



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**INSTITUTO DE BIOLOGÍA**  
**BIOLOGÍA EVOLUTIVA**

**EXPRESIÓN GÉNICA Y SU RELACIÓN CON LA LIGNIFICACIÓN DE LOS  
ELEMENTOS DE VASO EN ALGUNAS CACTOIDEAE**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**JORGE REYES RIVERA**

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS:**      **Dra. Teresa Margarita Terrazas Salgado**  
**Instituto de Biología, UNAM**

**COMITÉ TUTOR:**                      **Dr. Francisco Roberto Vergara Silva**  
**Jardín Botánico, Instituto de Biología, UNAM**  
**Dr. Pedro Guillermo Angeles Álvarez**  
**Instituto de Ecología, A.C.**

**TUTOR INVITADO:**                    **Dr. Gonzalo Canché Escamilla**  
**Centro de Investigación Científica de Yucatán**

**MÉXICO, D.F. NOVIEMBRE, 2015.**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.





**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
INSTITUTO DE BIOLOGÍA  
BIOLOGÍA EVOLUTIVA

**EXPRESIÓN GÉNICA Y SU RELACIÓN CON LA LIGNIFICACIÓN DE LOS  
ELEMENTOS DE VASO EN ALGUNAS CACTOIDEAE**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**JORGE REYES RIVERA**

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS:** Dra. Teresa Margarita Terrazas Salgado  
Instituto de Biología, UNAM

**COMITÉ TUTOR:** Dr. Francisco Roberto Vergara Silva  
Jardín Botánico, Instituto de Biología, UNAM  
Dr. Pedro Guillermo Angeles Álvarez  
Instituto de Ecología, A.C.

**TUTOR INVITADO:** Dr. Gonzalo Canché Escamilla  
Centro de Investigación Científica de Yucatán

**MÉXICO, D.F. NOVIEMBRE, 2015.**

**Dr. Isidro Ávila Martínez**  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión del Subcomité por Campo de Conocimiento de Biología Evolutiva y Sistemática del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 21 de septiembre de 2015, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** del alumno **REYES RIVERA JORGE** con número de cuenta **401089727** con la tesis titulada: **"EXPRESIÓN GÉNICA Y SU RELACIÓN CON LA LIGNIFICACIÓN DE LOS ELEMENTOS DE VASO EN ALGUNAS CACTOIDEAE"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. TERESA MARGARITA TERRAZAS SALGADO**:

Presidente:	DR. ÁNGEL SALVADOR ARIAS MONTES
Vocal:	DR. RAFAEL LIRA SAADE
Secretario:	DR. FRANCISCO ROBERTO VERGARA SILVA
Suplente:	DR. RAMÓN MARCOS SOTO HERNÁNDEZ
Suplente	DR. JORGE NIETO SOTELO

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"**  
Cd. Universitaria, D.F. a 3 de noviembre de 2015.

*M. del Coro Arizmendi*

**DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA**  
**COORDINADORA DEL PROGRAMA**



c.c.p. Expediente del (la) interesado (a).

## **AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES**

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM, por el apoyo otorgado para el desarrollo de mis actividades escolares durante la realización de este trabajo.

Al CONACYT, por la beca otorgada (220343), y al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, DGAPA, por el apoyo otorgado a los proyectos (IN209012, IN210115). A los responsables del Laboratorio de Sistemática Molecular y el Laboratorio de Secuenciación Genómica de la Biodiversidad y de la Salud, del Instituto de Biología (UNAM), y a su personal técnico altamente capacitado.

A los miembros de mi Comité Tutor: Dra. Teresa Margarita Terrazas Salgado, Dr. Francisco Roberto Vergara Silva, Dr. Pedro Guillermo Angeles Álvarez, y al Dr. Gonzalo Canché Escamilla, por el invaluable apoyo académico, el cual sirvió para enriquecer mi proyecto inicial de doctorado.

## **AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL**

Al Instituto de Biología por sus excelentes instalaciones y su excelente plantilla académica: sin ellos el desarrollo de este trabajo hubiera sido más tardado.

A la Dra. Teresa Terrazas por apoyarme en la realización de esta idea, producto de los resultados obtenidos de mis estudios de maestría.

A mis compañeros de laboratorio de anatomía en el Instituto de Biología (UNAM): Jorge, Dalia, Silvia, Alicia, Paty, Ale, Monse y Emilio. A mis compañeros del laboratorio de Membranas en el CICY: Elda, Flor, Mayra, Anahí, Ale y Milton. A mis compañeras del laboratorio de Fitoquímica en el Colegio de Postgraduados: Naybi, Vicky y Fátima. También a Gus, Mayra y Héctor del Departamento de Biología Molecular de Plantas en el Instituto de Biotecnología (UNAM). A ellas y ellos muchísimas gracias por las vivencias y conocimientos compartidos en el laboratorio y las salidas al campo, además, por hacer muy amena mi estancia en cada institución. Un especial agradecimiento a Dalia Grego por algunas de las preparaciones histológicas que fueron fotografiadas para este trabajo.

Al Dr. Francisco Vergara Silva del Jardín Botánico (I.B., UNAM) por los conocimientos impartidos en sus clases, los cuales sirvieron enormemente para diseñar este proyecto, además, por las constantes recomendaciones aportadas durante su seguimiento a este trabajo.

Al Dr. Pedro Guillermo Angeles Álvarez del INECOL por las recomendaciones teóricas y metodológicas hechas para mejorar este trabajo.

Al Dr. Gonzalo Canché Escamilla por el apoyo personal y académico brindado durante mi estancia en el CICY para el aprendizaje y desarrollo de las metodologías usadas en este trabajo: mi más grande y afectuoso agradecimiento.

Al Dr. Ramón Marcos Soto Hernández por el apoyo brindado en el Colegio de Postgraduados para el desarrollo de algunas de las metodologías usadas en este trabajo.

A la Dra. Svetlana Shishkova del Instituto de Biotecnología (UNAM) por las sugerencias y correcciones teóricas y metodológicas aportadas para el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Jorge Nieto Sotelo del Jardín Botánico (I.B., UNAM) por las sugerencias y correcciones metodológicas aportadas para el desarrollo y el enriquecimiento de este proyecto.

Al M.C. Gustavo Rodríguez Alonso del Instituto de Biotecnología (UNAM) por ayudarme y enseñarme a lidiar con las herramientas bioinformáticas... gracias Gus!!!

Al Dr. Ángel Salvador Arias Montes del Jardín Botánico (I.B., UNAM) por el apoyo otorgado con las especies en el invernadero y por la revisión de este escrito.

Al Dr. José Martín García Varela del Instituto de Biología (UNAM) por su amable disponibilidad y cooperación académica para el desarrollo de esta investigación.

