el crecimiento de todo el árbol. Sin embargo el crecimiento de nuevos órganos como son las hojas, implica que tanto proteínas como aquellas moléculas que son fuente de carbono sean empleadas lo más rápido posible para evitar ser transformadas a extractivos. Los radicales libres formados durante la actividad metabólica son atrapados por moléculas como la lignina, los lípidos y otros extractivos que pueden emplearse para que las moléculas que son fuente de carbono sean transformadas también en extractivos. En este tenor, Schultz y Nicolas (2000) han propuesto que los extractivos ya formados, además de poseer actividad fungicida y por tanto actuar como repelentes, son moléculas que impiden que radicales libres funcionen como oxidantes. De esta manera, los extractivos de origen fenólico como ligninas, taninos y catequinas, entre otros, actúan como antioxidantes atrapando radicales libres, permitiendo que siga creciendo la planta. Por otro lado, Stewart (1966) sugiere que los extractivos son traslocados en bajas concentraciones a través del parénquima radial hacia el límite de la zona de transición, en donde se acumulan y su concentración puede ser tan alta que esto podría ser una de las razones que causa la muerte de las células del parénquima y la formación del duramen.

Los diferentes tipos de extractivos varían entre y dentro de una especie y la concentración de estas sustancias puede variar con la edad del árbol y la estacionalidad, entre otros factores (Kumar y Singh, 1976). De acuerdo con Bauch (1980), Panshin y De Zeeuw (1980) y Label *et al.* (2000) el tipo de extractivos está relacionado con el control genético de cada especie, mientras que su cantidad esta influenciada por las condiciones fisiológicas presentes en el parénquima durante el tiempo de formación (Fukuda, 1996, 1997; Pennell y Lamb 1997).

Fukuda (1996, 1997) y Hillinger *et al.* (1996a, 1996b) proponen que las plantas más evolucionadas tienen la capacidad de programar su senescencia (muerte) o bien de regularla internamente. Este es un fenómeno que incluye el deterioro de todo el organismo y ocurre en la fase final de la etapa reproductiva o en un órgano en especial, como puede ser el tallo cuando está formando duramen. Magel *et al.* (1994, 2000) plantean que la formación del duramen es un proceso en el cual la muerte celular resulta benéfica ya que la parte central del tallo queda constituido por células muertas que proporcionan soporte a todo el árbol y no se requiere de energía para mantener al tejido muerto.

Haematoxylum brasiletto Karst y *Lysiloma tergemina* Benth son dos especies de árboles que se caracterizan por tener una amplia distribución en México y por presentar albura y duramen bien definidos. Esto último las hace resistentes al ataque de patógenos y microorganismos y por lo tanto se pueden convertir en especies de importancia económica. Se conoce muy poco acerca de estas dos especies. En la herbolaria y la medicina tradicional la corteza y madera de ambas especies se utilizan para diversos padecimientos. *H. brasiletto* se emplea para el tratamiento de enfermedades de la sangre, riñón, pulmón, dolor de estómago, úlcera gástrica y también se utiliza como planta de ornato. Sin embargo, de esta especie se extrae la hematoxilina, un colorante ampliamente usado para teñir tejidos vegetales y animales (Anónimo, 1994). Por su parte, la madera de *L. tergemina* es utilizada para elaborar mangos de herramientas de trabajo, vigas, postes, palanganas y también se utiliza en la coloración de gomas y en algunos casos su corteza se usa para tratamiento dental para amacizar las encías (Colín y Monroy, 1997). A pesar de estos usos, la madera de estas dos especies se usan principalmente como leña y carbón, por lo que urge hacer investigaciones sobre la biología de estas plantas.

2. ANTECEDENTES

2. 1. Histoquímicos

Los estudios sobre la transformación de albura a duramen han empleado técnicas histoquímicas que permiten localizar y evaluar los sitios de actividad metabólica, así como material de reserva. En este sentido, existen trabajos que demuestran que algunas enzimas se encuentran asociadas con el proceso de transformación de albura a duramen. Utilizando este tipo de técnicas, Onefeghara y Koroma (1974) localizaron la fosfatasa ácida en el tallo de *Curcubita* y encontraron que la actividad de esta enzima disminuye con la edad de la planta. Un estudio realizado por Hillis (1975, 1987) encontró que cuando la albura de *Rhus succdanea*, *Azadirachta indica* y *Samanea saman*, es tratada con ácido 2-cloroetil-fosfónico (sustancia que forma etileno) los granos de almidón desaparecen, mientras que la presencia de lípidos y polifenoles aumenta y que las actividades de la lipasa, la fosfatasa ácida, la succinato deshidrogenasa (SDH), la ATPsintetasa (ATPasa) y la peroxidasa aumentan en las células del parénquima axial y radial. Hillis (1987) sugiere que el etileno actúa sobre las enzimas involucradas en la síntesis de los extractivos del duramen. En este mismo estudio se encontró que los granos de almidón de lípidos y polifenoles. Por otra parte, un estudio realizado por Baqui *et al.* (1979) en la madera de *Melia azedarach*., mostró que la pérdida de actividad enzimática de la peroxidasa y de la SDH está directamente relacionada con el proceso de transición de albura a duramen y sugieren que los materiales de reserva, como el almidón y los lípidos, se pueden utilizar para sintetizar compuestos de tipo fenólico. En este mismo sentido, Shah *et al.* (1981) encontraron que los metabolitos primarios como el almidón y lípidos son transformados en compuestos fenólicos en la madera de *Acacia nilotica* y que la actividad enzimática de la ATPasa y SDH era alta en la zona de transición, mientras que la peroxidasa sólo se pudo detectar en la parte externa de la albura.

Para tratar de establecer la presencia y el posible papel de algunas enzimas, Nair y Shah (1983) trataron la madera de *Azadirachta indica* con paraquat (1,1'-dimetil-4,4'bipyridilium), que es una sal que acelera el envejecimiento y la muerte celular del parénquima axial y radial e induce la transformación a duramen. En este estudio se observó que la actividad de la fosfatasa ácida aumenta en la zona de transición entre albura y duramen y sugieren que su presencia podría estar involucrada en el transporte y la hidrólisis del almidón, así como con la lisis del citoplasma y la liberación de organelos. Este mismo estudio mostró que la actividad de la SDH presenta el mismo patrón que el de la fosfatasa ácida, esto es, un aumento en la actividad de esta enzima en la zona de transición,

posiblemente debido a la elevada tasa de respiración y actividad metabólica que ocurre antes de la muerte celular. Así mismo, observaron una disminución de la cantidad de granos de almidón y un aumento de lípidos, polisacáridos insolubles y de compuestos polifenólicos hacia el duramen. Un trabajo posterior realizado por Nair (1988) en la misma especie (*Azadirachta indica*), confirmó que la senescencia y muerte de las células del parénquima axial y radial ocurre en el límite del duramen y que la actividad de la peroxidasa es elevada en la zona cambial, lo que indica su relación con la lignificación.

Un estudio realizado por Datta y Kumar (1987) en ramas de *Tectona grandis*, mostró que durante la transformación de albura a duramen las enzimas peroxidasa, SDH, fosfatasa ácida, ATPasa y glucosa-6-fosfatasa sufren cambios significativos y también se observó que el contenido de almidones, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, disminuyen en la zona de transición mientras que los compuestos fenólicos aumentan hacia el duramen. Por otra parte, Subramanyam y Shah (1988), encontraron que la actividad de la fosfatasa ácida y SDH se encuentra elevada en células de parénquima cuando se produce un daño por traumatismo, lo cual promueve la formación de canales gomíferos en el floema secundario de *Moringa oleifera*.

2. 2. Carbohidratos estructurales y no estructurales

Los trabajos realizados para tratar de establecer el papel de carbohidratos estructurales durante el proceso de maduración de las células del xilema secundario, son variados. Jermyn e Isherwood (1956) encontraron que en el parénquima de albura, algunos polisacáridos de la pared, como pectinas y hemicelulosas, se hidrolizan y son usados como sustancias de reserva en los procesos de respiración celular por lo que su presencia disminuye hacia el duramen.

Otros estudios indican que estos polisacáridos de la pared (pectinas, hemicelulosas y celulosa) sirven como matrices que dirigen la polimerización oxidativa de la lignina y ciertos polifenoles (Siegel y Siegel, 1957; Goodman y Siegel, 1959).

Thorner y Northcote (1961a, 1961b) estudiaron los cambios en la composición química de las células del *cambium* vascular durante la diferenciación a elementos de xilema y de floema secundarios en cuatro especies de árboles (*Betula platyphylla*, *Pinus ponderosa*, *Acer pseudoplatanus* y *Fraxinus elatior*) y encontraron que existe un aumento en el depósito de celulosa, hemicelulosa y lignina hacia el duramen mientras que la cantidad de pectinas no cambia. En un estudio posterior Fukuda (1996) confirma que durante la formación de la pared secundaria los niveles de celulosa y hemicelulosa aumentan y el depósito de pectinas disminuye.

Saranpää y Höll (1989) al estudiar la madera de *Pinus silvestris* demostraron que las cantidades de almidón, glucosa, fructosa, sacarosa, rafinosa/estaquiosa disminuyen gradualmente de la albura hacia el duramen, mientras que la concentración de arabinosa/galactosa aumenta en dirección contraria y proponen que la hidrólisis de azúcares como arabinosa y galactosa se realiza a partir de las hemicelulosas de la pared celular y que la presencia de la galactosa puede estimular la actividad del etileno para inducir la formación del duramen. Así mismo sugieren que los azúcares son hidrolizados y transportados hacia la zona de transición donde rápidamente se incorporan como extractivos y que este fenómeno puede obedecer a factores genéticos y ambientales. En este mismo sentido, Fischer y Höll (1991, 1992) estudiaron la distribución radial en el tallo y el comportamiento estacional de carbohidratos no estructurales en *Pinus silvestris* y observaron que al inicio de la época de crecimiento, la cantidad de arabinosa, fructosa, sacarosa, glucosa/galactosa y almidón aumenta en la albura y su concentración disminuye hacia el invierno mientras que los azúcares solubles como la arabinosa/galactosa y la rafinosa/metilbiosa aumentan en dirección al duramen durante el invierno. Los resultados de este estudio confirman que azúcares como arabinosa/galactosa se pueden hidrolizar a partir de las hemicelulosas de la pared celular durante la formación del duramen. Algunos autores como Sauter y van Cleve (1994) proponen que el aumento en los niveles de azúcares solubles se relaciona con la desaparición de almidón y que el nivel más alto se registra cuando la hoja cae.

Recientemente, Piispanen y Saranpää (2001) estudiaron la variación longitudinal y radial de carbohidratos no estructurales como glucosa, sacarosa, fructosa, myo-inositol y almidón en la madera de *Betula pendula* y encontraron que la concentración de estos azúcares es muy alta en regiones cercanas al *cambium* vascular y disminuye gradualmente hacia el duramen mientras que la cantidad de glucosa y sacarosa es mayor en las ramas jóvenes cercanas al dosel, en donde la tasa de fotosíntesis es muy alta. Ellos proponen que existen variaciones dentro de un mismo árbol y entre diferentes individuos de una misma especie y que los carbohidratos de reserva son utilizados para mantener los procesos respiratorios y asegurar el crecimiento del árbol cuando no se realiza la fotosíntesis.

2. 3. Lípidos

Saranpää y Piispanen (1994) encontraron que la cantidad de triacilglicéridos (lípidos) y ésteres de esterilo en la madera de *Pinus silvestris* disminuye hacia la zona de transición y que la concentración de ácidos grasos aumenta en el duramen. Estos autores sugieren que los ésteres de esterilo podrían estar involucrados en el almacenamiento de los ácidos grasos y esteroides, así como en el transporte intracelular. Estudios más recientes han demostrado que la actividad de la fosfolipasa

A₁ y A₂ y la lipasa disminuye hacia la zona de transición en la madera de *Robinia pseudoacacia* (Hillinger *et al.* 1996a, 1996b) y que dichas enzimas están involucradas en el metabolismo de los triacilglicéridos. Asimismo, se encontró que la cantidad de fosfolípidos, ésteres libres, di y triacilglicéridos, disminuyen hacia la zona de transición mientras que los ésteres de esterilo se acumulan en la periferia del duramen. Por otra parte se observó que el depósito de los ácidos grasos aumenta hacia el duramen y que estos compuestos son modificados en su longitud molecular y en su grado de instauración. En este sentido, se ha propuesto que los ácidos grasos son capaces de realizar diversas funciones dentro del duramen, como por ejemplo, hacer más resistente al tronco a la pudrición ejerciendo una actividad antimicrobiana y pueden actuar como segundos mensajeros o precursores de hormonas (Hillinger *et al.* 1996a, 1996b).

2. 4. Proteínas

Existe una gran cantidad de trabajos que hacen referencia a las proteínas de almacenamiento. Un estudio realizado por Ziegler (1968) demostró que la presencia de proteínas y aminoácidos disminuyen hacia el duramen en la madera de *Pinus strobus*, *Larix decidua* y *Fagus sylvatica* y que existe un aumento en la cantidad de vitaminas hidrolizables como la tiamina, riboflavina, nicotinamida, piridoxina y biotina hacia la zona de transición, en donde posiblemente actúan como cofactores de diversas enzimas que pudieran estar involucradas en el proceso de transformación de albura en duramen, como carboxilasas, transaminasas, deshidrogenasas y ácido graso sintetasas. Sauter y Wellenkamp (1988), revelaron que en *Salix caprea* existen cuerpos proteicos de 0.5 a 2.5µm de masa molecular aproximada a 30-32 kilodaltones (KDa), que se localizan dentro de las vacuolas del parénquima radial. Al estudiar la madera de *Populus x canadensis*, Sauter *et al.* (1988) encontraron proteínas con la misma masa molecular dentro del parénquima de radio. Sauter y van Cleve (1989) observaron que estas proteínas se presentaron en otoño y desaparecieron en primavera, en la misma especie. Los mismos autores en 1990 encontraron un polipéptido de 32 KDa en el parénquima radial de la madera de *Populus x canadensis*, el que desaparece durante el surgimiento de nuevos brotes en el periodo de primavera.

Langheinrich y Tischner (1991) identificaron dos polipéptidos de 32 y 36 KDa en la corteza, la madera y las raíces de *Populus x canadensis* y se ha propuesto que estas proteínas de almacenamiento están relacionadas con cambios estacionales, ya que son abundantes en invierno y no se detectan en verano. Cleve y Apel (1993) propusieron que estos dos polipéptidos (32 y 36 KDa) podrían ser parte de una proteína de almacenamiento de 58 KDa.

Sauter (2000) propone que la acumulación de proteínas en el parénquima radial se inicia cuando las hojas se tornan amarillas y caen, con lo cual se inicia el proceso de hidrólisis, recuperación, síntesis y almacenamiento de proteínas en el parénquima axial y radial de los tallos con crecimiento secundario.

2. 5. Extractivos

Hillis (1958) propone que las leucoantocianidinas son los probables precursores de los taninos condensados y que su cantidad aumenta de la zona de transición hacia el duramen. Sin embargo, la formación de flavonoides es controversial. Por un lado, Ziegler (1968) propone que estos compuestos son sintetizados en la zona de transición de albura a duramen mientras que Hillis (1987) sugiere que los flavonoides son importados desde las hojas hacia el floema luego pasan al *cambium* y de ahí a las células del parénquima del xilema secundario. Magel *et al.* (1994) identificaron en la madera de *Robinia pseudoacacia*, la presencia de tres extractivos: flavonol robinetina (ROB), un derivado del ácido hidroxicinámico (HCA) y flavonol dehidrorobinetina (DHR) en la zona de transición, los cuales aumentan hacia el duramen y su presencia se asocia a la desaparición de carbohidratos no estructurales tales como glucosa, fructosa, sacarosa y almidón de la parte interna de la albura. Por otra parte, estos autores proponen que el almidón puede ser hidrolizado en la zona de transición y entonces ser la principal fuente de carbonos para la síntesis de ácido hidroxicinámico y flavonoides.

Quintanar *et al.* (1997) realizaron un estudio a nivel de las paredes celulares en el cual se detectaron transformaciones de las sustancias matriciales en la madera de *Gliricidia sepium* (Fabaceae). En este estudio se encontró que las células de la albura presentan paredes más delgadas, la cantidad de lignina es menor y que existe una ausencia de pectinas esterificadas en todos los elementos celulares, mientras se resalta la presencia de tálides de tipo común y esclerosadas tanto en albura como en duramen. Así mismo, este estudio mostró que existe una transformación muy rápida de albura a duramen, lo cual se acompaña por un aumento en la cantidad de extractivos en esta última región y esta diferencia podría favorecer la resistencia natural de esta especie a los ataques de patógenos.

3. HIPÓTESIS

La formación del duramen está relacionada con la estacionalidad, por lo tanto se espera que durante la época de sequía la actividad enzimática sea baja y que los materiales de reserva o de almacenamiento como el almidón, los lípidos y proteínas se utilicen para mantener el funcionamiento metabólico del árbol. Durante la época de lluvia se espera que la actividad enzimática aumente y que los materiales almacenados sean degradados y transformados para ser utilizados en el crecimiento de tejidos y órganos fotosintéticos.

4. OBJETIVOS

4. 1. General

Analizar las diferencias de algunos componentes estructurales, de reserva y enzimáticos en la albura y el duramen de *Haematoxylum brasiletto* Karst y *Lysiloma tergemina* Benth en las épocas de lluvia y sequía.

4. 2. Particulares

1. Realizar el estudio anatómico de la albura y el duramen de *H. brasiletto* y *L. tergemina*.
2. Comparar histoquímicamente algunos de los componentes de la pared celular (celulosa, pectinas y hemicelulosas), así como los materiales de almacenamiento (almidones, lípidos y proteínas) y/o extractivos (taninos, ligninas, polifenoles, catequinas y leucoantocianidinas) en los elementos celulares de albura y duramen.
3. Localizar, evaluar y comparar cualitativamente, con métodos histoquímicos, algunas de las enzimas involucradas en el proceso de transformación a duramen en el xilema secundario de *H. brasiletto* y *L. tergemina*.
4. Identificar la presencia de proteínas intravacuolares en parénquima radial, por medio de colorantes específicos, utilizando para ello la microscopia de luz.
5. Determinar el contenido de proteínas del parénquima radial y analizar a las proteínas solubles de la albura y el duramen de estas dos especies por medio de electroforesis.
6. Comparar los resultados obtenidos en la época de lluvia y sequía.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5. 1. Colecta

El material biológico que se utilizó proviene de la albura y el duramen de fustes y ramas de dos árboles sanos de *Haematoxylum brasiletto* con alturas de 6 a 7 m y dos de *Lysiloma tergemina* con alturas de 7 a 8 m, procedentes de una selva baja caducifolia localizada a cuatro kilómetros al Noroeste del municipio de Tlaquiltenango en el estado de Morelos, a 1050 metros sobre el nivel del mar y con una pendiente del 10%. La colecta de época de sequía se realizó el 16 de Abril del 2000 y la de época de lluvia se realizó el 28 de Septiembre del mismo año.

5. 2. Muestreo

Los cuatro árboles estudiados eran sanos de fustes rectos y bien formados. Los diámetros a la altura del pecho fueron entre 15-20 cm. Además de los fustes de cada individuo se obtuvieron cinco muestras de ramas con albura y duramen, estas últimas de 15 cm de largo pero de diferentes diámetros de 2 a 7 cm (Figura 2a y 3a). Los árboles se marcaron con pintura de aceite para muestrearlos tanto en época de sequía como de lluvia. Se tomaron muestras de herbario los cuales se depositaron en el Herbario de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, del Instituto Politécnico Nacional.

Este material fue transportado en frío (hielo) para minimizar alteraciones en la actividad enzimática. Las muestras se trasladaron al laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México para hacer el estudio histoquímico enzimático y el análisis de proteínas y en el Laboratorio de Anatomía y Tecnología de la Madera de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa se hicieron los estudios anatómico e histoquímico no enzimático.

5. 3. Procesamiento

De los fustes se obtuvieron 3 rodajas de cada individuo y de allí se obtuvieron cubos de 1 X 1 cm los cuales se fijaron en formol-alcohol-ácido acético (FAA) para utilizarse en el estudio anatómico microscópico y en las pruebas de histoquímica no enzimática para carbohidratos y extractivos, otros cubos se fijaron en calcio-formol para las pruebas de lípidos y ácidos grasos. Los cubos restantes se usaron en fresco para la prueba de vainillina y para los estudios enzimáticos y de proteínas (Figura 2b y 3b). De los cubos se obtuvieron cortes transversales, tangenciales y radiales de 4–20 μ m de grosor con criostato, xilotomo o con navajas de un solo filo (Figura 2c,d y e, 3c, d y e).

De los fustes se obtuvieron tablillas para el estudio anatómico macroscópico y se depositaron en la Xiloteca de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa (Figura 2b y 3b). De las ramas gruesas y delgadas se obtuvieron cortes transversales, tangenciales y radiales de 4–20 μm de grosor y virutas y/o astillas que se utilizaron para el estudio enzimático así como para el de proteínas del parénquima radial.

5. 4. Estudio anatómico

El estudio anatómico microscópico se hizo usando preparaciones fijas de cortes y de material disociado preparados de acuerdo con Johansen (1940). En las preparaciones fijas se describió, contó y midió: el número de poros por mm^2 , el diámetro de los poros, el índice de vulnerabilidad (el valor promedio del diámetro de los poros entre el número de poros) el tipo de puntuaciones intervasculares y el tipo de platina de perforación; el número de radios dividido entre un mm lineal, la altura y la anchura de los radios uniseriados y multiseriados, así como el tipo de células que lo forman, y el número de series en los radios multiseriados. En el material disociado se midió: la longitud, diámetro y el grosor de la pared celular de los elementos de vaso y fibras, tanto en albura como en duramen. Se hicieron como mínimo 50 mediciones tanto en preparaciones fijas como en material disociado. A los elementos mensurables se denominaron con base en la media de acuerdo con la clasificación de Chattaway (1932) IAWA (1937) y la IAWA (1939). Las descripciones anatómicas de la madera se hicieron de acuerdo con IAWA (1989) y el color de la albura y el duramen se obtuvo con las cartas de Munsell (1990) (Anexo 2).

5. 5. Estudio histoquímico no enzimático

El material biológico que se usó en esta parte del estudio, fue fijado previamente en FAA o en calcio-formol y para la reacción de vainillina el material era fresco. Los cortes se lavaron con agua destilada o con alcohol al 70% para eliminar el fijador. Posteriormente dichos cortes fueron usados en diferentes protocolos (Johansen, 1940; Jensen, 1962; O' Brien y McCully, 1964 y Krishnamurty, 1988) para la determinación de los distintos compuestos.

5. 5. 1. Almidón: para identificar el almidón el tejido fue tratado con Iodo-Yoduro de potasio (Anexo 3A). En *H. brasiletto* y *L. tergemina* el parénquima axial y radial los granos de almidón se tiñen de azul a negro (Figura 4e y 5e).

5. 5. 2. Hemicelulosas: (polisacáridos sulfatados y carboxilados) se tiñeron con azul de toluidina O' durante 5 minutos (Anexo 3B). En *H. brasiletto* las punteaduras de los vasos y el parénquima radial se tiñen de violeta y (Figura 4c). En *L. tergemina* las punteaduras de vasos de

tiñen de violeta, la pared de las fibras se tiñen de azul y violeta y el parénquima axial de violeta (Figura 5c).

5. 5. 3. Celulosa: la presencia de celulosa se identificó usando cloro-yoduro de zinc (Anexo 3C). En *H. brasiletto* algunas paredes de fibras, el parénquima axial y el radial se tiñen de azul-violeta (Figura 4a). En *L. tergemina* la pared de vasos se tiñen de azul, la pared de fibras se tiñen de violeta y el parénquima axial y radial de azul y violeta (Figura 5a).

5. 5. 4. Pectinas ácidas: para determinar pectinas ácidas, los cortes se colocaron en una solución acuosa de ácido tánico al 1% durante 10 minutos. Después de enjuagar 10 minutos con agua corriente, los cortes se colocaron en una solución acuosa de cloruro férrico al 3% durante 5-10 minutos (Anexo 3D). En *H. brasiletto* y *L. tergemina* la pared de vasos, fibras, parénquima axial y radial se tiñen de negro (figura 4b y 5b).

5. 5. 5. Pectinas esterificadas: para determinar pectinas esterificadas se usaron cortes en fresco. Estas se trataron con hidroxilamina alcalina. Después de 5-10 minutos, esta reacción se acidificó con una solución de HCl-Etanol 95% (1:3) y después se adicionó cloruro férrico al 10% (Anexo 3E). En *H. brasiletto* y *L. tergemina* la pared de los vasos, las fibras, el parénquima axial y el radial se tiñen de rojo (Figura 4d y 5d).

5. 5. 6. Ligninas: para evaluar ligninas, los cortes se trataron con una solución alcohólica de fluoroglucinol al 1% y después de 2-5 minutos se añadieron dos o tres gotas de HCl (Anexo 3F). En *H. brasiletto* la pared de vasos, fibras, el parénquima axial y radial se tiñen de fucsia (Figura 4i y 5i). En *L. tergemina* en la albura externa todos los elementos celulares se tiñen de amarillo lo que significa que no hay lignina y en la albura interna pared de vasos, fibras y el parénquima axial y radial se tiñen de fucsia. En otras muestras se usó azul de toluidina O' que tiñen de color verde-azul la lignina (Anexo 3B).

5. 5. 7. Polifenoles: la presencia de polifenoles se detectó usando por un lado cortes de tejido fresco a los cuales se le agrego dos a tres gotas del reactivo de vainillina (Anexo 3G). En *H. brasiletto* y *L. tergemina* la pared de vasos, fibras y parénquima axial y radial se tiñen de rojo (Figura 4l y 5l). Otros cortes de material fijado en FAA se tiñeron con azul de toluidina. Los polifenoles se tiñen de verde turquesa o verde azul (Anexo 3b). Los taninos se detectaron con Iodo-Yoduro de potasio (Anexo 3A). En *H. brasiletto* el parénquima radial se tiñe de rojo (Figura 4k). En *L. tergemina* la pared de los vasos, las fibras y el parénquima axial y radial se tiñen de rojo (Figura 5k).

5. 5. 8. Lípidos y lipoproteínas: Para teñir lípidos se usaron cortes en fresco o fijados en calcio-formol. Para la determinación de lípidos y lipoproteínas los cortes se colocaron en alcohol al 70% y posteriormente se tiñeron con Negro de Sudán B y se incubaron a 60°C durante 1 hora, después se lavaron con alcohol 70 % (Anexo 3H). En *H. brasiletto* y *L. tergemina* el parénquima axial y radial se tiñe de negro y de negro-azul (Figura 4h y 5h).

5. 5. 9. Lípidos totales: como una alternativa para observar lípidos totales, los cortes se trataron con dos métodos diferentes. Por una parte, los cortes se colocaron en alcohol 50 %, después se tiñeron con una solución saturada de Sudán IV e inmediatamente se lavaron con alcohol al 50 %. (Anexo 3I). En *H. brasiletto* y *L. tergemina* el parénquima radial se tiñe de rojo (Figura 4f y 5f). El otro método consiste en teñir con Azul Nilo sulfatado e incubar a 37°C. Después se agrega ácido acético y se incuba a 37°C. (Anexo 3J). En *H. brasiletto* la pared de fibras, vasos y el parénquima radial sin reacción y en el parénquima axial los lípidos neutros se tiñen como pequeñas gotas de rojo (Figura 4j). En *L. tergemina* los lípidos neutros se tiñen como pequeñas gotas de rojo dentro del parénquima radial (Figura 5j).

5. 5. 10. Ácidos grasos: como alternativa para detectar ácidos grasos y lípidos neutros, los cortes se tiñeron con Azul Nilo y se incubaron a 60°C. Después se lavaron con dH₂O y se les agregó ácido acético. Después se lavaron en dH₂O, se adicionaron de tres a cinco gotas de HCl al 0.5% para finalmente enjuagar con dH₂O (Anexo 3K). En *H. brasiletto* la pared del parénquima axial se tiñe de azul (Figura 4j y 5j). En *L. tergemina* la pared de vasos y fibras y parénquima axial y radial se tiñen de azul y se detectan gotas rojas de los lípidos neutros en el parénquima radial (Figura 5j).

5. 6. Estudio histoquímico enzimático

Con este tipo de estudios se localizó y evaluó *in situ* la actividad enzimática de manera cualitativa. Se usaron cortes en fresco con el propósito de no alterar la actividad enzimática. De acuerdo con van Fleet (1952), Pearse (1960), Bancroft (1975), Gahan (1984), Harris y Oparka (1994), los cortes se trataron con diferentes métodos para determinar la presencia de actividad enzimática en la albura y el duramen.

Con el fin de corroborar la especificidad de cada una de las reacciones, se utilizaron simultáneamente tanto los cortes a los que se les denominó experimentales, que se incubaron con sustrato, el cual varío de acuerdo con el tipo de enzima a localizar y los controles que fueron los cortes sin sustrato para la enzima estudiada. En este tipo de estudios la respuesta de la prueba se basa en la presencia e intensidad de las reacciones coloreadas. En todos los casos se tomaron fotografías de las preparaciones de material en fresco.

5. 6. 1. Fosfatasa ácida: Para detectar la actividad de la fosfatasa ácida, los cortes experimentales se incubaron durante 1 hora a 37°C en la solución con sustrato y en oscuridad total. Los controles se trataron con buffer de acetatos a pH = 5 bajo las mismas condiciones (Anexo 3L). En *H. brasiletto* y *L. tergemina* la pared de los vasos, el parénquima axial y radial se tiñen de rojo (figura 4n y 5n).

5. 6. 2. Catalasa: Para detectar la actividad de la catalasa los cortes experimentales se incubaron en una solución con sustrato aproximadamente durante 1 hora. Para inhibir la actividad de dicha enzima, los cortes control se incubaron 30 minutos con 3-amino-1,2,4-triazol (20mM). Para revelar la presencia de actividad, tanto los cortes control como los del experimento se incubaron en una solución de diaminobencidina (DAB)-buffer 2- amino-2-methyl-1, 3- propanediol a un pH = 10 con peróxido de hidrógeno durante 30 minutos a 37 °C. En los controles se excluyó al peróxido de hidrógeno. Después de este tiempo todos los cortes se lavaron con ddH₂O y se observaron al microscopio (Anexo 3M). En *H. brasiletto* la pared de vasos y parénquima axial y radial se tiñen de café (Figura 4m). En *L. tergemina* el parénquima axial y radial se tiñen de castaño oscuro (Figura 5m).

5. 6. 3. Fenol- oxidasa: Para la localización de fenol-oxidasa, los cortes experimentales se incubaron durante 20 minutos a 37°C en la solución sustrato y en oscuridad. Los cortes control se incubaron bajo las mismas condiciones pero en buffer fosfo-citrato a un pH = 4.5. Finalmente los cortes experimentales y los controles se lavaron con ddH₂O (Anexo 3N). En *H. brasiletto* y *L. tergemina* la pared de vasos parénquima axial y radial se tiñen de azul (Figura 4o y 5o).

5. 6. 4. Succinato deshidrogenasa (SDH): Para la localización de esta enzima los cortes se incubaron durante 1 hora a 37°C en la solución sustrato. Pasado este tiempo, los cortes se incubaron en formol salino por 15 minutos y entonces se tiñeron con verde de metilo al 2 % durante 5 minutos. Finalmente los cortes se lavaron con ddH₂O (Anexo 3O). En *H. brasiletto* y *L. tergemina* el parénquima axial y radial se tiñen de negro (Figura 4p y 5p).

5. 7. Estudio de proteínas del parénquima radial

5. 7. 1. Proteínas: Para identificar la presencia de proteínas de reserva se utilizaron cortes de material fresco de 4 a 7 µm de grosor. Los cortes experimentales se tiñeron con rojo Ponceau 2R y con Azul de Coomassie. Por otro lado se usaron muestras control que se trataron con pepsina para digerir los cuerpos proteicos (Anexo 3P). Con Ponceau el parénquima radial de *H. brasiletto* se tiñen de rojo (Figura 4g). En *L. tergemina* el parénquima radial se tiñen de color azul (Figura 5g).

5. 7. 2. Extracción y cuantificación de proteínas totales: Para este ensayo se utilizaron virutas y/o astillas de los fustes y ramas de cada especie y en algunos casos el material se pulverizó

con congelación con ayuda de un molino criogénico (Freezer Mill 6750). De cada muestra de viruta, astilla o polvo, se pesaron de 0.075 a 1g; se colocaron en un tubo cónico de 15 mililitros (ml) con 3 ml de buffer Tris-HCl 0.0625 M pH 6.8-SDS 0.1% y entonces se incubaron a 4°C con agitación durante 96 horas. La concentración total de proteínas en el extracto resultante de cada muestra se determinó usando el ensayo de proteínas de Bio-Rad de acuerdo a las especificaciones del fabricante y cuyo principio se basa en el método descrito por Bradford (1976). Los resultados de este ensayo se expresan como μg de proteína/mg de tejido fresco (Anexo 3Q) (Tabla 9).

5. 7. 3. Evaluación de proteínas por electroforesis: Para este ensayo se utilizaron 2.8 ml de cada muestra de los extractos de proteínas totales y se dializaron contra agua o contra un buffer Tris-HCl 0.00625 M pH 6.8-SDS 0.001 % durante 96 horas a 4 °C. Después de la diálisis, las muestras se deshidrataron completamente utilizando un concentrador Speed Vac Plus RC110A (Savant). Las muestras fueron resuspendidas con ddH₂O hasta obtener un volumen final de 75-200 microlitros (μl) y nuevamente se determinó la concentración de proteínas totales. Cada una de las muestras (2-4 μg de proteínas totales) fue sujeta a una electroforesis en geles de poliacrilamida al 12% en condiciones reductoras (Laemmli, 1970), corriendo los geles a 150 volts (Figura 6, 7 y 8).

6. RESULTADOS

6. 1. Estudio anatómico

6. 1. 1. Estudio anatómico de *Haematoxylum brasiletto* Karst.

Distribución: aparece en la vertiente del Pacífico, desde Baja California, Chihuahua hasta Chiapas y también se encuentra en la vertiente del Golfo de Veracruz, Campeche y Yucatán. Esta especie también se puede localizar en los estados de Puebla, México y Morelos (Standley, 1982; Martínez, 1994).

Nombre común: Brasil y palo de tinta (Morelos), brasilito y marismeña (Sonora), palo Brasil y jallo huchagoso (Chihuahua), espolón de gallo (Michoacán) y azulillo (Oaxaca) (Barajas-Morales y León, 1989).

Asociación: *Conzattia multiflora*, *Lysiloma divaricata*, *Lysiloma tergemina* y *Bursera bipinnata*.

Características macroscópicas

Los árboles de *H. brasiletto* presentan diferencias muy marcadas de color entre albura y duramen. La albura es de color castaño muy pálido 10YR (8/3) y el color del duramen va de rojo oscuro 10R(3/6) a castaño rojizo oscuro 2.5YR(2.5/4). El duramen de esta especie no forma un cilindro típico sino que desarrolla brazos siguiendo la forma del tallo. No presenta olor, la albura sin sabor característico y el duramen tiene sabor amargo, el hilo es entrecruzado, la textura es fina y el veteado es pronunciado (Figura 2a y b).

Características microscópicas en albura y duramen.

Esta especie presenta porosidad difusa, principalmente son poros solitarios, algunos son múltiples radiales de 2 a 3 células y agrupados, son moderadamente numerosos. Los elementos de vaso son de diámetros tangenciales moderadamente pequeños y de longitud muy corta (Figura 2c, Tabla 1). Sus paredes presentan punteaduras areoladas alternas y platinas de perforación simple. Los campos de cruzamiento presentan punteaduras similares a las intervasculares. Los vasos cercanos al duramen y los del duramen presentan extractivos.