A la Dra. Silvia Aguilar Rodríguez por los valiosos comentarios aportados para el desarrollo y enriquecimiento de este trabajo.

A la Dra. Alejandra Vasco Gutiérrez por involucrarse en este proyecto.

A la Dra. Lidia Irene Cabrera, y a las biólogas Claudia Montealegre y Mónica Flores, por su valiosa orientación en el laboratorio de Sistemática Molecular del departamento de Botánica en el Instituto de Biología (UNAM).

A la M. C. Laura Margarita Márquez Valdelamar, responsable del laboratorio de secuenciación genómica de la biodiversidad y de la salud, del Instituto de Biología (UNAM), y a su personal técnico altamente capacitado.

Un agradecimiento especial al Q.I. Santiago Duarte Aranda del CICY; al M. C. Rubén San Miguel Chávez y al Sr. Domingo Gonzáles Meraz, del Colegio de Postgraduados. Mi entero agradecimiento por orientarme enormemente y por la excelente asistencia técnica que me brindaron en los respectivos laboratorios.



## INDICE

<b>Resúmen</b>	i
<b>Abstract</b>	iii
<b>Estructura de la tesis</b>	v
<b>Capítulo 1. Introducción general</b>	1
Variación de la forma de crecimiento en Cactaceae y crecimiento secundario	2
Regulación del crecimiento secundario y diferenciación celular	3
Genes reguladores y niveles de expresión	3
El papel de la lignina y sus subunidades	4
Variantes cambiales en Cactaceae y su relación con el grado de lignificación en el xilema secundario	5
<b>Capítulo 2. Revisión de la morfo-anatomía del tallo en Cactaceae</b>	6
Generalidades de los cactus	7
Morfo-anatomía del tallo	8
Córtex	10
Haces corticales	11
Médula	12
Haces medulares	13
Sistema vascular	14
Tipos celulares del sistema vascular en Cactaceae	14
Elementos de vaso	14
Traqueidas de Banda Ancha (TBAs)	17
Fibras	19
Parénquima axial	22
Radios vasculares	22
Floema	24
Xilema	25
El cámbium vascular y sus derivados	25
Acumulación del xilema secundario	27
Madera fibrosa	30
Madera con TBAs	31
Madera dimorfa	32
De madera con TBAs a madera fibrosa	33
De madera con TBAs a madera parenquimatosa	34
De madera fibrosa a madera parenquimatosa	36
Madera trimorfa (de TBAs a Fibrosa y después a TBAs)	37
Cambio de fase según la edad del cámbium vascular (variación longitudinal y radial)	38

Correlaciones	39
Lignificación de radios y composición de cristales	39
Forma de crecimiento, lluvia y hábitat	39
Alometría	40
Longitud celular	41
Forma de crecimiento y lignificación de la madera	42
<b>Capítulo 3. Wood Chemical Composition in Species of Cactaceae: The relationship between Lignification and Stem Morphology</b>	44
<i>Abstract</i>	45
<i>Introduction</i>	46
<i>Materials and methods</i>	48
<i>Klason lignin analysis/FTIR</i>	48
<i>Determination of the S/G ratio by nitrobenzene oxidation/HPLC</i>	49
<i>Content of cell wall carbohydrates</i>	50
<i>Isolation of hemicellulose A</i>	50
<i>Isolation of hemicellulose B</i>	50
<i>Results and Discussion</i>	50
<i>Lignification variation between species of different sizes</i>	50
<i>Variation in individuals of different sizes belonging to the same species</i>	51
<i>Juvenile/mature wood and longitudinal variation</i>	52
<i>Lignification and wood anatomy</i>	52
<i>Wood anatomy and chemical composition of lignin relationship</i>	53
<i>Characterization of lignin by FTIR</i>	53
<i>S/G ratio by HPLC</i>	56
<i>Conclusions</i>	58
<i>References</i>	58
<b>Capítulo 4. Un ortólogo putativo de <i>KNAT1</i> se expresa durante el crecimiento secundario en especies de Cactaceae con madera fibrosa, no fibrosa y dimorfa</b>	62
Introducción	63
Materiales y métodos	66
Aislamiento de ARN total, síntesis de ADNc y amplificación	66
Secuenciación	67
Alineamiento de secuencias y análisis filogenético	67
Resultados	68
Discusión	69
Conclusiones	71
Referencias	72

<b>Capítulo 5. Discusión general</b>	80
Caracteres ancestrales y especialización	81
Hipótesis de la evolución del xilema secundario	82
Morfogénesis	85
Lignificación de los elementos de vaso como indicador de la evolución del xilema secundario en Cactaceae	87
Conclusiones generales y expectativas	88
<b>Referencias generales</b>	89

## ANEXOS

<b>Anexo 1.</b> Información general de las secuencias de proteínas utilizadas para los alineamientos y análisis filogenéticos	99
<b>Anexo 2.</b> Secuencias de nucleótidos a partir de las cuales se obtuvieron las proteínas deducidas	102

## FIGURAS Y CUADROS

### Capítulo 2

<b>Figura 1.</b> Morfología de los tipos celulares en la madera de Cactaceae	18
<b>Figura 2.</b> Tipos de punteaduras y estructura de la pared secundaria en los elementos de vaso del xilema secundario en Cactaceae	21
<b>Figura 3.</b> Acumulación del xilema secundario en algunas Cactaceae	28
<b>Figura 4.</b> Madera dimorfa en <i>F. pilosus</i>	35
<b>Cuadro 1.</b> Cantidad de xilema secundario en especies de Cactoideae con diferentes formas de crecimiento y grados de succulencia	41

### Capítulo 3

<b>Figure 1.</b> <i>Phylogeny of Cactaceae</i>	46
<b>Figure 2.</b> <i>Non fibrous wood in species of Cactaceae</i>	53
<b>Figure 3.</b> <i>Fibrous wood in species of Cactaceae</i>	54
<b>Figure 4.</b> <i>FTIR spectra of lignin in the lower wood of thirteen species of Cactaceae</i>	55
<b>Figure 5.</b> <i>Relationship between plant species size and percentage of syringyl lignin</i>	57
<b>Table 1.</b> <i>Characteristics of individuals studied from thirteen species of Cactaceae</i>	49
<b>Table 2.</b> <i>Chemical composition of wood in species of Cactaceae</i>	51
<b>Table 3.</b> <i>Assignment of FTIR absorption bands in wood lignins</i>	54

### Capítulo 4

<b>Figura 1.</b> Morfología de los derivados del cambium vascular en algunas Cactaceae	78
<b>Figura 2.</b> Gel de agarosa y productos de amplificación por PCR	78
<b>Figura 3.</b> Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de ARK2 en Cactaceae y filogenia de proteínas KNOX	79
<b>Cuadro 1.</b> Matrices de identidad/similitud para secuencias de nucleótidos y proteínas	76