El arreglo del parénquima axial es en bandas de más de 3 células de ancho y presenta abundancia de gomas y cristales romboidales (Figura 2c). Los radios uni y multiseriados son de tipo homogéneo. Los radios multiseriados son muy bajos y moderadamente finos. Los uniseriados son extremadamente bajos y extremadamente finos. Son moderadamente numerosos (Figura 2d y e, Tablas 3).

Las fibras son de tipo libriforme de longitud moderadamente corta, de diámetro fino y de paredes gruesas (Figura 2d y e, Tabla 4).

Haematoxylum brasiletto Karst.

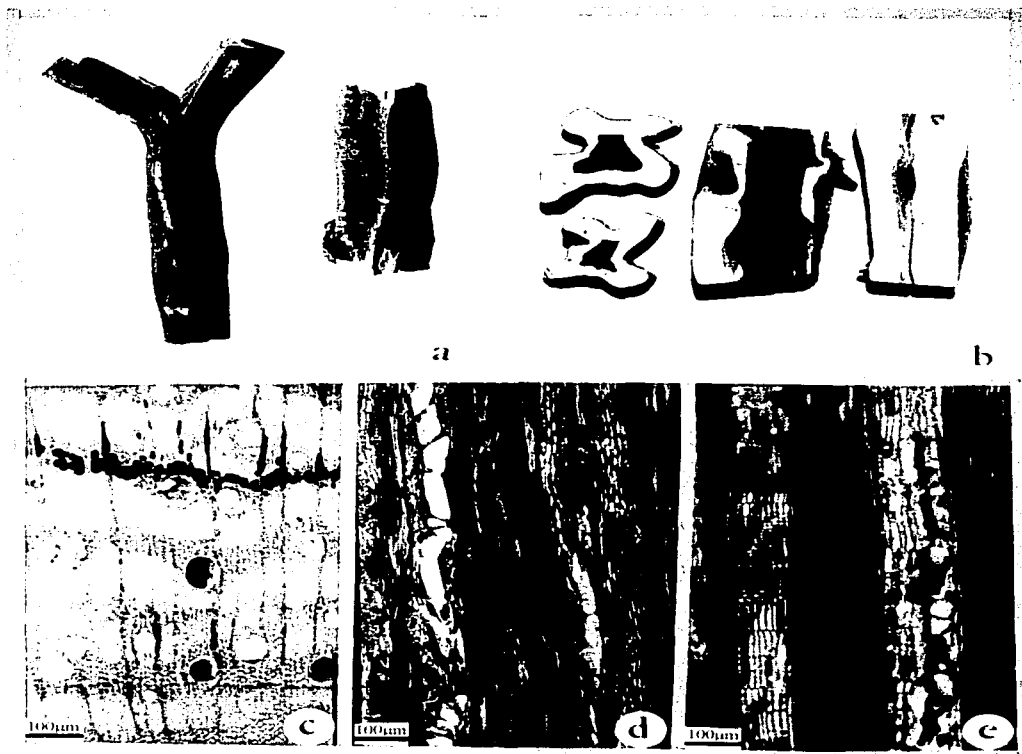


Figura 2. a) fuste y rama; b) rodajas y tablillas; c) corte transversal 10X; d) corte tangencial 10X; e) corte radial 10X.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

6. 1. 2. Estudio anatómico de *Lysiloma tergemina* Benth.

Distribución: desde las costas del sur de Nayarit hasta Puerto Vallarta (Colima, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Morelos y Puebla) (Standley, 1982; Martínez, 1994; Colin y Monroy, 1997).

Asociación: *Conzattia multiflora*, *Haematoxylum brasiletto*, *Lysiloma divaricata* y *Bursera bipinnata*.

Nombre común: pata de cabra.

Características macroscópicas

Los árboles de esta especie presentan diferencias muy marcadas de color entre albura y duramen. El color de la albura va desde castaño muy pálido 10YR (8/3) hasta amarillo 2.5Y(8/6) y el duramen es de color castaño 7.5YR(5/4). Los tallos de esta especie son cilíndricos y el duramen concéntrico. No presenta olor ni sabor característicos, el hilo es entrecruzado, la textura mediana y el veteado pronunciado (Figura 3a y b).

Características microscópicas en albura y duramen.

Esta especie presenta porosidad difusa, la mayoría son poros solitarios y múltiples radiales de 2 o 3 células y algunos agregados de 3 a 4 células, moderadamente pocos. Los elementos de vaso son de diámetros tangenciales medianos y de longitud moderadamente corta (Figura 3c). Sus paredes presentan punteaduras areoladas alternas y platinas de perforación simple. Los campos de cruzamiento presentan punteaduras similares a las intervasculares. Los vasos cercanos al duramen y los del duramen presentan extractivos (Tabla 1).

El arreglo del parénquima axial es aliforme y aliforme confluyente de más de 3 células de ancho con cristales romboidales (Figura 3c). Los radios son uniseriados y biseriados de tipo homogéneo, ambos son extremadamente bajos y extremadamente finos. Son moderadamente numerosos (Figura 3d y e, Tabla 3).

Las fibras son de tipo libriforme de longitud moderadamente corta, de diámetro fino, de paredes gruesas (Figura 3d y e, Tabla 4).

Para ambas especies se determinó el índice de vulnerabilidad y se encontró que el valor de este índice en la albura de *L. tergemina* fue más alto comparado con el de *H. brasiletto* y es menor en el duramen de ambas especies (Tabla 2).

Lysiloma tergemina Benth.

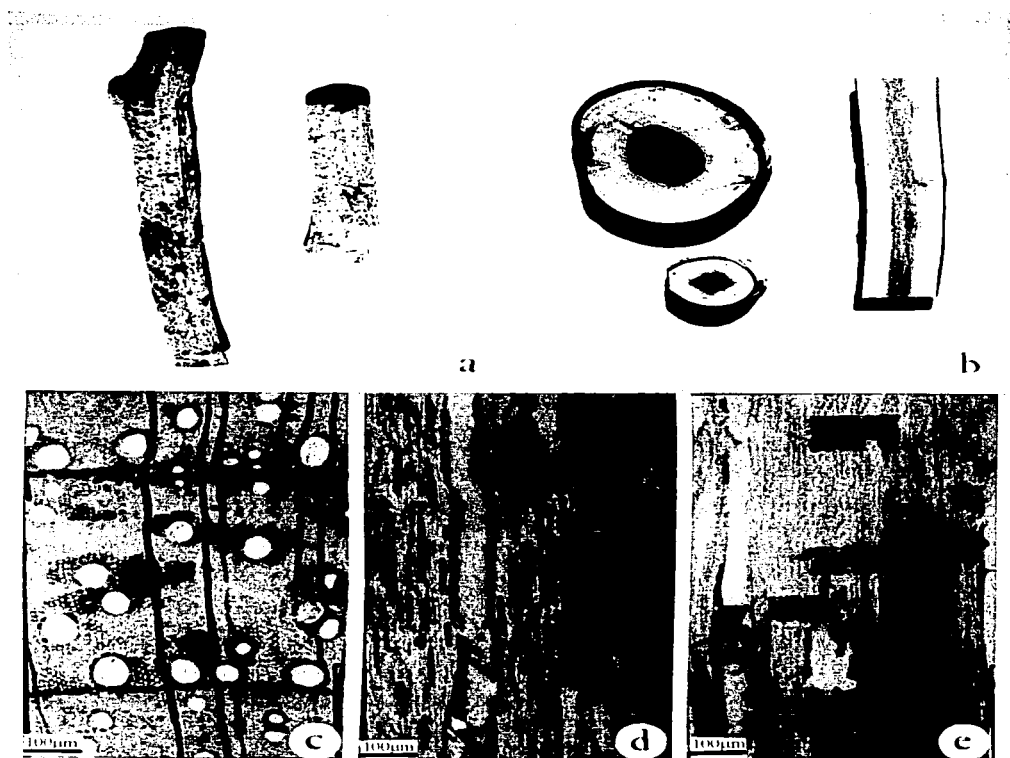


Figura 3. a) ramas; b) rodajas y tablilla; c) corte transversal 10X; d) corte tangencial 10X; e) corte radial 10X.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 1. Cuadro comparativo de los caracteres microscópicos de los elementos de vaso.

Especie	Longitud	Diámetro	Grosor de pared	Número de poros por mm ²
<i>H. brasileto</i>	234 (110-376)	76 (36-136)	7 (4-10)	13 (9-16)
<i>L. tergemina</i>	286 (200-384)	101 (42-166)	7 (4-10)	8 (6-14)

Promedios en micras, (dato mínimo y máximo)

Tabla 2. Cuadro comparativo de la relación eco-anatómica

Especie	Vulnerabilidad	
	Albura	Duramen
<i>H. brasileto</i>	7	5
<i>L. tergemina</i>	15	11

Tabla 3. Cuadro comparativo de los caracteres microscópicos de los radios.

Especie	Altura		Anchura		Número por mm lineal	Número de series de los multiseriados mm
	Multiseriados	Uniseriados	Multiseriados	Uniseriados		
<i>H. brasileto</i>	602♣ (216-1320)	260 (128-440)	50♣ (30-80)	18 (14-24)	6 (4-9)	5♣ (2-7)
<i>L. tergemina</i>	128♣ (74-168)	119 (62-172)	23♣ (16-30)	18 (14-22)	7 (5-10)	2♣ (1-2)

Promedio en micras, (dato mínimo y máximo). rayos ♣ biseriados, ♣ multiseriados

Tabla 4. Cuadro comparativo de los caracteres microscópicos de las Fibras.

Especie	Longitud	Diámetro	Grosor
<i>H. brasileto</i>	794 (440-1248)	14 (10-20)	7 (4-10)
<i>L. tergemina</i>	877 (600-1200)	18 (14-22)	6 (4-8)

Promedio en micras, (dato mínimo y máximo)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

6. 2. Estudio histoquímico no enzimático

6. 2. 1. Carbohidratos

Se observó que en el parénquima axial y radial la presencia de almidón, celulosa, polisacáridos sulfatados y carboxilados es mayor en la albura y menor en el duramen en ambas épocas del año (Tabla 5 y Figuras 4a, c, e y 5a, c, e). La cantidad de carbohidratos fue más alta en la época de lluvia que en la de sequía. En la albura de estas dos especies se observó que en la pared de las fibras, la presencia de celulosa, pectinas ácidas y polisacáridos sulfatados y carboxilados fue constante en las dos épocas del año (Tabla 5 y Figuras 4b y 5b). Por otra parte los pectatos de calcio en la pared de los vasos de ambas especies permanecieron constantes en las dos épocas del año. En todos los elementos celulares, las pectinas esterificadas mostraron un patrón inverso al que ocurre con los otros polisacáridos, es decir, se observó un aumento de estos carbohidratos en el duramen en ambas épocas (Tabla 5, Figuras 4d y 5d). También se observó que el duramen de *H. brasiletto* sufre un proceso de metil-esterificación (Tabla 5). La prueba con lugol demostró que los granos de almidón en el parénquima axial y radial de *H. brasiletto* son de forma esférica y con capas concéntricas, mientras que los de *L. tergemina*, son de forma oval y en capas excéntricas.

Tabla 5. Cuadro comparativo para identificar la presencia de polisacáridos.

Época del año		<i>H. brasiletto</i>				<i>L. tergemina</i>			
Región		Sequía		Lluvia		Sequía		Lluvia	
Reacción (componente que se identifica)	Elemento Celular	A	D	A	D	A	D	A	D
Lugol (Almidones)	P. axial	++	+	+++	+	+++	+	++++	+
	P. radial	++	+	+++	+	+++	+	++++	+
	Fibras	-	-	-	-	-	-	-	-
	Vasos	-	-	-	-	-	-	-	-
Yodo-cloruro de zinc (Celulosa)	P. axial	++	-	+++	-	+++	-	++++	-
	P. radial	++	-	+++	-	+++	-	++++	-
	Fibras	++	-	++	-	++	-	++	-
	Vasos	-	-	-	-	-	-	-	-
Ácido tánico- Cloruro férrico (Pectatos de calcio o Pectinas ácidas)	P. axial	++	-	+++	-	++	-	+++	-
	P. radial	++	-	+++	-	++	-	+++	-
	Fibras	+	-	+	-	+	-	+	-
	Vasos	++	-	++	-	++	-	++	-
Hidroxilamina alcalina (Pectinas esterificadas)	P. axial	+	+++	+	+++	+	++	+	++
	P. radial	+	+++	+	+++	+	++	+	++
	Fibras	++	+++	++	+++	+	++	+	++
	Vasos	++	+++	++	+++	+	++	+	++
Polisacáridos Sulfatados y carboxilados "Hemicelulosas" (Azul de Toluidina O')	P. axial	-	-	++	-	-	-	++	-
	P. radial	++	-	++	-	-	-	++	-
	Fibras	+	-	+	-	+	-	+	-
	Vasos	++	-	+++	-	++	-	++	-

P = parénquima, A = Albura, D = duramen, no se detecta (-), baja (+), moderada (++) , alta (+++) y muy alta(++++).

6. 2. 2. Lípidos

Estos compuestos se localizan en las células del parénquima axial y radial de la parte externa de la albura pero están ausentes en el duramen (Tabla 6 y Figuras 4f, h, j y 5f, h, j); su presencia es mayor en la época de lluvia. La presencia de lípidos neutros fue baja y sólo se detectaron en el parénquima axial de *H. brasiletto* en la época de sequía y en el parénquima radial de *L. tergemina* en la época de lluvia.

La presencia de ácidos grasos libres fue mayor en el duramen de ambas especies; su presencia no se modifica en esta zona durante las dos épocas del año.

Tabla 6. Cuadro comparativo para identificar de la presencia de diversas sustancias grasas.

Época del año		<i>H. brasiletto</i>				<i>L. tergemina</i>			
		Sequía		Lluvia		Sequía		Lluvia	
Región		A	D	A	D	A	D	A	D
Reacción (componente que se identifica)	Elemento Celular								
Sudan IV (Lípidos)	P. axial	++	-	+++	-	+	-	+	-
	P. radial	++	-	+++	-	++	-	+++	-
	Fibras	-	-	-	-	-	-	-	-
	Vasos	-	-	-	-	-	-	-	-
Sudan negro B (Lípidos y Lipoproteínas)	P. axial	+++	-	++	-	+++	-	++	-
	P. radial	+++	-	++	-	+++	-	++	-
	Fibras	-	-	+	-	+	-	+	-
	Vasos	-	-	-	-	-	-	-	-
Azul Nilo Sulfatado (Ácidos grasos libres y fosfolípidos)	P. axial	+	++	+	++	+	++	+	++
	P. radial	+	++	+	++	+	++	+	++
	Fibras	+	++	+	++	+	++	+	++
	Vasos	+	++	+	++	+	++	+	++
Azul Nilo Sulfatado (Lípidos neutros)	P. axial	++	-	-	-	-	-	-	-
	P. radial	-	-	-	-	-	-	+	-
	Fibras	-	-	-	-	-	-	-	-
	Vasos	-	-	-	-	-	-	-	-

P = parénquima, A = Albura, D = duramen, no se detecta (-), baja (+), moderada (++) , alta (+++) y muy alta(+++++).

6. 2. 3. Extractivos

La presencia de metabolitos secundarios, infiltraciones y extractivos (lignina, catequinas, leucoantocianidinas, polifenoles y taninos) fue mayor en el duramen de ambas especies y en las dos épocas del año. Sin embargo, el duramen de *H. brasiletto* mostró mayor presencia de catequinas y leucoantocianidinas y menor de taninos, mientras que el duramen de *L. tergemina* mostró un patrón opuesto (Tabla 7 y Figuras 4c, i, j, k, l y 5c, i, j, k, l).

Tabla 7. Cuadro comparativo para identificar la presencia de compuestos fenólicos.

		<i>H. brasiletto.</i>				<i>L. tergemina.</i>			
Época del año		Sequía		Lluvia		Sequía		Lluvia	
Región		A	D	A	D	A	D	A	D
Reacción (componente que se identifica)	Elemento Celular								
Azul de Toluidina O ⁺ (Ligninas)	P. axial	++	+++	+	+++	++	+++	+	+++
	P. radial	+	+++	+	+++	+	+++	+	+++
	Fibras	++	+++	+	+++	+	+++	+	+++
	Vasos	++	+++	+	+++	+	+++	+	+++
Azul de Toluidina O ⁺ (Polifenoles)	P. axial	+	++	+	++	+	++	+	++
	P. radial	+	++	+	++	+	++	+	++
	Fibras	++	+++	+	+++	+	++	+	+++
	Vasos	+	++	+	++	+	++	+	+++
Fluoroglucinol (Ligninas)	P. axial	-	+++	-	+++	-	+++	-	+++
	P. radial	-	+++	-	+++	-	+++	-	+++
	Fibras	-	+++	-	+++	-	+++	-	+++
	Vasos	-	+++	-	+++	-	+++	-	+++
Lugol (Taninos)	P. axial	-	-	-	-	-	++	-	++
	P. radial	+	++	+	++	+	+++	+	+++
	Fibras	-	-	-	-	-	++	-	++
	Vasos	-	-	-	-	-	+	-	+
Vainillina (Catequinas y leucoantocianidinas)	P. axial	-	+++	-	+++	-	+	-	++
	P. radial	-	+++	-	+++	+	++	-	++
	Fibras	-	+++	-	+++	-	+	-	++
	Vasos	-	+++	-	+++	-	+	-	+

P = parénquima, A = Albura, D = duramen, no se detecta (-), baja (+), moderada (++) , alta (+++) y muy alta(++++) .