## RESÚMEN

Dentro de las angiospermas la familia Cactaceae es una de las más variables morfológicamente. En esta familia existe una gradación de formas, desde aquellas especies de hábito arbóreo, poco suculentas y con hojas, como aquellas de *Pereskia*, hasta aquellas de los géneros más derivados con tallos globosos deprimidos de talla pequeña, como *Ariocarpus*. La variabilidad morfológica está correlacionada con las características anatómicas del xilema secundario (madera): las especies con hábitos arbóreos tienen madera predominantemente fibrosa, mientras que la madera de las especies globosas está compuesta predominantemente por un tipo celular particular, menos lignificado que las fibras, denominado traqueida de banda ancha (TBA). Además, en Cactaceae ocurre un proceso único dentro de las angiospermas, en el cual la madera (dimorfa) sufre un cambio de fase durante la ontogenia: el cambium vascular pasa de producir un tipo celular predominante en las etapas juveniles a otro tipo diferente, predominante en las etapas adultas. Este cambio se ha relacionado con la maduración de los individuos y con las formas de crecimiento, en términos del soporte que le confiere a la planta en general. La escasa correlación entre estos procesos y la taxonomía de las especies, así como los cambios en la morfología de los tallos y su correlación con las características anatómicas de la madera, han llevado a considerar que la evolución de las formas de crecimiento en Cactaceae ha sucedido por medio de eventos heterocrónicos (paedomorfosis), y que la variación de la madera obedece a la actividad de genes homeóticos. Dentro de los principales rasgos paedomórficos en la madera de Cactaceae se encuentran: el retardo en la lignificación, la escasa acumulación de madera, la presencia de TBAs y la retención de elementos de vaso parecidos a los del protoxilema dentro del xilema secundario.

Recientemente se ha demostrado que la lignificación y la diferenciación celular a nivel de cambium vascular son procesos estrechamente relacionados, controlados por programas genéticos similares en plantas modelo. En *Populus* el gen homeótico *ARBORKNOX2* [*ARK2*] (ortólogo de *BREVIPEDICELLUS* [*BP*], también conocido como *KNOTTED LIKE FROM ARABIDOPSIS THALIANA 1* [*KNAT1*] en *Arabidopsis*) es un regulador del desarrollo de la madera y la lignificación celular: su sobreexpresión induce el retardo en la diferenciación celular provocando una escasa acumulación de madera, también reduce el contenido total de lignina y modifica su composición química.

Hasta ahora no se sabe si la variación en la actividad del cambium vascular y sus derivados dentro de Cactaceae obedece a la acción de genes como *ARK2*. Con la finalidad de conocer si genes homeóticos como *ARK2* se expresan en las especies de Cactaceae se estandarizaron los protocolos para aislar el ADN complementario desde los transcritos de *ARK2* expresados en muestras de cambium vascular en especies con madera fibrosa, no fibrosa y dimorfa. Además, para conocer si existe variación en los componentes químicos de la madera, con énfasis en la lignina, se estudió la composición química de la madera en trece especies con diferentes formas de crecimiento (incluyendo los tres tipos de madera) por medio de espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier y cromatografía líquida de alto rendimiento. Se encontró que un ortólogo de *KNATI/ARK2* se expresa a nivel de cambium vascular en especies de Cactaceae con madera fibrosa, no fibrosa y dimorfa. Por otro lado, se observó que el contenido de lignina varía según la morfología de las especies, pero en general el contenido de lignina es menor en las especies pequeñas. Además, la composición de la lignina está correlacionada con la anatomía de la madera y la forma de crecimiento de las especies. Estos resultados sugieren fuertemente que la variación anatómica de la madera (correlacionada con las formas de crecimiento) obedece a la actividad diferencial de genes reguladores de la diferenciación y lignificación a nivel de cambium vascular, además de que las proporciones de cada tipo celular confieren distintas propiedades mecánicas a la madera según su grado de lignificación.

Se sugiere llevar a cabo la caracterización funcional de los ortólogos de *ARK2* en Cactaceae, así como analizar los patrones de expresión génica para conocer la acción específica de estos genes en la diferenciación de los derivados del cambium vascular y su posible relación con la evolución de la forma de crecimiento y el xilema secundario en esta familia. Además, el uso de nuevas herramientas, tales como los análisis comparativos de transcriptomas, podría ayudar a entender los mecanismos moleculares por medio de los cuales ha evolucionado el desarrollo del xilema secundario.

## ABSTRACT

In angiosperms the Cactaceae family is one of the most variable morphologically. Within this family there is a gradation of growth forms from those plants barely succulent with leaves and tree-like habit, as the members of *Pereskia*, to those genres most derived with small size and depressed globose stems, as *Ariocarpus*. The morphological variability is correlated with the anatomy of secondary xylem (wood): species with tree-like habits have predominantly fibrous wood, while the wood of globose species is composed predominantly of a particular cell type, less lignified than the fibers, called wide-band tracheid (WBT). Furthermore, a unique process within angiosperms occurs in Cactaceae, in which the wood (dimorphic) undergoes a phase change during the ontogeny: the vascular cambium changes from producing a predominant cell type in juvenile stages to producing a different predominant type in adult stages. This change has been linked to the maturation of individuals and the growth forms in terms of the support conferred to the plant in general. The little correlation between the occurrence of these processes and the taxonomy of the species, as well as the changes in the morphology of the stems and their correlation with the anatomical characteristics of the wood, have led to the conclusion that the evolution of growth forms in Cactaceae has occurred through heterochronic events (paedomorphosis), and that variation of the wood is due to the activity of homeotic genes. The main paedomorphic features in the wood of Cactaceae are: the delay in lignification, scarce accumulation of wood, presence of WBTs and retaining protoxylem-like vessel elements within the secondary xylem.

Recently it has been shown that lignification and cell differentiation at the level of vascular cambium are closely related processes, controlled by similar genetic programs in model plants. In *Populus* the homeotic gene *ARBORKNOX2* [*ARK2*] (an ortholog from *BREVIPEDICELLUS* [*BP*], also known as *KNOTTED LIKE FROM ARABIDOPSIS THALIANA 1* [*KNATI*] in *Arabidopsis*) is a regulator of cell lignification and development of the wood. Its overexpression induces delay of cell differentiation causing little accumulation of wood, it also reduces the total content of lignin and modifies its chemical composition.