6. 3. Estudio histoquímico enzimático

Los resultados mostraron que en la albura de ambas especies, la actividad de las enzimas catalasa, fenol-oxidasa y SDH fue alta en la época de lluvia (Tabla 8 y Figuras 4m, o, p y 5m, o, p). La catalasa, la fosfatasa ácida, la fenol-oxidasa y SDH no mostraron actividad en las células de parénquima del duramen. Por otro lado en la época de sequía, las enzimas catalasa y SDH mostraron actividad moderada en tanto que la fosfatasa ácida se presenta en esta época con una baja actividad (Tabla 8; Figuras 4n y 5n).

Tabla 8. Análisis cualitativo de presencia de actividad enzimática.

Especie		<i>Haematoxylum brasiletto</i>				<i>Lysiloma tergemina</i>			
Epoca del año		Sequia		Lluvia		Sequia		Lluvia	
Región		A	D	A	D	A	D	A	D
Enzima	Elemento celular								
Catalasa	P. axial	+	-	+++	-	+	-	+++	-
	P. radial	++	-	+++	-	++	-	+++	-
	Fibras	-	-	-	-	-	-	-	-
	Vasos	+	-	++	-	-	-	-	-
	C. V.	++	-	+++	-	+++	-	+++	-
	Corteza	++	-	+++	-	+++	-	+++	-
Fenol-oxidasa	P. axial	-	-	++	-	-	-	+++	-
	P. radial	-	-	++	-	-	-	+++	-
	Fibras	-	-	-	-	-	-	-	-
	Vasos	-	-	+	-	-	-	+	-
	C. V.	++	-	+++	-	+	-	+++	-
	Corteza	++	-	+++	-	+	-	+++	-
Fosfatasa ácida	P. axial	+	-	-	-	+	-	-	-
	P. radial	+	-	-	-	+	-	-	-
	Fibras	-	-	-	-	-	-	-	-
	Vasos	+	-	-	-	+	-	-	-
	C. V.	+	-	-	-	+	-	-	-
	Corteza	+	-	-	-	+	-	-	-
SDH	P. axial	++	-	+++	-	+	-	+++	-
	P. radial	++	+	+++	+	++	+	+++	+
	Fibras	-	-	-	-	-	-	-	-
	Vasos	-	-	-	-	-	-	-	-
	C. V.	+++	-	+++	-	++	-	+++	-
	Corteza	+++	-	+++	-	++	-	+++	-

P = parénquima, A = Albura, D = duramen, C. V. = cambium vascular, nula (-), baja (+), moderada (++) y alta (+++).

Figura 4. Reacciones histoquímicas no enzimáticas, enzimáticas y de proteínas del parénquima radial. a) Celulosa: albura-lluvia arriba (Ta. 20X) y abajo. (Tr. 20X), b) Pectinas ácidas: albura-sequia arriba (20X) y abajo (Tr. 40X), c) Hemicelulosas: albura-sequia izquierda y derecha (Ta. 100X), d) Pectinas esterificadas: duramen-lluvia. (Tr. 10X), e) Almidón: albura-lluvia (Tr. 20X), f) Lípidos: Albura-sequia (Ra. 100X), g) Proteínas: albura-sequia. (Ra 100x), h) Lípidos y lipoproteínas: albura-lluvia (Tr. 40X), i) Lignina: duramen-lluvia (Tr. 40X), j) Ácidos grasos: albura interna-sequia (Tr. 100X), k) Taninos: duramen-lluvia (Tr. 40X), l) Catequinas y leucoantocianidinas: duramen-lluvia (Tr. 20X), m) Catalasa: albura-sequia arriba (Tr. 10X), Albura-lluvia abajo (Tr. 10X), n) Fosfatasa ácida: albura- sequia (Tr. 10X), o) Fenol-oxidasa: albura- lluvia (Tr. 10X), p) SDH: albura-sequia (Tr. 20X).

Figura 5. Reacciones histoquímicas no enzimáticas, enzimáticas y de proteínas del parénquima radial. a) Celulosa: albura-sequia arriba (Ta. 20x), albura-lluvia: abajo (Tr. 20X), b) Pectinas ácidas: albura-lluvia (Tr. 20X), c) Hemicelulosas: albura-lluvia (Tr. 20X), d) Pectinas esterificadas: duramen-lluvia (Tr. 40X), e) Almidón: albura-lluvia (Tr. 20X), f) Lípidos: albura-lluvia (Ra. 20X), g) Proteínas: albura-sequia (Ra. 100X), h) Lípidos y lipoproteínas: albura-lluvia izquierda y derecha (Ta. 40X), i) Lignina: albura externa-lluvia (Tr. 10X), j) Ácidos grasos y lípidos neutros: albura interna-lluvia (Ra. 40X), k) Taninos: duramen-sequia izquierda (Tr. 100X) y derecha (Tr. 40X), l) Catequinas y Leucoantocianidinas: duramen-lluvia (Tr. 40X), m) Catalasa: albura-lluvia (Tr. 10X), n) Fosfatasa ácida: albura-sequia izquierda (Ra. 20X) y derecha (Tr. 10X), o) Fenoloxidasa: albura-lluvia izquierda (Ra. 40X) y derecha (Tr. 10X), p) SDH: albura-sequia (Tr. 40X).

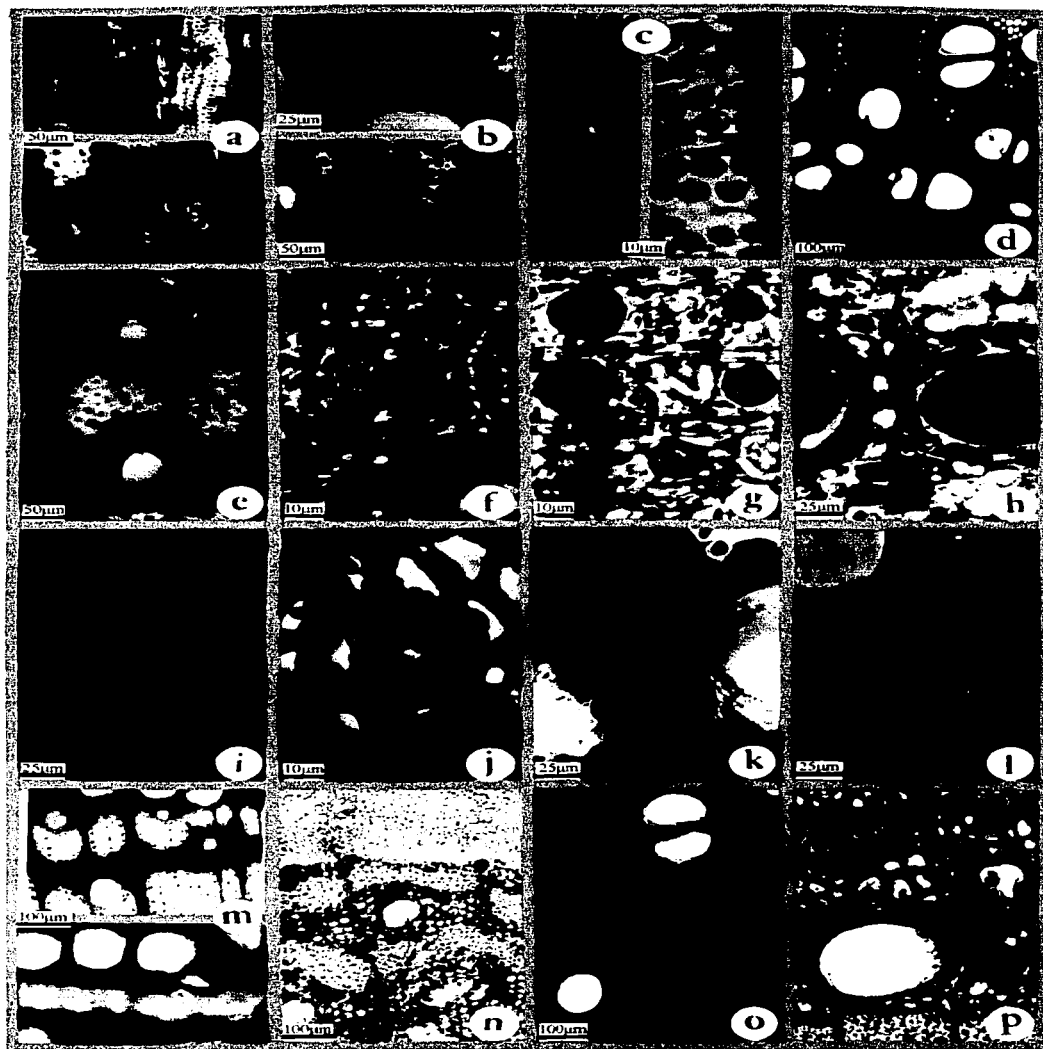


Figura 4. *Haematoxylum brasiletto* Karst.

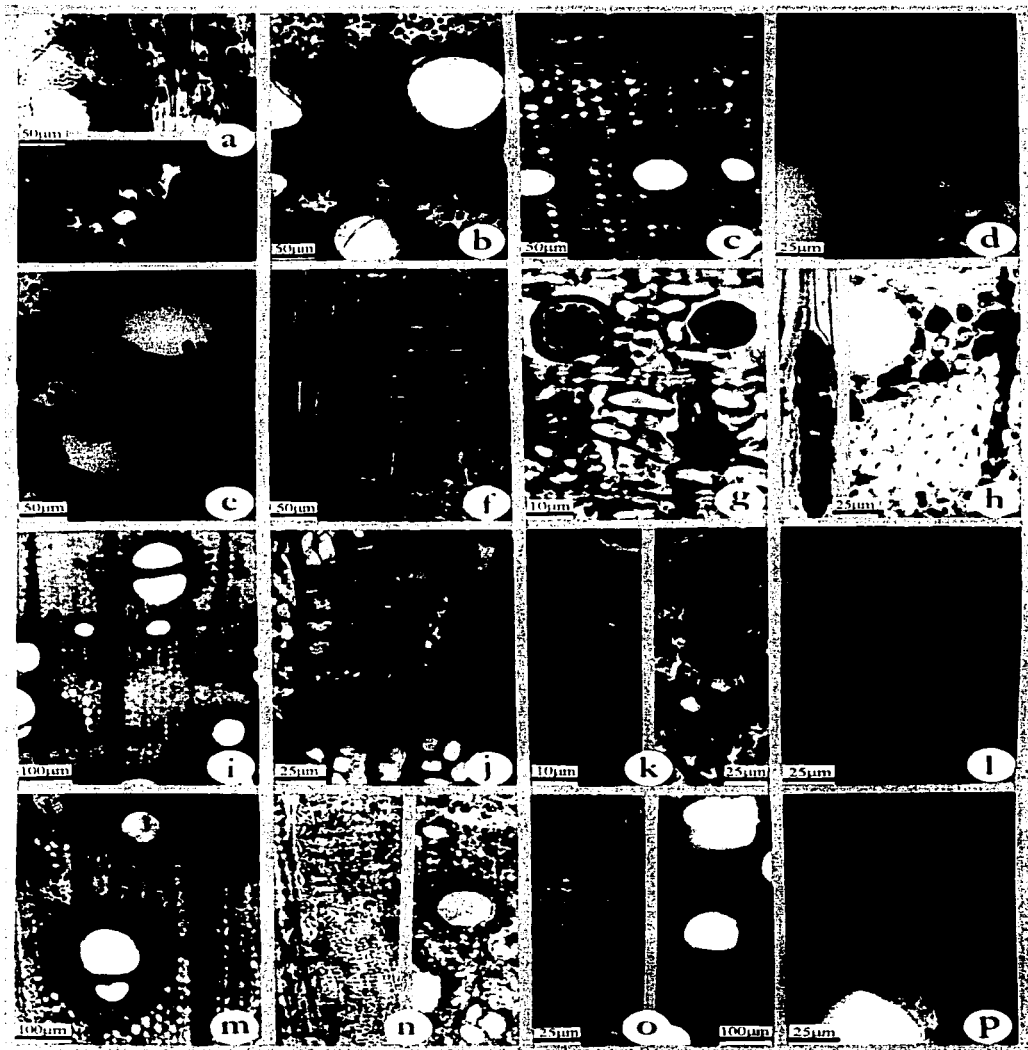


Figura 5. *Lysiloma tergema* Benth.

6. 4. Estudio de proteínas del parénquima radial

6. 4. 1. Presencia de proteínas de almacenamiento

La microscopia de luz reveló que en ambas especies, la presencia de proteínas de almacenamiento intravacuolares ocurre en el parénquima radial en la época de sequía. En secciones transversales, esos cuerpos proteicos mostraron tinción positiva y digestión enzimática con pepsina, lo cual indica su naturaleza proteica (Figuras 4g y5g).

6. 4. 2. Contenido de proteínas totales

Para ambas especies se observaron grandes diferencias en el contenido de proteínas totales de la albura de ramas delgadas y gruesas entre la sequía y la lluvia. En la madera de *H. brasiletto* el contenido de proteínas totales fue de 2.07 - 2.41 $\mu\text{g}/\text{mg}$ en la época de sequía y de 0.60-0.64 $\mu\text{g}/\text{mg}$ para la de lluvia. En el caso de la madera de *L. tergemina*, el contenido fue de 1.52 - 1.80 $\mu\text{g}/\text{mg}$ en la época de sequía y de 0.38 - 0.40 $\mu\text{g}/\text{mg}$ en la época de lluvia (Tabla 9).

Tabla 9. Determinación de Proteínas totales.

Especie	Rama	Mayo (Sequía)	Septiembre (Lluvia)
		μg proteína/ mg de tejido fresco	μg proteína/mg de tejido fresco
<i>H. brasiletto.</i>	Delgada	2.17	0.64
		2.41	
	Gruesa	2.07	0.60
		2.30	
<i>L. tergemina.</i>	Delgada	1.69	0.40
		1.80	
	Gruesa	1.52	0.38
		1.60	

TESIS CON
PALLA DE ORIGEN

6. 4. 3. Análisis de proteínas por electroforesis

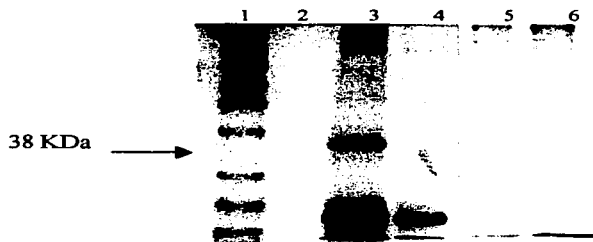
El análisis por electroforesis de los extractos de proteínas totales de la albura mostró la presencia de proteínas de masas moleculares aproximadas a 129, 82 y 61 KDa (Figura 6 y 7) en ambas especies, tanto en época de lluvia como en sequía. Por otra parte, este análisis reveló que existe un patrón diferencial de proteínas para ambas especies y épocas.

En la albura de *H. brasiletto* se observaron proteínas de ~ 38 y 21 KDa durante la época de sequía (Figura 6). Sin embargo, la presencia de éstas dos es considerablemente menor en lluvia, época en la que se detectó otra banda de ~16 KDa (Figura 7). Estas proteínas no se detectaron en el duramen (Figura 8). En la albura de *L. tergemina* se observó una proteína de ~34 KDa en época de sequía, la cual no está presente en la de lluvia, ni en el duramen (Figura 6 y7). Los resultados de la

determinación de proteínas totales y el análisis por electroforesis mostró que el contenido de proteínas de *H. brasiletto* es ligeramente más alto que el de *L. tergemina*, (Tabla 9 y Figuras 6 y 7).



Figura 6. Gel de electroforesis al 12% de acrilamida de extractos de proteínas totales de ramas delgadas con crecimiento secundario en época de sequía. Carril 1: marcadores de masa molecular; Carril 3: *L. tergemina* 1; Carril 4: *L. tergemina* 2; Carril 5: *H. brasiletto* 1; Carril 6: *H. brasiletto* 2.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 7. Gel de electroforesis al 12% de acrilamida de extractos de proteínas totales de ramas con crecimiento secundario en época de lluvia. Carril 1: marcadores de masa molecular; Carril 3: *H. brasiletto* delgada; Carril 4: *H. brasiletto* gruesa; Carril 5: *L. tergemina* delgada; Carril 6: *L. tergemina* gruesa.

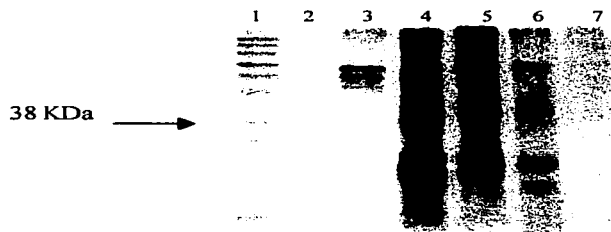


Figura 8. Gel de electroforesis al 12% de acrilamida de extractos de proteínas totales de fustes y ramas en época de sequía. Carril 1: marcadores de masa molecular; Carril 3: *H. brasiletto* duramen; Carril 4: *H. brasiletto* rama; Carril 5: *H. brasiletto* albura; Carril 6: *L. tergemina* albura; Carril 7: *L. tergemina* duramen.

7. DISCUSIÓN

7. 1. Anatomía

Haematoxylum brasiletto Karst y *Lysiloma tergemina* Benth son especies características de selvas bajas caducifolias del estado de Morelos. Estas dos especies pertenecen al orden Fabales, a la Familia Leguminosae y *H. brasiletto* a la subfamilia Caesalpinoideae, mientras que *L. tergemina* a la subfamilia Mimosoideae. La madera de ambas especies presentó albura y duramen bien marcado. Las alburas son castaño muy pálido hacia el amarillo. El duramen de *H. brasiletto* es de color rojo oscuro a castaño rojizo oscuro y el de *L. tergemina* es castaño. Estas maderas no muestran zona de transición con respecto al color a pesar de estar caracterizada por cambios en la actividad enzimática y en la composición química de los elementos celulares. Las características anatómicas de la madera de estas especies corresponden en general con las características descritas para especies de la misma familia y de diferentes subfamilias (Barajas y León, 1989; Baretta-Kuipers, 1981). Presentan porosidad difusa, parénquima axial vasicéntrico, aliforme, aliforme confluyente y en bandas. Los poros son principalmente solitarios o múltiples radiales y sus radios son finos y bajos. Las fibras son cortas o medianas de tipo libriforme y paredes. En este estudio no se observaron diferencias anatómicas entre la albura y el duramen, pero si histoquímicas, esto es fibras, vasos y parénquima axial y radial de la parte externa de la albura presentan carbohidratos estructurales, material de almacenamiento, actividad enzimática y las paredes están parcialmente lignificadas. Hacia la parte interna de la albura, la presencia de granos de almidón y lípidos es menor y hay ausencia de proteínas de almacenamiento, de carbohidratos estructurales, de actividad enzimática y los elementos celulares están lignificados y hay presencia de extractivos. En el duramen todas las células se caracterizan por carecer de actividad enzimática, el material de almacenamiento se transformó en algún tipo de metabolito secundario.

7. 1. 1. Elementos de vaso

Los datos revelan que las dimensiones de los elementos de vaso para ambas especies se presentan de la siguiente manera: de acuerdo con Chattaway (1932) el número de vasos/mm² para la albura y el duramen en ambas especies es muy similar, sin embargo entre especies si existen diferencias: el número de poros en el caso de *H. brasiletto* es moderadamente numerosos y en *L. tergemina* moderadamente pocos. El diámetro tangencial y la longitud de los vaso es menor en *H. brasiletto* que *L. tergemina* (Tabla 1). Estos datos son consistentes con el ejemplar descrito por

Barajas y León (1989) y con lo propuesto por Baretta-Kuipers (1981) para este carácter en leguminosas.

El índice de vulnerabilidad intenta explicar la estrategia de conducción del sistema vascular en las fanerógamas. Es decir las dimensiones de los elementos conductores deben reflejar una relación directa con la disponibilidad de agua (Carlquist, 1980). Un valor alto para este índice, indica que las dos especies son muy eficientes en la conducción de agua pero de acuerdo con este índice sus vasos son poco resistentes a la cavitación³. Resalta que ambas especies habitan en un clima tropical seco que se esperaba influyera en la presencia de un mayor número de vasos por mm² y de diámetros más angostos. Las tallas de ambas especies está entre los 6 y 8 m y el sitio de colecta está ubicado en una zona donde corren ríos y hay registro de manantiales alimentados por los deshielos de los volcanes, por lo que estas plantas no tienen problemas serios de estrés hídrico y tampoco de conducir agua a grandes alturas, lo que explica que las dimensiones de los vasos no correspondan a las tendencias encontradas en las plantas leñosas de hábitats secos (Lindorf, 1994). Este índice también puede aportar información sobre la cantidad de agua que está disponibles para los procesos metabólicos que ocurren en el tallo, de manera que en *H. brasiletto* el aporte de agua puede ser mayor. Esto tendría que demostrarse con pruebas de conductividad hidráulica y capacidad de almacenamiento de agua. Esta última característica está directamente relacionada con la abundancia del parénquima axial presente en plantas de clima tropical.

7. 1. 2. *Fibras*

Panshin y De Zeeuw (1980) señalan que el grosor de la pared de las fibras tiene que ver por un lado, con las condiciones de crecimiento del árbol y por otro, con la capacidad y la cantidad de productos fotosintéticos que el árbol pueda captar. En el caso de *H. brasiletto* y *L. tergemina* sus fibras son moderadamente cortas, de diámetro fino y de paredes gruesas. Estas dos especies crecen en un clima seco donde la humedad relativa es baja y la época de sequía dura hasta cinco meses. Estos factores limitan el crecimiento del individuo, tanto en altura como en anchura de manera que su actividad metabólica se canaliza hacia el engrosamiento de las paredes celulares o a su transformación en extractivos que se depositan en las cavidades de las fibras, de los vasos, y del parénquima axial y radial. El engrosamiento de las paredes de estas células hace que estas dos especies tengan una mayor resistencia mecánica.

³ Cavitación es la aparición de microburbujas de aire en el tejido conductor y cuando se forman en el vaso o la traqueida son incapaces de conducir savia (Cruiziat y Tyree, 1990).

7. 1. 3. *Parénquima axial y radial*

Wheeler y Baas (1991), señalan que en todas las especies de clima tropical que ellos estudiaron presentan radios homogéneos y finos. El parénquima axial predominantemente paratraqueal o en bandas. En las dos especies que se estudiaron se encontró que *L. tergemina* tiene radios homogéneos, uni y biseriados y el arreglo del parénquima axial es paratraqueal aliforme y aliforme confluyente (Figura 3c). En *H. brasiletto* los radios son homogéneos, uni y multiseriados y la distribución del parénquima axial es en bandas (Figura 2c), lo que es consistente con lo propuesto con estos autores. En el espécimen revisado por Barajas y León (1989) se describe como parénquima aliforme confluyente y a veces formando bandas irregulares, lo que no es consistente con los dos especímenes de este trabajo (Fig. 2a).

Yang (1986), propone que el tamaño y la forma de los radios se pueden usar para expresar la actividad metabólica, así como el vigor de las células del parénquima. Esto es, los radios tienen la capacidad de almacenar y transformar almidones, lípidos y proteínas en sustancias que mantienen el crecimiento y el desarrollo del árbol cuando no se realiza la fotosíntesis, por lo que el tamaño de éstos en la albura fue ligeramente mayor que en el duramen, esto es, están activos (Tabla 3). Esto último también puede explicar las diferencias en grosor de las paredes celulares, las cuales son más delgadas en la albura. La hipótesis es que en la época del crecimiento en grosor el almidón se hidroliza y aumenta la presión de turgor, el citoplasma aumenta su volumen por lo que las paredes deben mantenerse elásticas y sin la rigidez conferida cuando ocurre la lignificación.

Entre especies se observa que los radios de *L. tergemina* son más cortos y más numerosos que los de *H. brasiletto*. La altura de los radios de las leguminosas de acuerdo con Baretta-Kuipers (1981) nos dicen que entre más cortos son más especializados como en el caso de *L. tergemina* y que la subfamilia que presenta radios menos especializados es la Caesalpinioideae a la cual pertenece *H. brasiletto*.

Los resultados muestran que *H. brasiletto* presenta mayor cantidad de células de parénquima radial/mm lineal, esto es, son en promedio 6 por mm/lineal y de 5 series, lo que hace un promedio de 30 células mm/lineal, siguiendo el mismo criterio para *L. tergemina*, esta especie presenta 14 series /mm. Ahora si se observa que *H. brasiletto* tiene radios más alto (602 micras), y *L. tergemina* 128 micras, la pregunta que sigue es ¿existe alguna relación entre la cantidad de células de este tipo y la estrategia de almacenamiento?. Los resultados de las proteínas revelaron que *H. brasiletto* tiene una mejor estructura de almacenamiento de proteínas que *L. tergemina*. En el campo se ha observado que

H. brasiletto retoña muy fácilmente. Las características de retoño por daño mecánico u otro tipo de daño habría que demostrarlas con estudios más profundos para ambas especies.

En cuanto al parénquima axial se encontró que en ambas especies es paratraqueal de más de tres células de ancho, en *H. brasiletto* es en bandas y en *L. tergemina* es aliforme confluyente. Esta diferencia esta relacionada con el área que ocupa dentro del xilema secundario y con su capacidad para almacenar nutrimentos, es decir, *H. brasiletto* tiene una mayor capacidad para almacenar metabolitos primarios pues presenta una mayor área de parénquima que *L. tergemina*. Suponemos que esta capacidad también esta relacionada con el número de series que presenta el parénquima radial y del cual se moverá material de reserva hacia la corteza. Por otro lado *H. brasiletto* produce menos duramen que *L. tergemina* lo que pensamos puede estar relacionado con cierta capacidad para conservar metabolitos primarios que le permiten sobrevivir en condiciones desfavorables durante más tiempo.

En este estudio observamos que el parénquima axial de *H. brasiletto* y *L. tergemina* es el vertedero del material de reserva, donde principalmente encontramos principalmente almidón y en menor cantidad a los lípidos. Las proteínas de almacenamiento solo es posible detectarlas en el parénquima radial, esto hace suponer que la planta utiliza diferentes mecanismos para guardar las reservas alimenticias, esto es el material que le proporciona fuente de carbono y energía "baratos", los empaqueta y almacena por largos periodos en el parénquima axial en forma de moléculas pequeñas (almidón y lípidos), fáciles de transformar o mover y las va utilizando de acuerdo a las necesidades de la planta. El material que por su tamaño e importancia biológica como es el caso de las proteínas de reserva se deposita en el parénquima radial y este se encarga de su almacenamiento y del transporte de estas moléculas en el momento que la planta las necesite durante el periodo de crecimiento.

7. 2. Histoquímica

El parénquima del xilema secundario es un tejido de almacenamiento y en él se llevan a cabo procesos de movilización de material orgánico e inorgánico (Sauter y Kloth, 1986). En este tejido se depositan productos de la fotosíntesis que no se utilizaron y que son transportados y translocados por el sistema simplástico y/o apoplástico durante la época de lluvia. En este tejido, el material de reserva es utilizado de acuerdo a las demandas metabólicas del árbol. Por ejemplo, durante el crecimiento vegetativo, este material de reserva ayuda en el crecimiento de tallos y raíces, así como en el despliegue de hojas y también están involucrados en la formación de flores y frutos, o bien,

estas sustancias de reserva se pueden utilizar para formar las primeras capas de la madera en el *cambium* vascular activo (Hansen y Beck, 1990; Fischer y Höll, 1992; Hansen y Beck, 1994; Sauter y Van Cleve, 1994, Hillinger *et al*; 1996a, 1996b).

7. 2. 1. No enzimática

Los cambios en la composición química de los elementos de vaso, fibras y células del parénquima axial y radial de ambas especies, sugieren un incremento de ligninas, ácidos grasos libres y pectinas esterificadas con respecto a la albura (Tablas 6, 7 y 8). El aumento de extractivos en los elementos celulares del duramen sugiere que los polisacáridos de la pared celular de fibras, vasos y parénquima axial y radial de la albura de *H. brasiletto* y *L. tergemina* pueden ser utilizados como fuentes de carbono para la síntesis de lignina y de otros metabolitos secundarios o para mantener la respiración (Siegel y Siegel, 1957; Goodman y Siegel, 1959; Shain y Mackay, 1973).

Se observó mayor intensidad para la celulosa de la albura de *H. brasiletto* y *L. tergemina*, durante la época de lluvia. Glerum y Balatinecz (1980) proponen que la síntesis de celulosa durante esta época está directamente relacionada con la actividad del *cambium* vascular y con la disponibilidad de los productos de la fotosíntesis. Otros autores han sugerido que este compuesto actúa como una matriz catalítica para la formación de la lignina y aseguran que los componentes de la pared celular pueden estar involucrados en los procesos de respiración celular y por lo tanto con un aumento en la actividad de la enzima SDH (Jermyn y Isherwood, 1956; Siegel y Siegel, 1957; Goodman y Siegel, 1959).

De acuerdo con Jermyn e Isherwood (1956), Thornber y Northcote (1961a, 1961b), Fisher y Höll (1991) la lignificación es un el proceso que ocurre simultáneamente con la disminución de pectinas ácidas en la lámina media y el cese del crecimiento de la célula vegetal. De acuerdo con estos autores, la ausencia de pectinas ácidas en el duramen puede estar relacionada con el proceso de diferenciación de los elementos de la albura en duramen. Hafrén *et al.* (2000) han propuesto que los iones de calcio, al encontrarse unidos a estos polisacáridos, actúan como componentes estructurales de los geles que unen dos láminas medias y también contribuyen a unir extractivos a la pared celular. Esta función dual facilita el proceso de lignificación. En *H. brasiletto* y *L. tergemina* se observó un patrón similar al propuesto por los autores antes citados, lo que sugiere la utilización de las pectinas de estas especies de manera similar.

Con respecto a la presencia de pectinas esterificadas en el duramen, los resultados revelan las diferencias mostradas por ambas especies. El duramen de *H. brasiletto* experimentó un proceso de

metil-esterificación al desarrollar depósitos rojos intensos en la pared celular de todos los elementos celulares. Este proceso ocurre cuando las pectinas se esterifican con metanol en el carbono 6 y el grado de metilación, lo que genera un polímero más estable y menos soluble, lo que hace difícil el ataque por patógenos (Goodenough y Cater 2000). Esto significaría que las especies producen calidades de duramen significativamente distintos y que la maduración del tejido secundario asegura una mejor estrategia de defensa (Micheli *et al.* 2000). En el caso del duramen de *L. tergemina* se observó una mayor presencia de pectinas ácidas y ausencia de metil-esterificados, lo que supone un mecanismo de síntesis de extractivos más sencillo, que no necesariamente asegura una mejor estrategia de defensa.

Las hemicelulosas aparecen con mayor intensidad en la albura principalmente de la época de lluvia de la madera de palo brasil y muy similar intensidad en ambas épocas del año en la madera de pata de cabra, lo cual está relacionado con lo sugerido para la celulosa. Es interesante lo apuntado por Glerum y Balatinecz (1980), Saranpää y Höll (1989), Fischer y Höll (1991) y Höll (2000) con respecto a que estas moléculas, al hidrolizarse, producen arabinosa y galactosa, que son fuente de carbono para la síntesis de extractivos en el duramen.

Los carbohidratos estructurales como pectinas, hemicelulosas y celulosa son macromoléculas de naturaleza no proteica que desempeñan un papel crucial en el crecimiento y el desarrollo de los elementos celulares del xilema durante el crecimiento primario (Loewus y Loewus 1983). Por otro lado, también funcionan como fuente de carbono involucrado en el proceso de auto-oxidación de ligninas y de otros compuestos de tipo fenólico en sitios con crecimiento secundario (Jermyn e Isherwood, 1956; Siegel y Siegel, 1957; Goodman y Siegel 1959; Thorber y Northcote, 1961a; Fischer y Höll, 1991; Höll, 2000). De lo anterior se desprende que la duraminización es un proceso asociado muy estrechamente a la presencia de éstas moléculas y con el crecimiento primario de la planta.

La madera de *H. brasiletto* presenta granos de almidón de forma esférica, con capas concéntricas y más pequeños que los de *L. tergemina*, los cuales son de forma oval y de capas excéntricas. La forma y el tamaño de los granos de almidón se consideran como un rasgo que permiten caracterizar y establecer relaciones de parentesco entre especies (Roth 1966). En este estudio se encontró que los granos de almidón son morfológicamente distintos en ambas especies; tal vez este carácter entre subfamilia sea distintivo, sin embargo, sería necesario hacer estudios comparativos entre especies de la misma subfamilia. Los resultados histoquímicos también mostraron que para ambas especies, la presencia de los granos de almidón es alta en la albura y

disminuyen gradualmente hasta desaparecer en la parte interna del duramen y que la presencia de extractivos se incrementa conforme disminuye la de almidones (Figuras 2e y 3e). Estos resultados coinciden con los reportados en otros estudios (Hillis, 1975; Baqui *et al.* 1979; Shah *et al.* 1981; Nair y Shah, 1983; Datta y Kumar, 1987; Saranpää y Höll, 1989; Fisher y Höll, 1991, 1992; Piispanen y Saranpää, 2001). Por otro lado se observó que la presencia de almidón en la albura de *H. brasiletto* y *L. tergemina* fue mayor en época de lluvia que en la de sequía. Nair y Shah (1983); Wardrop y Cronshanw (1962); Magel *et al.* (1991, 1994), Lehninger (1991), Fisher y Höll (1991); Höll (2000), señalan que los granos de almidón se transforman en lípidos, o bien, se hidrolizan en moléculas más sencillas (glucosa) que se usan como fuentes de carbono para la síntesis de metabolitos secundarios del duramen, como son los taninos, flavonoides, catequinas, leucacatequinas y otros polifenoles. La madera de estas especies revela contenidos importantes de almidones en la periferia; en la región intermedia de la albura aparecen lípidos y después en el duramen ácidos grasos. Lo anterior sugiere un mecanismo de hidrólisis tanto de almidones como de lípidos en la albura para la producción de ácidos grasos libres o extractivos. Los productos de la hidrólisis del almidón (glucosa) también se pueden utilizar para asegurar la respiración y mantener el crecimiento y desarrollo del árbol cuando no se realiza la fotosíntesis (Loewus y Loewus, 1983; Sauter y Van Cleve, 1994; Hillinger *et al.* 1996a, 1996b; Piispanen y Saranpää, 2001).

Las pruebas para lípidos totales mostraron una presencia intensa en albura y en época de sequía, en ambas especies (Figura 2f y 3f). Los lípidos neutros tuvieron un comportamiento extraño pues se identificaron en el parénquima axial de *H. brasiletto* en la época de sequía, no así en la de lluvia, mientras que en *L. tergemina* estos lípidos se presentaron en lluvia pero no en la sequía, lo que podría sugerir que en esta planta este tipo de lípidos es usado como fuente indirecta de carbohidratos en el crecimiento y no como material de almacenamiento. Las pruebas para los ácidos grasos mostraron que este tipo de moléculas es común en todos los elementos celulares del duramen, en ambas especies, y su presencia no se modifica en las dos épocas del año. Saranpää y Nyberg (1987) sugieren que los ácidos grasos libres del duramen de *Pinus sylvestris* son el resultado de la degradación de los lípidos en glicerol y ácidos grasos. Estos últimos pueden sufrir modificaciones de acuerdo a su grado de insaturación y de este modo pueden almacenarse como otro tipo de extractivo en el duramen.

Los lípidos juegan un papel importante en el proceso de envejecimiento y formación del duramen, especialmente por su función como parte estructural de las biomembranas, además de que desempeñan funciones de protección en el duramen (Baqui *et al.* 1979; Shah *et al.* 1981; Datta y

Kumar, 1987; Saranpää y Nyberg, 1987a; Fischer y Höll, 1992; Saranpää y Piispanen, 1994; Hillinger *et al.* 1996a, 1996b).