So far it is not known if the variation in the activity of the vascular cambium and its derivatives within Cactaceae is due to the action of genes such as *ARK2*. In order to know if

homeotic genes as *ARK2* are expressed in species of Cactaceae, protocols to isolate the *ARK2* gene from the vascular cambium in species with fibrous, non-fibrous and dimorphic wood were standardized. Moreover, the chemical composition of wood in thirteen species with different forms of growth (including the three types of wood) were studied by Fourier transform infrared spectroscopy and high performance liquid chromatography, in order to see if there is variation in the chemical components of wood, with emphasis on lignin. It was found that an ortholog of *KNAT1/ARK2* is expressed at the vascular cambium in species of Cactaceae with fibrous, non-fibrous and dimorphic wood. Furthermore, we found that the lignin content varies according to the morphology, but in general the lignin content is lower in the smaller species where the vessel elements are seemed to those from protoxylem. Furthermore, the composition of lignin was correlated with wood anatomy and growth form of the species. These results strongly suggest that anatomical variation of wood (correlated with growth forms) must be due to the differential activity of genes regulating differentiation and lignification at the vascular cambium level, also the proportions of each cell type confer different mechanical properties to the wood according to their lignification.

I suggest to explore the functional characterization of *ARK2* orthologs in Cactaceae and to analyse their patterns of gene expression to know the specific action of these genes in the differentiation of vascular cambium derivatives and their possible relationship with the evolution of growth form and the secondary xylem in this family. Furthermore, using new tools, such as comparative analysis of transcriptomes, might help to understanding the molecular mechanisms by which the development of secondary xylem has evolved.

## Estructura de la tesis

La presente tesis está organizada de la siguiente manera: En el [Capítulo 1](#) se da una introducción general de los factores moleculares y químicos involucrados en el desarrollo del xilema secundario y su posible relación con la variación morfológica del tallo en la familia Cactaceae. En el [Capítulo 2](#) se hace una revisión de la morfo-anatomía del tallo en la familia Cactaceae, con énfasis en las variantes cambiales y su relación con la forma de crecimiento de las especies. En el [Capítulo 3](#) se presentan los resultados del análisis de la composición química de la madera en trece especies de Cactaceae y se analiza la relación de la lignificación con la forma de crecimiento de las especies. En el [Capítulo 4](#) se presentan las secuencias del ADN complementario sintetizadas desde los transcritos de *ARK2* expresados en muestras de cambium vascular en especies con madera fibrosa, no fibrosa y dimorfa. Se presentan los resultados del análisis filogenético de las proteínas KNOX clases I y II. Además, se reportan por primera vez los ortólogos de *ARBORKNOX2* [*ARK2*] (también conocido como *KNATI*) para especies de Cactaceae. En el [Capítulo 5](#) se hace la discusión general de la evolución del xilema secundario y la forma de crecimiento en Cactaceae y los genes que podrían estar involucrados en el proceso evolutivo. Además, se presentan las conclusiones generales y las expectativas de este incipiente campo de estudio del xilema secundario de Cactaceae. Finalmente, aquellas referencias citadas en los capítulos 1, 2 y 5 se muestran en la sección de [referencias generales](#).



# **Capítulo 1**

## **Introducción general**

## **Variación de la forma de crecimiento en Cactaceae y crecimiento secundario**

La variedad de formas de crecimiento en las angiospermas es muy amplia y en algunos grupos, como las dicotiledóneas, se puede reconocer una gradación desde los representantes herbáceos hasta especies de gran talla que constituyen árboles típicamente leñosos (Carlquist 2009). No obstante, existen grupos de plantas con tallos suculentos y rasgos en el xilema secundario que se consideran muy especializados, como en la familia Cactaceae (Altesor y Ezcurra 1994, Arias y Terrazas 2001, Gibson 1973, Mauseth y Plemons-Rodríguez 1998, Terrazas y Arias 2003, Mauseth 2006a), cuyos representantes desarrollan formas diferentes a los árboles típicamente leñosos. Dentro de esta familia se han descrito 13 diferentes formas de crecimiento, desde los tallos globosos deprimidos hasta los de hábito arbóreo, las cuales están relacionadas con las características anatómicas del xilema secundario (madera) (Gibson 1973, Gibson y Nobel 1986, Altesor y Ezcurra 1994, Anderson 2001, Terrazas y Mauseth 2002, Mauseth 2004, Reyes-Rivera 2010, Vázquez-Sánchez y Terrazas 2011). Por otro lado, se ha propuesto que la gran variedad de formas de crecimiento en dicotiledóneas, así como los diversos ambientes que colonizan, están relacionados con el crecimiento secundario proporcionado por el cambium vascular, la actividad cambial y las características de la madera (Groover 2005, Carlquist 2009; 2010, Spicer y Groover 2010, Lucas *et al.* 2013, Růžička *et al.* 2015). Particularmente para Cactaceae la hipótesis más aceptada es que la evolución del xilema secundario, y consecuentemente las formas de crecimiento, han seguido vías heterocrónicas (paedomorfosis *sensu* Carlquist 1970; 2009, juvenilismo *sensu* Gibson 1973, o neotenia alométrica *sensu* Altesor *et al.* 1994). En este sentido, el papel del cambium vascular es clave en la ontogenia de la madera ya que las células que formarán la madera del tallo son diferenciadas desde células madre producidas por dicho meristemo (Esau 1977, Larson 1994). De ese modo, la arquitectura de la madera es consecuencia de los cambios que sufre el cambium vascular y las células que de él se diferencian durante la ontogenia del individuo (Groover y Jones 1999, Kubo *et al.* 2005, Groover *et al.* 2006, Li *et al.* 2010, Du *et al.* 2009, Spicer y Groover 2010, Xu *et al.* 2013, Liu *et al.* 2014, Lucas *et al.* 2013, Zhong y Ye 2015, Ye y Zhong 2015, Růžička *et al.* 2015).

## **Regulación del crecimiento secundario y diferenciación celular**

Los meristemos primarios (meristemos apicales), la diferenciación del cambium vascular (meristemo lateral) y el crecimiento secundario están regulados por genes similares ya que hay un traslape en los mecanismos que regulan su crecimiento (Schrader *et al.* 2004, Groover 2005, Groover *et al.* 2006, Spicer y Groover 2010, Lucas *et al.* 2013, Liu *et al.* 2014, Růžička *et al.* 2015). Asimismo, la diferenciación celular (p. ej. de los elementos traqueales) es un mecanismo coordinado entre la muerte celular programada y la síntesis de pared celular secundaria, en el cual la hidrólisis de los contenidos celulares sucede al tiempo que las paredes celulares secundarias aumentan su grosor para formar esqueletos resistentes y funcionales (Groover y Jones 1999, Růžička *et al.* 2015, Zhong y Ye 2015, Taylor-Teeple *et al.* 2015). Por lo tanto, las vías para la biosíntesis de la pared celular secundaria juegan un papel fundamental para la correcta diferenciación de los elementos traqueales ya que la asincronía en la muerte celular programada y la diferenciación puede resultar en un elemento propenso al colapso (Groover y Jones 1999, Escamez y Tuominen 2014, Barros *et al.* 2015, Růžička *et al.* 2015, Zhong y Ye 2015).