La presencia de estos compuestos mostró diferencias en el duramen de estas especies. Aunque el incremento de lignina en el duramen se esperaba lógico, resulta de mayor interés el tipo de extractivos presentes en cada especie. De manera que en *H. brasiletto*, las catequinas y leucoantocianidinas en las dos épocas del año se presentaron en mayor cantidad que los taninos y en *L. tergemina* ocurrió lo contrario, lo que revela mecanismos específicos y seguramente genéticos determinan el tipo de duramen.

Estas moléculas son polímeros ramificados que penetran y se infiltran en la estructura o sellan las cavidades de todos los tipos celulares, lo que permite que el duramen funcione como una región de gran soporte y de alta resistencia a los patógenos. Esto es consistente con Stewart (1966) quien además de sugerir que estos compuestos son más abundantes en el duramen, que proporcionan soporte mecánico, durabilidad y rigidez al tallo, pueden desempeñar funciones fisiológicas importantes, como es el caso de los taninos, al actuar como agentes antioxidantes, inhibidores del crecimiento fúngico, reguladores del crecimiento o como agentes alelopáticos⁶ (Scalbert y Haslam, 1987; Salatino *et al.* 1993; Schultz y Nicholas, 2000). Hillis (1955) propone que las leucoantocianidinas pueden ser los precursores de catequinas y taninos que son sintetizados en las células de parénquima radial del duramen. En el caso de *H. brasiletto* es posible que esas leucoantocianinas sean transformadas principalmente en catequinas y leucoantocianidinas y una cantidad muy pequeña en taninos, mientras que en *L. tergemina* sean transformadas preferentemente en taninos. La presencia de diferentes tipos de extractivos en el duramen en estas especies puede significar que emplean diferentes mecanismos de defensa a agresores externos, lo cual garantizaría la competencia diferencial y la supervivencia del más apto.

7. 2. 2. Enzimática

La actividad de las enzimas estudiadas se observó principalmente en la parte externa de la albura de las especies y no se localizó en el duramen. La fosfatasa ácida cataliza una variedad de reacciones bioquímicas y juega un papel vital en la regulación del metabolismo de las células vegetales durante la transición de albura a duramen. Datta y Kumar (1987), al igual que van Fleet (1952), Onefeghara y Koroma (1974), Shah *et al.* (1981), Nair y Shah (1983), encontraron que la fosfatasa ácida esta estrechamente relacionada con la diferenciación celular y con la transformación

⁶ Alelopatía: toxicidad biogénica. Inhibición química al establecimiento y/o desarrollo de un organismo por sustancias secretadas por otro (Portilla y Zavala, 1990).

de carbohidratos que tienen lugar en los estados críticos de la morfogénesis. Parece además que el patrón de distribución de la enzima en diferentes plantas de edades variadas, está involucrada en los procesos fisiológicos que apoyan la diferenciación y la maduración. Esto puede indirectamente estar relacionado con las reacciones de transferencia de energía a través de la hidrólisis de sustratos adecuados tales como los fosfatos de azúcar. También se ha observado que esta enzima participa en la ruptura (lisis) celular durante el proceso de formación del duramen (Nair y Shah, 1983). Gahan y McLean (1968) deducen que las fosfatasa ácidas, junto con algunas esterasas, pueden encargarse de transporte intracelular y la formación de la pared. La baja actividad de la fosfatasa ácida en la pared de los vasos y en las células del parénquima axial y radial de *H. brasiletto* y *L. tergemina* podría considerarse como la necesaria para participar en los procesos antes descritos (Tabla 9 y Figuras 4n y 5n). Sin embargo resulta interesante que sólo se detectó en la época de sequía.

La fenol-oxidasa se detectó como depósitos de color azul en la parte externa de la albura de *H. brasiletto* y de *L. tergemina* en época de lluvia (Tabla 9, Figuras 4o y 5o). Por otro lado se observaron depósitos de color rojo en los elementos de vaso, fibras, parénquima axial y radial de la albura y el duramen de ambas especies en época de sequía. Van Fleet (1952), sugiere que la fenol-oxidasa requiere la presencia de aminoácidos de tirosina no oxidados, lo que produce coloración azul en el tejido. Sin embargo, en época de sequía este aminoácido se encuentra en la albura parcialmente oxidado por lo que sugiere se desarrolle una coloración roja. Lo anterior significa que en la época de sequía, la actividad de esta enzima está supeditada a la presencia de tirosina oxidada y este aminoácido es intermediario importante en la biosíntesis de extractivos.

La SDH se localizó en el parénquima axial y radial de la albura de *H. brasiletto* y *L. tergemina*. La actividad de esta enzima se detectó en las dos épocas del año, pero su mayor actividad fue en la época de lluvia (Tabla 9 y Figuras 4p y 5p). La elevada actividad de la SDH en la parte externa de la albura sugiere que en ese lugar la tasa metabólica y de respiración es muy alta pues en esa región de la albura la SDH se encarga de oxidar el succinato en fumarato cuando está activa en el ciclo de Krebs y en la cadena respiratoria se encarga de remover y transferir los electrones desde el succinato a la ubiquinona o bien al NAD o NADP (Bancroft, 1975; Gahan, 1984; Jensen, 1962; Kozlowski y Pallardy, 1997). La actividad de la enzima SDH es baja en el duramen. Bamber y Fukazawa (1985) sugieren que lo anterior se debe a que durante el proceso de lignificación, las enzimas PAL y CHS se activan y durante su acción generan compuestos residuales de origen fenólico que promueven la desorganización de la membrana de la mitocondria y con ello la desnaturalización de las enzimas que allí se localizan, por ejemplo las del ciclo de Krebs y las de la

cadena respiratoria (SDH), de manera que estos cambios también contribuyen al aumento en la tasa de respiración. La destrucción de la mitocondria y sus enzimas puede inducir la pérdida de la unidad entre los organelos y con ello ocurre la liberación de los materiales de reserva que todavía quedan (almidón, lípidos y proteínas) para luego ser degradados y transformados en extractivos que formarán parte del duramen (Shah *et al.* 1981; Nair y Shah, 1983; Nair, 1988). Asimismo, se ha propuesto que cuando la SDH deja de funcionar se produce la autólisis y este proceso favorece la formación del duramen (van Fleet, 1952).

La catalasa fue la única enzima presente en todos los elementos celulares de la albura de las dos especies. Esta enzima se asocia a tejidos vivos y puede estar involucrada en el manejo de los productos de desecho en esta región pues activa la descomposición del H_2O_2 en H_2O y O_2 molecular (Gahan, 1984; Hillinger, *et al.* 1996a 1996b; Pennell y Lamb, 1997). Cabe destacar que la actividad de la catalasa fue la más alta de las tres enzimas, lo que sugiere su intensa participación en procesos de detoxificación celular, que ocurren por una alta actividad metabólica en la época de lluvia lo que es consistente con los resultados (Tabla 9, Figura 4m y 5m). En el proceso de formación de duramen los sistemas de detoxificación (catalasas y peroxidasas) de las células del parénquima radial comienzan a fallar por el aumento de extractivos, así como de peróxido de hidrógeno, lo que provoca la destrucción parcial de la mitocondria y la inactivación de la SDH (Shain y Mackay, 1973).

La ausencia de actividad enzimática en la parte más interna de la albura y en el duramen puede deberse al proceso de lignificación de las células, lo que promueve la acumulación de extractivos. El incremento de extractivos promueve que los sistemas de detoxificación (catalasas, peroxidasas) dejen de funcionar entonces los productos de desecho se acumulan, provocando que aumente la tasa de respiración, el deterioro de los organelos y finalmente la muerte celular (Savidge, 1996).

Los cambios en la composición química y la pérdida de actividad enzimática de los elementos celulares del duramen (vasos, fibras y parénquima axial y radial) pueden ser el resultado de los cambios en el metabolismo celular de la albura. Stewart (1966) propone que una disminución en el contenido de agua y un aumento en el depósito de extractivos son procesos que promueven la autólisis⁷ de las células del parénquima radial. Finalmente, el suministro de agua al tejido vivo está regulando todos los procesos de crecimiento longitudinal y radial de la planta.

7. 3. Proteínas

Las proteínas se utilizan como fuente de carbono, nitrógeno y azufre durante la época de crecimiento. Al parecer, las proteínas de almacenamiento son altamente específicas tanto en gimnospermas (Harms y Sauter 1992) como en angiospermas (Sauter *et al.* 1988; Sauter y B. van Cleve, 1990; Wetzel *et al.* 1989a, b). Las dos especies estudiadas aquí mostraron cambios importantes en el contenido de proteínas en ambas épocas del año. Para *H. brasiletto* y *L. tergemina* el contenido de proteínas totales fue mayor en la época de sequía que en la de lluvia. Estos resultados son consistentes con los reportados en otros estudios de proteínas de reserva, tanto de la corteza como de la madera (Greenwood *et al.* 1986; Sauter *et al.* 1988; Sauter y Wellenkamp, 1988; Sauter y van Cleve, 1989; Wetzel *et al.* 1989a; Wu y Hao, 1991; Hao y Wu, 1993).

Por otro lado, el análisis por electroforesis reveló la presencia de 3 proteínas de ~129, 82 y 61 KDa, tanto en la albura como en el duramen de ambas especies y su patrón no se modifica en las dos épocas del año (Figuras 4 y 5), lo que sugiere que son proteínas de tipo estructural.

La presencia de proteínas en la albura de ambas especies, de menor peso molecular a las antes mencionadas y su ausencia en la época de lluvia (Tabla 10), sugiere que éstas sean proteínas de almacenamiento que se depositaron durante la época de sequía y que son utilizadas en lluvia para promover el crecimiento de hojas, tallos, raíces, flores y frutos, lo que explica su decremento o ausencia en los extractos de esta época. En este sentido, varios autores han reportado la presencia de proteínas de almacenamiento en la corteza y la madera de diferentes especies de angiospermas y gimnospermas, en época de sequía y cuyas masas moleculares están entre los 30-38, 45 y hasta 66 KDa (Sauter y Kloth, 1986; Sauter *et al.* 1988; Sauter y Wellenkamp, 1988; Wetzel *et al.* 1989a; Sauter y van Cleve, 1990; Wetzel y Greenwood, 1991; Langheinrich y Tischner, 1991; Sauter y van Cleve, 1992; Coleman *et al.* 1992; Harms y Sauter, 1992; Stepień y Martin, 1992; van Cleve y Apel, 1993; Stepień y Sauter, 1994).

Los cambios en el contenido de proteínas totales y la variación de proteínas en la albura que se observó en *H. brasiletto* y *L. tergemina* pueden estar relacionados con factores genéticos y ambientales como ocurre en otras especies reportadas (Kang y Titus, 1980; Greenwood *et al.* 1986; Sauter y Wellenkamp, 1988; Sauter *et al.* 1988; Wetzel *et al.* 1989 b; Stepień y Sauter, 1994; Hansen y Beck, 1994). Para el caso de los materiales de almacenamiento nuestros resultados coinciden con los observados por Fischer y Höll (1992) en el sentido de que la presencia de almidón es mayor que la de lípidos y proteínas.

* Autólisis: Degradación, digestión o destrucción de células o de tejidos orgánicos propios en un individuo debido a procesos enzimáticos o de otra

Las fibras, vasos y células del parénquima axial y radial son elementos que se especializan respectivamente en el sostén, la conducción y almacenamiento. La acumulación y utilización de moléculas de diversa índole en presencia o ausencia de agua, promueve el crecimiento longitudinal y radial de árbol. La diferenciación de los elementos celulares en ambas especies se puede describir en tres etapas (Savidge, 1996; Fukuda, 1996, 1997; Pennell y Lamb, 1997): a) la diferenciación primaria por división celular y extensión de las paredes celulares. En esta etapa se supone que parte de los materiales de reserva se utilizaron para promover el aumento en número y en la longitud de dichos elementos, lo cual fue identificado por la presencia de carbohidratos estructurales (pectinas, hemicelulosas y celulosa), ausencia de extractivos y una actividad enzimática de diferente intensidad. Al mismo tiempo el parénquima axial y radial recién formado se alimentan de los productos de la fotosíntesis a través del floema para su crecimiento. Cuando la cantidad de estos productos excede la capacidad de consumo, y son transformados en moléculas de almacenamiento como almidón, lípidos y proteínas que se utilizan durante el crecimiento vegetativo. En la época de lluvia se activa el crecimiento, por lo que estos materiales de reserva se transforman en azúcares solubles (sacarosa) y aminoácidos, los cuales se van a mover de acuerdo a la demanda de órganos (hojas, tallos y raíces) y formación de flores. b) la diferenciación secundaria (o maduración), se caracteriza por el aumento en diámetro y la célula aún conserva su núcleo, por lo que tiene la capacidad para realizar divisiones celulares e intercambio intercelular en condiciones desfavorables; en esta etapa polisacáridos como las pectinas, las hemicelulosas y los granos de almidón se utilizan como fuentes de carbono para la lignificación de la pared secundaria y la síntesis de compuestos fenólicos. La presencia de extractivos está acompañada del aumento en la actividad respiratoria (Shain y Mackay, 1973) y por lo tanto, la actividad de la SDH también aumenta. En este punto las pectinas ácidas se pueden esterificar o metilesterificar y así formar parte de los extractivos. Por último c) la muerte celular (apoptosis), en esta etapa el núcleo se degenera al igual que los demás organelos, posteriormente ocurre la digestión parcial de la pared primaria en lugares específicos (dependiendo de la función de la célula) y se inicia el engrosamiento y lignificación de la pared secundaria. Finalmente ocurre la ruptura del tonoplasto y en este último proceso se propone que enzimas hidrolíticas, como pudiera ser la fosfatasa ácida, estén involucradas. Todos esos cambios al parecer fueron provocados por alteraciones hormonales (Bamber y Fukazawa, 1985; Leitch y Savidge, 1995) y por factores físicos tales como la disponibilidad del agua. La actividad metabólica aumenta por la degradación del material de reserva y la síntesis de los extractivos (figura 1). Con la muerte celular se da la liberación

de los extractivos que estaban almacenados en la vacuola y estas sustancias sufren procesos de oxidación y polimerización por la acción de enzimas u otros productos químicos (Higuchi, 1997, Magel, 2000). La muerte celular programada o apoptosis es un fenómeno que aún no se conoce bien. No se sabe cómo es que ciertas células mueren (las de la parte interna de la albura y las del duramen) y otras (las de la parte externa de la albura) sobreviven. Stewart (1960), propuso que una posibilidad sea el control de la producción de radicales libres y la transformación del H_2O_2 en H_2O y O_2 molecular por la actividad de la catalasa y peroxidasa, con lo que podría evitarse la muerte celular programada. Ubicando a fibras y a vasos en el contexto de las etapas antes descritas, su muerte celular ocurre muy rápido, lo que podría estar relacionado con liberación de iones calcio de las pectinas, necesarios en la lignificación.

De manera resumida y de acuerdo con Frey-Wyssling y Bosshard (1959); Fukazawa y Higuchi (1965); Hugentobler (1965); Necesany (1966); Nobuchi *et al.* (1976); Yang *et al.* (1994), el cambio más importante durante la formación del duramen, en estas dos especies, es la pérdida de actividad metabólica que conduce a la senescencia o muerte de las células del parénquima radial, lo que se debe a que las células se lignifican y los sistemas de detoxificación fallan (catalasas y peroxidasas), entonces se produce el aumento de sustancias tóxicas como CO_2 el H_2O_2 y los extractivos (Stewart, 1966; Rudman, 1966; Carrodus, 1971) y el de sustancias que regulan el crecimiento como el etileno y las auxinas (Bamber, 1985; Leitch y Savidge, 1995). Estos dos aspectos pueden estar asociados al déficit de agua (Harris, 1954; Zimmermann y Brown, 1971) y a factores genéticos (Bauch, 1980; Panshin y De Zeeuw, 1980; Label *et al.* 2000; Bosssinger y Leitch, 2000).

8. CONCLUSIÓN

La madera de *H. brasiletto* y de *L. tergemina* se caracteriza por presentar albura y duramen bien definidos. La albura en ambos casos se caracteriza por que tiene actividad metabólica. En el parénquima axial se almacenan los granos de almidón, lípidos y en el radial las proteínas. En el duramen todas las células están muertas y tienen extractivos. Ambas especies han desarrollado mecanismos que les permite responder fisiológicamente de manera similar en época de lluvia y sequía, esto es durante en lluvia hay mayor actividad enzimática y presencia de carbohidratos estructurales y de reserva y en sequía hay mayor contenido de lípidos y proteínas. De acuerdo con el índice de vulnerabilidad el xilema de *L. tergemina* puede subir más agua que el de *H. brasiletto* pero éste compensa la cantidad de agua que puede subir reservándola en el parénquima en bandas que es más abundante. A pesar de sus diferencias anatómicas ambas especies cuentan con un metabolismo que les permite terminar de crecer y de formar las paredes de sus células en la época de sequía. *H. brasiletto* mantiene por tiempos más largos sus proteínas de almacenamiento, almidones y lípidos. En la albura externa de ambas especies la actividad de las enzimas estudiadas es intensa lo que revela un proceso inicial de lignificación y esterificación de las paredes. La pérdida de actividad de estas enzimas puede estar relacionada con los procesos de diferenciación, detoxificación, respiración, transporte, lignificación y transformación de polisacáridos estructurales y de materiales de almacenamiento en metabolitos secundarios que conducen a la muerte celular y por tanto a la formación del duramen.

Entre especies se observó que el duramen de *H. brasiletto* las cavidades de fibras, vasos y parénquima axial y radial presentan mayor intensidad en componentes fenólicos, pectinas metil-esterificadas y baja en taninos, al contrario del duramen de *L. tergemina* que resalta por la presencia de taninos y pocas catequinas y leucoantocianidinas. Estas diferencias pueden estar relacionadas con un duramen más tóxico para el palo brasil. El duramen de *L. tergemina* se caracteriza por presentar taninos, y la presencia de catequinas y leucoantocianidinas es menor. Esto último se relaciona con dos mecanismos de defensa que cada una de ellas ha desarrollado para evitar ser infectadas por agentes patógenos (bacterias, hongos e insectos) y, al mismo tiempo, los extractivos proporcionan mayor durabilidad y soporte mecánico.