## **Genes reguladores y niveles de expresión**

En años recientes se han identificado y analizado diversas clases de genes involucrados con las vías biosintéticas de la pared celular secundaria en géneros como *Arabidopsis* (Mele *et al.* 2003, Taylor-Teeple *et al.* 2015), *Eucalyptus* (Goicoechea *et al.* 2005), *Pinus* (Patzlaff *et al.* 2003) y *Populus* (Groover *et al.* 2006, Coleman *et al.* 2008, Du *et al.* 2009, Xu *et al.* 2013, Ye y Zhong 2015), de los cuales, la sobreexpresión de algunos (p. ej. *PtMYB4* en *Pinus*) resulta en deposición ectópica de lignina dentro del xilema por activación de las vías biosintéticas de sus monolignoles. Asimismo, la sobre expresión de genes relacionados con la síntesis de la lignina puede resultar en un incremento del grosor de la pared celular secundaria de los elementos del xilema (p. ej. *EgMYB2* en *Eucalyptus*). Por otro lado, el decremento en los niveles de expresión génica puede dar como resultado cambios en las proporciones de las subunidades de la lignina como se observó en mutantes *ref8* de *Arabidopsis* donde la actividad de la p-cumarato 3-hidroxilasa [C3H] se redujo, causando cambios en la biosíntesis y la deposición de la lignina (Franke *et al.* 2002). En *Medicago* se ha encontrado que la deficiencia en la actividad de C3'H afecta el contenido de lignina e

incrementa la proporción de la unidad *p*-hidroxifenilo, cuando normalmente las subunidades guayacilo [G] y siringilo [S] son dominantes (Ralph *et al.* 2006).

### **El papel de la lignina y sus subunidades**

El análisis de los componentes de la lignina en la madera y hojas de las plantas leñosas había sido utilizado anteriormente con fines sistemáticos a raíz de la prueba descrita por Mäule en 1900, en la cual, la gran mayoría de angiospermas mostraba una reacción positiva (rojo) y negativa en las gimnospermas (café). Trabajos posteriores revelaron que las pruebas positivas se deben a la presencia de la unidad Siringilo de la lignina (Creighton *et al.* 1944). Los estudios de oxidación alcalina revelaron que al descomponer la lignina de algunas monocotiledóneas se obtuvo el *p*-hidroxibenzaldehído además de vainillina y siringaldehído como componentes de la pared celular (Creighton y Hibbert 1994). Después se generalizó su presencia en las monocotiledóneas y su ausencia en dicotiledóneas (Towers y Gibbs 1953). Asimismo, un estudio de los ácidos fenólicos en angiospermas reveló que el ácido sinápico y el ácido ferúlico están ampliamente distribuidos en las monocotiledóneas y que el ácido *p*-cumárico está presente tanto en monocotiledóneas como en dicotiledóneas.

En la actualidad se sabe que la expresión de ciertos genes como *ARBORKNOX1* [*ARK1*] y *ARBORKNOX2* [*ARK2*] alteran la proporción de las subunidades de la lignina (*p*-hidroxifenilo [H], guayacilo [G], o siringilo [S]) y sus vías biosintéticas, modificando la composición de la pared celular secundaria y la diferenciación celular en la zona cambial (Groover *et al.* 2006, Ralph *et al.* 2006, Du *et al.* 2009, Du y Groover 2010, Růžička *et al.* 2015, Zhong y Ye 2015, Taylor-Teeple *et al.* 2015). Por ello, algunos autores suponen que las variantes cambiales presentes en angiospermas tienen que ver con los niveles de expresión génica y la regulación de la diferenciación celular (Mauseth y Plemons 1995, Carlquist 2009, Spicer y Groover 2009, Du y Groover 2010, Hirakawa *et al.* 2010). En Cactaceae se ha estudiado la madera y solo se ha supuesto el papel de la expresión génica como responsable de las variantes cambiales (Mauseth y Plemons 1995, Mauseth 2004), por lo que es necesario estudiar los genes que se expresan durante la diferenciación celular a nivel de cambium vascular y su influencia en el desarrollo de los elementos de vaso y la madera en Cactaceae.

## **Variantes cambiales en Cactaceae y su relación con el grado de lignificación en el xilema secundario**

Se han identificado dos tipos de madera en Cactaceae: fibrosa y no fibrosa (Terrazas y Mauseth 2002), así como polimorfa en la subfamilia Cactoideae (Mauseth y Plemons 1995). En la tribu Cacteeae se reconoce el predominio de maderas con traqueidas de banda ancha (TBAs), así como fibrosas y polimorfas (Gibson 1973, Mauseth y Plemons 1995, Reyes-Rivera 2010, Vázquez-Sánchez y Terrazas 2011). En estudios ontogenéticos recientes dentro de la tribu Cacteeae se encontró que el grado de lignificación en la pared de los elementos de vaso y la madera aumenta con relación al tamaño. Las especies con tallos deprimidos tienen los elementos de vaso muy similares a los del xilema primario (protoxilema). En contraste, las especies con tallas grandes tienen elementos de vaso con pared secundaria mayormente lignificada y punteaduras escalariformes, las TBA son escasas y similares a las del resto de las especies, en tanto que la madera presenta fibras que son proporcionalmente mucho más numerosas que el resto de los elementos traqueales y algunas especies presentan engrosamientos helicoidales (Fig. 1; Reyes-Rivera 2010). Esos cambios en la actividad del cambium vascular y sus derivados sugieren fuertemente que existe una relación entre el grado de lignificación del xilema secundario y el tamaño de las especies, asimismo, se sugiere que la acción de diferentes genes podría influir en el grado de lignificación de los elementos traqueales, el patrón de deposición de la pared secundaria y por lo tanto en la arquitectura de la madera, provocando una gradación en tamaño y forma a lo largo de las especies de Cactaceae.

# **Capítulo 2**

## **Revisión de la morfo-anatomía del tallo en Cactaceae**

## GENERALIDADES DE LOS CACTUS

La familia Cactaceae está compuesta mayormente por plantas suculentas, con tallos fotosintéticos (excepto algunas especies de *Pereskia*; Edwards y Donoghue 2006, Mauseth 2006a, Ogburn y Edwards 2009), especializados para almacenar agua como adaptación a los ambientes xéricos; en algunas especies cerca del 90% del peso fresco puede ser agua (Gibson y Nobel 1986, Anderson 2001).

Aunque sus especies son diversas estructural y ecológicamente, éstas son fáciles de entender ya que todas tienen los mismos tejidos y órganos de cualquier dicotiledónea. Ninguna difiere en su organización de *Arabidopsis* o de otras plantas modelo (Mauseth 2006a) y cuentan con la misma organización del plan corporal, pero con hojas reducidas y mayor cantidad de córtex (Terrazas y Mauseth 2002, Mauseth 2006a).