BIBLIOGRAFÍA

- Anónimo. 1994. Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. Instituto Nacional Indigenista. Méx. Vol. II 1099 pp.
- Azcon-Bieto, J. y M. Talón. 1993. Fisiología y Bioquímica Vegetal. McGraw-Hill, España. 581 p.
- Bamber, R. K and K. Fukazawa. 1985. Sapwood y heartwood: a review. **Forestry Abstracts** 46 (9): 567-580.
- Bancroft, J. D. 1975. Histochemical Techniques. 2edn. Butterworths, London and Boston. 348 p.
- Baqui, S., J. J. Shah., R. C. Pandalai. y I. L. Kothari. 1979. Histochemical changes during transition from sapwood to heartwood in *Melia azedarach* L. **Ind. J. Exp. Biol.** 17: 1032-1037.
- Barajas, M. J. y León. G. C. 1989. Anatomía de maderas de México: especies de selva baja caducifolia. Publicaciones especiales. Instituto de Biología UNAM. 126 p.
- Baretta-Kuipers, T. 1981. Wood anatomy of leguminosae: its relevance to taxonomy. En: Advances in Legume Systematics. Part II Ed. R. M. Polhill & P. H. Raven 501-512.
- Bauch, T. 1980. Variation of wood structure due to secondary changes. IUFRO All Division 5 Conferences, Oxford, 8-16 April. Citado en Bamber y Fukazawa, (1985).
- Bossinger, G. y M. A. Leitch. 2000. "Isolation of cambium-specific genes from *Eucalyptus globulus* Labill". En: Cell and Molecular Biology of Wood formation. Savidge, R. A., J. R. Barnett y R. Napier. Editores. Bios Scientific Publishers Ltd. 203-207pp.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Coomassie (Bio-Rad) Protein Assay. **Anal. Biochem.** 72: 248-254.
- Canut, H., G. Alibert. y A. M. Boudet. 1985. Hydrolysis of intracellular proteins in vacuoles isolated from *Acer pseudoplatanus* L. Cell. **Plant Physiol.** 79: 1090-1093.
- Carlquist, S. 1980. Further concepts in ecological wood anatomy, with comments recent work in wood anatomy and evolution. **ALISO** 9 (4): 499-553.
- Carrodus, B. B. 1971. Carbon dioxide and the formation of heartwood. **New Phytol** 70: 939-943.
- Chattaway, M. 1932. Proposed standards for numerical value used in describing woods. **Trop. Woods** 29: 20-28.
- Cleve, B. van y K. Apel. 1993. Induction by nitrogen and low temperature of storage- protein synthesis in poplar trees exposed to long days. **Planta** 189: 157-160.
- Coleman, G. D., T. H. H. Chen y L. H. Fuchigami. 1992. Complementary DNA cloning of poplar bark storage protein and control of its expression by photoperiod. **Plant Physiol.** 98: 687-693.
- Colín, H. y R. Monroy. 1997. Prontuario de árboles de selva baja caducifolia. Ed. Cambio XXI. S.A. de C.V. SEMARNAP. México. 79 p.

- Craib, W., G. 1923. Regional spread of moisture in the wood of trees III. Notes R. Bot. Gardon Edind XIV (LXVI). Jan. 1-11.
- Cruziat, P. y M. T. Tyree. 1990. La subida de la savia en los árboles. **Mundo Científico** 10 (103): 630-638.
- Datta S. K y A. Kumar. 1987. Histochemical studies of the transition from sapwood to heartwood in *Tectonia grandis*. **IAWA Bulletin**. 8 (4): 363-367.
- Fahn, A. 1990. Plant Anatomy. Pergamon Press, Oxford. 588 p.
- Fischer, C. y W. Höll. 1991. Food reserves of scots pine (*Pinus sylvestris* L.). I. Seasonal changes in the carbohydrate and fat reserves of pine needles. **Trees** 5: 187-195.
- Fischer, C. y W. Höll. 1992. Food reserves of scots pine (*Pinus sylvestris* L.). II. Seasonal changes and radial distribution of carbohydrate and fat reserves of pine wood. **Trees** 6: 147-155.
- Frey-Wyssling, A. y H. H. Bosshard. 1959. Cytology of the ray cell in sapwood and heartwood. **Holzforschung** 13:129- 137.
- Fukazawa, K. y Higuchi T. 1965. Studies on the mechanism of heartwood III. Some observations on nucleus and DNA content in the ray parenchyma cell. **Mokuzai Gakkaishi** 11: 196-201.
- Fukuda, H. 1996. Xylogenesis: initiation, progression and cell death. **Annu. Rev. Plant Mol. Biol.** 47: 299-325.
- Fukuda, H. 1997. Tracheary element differentiation. **The Plant Cell** 9: 1147-1156.
- Gahan, P. B. y J. McLean. 1968. Hydrolase activities in plant cells. Fourth european regional conference on electron microscopy Rome. 2-75.
- Gahan, P. B. 1984. Plant histochemistry and cytochemistry. USA. Academic Press, Inc. (London) LTD. 301 p.
- Goodenough, P. W. y C. E. Carter. 2000. "The structure of pectin methyl esterase: the relevance of parallel β helix proteins to xylem differentiation". En: Cell and Molecular Biology of Wood formation. Savidge, R. A., J. R. Barnett y R. Napier. Editores. Bios Scientific Publishers Ltd. 305-313.
- Goodman, N. S. y S. M. Siegel. 1959. Reaction-directing properties of non-enzymic macromolecules: pyrogallol oxidation in system iron (III)-cellulose. **Nature** 184: 53-54.
- Greenwood, J. S., H. M. Stinissen., W. J. Peumans y M. J. Chrispeels. 1986. *Sambucus nigra* agglutinin is located in protein bodies in the phloem parenchyma of bark. **Planta** 167: 275-278.
- Glerum, C y J. J. Balatinecz. 1980. Formation and distribution of food reserves during autumn and their subsequent utilization in Jack pine. **Can. J. Bot.** 58: 40-54.
- Hafrén, J., G. Daniel y U. Westermark. 2000. The distribution of acidic and esterified pectin in cambium, developing xylem and mature xylem of *Pinus sylvestris*. **IAWA Journal**. 21 (2): 157-168.
- Hansen, J. y E. Beck. 1990. The fate and path of assimilation products in the stem of 8-year-old Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) trees. **Trees** 4: 16-21.

- Hansen, J. y E. Beck. 1994. Seasonal changes in the utilization and turnover of assimilation products in 8-year-old Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) trees. **Trees** **8**: 172-182.
- Hao, B-Z. y J-L. Wu. 1993. Vacuole proteins in parenchyma cells of secondary phloem and xylem of *Dalbergia odorifera*. **Trees** **8**: 104-109.
- Harms, U. y J. J. Sauter. 1991. Storage proteins in the wood Taxodiaceae and of *Taxus*. **J. Plant Physiol.** **138**: 497-499.
- Harms, U. y J. J. Sauter. 1992. Localization of a storage protein in the wood ray parenchyma cells of *Taxodium distichum* (L.) C. Rich. by immunogold labeling. **Trees** **6**: 37-40.
- Harris, J. M. 1954. Heartwood formation in *Pinus radiata* D. Don. **New Phytol.** **53**: 517-524.
- Harris, N. y M. J. Chrispeels. 1975. Histochemical and biochemical observations on storage protein body autolysis in cotyledons of germinating mung beans. **Plan Physiol.** **56**: 292-299.
- Harris, N. y K. J. Oparka. 1994. Plant cell biology: a practical approach. Ed. Oxford. University Press. 329 p.
- Hazenber, G. and K. C. Yang. 1991. Sapwood/heartwood width relationships with tree age in Balsam fir. **IAWA Bulletin n. s., 12 (1)**: 95-99.
- Higuchi, T. 1997. Biochemistry and molecular biology of wood. Springer Series in Wood Science Springer-Verlag, Berlin. Heidelberg. 362 p.
- Hillinger, C., W. Höll y H. Ziegler. 1996a. Lipids and lipolytic enzymes in trunkwood of *Robinia pseudoacacia* L. during heartwood formation. I. Radial distribution of lipid classes. **Trees** **10**: 366-375.
- Hillinger, C., W. Höll y H. Ziegler. 1996b. Lipids and lipolytic enzymes in trunkwood of *Robinia pseudoacacia* L. during heartwood formation. II. Radial distribution of lipases and phospholipases. **Trees** **10**: 376-381.
- Hillis, W. E. 1955. Formation of leuco-antocyanins in Eucalypt tissues. **Nature** **175**: 597-598.
- Hillis, W. E. 1958. Formation of condensed tannins in plants. **Nature.** **178**: 1371.
- Hillis, W. E. 1975. Etylene and extraneous material formation in wood tissues. **Phytochemistry** **14**: 2559-2562.
- Hillis, W.E. 1987. Heartwood and tree exudates. Springer, Berlin Heilderberg. New York. 100-101 pp.
- Höll, W. 2000. "Distribution, fluctuation and metabolism of food reserves in the wood of trees". En: Cell and Molecular Biology of Wood formation. Savidge, R. A., J. R. Barnett y R. Napier. Editores. Bios Scientific Publishers Ltd. 347-361.
- Hugentobler, V. 1965. Zur cytologie der kernholzbildung Vierteljahrshr Naturforsch Ges Zürich **110**: 321-342. Englis traslation. Forcing Language Division, Dept. of Secretary of State Bureau for Translation, No. 106, 1967, Ottawa.
- IAWA. 1937. Standards terms of size lenghts of vessel member and wood fibers. **Trop. Woods** **51**:21.
- IAWA. 1939. Standards of size for vessel diameter and ray width. **Trop. Woods** **59**:51.52.

- IAWA Committee. 1989. IAWA list of microscopic features for hardwood identification. **IAWA Bull.** n.s. **10**: 219-332.
- Jensen, W. A. 1962. Botanical histochemistry principles and practice. W. H. Freeman, San Francisco. EUA. 408 p.
- Jermyn, M. A y F. A. Isherwood. 1956. Changes in the cell wall of Pear during ripening. **Biochem. J.** **64**: 123-132.
- Johansen, D. A. 1940. Plant microtechnique. McGraw Hill, New York. 523 p.
- Kang, S-M. y J. S. Titus. 1980a. Qualitative and quantitative in nitrogenous compounds in senescing leaf and bark tissues of the apple. **Physiol. Plant.** **50**: 285-290.
- Kang, S-M y J. S. Titus. 1980b. Activity profiles of enzymes involved in glutamine and glutamate metabolism in the apple during autumnal senescence. **Physiol. Plant.** **50**: 291-297.
- Kang, S-M y J. S. Titus. 1980. Isolation and partial characterization of an acid endoprotease present in dormant apple shoot bark. **Plant Physiol.** **66**: 984-989.
- Kort, I. 1993. Relationships between sapwood amount, latewood percentage, moisture content and crown vitality of Douglas fir, *Pseudotsuga menziesii*. **IAWA Bulletins n. s.**, **14** (4): 413-427.
- Kozłowski, T. T. y S. G. Pallardy. 1997. Physiology of woody plants. 2 ed. Academic Press. 411 p.
- Krishnamurty, K. V. 1988. Methods in plant histochemistry. Bharathidasan. University. S. Viswanathan Press. India. 90 pp.
- Kumar, H. D. and H. N. Singh. 1976. Plant metabolism. British Library Cataloguing in Publication, Data. Indian 302 p.
- Label, P., I. Beringnolo, P. Burtin, L. Dehon, I. Couée, C. Breton, J-P. Charpentier y C. Jay-Allemand. 2000. "Cambial activity and xylem differentiation in walnut (*Juglans* sp.)". En: Cell and Molecular Biology of Wood formation. Savidge, R. A., J. R. Barnett y R. Napier. Editores. Bios Scientific Publishers Ltd. 209- 221.
- Langheinrich, U. and R. Tischner. 1991. Vegetative storage proteins in poplar induction and characterization of a 32 and a 36-kilodalton polypeptide. **Plant Physiol.** **97**: 1017-1025.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. **Nature** **227**: 680-685.
- Leitch, M. A. and R. A. Savidge. 1995. Evidence for auxin regulation of bordered-pit positioning during tracheid differentiation in *Larix laricina*. **IAWA Journal** **16** (3): 289-297.
- Lehninger, A. L. 1991. Bioquímica las bases moleculares de la estructura y la función celular. 2 ed. Ediciones Omega, S. A. Barcelona, España. 1117 p.
- Leitch, M. A. and R. A. Savidge. 1995. Evidence for auxin regulation of bordered-pit positioning during tracheid differentiation in *Larix laricina*. **IAWA J.** **16** (3): 289-297.
- Lindorf H. 1994. Eco-anatomical wood features of species from a very dry tropical forest. **IAWA Journal** **15** (4): 361-376.

Lira, S. R. H. 1994. Fisiología vegetal. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Editorial Trillas. México D. F. 237p.

Loewus, F. A. y M. W. Loewus. 1983. Myo-Inositol: its biosynthesis and metabolism. **Ann. Rev. Plant Physiol.** 34: 137-161.

Magel, E., A. A. Drouet., A. C. Claudot and Ziegler. 1991. Formation of heartwood substances in the stem of *Robinia pseudoacacia* L. I. Distribution of phenylalanine ammonium lyase and chalcone synthase across the trunk. **Trees** 5: 203-207.

Magel, E., A. C. Jay-Allemand y H. Ziegler. 1994. Formation of heartwood in the substances in the stem of *Robinia pseudoacacia* L. II. Distribution of nonstructural carbohydrates and wood extractives across the trunk. **Trees** 8: 165-171.

Magel, E. A. 2000. "Biochemistry and physiology of heartwood formation". En: Cell and Molecular Biology of Wood formation. Savidge, R. A., J. R. Barnett y R. Napier. Editores. Bios. Scientific Publishers Ltd. 362-376.

Martínez, M. 1994. Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas de Mexicanas. Fondo de Cultura Económica, México. 1247 p.

Micheli, F., M. Bordenave y L. Richard. 2000. "Pectin methylesterases: possible markers for cambial derivative differentiation?" En: Cell and Molecular Biology of Wood formation. Savidge, R. A., J. R. Barnett y R. Napier. Editores. Bios. Scientific Publishers Ltd. 295- 302.

Munsell color company. 1990. Munsell soil color charts. Baltimore, Maryland. 17 p.

Nair, M. N. B. y J. J. Shah. 1983. Histochemistry of paraquat treated wood in *Azadirachta indica* A. Juss. **IAWA Bulletin n.s., 4 (4)**: 249-254.

Nair, M. N. B., J. J. Shah y S. V. Subramanyam. 1983. Ultrastructure and histochemistry of traumatic gum ducts in the wood of *Azadirachta indica* A. Juss. **IAWA Bulletin.** 4 (2-3): 103-112.

Nair, M. N. B. 1988. Wood anatomy and heartwood formation in *Necem (Azadirachta indica)* A. Juss). **Bot. J. of the Linn. Soc.** 97: 79-90.

Necasany, V. 1966. Changes in the vitality of parenchyma cells as the physiological basic of heartwood formation. **Holzforsch Holzverwert** 18: 61-65.

Nobuchi, T., Y. Kamozone y H. Harada. 1976. Cytological changes of parenchyma cells associates with heartwood formation on tree softwood species; sugi (*Cryptomeria japonica*), Momii (*Abies firma*) and Akamatsu (*Pinus densiflora*). **Bull Kyoto Univ For** 48: 178-196.

O'Brien T. P. y M. E. McCully. 1964. Polychromatic staining of plant cell wall by toluidine blue O. **Protoplasma, Bd. LIX, H. 2**: 367-373.

Onofeghara, F. A y S. A. Koroma. 1974. Histochemical localization of enzymes in the Cucurbitaceae. **Ann. Bot.** 38: 477-483.

Panshin, A. J. y C. de Zeeuw. 1980. Textbook of wood technology. Vol. I. 3 ed. McGraw- Hill, Toronto. 705 p.

- Pearse, A. G. E. 1960. Histoquímica teórica y aplicada. Ed. Aguilar. Madrid, España. 184-348 pp.
- Pennell, R. I. y C. Lamb. 1997. Programmed cell death in plants. **The Plant Cell** 9: 1157-1168.
- Piispanen, R. y P. Saranpää. 2001. Variation of non-structural carbohydrates in Silver birch (*Betula pendula* Roth) wood. **Trees** 15: 444-451.
- Portilla G. E. y A. Zavala. 1990. **OIKOS**: un diccionario ecológico. Colección de la división de Ciencias Biológicas y de la Salud UAM. 102 p.
- Quintanar, A.; L. Rivera; A. Torre-Blanco y S. Rebollar. 1997. Comparative histochemistry and cell morphology of sapwood and heartwood of *Gliricidia sepium* Fabaceae. **Rev. Biol. Trop.** 45 (3): 1005-1011.
- Robles, S. R. 1982. Terminología genética y fitogenética. 2a edición. Ed. Trillas. México. 163 p.
- Roth, I. 1966. Anatomía de las plantas superiores. Universidad Central de Venezuela. Ediciones de la biblioteca de Caracas. Colección Ciencias Biológicas. 357 p.
- Rudman, P. 1966. Heartwood formation in trees. **Nature** 210: 608-610.
- Salatino, A., J. E. Kraus y M. L. F. Salatino. 1993. Contents of tannins and their histological localization in young and adult parts of *Struthanthus vulgaris* Mart. (Loranthaceae). **Annals of Botany**. 72: 409-414.
- Salisbury, F. B. y C. W. Ross. 1999. Fisiología Vegetal. Grupo Editorial Iberoamérica S. A. de C. V. 759 p.
- Saranpää, P. y H. Nyberg. 1987a. Lipids and sterols of *Pinus sylvestris* L. sapwood and heartwood. **Trees** 1: 82-87.
- Saranpää, P. y H. Nyberg. 1987b. Seasonal variation of neutral lipids in *Pinus sylvestris* L. sapwood and heartwood. **Trees** 1: 139-144.
- Saranpää, P. y W. Höll. 1989. Soluble carbohydrates of *Pinus sylvestris* L. sapwood and heartwood. **Trees** 3: 138-143.
- Saranpää, P. y R. Piispanen. 1994. Variation in the amount of triacylglycerols and steryl esters in the outer sapwood of *Pinus sylvestris* L. **Trees** 8: 228-231.
- Sauter, J. J y S. Kloth. 1986. Plasmodesmatal frequency and radial translocation rates in ray cells of Poplar (*Populus x canadensis* Moench "robusta"). **Planta** 168: 377-380.
- Sauter, J. J., B. van Cleve y K. Apel. 1988. Protein bodies in ray cells of *Populus x canadensis* Moench "robusta". **Planta** 173: 31-34.
- Sauter, J. J. y B. S. Wellenkamp. 1988. Protein storing vacuoles in ray cell of Willow wood (*Salix caprea* L.) **IAWA Bulletin**. 9 (1): 59-65.
- Sauter, J. J. y B. van Cleve. 1989. Micromorphometric determination of organelles and of storage material in wood ray cells-A useful method for detecting differentiation within a tissue. **IAWA Bulletin**. 10 (4): 395-403.
- Sauter, J. J y B. van Cleve. 1990. Biochemical, immunochemical, and ultrastructural studies of protein storage in poplar (*Populus x canadensis* "robusta") wood. **Planta** 183: 92-100.