El vástago consta de nudos, entrenudos y yemas. Las areolas son un rasgo único de Cactaceae y algunos autores las han considerado como homólogas a las yemas axilares de otras dicotiledóneas. Las areolas producen las espinas, flores, nuevos tallos, hojas, glóquidas, cerdas, tricomas, y a veces raíces adventicias (Bravo-Hollis 1978, Anderson 2001, Mauseth 2006a). Otros autores consideran las areolas como tallos cortos por su alto grado de compactación, mientras que el cuerpo de la cactácea correspondería a un tallo largo desde el cual se desarrollan otros tallos cortos y hojas altamente reducidas en la mayoría de las especies (Terrazas y Mauseth 2002). En la subfamilia Cactoideae no existen especies con hojas visibles, sin embargo, éstas desarrollan hojas microscópicas vestigiales (Anderson 2001). Por otro lado, sólo las especies de *Pereskia*, *Pereskopsis* y *Quiabentia* (pertenecientes a las subfamilias más ancestrales) desarrollan hojas con limbo amplio y carnoso capaz de fotosintetizar (Bravo-Hollis 1978, Mauseth y Landrum 1997).

Las espinas son una característica distintiva en la mayoría de las Cactaceae. Sin embargo, están completamente ausentes en *Blossfeldia* y algunas especies de los géneros epífitos como *Epiphyllum*, *Lepismium* y *Rhipsalis* (Mauseth 2006a). Un tipo inusual de espina denominado glóquida está presente en todos los miembros de Opuntioideae, excepto en *Puna clavarioides* (Kiesling 1984, Mauseth 2006a). Histológicamente, las espinas están compuestas de tres zonas: un meristemo basal, una zona de elongación/diferenciación y una zona apical con fibras lignificadas (Mauseth 1977). Las espinas maduras solo tienen fibras

libriiformes con lumen estrecho altamente alineadas (Huang *et al.* 2014). La epidermis es esclerificada y carece de tejido vascular (Mauseth 2006a).

Los tubérculos se desarrollan a partir de la yema cotiledonar apical, por hipertrofia de la base de la hoja; se proyectan en forma cónica y se ordenan en series espiraladas acrópetas siguiendo la sucesión de Fibonacci [3, 5, 8, 13...] (Bravo-Hollis 1978). Los tubérculos son asociados con las formas de crecimiento pequeñas; están presentes cuando el tallo es suficientemente corto y amplio para ser soportado únicamente por presión de turgencia en lugar de ser soportado por una madera fibrosa (Mauseth 2006a). Las costillas son características de los tallos columnares; en algunas especies las plántulas son tuberculadas y posteriormente los tubérculos se alinean para formar costillas verticales (P. ej. *Carnegiea gigantea*, *Astrophytum myriostigma*, *Echinocactus grusonii*, *Ferocactus macrodiscus* y *Stenocereus queretaroensis*; Anderson 2001; Loza-Cornejo *et al.* 2003), por ello se asume que las costillas se desarrollan de esa forma en la mayoría de las especies con costillas (Bravo-Hollis 1978).

Las implicaciones biológicas de los tubérculos y de las costillas están relacionadas con la capacidad de expansión-contracción que le confieren a los tallos a medida que ganan o pierden agua (Buxbaum 1950, Anderson 2001, Mauseth 2000; 2006a, Vázquez-Sánchez 2012). Además, las especies de mayor talla frecuentemente desarrollan una gruesa hipodermis y peridermis que siguen el patrón de los pliegues de las costillas y confieren soporte y flexibilidad a la planta, como ocurre en especies columnares (*ver más abajo*). La variación en el patrón de las características del tallo, tales como los tubérculos, costillas, hojas, areolas y espinas, es de importancia taxonómica (Anderson 2001).

## **MORFO-ANATOMÍA DEL TALLO**

El tallo de las Cactaceae, al igual que otras dicotiledóneas, está compuesto de tejidos primarios como la epidermis, el córtex, el sistema vascular (xilema y floema primarios) y la médula. Los tejidos secundarios como el xilema y el floema secundarios, y la corteza, son originados a partir de meristemas laterales: el cámbium vascular es derivado del procámbium, en tanto que el cámbium de corcho (felógeno) se deriva de las células epidérmicas o de las células corticales más externas (Bailey and Srivastava 1962, Mauseth 1995, Mauseth y Plemons 1995, Mauseth y Landrum 1997, Anderson 2001, Terrazas y



Arias 2002, Terrazas y Mauseth 2002, Loza-Cornejo y Terrazas 2003, Terrazas *et al.* 2005, Mauseth 2005; 2006a; 2006b).

La epidermis consta de una capa de células con paredes delgadas y cutinizadas en la parte exterior, el grosor de la cutícula varia, en la mayoría es relativamente delgada (1-10  $\mu\text{m}$ ). Sin embargo, en especies como *Ariocarpus fissuratus* y varias del genero *Pachycereus* es notablemente gruesa (Loza-Cornejo y Terrazas 2003). Los estomas son generalmente paracíticos y a menudo hundidos (Eggli 1984, Anderson 2001, Loza-Cornejo y Terrazas 2003, Mauseth 2005; 2006a). Las células epidérmicas dan origen a un felógeno en la base de los tallos viejos, el cual producirá células de corcho con paredes delgadas o gruesas. Esto es más evidente en algunas especies con tallos grandes (Mauseth 1996, Mauseth *et al.* 1998).

La hipodermis se origina diferencialmente de la epidermis y se extiende en posición subepidérmica. Puede consistir de varias capas de células rígidas con paredes celulares engrosadas y lumen extremadamente estrecho, a menudo se pueden observar cristales de oxalato de calcio dentro de las células hipodérmicas (Gibson y Horak 1978, Anderson 2001, Terrazas Salgado y Mauseth 2002, Loza-Cornejo y Terrazas 2003, Terrazas y Arias 2003, Mauseth 2006a). La hipodermis es común en las especies suculentas de talla mediana y grande. Está presente en especies de Cactoideae, aunque ha sido perdida secundariamente en varios taxones como *Blossfeldia* (raramente puede observarse en forma de unas pocas capas de células con paredes delgadas) y en especies de *Astrophytum* y *Echinocereus* (Barthlott y Porembski 1996, Herrera-Cárdenas *et al.* 2000, Terrazas y Arias 2002, Loza-Cornejo y Terrazas 2003, Mauseth 2006a). Además, está ausente en los tallos de *Maihuenia* y *Pereskia* (Mauseth 2006a). En otros taxones de Cactoideae puede desarrollarse una peridermis a partir del córtex más externo y eventualmente la hipodermis desaparece (Terrazas y Arias 2002). La función que cumple la hipodermis está relacionada con la protección mecánica que le confiere al tallo, no obstante, en especies columnares el grosor y rigidez de la hipodermis, junto con los pliegues de las costillas, proporcionan estabilidad, flexibilidad y resistencia mecánica al tallo como en *Echinocactus platyacanthus*, *Ferocactus diguetii* y *Neobuxbaumia tetetzo* (Cornejo y Simpson 1997, Bernal-Salazar y Terrazas 2005, Mauseth 2006a, Reyes-Rivera 2010).

## CÓRTEX

El córtex es el tejido más abundante en el tallo de las Cactaceae (excepto en Pereskioideae). En las especies que desarrollan haces corticales (*ver más abajo*), el sistema de conducción vasculariza la mayor parte del córtex (Mauseth 2006a). Dada la adaptación de estas plantas a los ambientes xéricos el córtex cumple con dos funciones principales: 1) almacenamiento de agua durante largos periodos de sequía (Sajeva y Mauseth 1991, Mauseth 1995), 2) fotosíntesis y fijación de dióxido de carbono por medio del parénquima fotosintético (Anderson 2001, Mauseth 2006a). Además, algunas especies de Cactoideae con tallos delgados pueden desarrollar córtex de reacción, un tejido que les permite erguir la región apical de los tallos generalmente postrados (Mauseth 2006a).

El córtex consiste de tres regiones: 1) el parénquima fotosintético (clorénquima), situado en la parte más externa del córtex, se distribuye en forma de empalizada y está compuesto de células vivas, muchas de ellas lignificadas en especies de *Eulychnia*, *Pachycereus* y *Stetsonia* (Gibson y Horak 1978, Mauseth 1995, Nyffeler *et al.* 1997, Terrazas y Arias 2003) y comúnmente presenta células de mucilago y drusas (Terrazas y Mauseth 2002, Mauseth 2006a). 2) El córtex escasamente clorofílico, se encuentra en la región intermedia de las costillas y los tubérculos, caracterizado por células grandes, isodiamétricas, no alineadas, con cloroplastos dispersos. Ésta región almacena agua adyacente al clorénquima, sus células pueden expandirse y contraerse conforme el tallo absorbe o pierde agua, consecuentemente la turgencia de los tubérculos y las costillas depende de la cantidad de agua almacenada en esta región (Mauseth 2006a). 3) El córtex interno no clorofílico, situado entre el estele y la base de los tubérculos, se caracteriza por tener células parenquimatosas grandes, con paredes celulares lisas (Mauseth 1995, Anderson 2001). En las especies con tallos voluminosos esta región almacena la mayor cantidad de agua (Mauseth 2000). Algunas especies de *Mammillaria* presentan laticíferos en el córtex (Mauseth 1978, Wittier y Mauseth 1984). Las células de mucilago son abundantes en las subfamilias Cactoideae y Opuntioideae (Terrazas y Mauseth 2002, Mauseth 2006b), en esta última se pueden observar también células con cristales (Mauseth 1980).

En el córtex interno de varias especies se pueden observar zonas especializadas, con células parenquimatosas de paredes celulares flexibles muy onduladas, denominado

parénquima colapsable (Mauseth 1995). Este tejido se localiza en la región media del córtex interno y es un tejido que amortigua la pérdida de agua, abasteciendo con el agua desplazada de su interior a las células corticales adyacentes que tienen paredes celulares rígidas. Evitar la excesiva deshidratación prevendría la eventual producción de ácido abscísico que causaría la inactividad metabólica de las células corticales en general, de una forma similar a la quiescencia de los tejidos foliares con extrema desecación (Salisbury y Ross 1992, Mauseth 1995). Las células del parénquima colapsable inician su diferenciación en la parte superior del tallo, en regiones relativamente jóvenes (menos de un año), aun cuando el tejido es lo suficientemente turgente para desarrollarse (Mauseth 1995). El parénquima colapsable no está presente en la médula, nunca hace contacto directo con los fascículos del estele, ni con los radios medulares, sin embargo, los haces corticales pueden extenderse en esta región de una forma sinuosa (Mauseth 1995). Este tejido está presente en géneros cercanamente relacionados como *Bolivicereus*, *Borzicactus*, *Cleistocactus*, *Espositoa*, *Gymnocalycium*, *Haageocereus* y *Loxanthocereus*. No obstante, también está presente en el género *Jasminocereus*, no relacionado a los anteriores, y está ausente en Opuntioideae (Mauseth 1995, Mauseth 2006a).

De manera general, se puede decir que el córtex en la subfamilia Pereskioideae es el más simple dentro de la familia Cactaceae. Está formado por una delgada capa (0.5-1 mm) de grosor uniforme, con células isodiamétricas predominantemente de clorénquima, no organizadas en empalizada, con células de mucílago en todas las especies; las esclereidas pueden o no estar presentes. Los haces corticales y el parénquima colapsable están ausentes (Mauseth y Landrum 1997). Por el contrario, el córtex de Cactoideae es el más especializado, los haces corticales están siempre presentes y la capa externa es fotosintética, dispuesta en empalizada con grandes espacios apoplásticos, cámaras subestomáticas y alto contenido de cloroplastos (Sajeva y Mauseth 1991); el parénquima colapsable, los laticíferos y las células con mucílago y/o cristales son comunes (Mauseth y Landrum 1997).

### **Haces corticales**

Los haces corticales son colaterales, poseen xilema y floema tanto primario como secundario (*ver sección Sistema vascular*); vascularizan el córtex cambiando de dirección frecuentemente, sin extenderse hasta la hipodermis (Terrazas y Mauseth 2002, Mauseth

2006a), muchos de ellos se dirigen hacia las areolas. Los haces corticales parecen estar relacionados con tres procesos en particular: 1) el transporte de fotosintatos desde el córtex fotosintético hacia el estele, 2) el transporte de azúcares a través de células almacenadoras de agua en el córtex (interno) no fotosintético, y 3) el transporte de agua a través del córtex (Terrazas y Mauseth 2002). Mediante este sistema de haces corticales el transporte de grandes cantidades de agua puede ser rápido y alcanzar las regiones más externas del tallo, conservando el clorénquima, la hipodermis y la epidermis bien hidratados sin importar a que distancia se encuentren del estele o cilindro vascular (Terrazas y Mauseth 2002, Mauseth 2006a). Ya que la tasa de acumulación del floema secundario es mayor a la del xilema secundario, que puede o no incrementarse con la edad (Mauseth y Sajeve 1992), se ha supuesto que la continua producción de floema agiliza la translocación de azúcares, la cual no sería lo suficientemente rápida si se realizara sólo por difusión a través del córtex (Terrazas y Mauseth 2002).