Sauter, J. J. y B. van Cleve. 1992. Seasonal variation of amino acids in the xylem sap of "*Populus x canadensis*" and its relation to protein body mobilization. **Trees** 7: 26-32.

Sauter, J. J. y B. van Cleve. 1994. Storage, mobilization and interrelations of starch, sugars, protein and fat in the ray storage tissue of Poplar trees. **Trees** 8: 297-304.

Sauter, J. J. 2000. "Photosynthate allocation to vascular cambium: facts and problems". En: Cell and Molecular Biology of Wood formation. Savidge, R. A., J. R. Barnett y R. Napier. Editores. Bios Scientific Publishers Ltd. 71-81.

Savidge, R. A. 1996. Xylogenesis, genetic and environmental regulation—A Review-. **IAWA Journal** 7(3): 269-310.

Savidge R. A. 2000. "Biochemistry of seasonal cambial growth and wood formation- an overview of the challenges". En: Cell and Molecular Biology of Wood formation. Savidge, R. A., J. R. Barnett y R. Napier. Editores. Bios. Scientific Publishers Ltd. 1-28.

Scalbert, A. y E. Haslam. 1987. Polyphenols and chemical defence of the leaves of *Quercus robur*. **Phytochemistry** 26 (12): 3191-3195.

Schultz T. P. y Darrel D. Nicholas. 2000. Naturally durable heartwood: evidence for a proposed dual defensive function of the extractives. **Phytochemistry** 54: 47-52.

Shah, J. J., R. C. Baqui., R. C. Pandalai y K. R. Patel. 1981. Histochemical changes in *Acacia nilotica* L. during transition from sapwood to heartwood. **IAWA Bulletin n. s.,** 2(1): 31-36.

Shain, L. y J. F. G. Mackay. 1973. Seasonal fluctuation in respiration of aging xylem in relation to heartwood formation in *Pinus radiata*. **Can. J. Bot.** 51: 737-741.

Siegel, S. M. y B. Z. Siegel. 1957. Enhancement by deoxyribonucleic acid of the catalytic peroxidation of pyrogallol. **Nature** 179: 421-422.

Standley, P. C. 1982. Trees and shrubs of Mexico. Contr. Smith. Inst. U. S. Natl. Herbarium. Vol. 23. Washington.

Stepien, V. y F. Martin. 1992. Purification, characterization and localization of the bark proteins of Poplar. **Plant Physiol. Biochem.** 30: 399-407.

Stepien, V. y J. J. Sauter. 1994. Ringing induces the accumulation of vegetative storage proteins in Poplar bark. **Trees** 9: 88-92.

Stewart, C. M. 1960. Detoxification during secondary growth in plants. **Nature** 186: 374-375.

Stewart, M. C. 1966. Excretion and heartwood formation in living trees. **Science** 153: 1068- 1074.

Subrahmanyam, S. V. y J. J. Shah. 1988. The metabolic status of traumatic gum ducts in *Moringa oleifera* Lam. **IAWA Bulletin n. s.** 9 (2): 187-195.

Thornber, J. P. y D. H. Northcote. 1961a. Changes in the chemical composition of a cambial cell during its differentiation into xylem and phloem tissues in trees. 1. Main components. **Biochem. J.** 81: 449-455.

Thornber, J. P. y D. H. Northcote. 1961b. Changes in the chemical composition of a cambial cell during its differentiation into xylem and phloem tissues in trees. 2. Carbohydrate constituents of each main component. **Biochem. J.** **81**: 455-464.

Tortorelli, L. 1956. Madera y bosques argentinos. ACME. Buenos Aires, Argentina. 910 p.

van Bel, A. J. E. y K. Ehlers. 2000. "Symplasmic organization of the transport phloem and the implications for photosynthate transfer to the cambium". En: Cell and Molecular Biology of Wood formation. Savidge, R. A., J. R. Barnett y R. Napier. Editores. Bios Scientific Publishers Ltd. 85-97.

van Fleet, D. S., 1952. Histochemical localization of enzymes in vascular plants. **Bot. Rev.** **18**: 354-398.

Viestra, R. D. 1993. Protein degradation in plants. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.** **44**: 385-410.

Walker, J. R. L. 1975. The Biology of plant phenolics. Studies in Biology 54. Edward Arnold (Publishers) LTD.

Wardrop, A. B. y J. Cronshaw. 1962. Formation of phenolic substances in the ray parenchyma of angiosperms. **Nature**: **193**: 90-93.

Wetzel, S., C. Demmers y J. S. Greenwood. 1989a. Seasonally fluctuating bark proteins are a potential form of nitrogen in three temperate hardwoods. **Planta** **178**: 275-281.

Wetzel, S., C. Demmers y J. S. Greenwood. 1989b. Spherical organelles, analogous to seed protein bodies, fluctuate seasonally in parenchymatous cells of hardwoods. **Can. J. Bot.** **67**: 3439-3445.

Wetzel, S. y J. S. Greenwood. 1991. A survey of seasonal bark proteins in eight temperate hardwoods. **Trees** **5**: 153-157.

Wheeler, E. y P. Baas. 1991. A survey of the fossil for dicotyledonous wood and its significance for evolutionary and ecological wood anatomy. **IAWA Bulletin n. s.**, **12 (3)**: 275- 317.

Wilkes, J. 1991. Heartwood development and its relationship to growth in *Pinus radiata*. **Wood Sci. Technol.** **25**: 85-90.

Wilkins, A. P. 1991. Sapwood, heartwood and bark thickness of silviculturally treated *Eucalyptus grandis*. **Wood Sci. Technol.** **25**: 415-423.

Wu, J-L. y B-Z. Hao. 1991. Vacuole proteins in secondary phloem parenchyma cells of three Meliaceae species. **IAWA Bulletin.** **12 (1)**: 51-56.

Yang, K. C. 1986. Metabolic activity of living sapwood ray cells in *Picea mariana* expressed by a new indicator. **Can. J. Bot.** **65**: 1775-1778.

Yang, K. C., Y. S. Chen., C. Chiu y G. Hazenberg. 1994 Formation and vertical distribution of sapwood and heartwood in *Cryptomeria japonica* D. Don. **Trees** **9**: 35-40.

Ziegler, H. 1968. Biological aspects of heartwood formation. **Holz Roh- Werkst** **26**: 61-68.

Zimmermann, M. H. y C. L. Brown 1971. Trees: structure and function Springer, Berlin Heidelberg New York.

ANEXO 1: Abreviaturas

Ácido hidroxicinámico = HCA

A = albura

H₂O = agua

dH₂O = agua desionizada

ddH₂O = agua ultrapura (milliQ)

aa = aminoácido

ATPasa = adenosin trifosfato sintetasa

CHS = Chalcono sintetasa

flavonol dehidrorobinetina = DHR

FAA = formol- Alcohol-ácido acético

DAP = diámetro a la altura del pecho

SDS = dodecil sulfato de sodio

D = duramen

PAL = Fenil-alanina-amonio liasa

PEP = fosfoenolpiruvato

flavonol robinetina = ROB

Glu = glucosa

Glu-1-P = glucosa-1-fosfato

Glu-6-P = glucosa-6-fosfato

KDa = kilodaltones

m snm = metros sobre el nivel del mar

OAA = Oxalacetato

P = parénquima

SDH = Succinato deshidrogenasa

Ta = tangencial

Tr = transversal

Ra = radial

ANEXO 2: Clasificación de los valores anatómicos

Vasos

No de poros por mm² (Chattaway, 1932)

< 2	muy pocos
2 – 5	pocos
6 – 10	moderadamente pocos
11 – 20	moderadamente numerosos
21 – 40	numerosos
> 40	muy numerosos

Diámetro tangencial de los poros(μm) (IAWA 1939)

< 25	extremadamente pequeños
25 – 50	muy pequeños
51 – 100	moderadamente pequeños
101 – 200	medianos
201 – 300	moderadamente grandes
301 – 400	muy grandes
> 400	extremadamente grandes

Longitud de elementos (μm) (Chattaway, 1932)

< 175	extremadamente cortos
175 – 250	muy cortos
251 – 350	moderadamente cortos
351 – 800	medianos
801 – 1100	moderadamente largos
1101 – 1900	muy largos
> 1900	extremadamente largos

Radíos

No por mm lineal (Chattaway, 1932)

< 2	muy pocos
2 – 4	pocos
5 – 7	moderadamente numerosos
8 – 10	numerosos
> 10	muy numerosos

Altura (Chattaway, 1932)

< 0.5mm	extremadamente bajos
0.5mm – 1.0mm	muy bajos
1.01mm – 2.0mm	bajos
2.01mm – 5.0mm	algo bajos
5.01mm – 1.0cm	moderadamente altos
1.01cm – 2.0cm	altos
2.01cm – 5.0cm	muy altos
> 5.01cm	extremadamente altos

Anchura (μm) (IAWA, 1939)

<15	extremadamente finos
15 – 25	muy finos
26 – 50	moderadamente finos

51 – 100	medianos
101 – 200	moderadamente anchos
201 – 400	muy anchos
> 400	extremadamente anchos

Fibras

Longitud (μm) (IAWA, 1937)

< 500	extremadamente cortas
500 – 700	muy cortas
701 – 900	moderadamente cortas
901 – 1600	medianas
1601 – 2200	moderadamente largas
2201 – 3000	muy largas
> 3000	extremadamente largas

Diámetro (μm) (Tortorelli, 1956)

< 25	fino
25 – 40	mediano
> 40	ancho

Grosor de la pared (μm) (IAWA, 1939)

Lumen > que la pared	delgado = lumen > que la pared
Lumen < que la pared	grueso = lumen < que la pared
Lumen casi cerrado	muy grueso = lumen casi cerrado

ANEXO 3: soluciones, colorantes y reactivos

A. Yodo-Ioduro de potasio

- Disolver 2 g de Yoduro de potasio y 0.2 g de Iodo en 100 ml de dH_2O .

B. Azul de Toluidina O'

- Preparar buffer de benzoatos disolviendo 0.25 g de ácido benzoico y 0.29 g de benzoato de sodio. Ajustar el pH a 4.4 con HCl. Disolver 0.05 g de Azul de Toluidina O en el buffer.

C. Cloruro de zinc

- Disolver 50 g de Cloruro de Zinc (Cl_2Zn) y 16 g de Ioduro de Potasio(KI) en 17 ml de ddH_2O . La solución se deja sedimentar por varios días y se trabaja con el sobrenadante.

D. Ácido tánico 1%-cloruro férrico 3%

- Disolver 0.5 g de ácido tánico en 50 ml de dH_2O .
- Disolver 1.5 g de cloruro férrico en 50 ml de dH_2O .

E. Hidrocloruro de hidroxilamina alcalina

- Disolver 14 g de hidróxido de sodio (NaOH) en 100 ml de etanol al 60% (Solución A).
- Disolver 14 g de hidroxilamina clorhídrica en 100 ml de etanol al 60% (Solución B).
- Para obtener hidroxilamina alcalina mezclar las soluciones A y B por partes iguales.
- Disolver 5 g de cloruro férrico en 50 ml de HCl 0.1 N en etanol al 60%.

F. Fluoroglucinol 1 % en etanol.

- Disolver 1 g de fluoroglucinol en 100 ml de etanol al 96 %.

G. Vainillina

- Disolver 0.2 g de vainillina en 10 ml de dH_2O (solución A).
- Mezclar 1 ml de acetaldehído y 9 ml de etanol al 95 % (solución B).
- Mezclar solución A y B y añadir 10 ml de HCl concentrado.

H. Sudan negro B

- Disolver 0.4 g de Sudan negro B en 100 ml de etanol al 70 % y filtrar la solución.

I. Sudan IV

- Disolver 0.2 g de Sudan IV en 100 ml de etanol al 70 %.

J. Azul Nilo sulfatado

- Disolver 1 g de azul nilo sulfatado en 100 ml de dH_2O .

K. Azul nilo

- Disolver 0.25 g de azul nilo A en 100 ml de dH_2O . Añadir 1 ml de ácido sulfúrico. La mezcla se mantiene hirviendo durante 2 horas y después se filtra.

L. Localización de fosfatasa ácidas

- Disolver 1.9 g de acetato de sodio trihidratado en 70 ml de dH_2O (solución A).
- Mezclar 0.34 ml de ácido acético en 100 ml de dH_2O (solución B).
- Mezclar 70 ml de la solución A y 30 ml de la solución B para obtener 100 ml de buffer de acetatos pH 5 (solución C).
- Disolver 20.8 mg de naphthol AS/MX phosphate en 1 ml de dimetil formamida (solución D).
- Disolver 51.4 mg de Fast Red en 1 ml de dimetil formamida al 70 % (Solución E).
- Para preparar la solución sustrato mezclar 10 μl de la solución D más 10 μl de la solución E en 5 ml de solución C. La solución sin sustrato carece de la solución D.

M. Localización de Catalasa

- Disolver 10 mg de diaminobenzidina (DAB) en 5 ml de buffer (2- amino-2-methyl-1, 3- propanediol) y ajustar la solución a pH 10 (solución A).
- Para preparar la solución sustrato: adicionar 0.1 ml de peróxido de hidrógeno a la solución A y reajustar a pH 9.

N. Localización de Fenol – oxidasa

- Buffer de fosfo citrato: mezclar 18.7 ml de fosfato de sodio y 10.65 ml de ácido cítrico. Aforar a 100 ml con dH_2O y ajustar a pH 4.5.
- Para preparar la solución sustrato: disolver 5mg de naphthol y 5mg de 4-aminodifenilamina en 0.5 ml de dimetil formamida (DMF), a esta mezcla se adicionan 10ml del buffer de fosfo citrato. La solución sin sustrato carece de naphthol.

O. Localización de succinato deshidrogenasa

Solución sustrato.

- Disolver 10 mg de 1, 3 (4,5-Dimethyl thiazolyl) 5- dyphenyl tetrazolium bromide (MTT) en 10 ml de ddH_2O (solución A).
- Disolver 0.606 g de Trisma- base en 100 ml de ddH_2O . Ajustar a pH 7.4 (solución B).

- Disolver 0.6 g de cloruro de cobalto en 0.05 ml de ddH₂O (solución C).
- Disolver 0.1 g de cloruro de magnesio en 0.05 ml de ddH₂O (solución D).
- Disolver 6.75 g de succinato de sodio en 10 ml de ddH₂O y ajustar el pH a 7 (solución E).
- Solución stock de tetrazolium: mezclar 2 ml de la solución A, 2 ml de la solución B, 0.4 ml de la solución C, 0.8 ml de la solución D y 2.0 ml de ddH₂O.
- Para preparar la solución sustrato: mezclar 0.9 ml de la solución stock de tetrazolium y 0.1 ml de la solución E.

Solución teñidora.

- Disolver 0.1 g de methyl green en 5 ml de cloroformo al 2 % (solución F).
- Disolver 0.04 g de piridina-Y en 2 ml de cloroformo al 2 % (solución G).
- Disolver 1.63 g de acetato de sodio trihidratado en 60 ml de dH₂O (solución H).
- Mezclar 0.45 ml de ácido acético en 100 ml de dH₂O (solución I).
- Preparar buffer Walpole's mezclando 60 ml de la solución H y 40 ml de la solución I. Ajustar el pH a 4.8.
- Para preparar la solución teñidora se mezclan 2.7 ml de solución F, 1.2 ml de solución G y 4.2 ml de glicerol, a esta mezcla se añaden 6.9 ml de buffer de Walpol's.

Formol salino 10%.

- Mezclar 10 ml de formaldehído en 100 ml de ddH₂O y disolver 0.9 g de NaCl.

P. Identificación de proteínas de almacenamiento

Rojo Ponceau.

- Disolver 0.17g de ácido peryódico en 37 ml de dH₂O y justar el pH a 1.5. Añadir 0.5 g de Ponceau 2R.

Azul de Coomassie.

- Disolver 0.02 g de azul de Coomassie en etanol-ácido acético glacial 3: 1.V

Pepsina.

- Disolver 0.125g de pepsina en 25ml de 0.1 N HCl - Tritón X-100 al 0.5%.

Q. Buffer Tris-HCl 0.0625 M pH 6.8, SDS 0.1%.

Preparar buffer Tris-HCl 0.0625 M disolviendo 0.76 g de Trizma base en 100 ml de ddH₂O. Ajustar el pH a 6.8 con HCl 1N. Tomar 99 ml de buffer y agregar 1 ml de SDS al 10% (p/v).