Los haces corticales están presentes en toda la subfamilia Cactoideae (excepto en *Blossfeldia liliputana*) y ausentes en Maihuenioideae, Opuntioideae y Pereskioideae (Terrazas y Mauseth 2002, Terrazas y Arias 2003, Mauseth 2006a). Su complejidad varía de acuerdo a la especie. Por ejemplo, *Carnegiea gigantea* desarrolla haces con vaina (Terrazas y Arias 2003), mientras que otras desarrollan fibras de floema adyacentes a las células conductoras del floema, como en *Acanthocereus*, *Bergerocactus*, *Calymanthium*, *Cleistocactus*, *Corryocactus*, *Epiphyllum*, *Espostoa*, *Haagepocereus*, *Lepismium*, *Leptocereus* y *Selenicereus* (Gibson y Horak 1978, Mauseth y Saveja 1992, Mauseth *et al.* 1998, Terrazas y Loza-Cornejo 2002, Terrazas y Mauseth 2002, Terrazas y Arias 2003, Mauseth 2006a). Sólo en *Cereus mortensenii* se han reportado fibras xilemáticas (Mauseth y Sajeve 1992).

## **MÉDULA**

La médula consiste en su totalidad de células de parénquima. No obstante, la mayoría de las especies de Opuntioideae también desarrollan traqueidas de banda ancha (TBAs) dentro de la médula y en los radios medulares (zona perimedular *sensu* Mauseth (2005)).

Generalmente la médula es rodeada por los fascículos del estele y no es voluminosa comparada con el córtex del mismo tallo (Mauseth 2000, Mauseth 2006a). Sin embargo,

muchas Cactaceae tienen una médula extremadamente amplia (75 mm de diámetro) que puede constituir la mitad del volumen del tallo, quedando viva lo mismo que el individuo (Bailey 1962, Mauseth 1993). La ventaja de conservar la médula y el córtex amplios es que en los periodos de sequía estos tejidos funcionarían como amortiguadores (Arias y Terrazas 2001). Aunque hay algunas excepciones, la presencia de una médula amplia se ha correlacionado con el desarrollo de haces medulares (Mauseth 1993). Por ello, se ha propuesto que probablemente el desarrollo de una médula amplia y un sistema de haces medulares sea una adaptación evolutiva al estrés hídrico (Mauseth 1993, Arias y Terrazas 2001).

### **Haces medulares**

Los haces medulares pueden tener xilema y floema primario; los elementos traqueales en estos haces a menudo son más angostos que los elementos del estele; sin embargo, en *Neoporteria coimasensis* pueden ser igual de anchos que aquellos de los fascículos vasculares (Mauseth 1993). La densidad de haces medulares es alta en las regiones cercanas al ápice del tallo pero muy baja en el tronco de los individuos más viejos, por ello se ha propuesto que se originan en la región cercana al meristemo apical (Mauseth 1993).

En todas las especies con haces medulares, éstos están interconectados con los fascículos del estele y en muchos casos atraviesan el córtex y se interconectan también con los haces corticales (Mauseth 1993). De esta forma el sistema de haces medulares permitiría la translocación eficiente de agua y almidones a través de una médula usualmente amplia. De otro modo, el transporte de estos compuestos, desde un área donde son abundantes hasta otra donde no lo son, sería igualmente necesario pero más lento si se realizara sólo a través de las células parenquimatosas de la médula (Terrazas y Mauseth 2002).

Los haces medulares están ausentes en las subfamilias Maihuenioideae, Opuntioideae y Pereskioideae (Boke 1954, Bailey 1962, 1963); están presentes en muchas especies de Cactoideae, pero se han perdido en varios miembros de Cactaceae y algunos de Echinocereae (Pachycereae) y Notocactaceae (Gibson y Horak 1978, Mauseth 1993, Loza-Cornejo y Terrazas 1996, Mauseth y Landrum 1997, Mauseth 2006a, Terrazas y Mauseth 2002). Aunque parecen estar ancestralmente ausentes, se ha propuesto que aparecieron tempranamente en la evolución de Cactoideae (Terrazas y Mauseth 2002).

## **SISTEMA VASCULAR**

El sistema vascular comprende los tejidos especializados en el movimiento de sustancias esenciales en el interior del tallo. Dada la succulencia de los tallos en Cactaceae, éste es uno de los sistemas más especializados. Ya que comprende no sólo los haces vasculares del estele, sino también los haces medulares y corticales descritos anteriormente, éste sistema ha sido clave para la evolución de formas en los miembros de esta familia (*ver Capítulo 5*) (Bailey 1964, Gibson 1973, Altesor *et al.* 1994, Mauseth y Plemonts 1995, Arias y Terrazas 2001, Terrazas y Mauseth 2002, Terrazas y Arias 2003, Terrazas y Loza-Cornejo 2003, Mauseth 2004, Bernal-Salazar y Terrazas 2005, Carlquist 2009, Reyes-Rivera 2010). Sus dos componentes son: el xilema, especializado en la conducción del agua y nutrimentos disueltos, y el floema, responsable de la translocación de fotosintatos y otras moléculas orgánicas (Terrazas y Mauseth 2002). Durante las etapas iniciales de las plantas se desarrollan el xilema y floema primarios a partir del procámbium. Con la maduración subsecuente de los individuos y el aumento de tamaño se desarrollan xilema y floema secundarios, derivados del cámbium vascular (Mauseth y Plemons 1995, Terrazas y Mauseth 2002, Mauseth 2004).

## **TIPOS CELULARES DEL SISTEMA VASCULAR EN CACTACEAE**

### **Elementos de vaso**

En general, dentro de Cactaceae los elementos de vaso en raíces y tallo son altamente especializados tanto en el xilema primario como en el secundario (Bailey y Srivastava 1962, Bailey 1964, Gibson 1973, Mauseth y Landrum 1997, Anderson 2001, Terrazas y Mauseth 2002, Terrazas y Arias 2003, Terrazas y Loza-Cornejo 2003, Bernal-Salazar y Terrazas 2005, Mauseth 2006a; 2006b, Reyes-Rivera 2010). Los elementos de vaso del xilema primario son los típicos del proto y metaxilema, generalmente son angostos: los primeros poseen paredes celulares primarias delgadas y paredes celulares secundarias con engrosamientos anulares o helicoidales. En los del metaxilema, la pared secundaria es más desarrollada y se pueden encontrar punteaduras escalariformes o pseudoescalariformes (Bailey y Srivastava 1962, Terrazas y Mauseth 2002, Mauseth 2006a).

En todas las especies las placas de perforación son simples (**Fig. 1**), un rasgo altamente especializado que les permite conducir el agua con mayor rapidez (Nobel 1999,

Terrazas y Mauseth 2002). Sin embargo, en especies de *Harrisia* ocasionalmente se encuentran placas de perforación múltiples en el xilema secundario (Metcalf y Chalk 1950). Los elementos de vaso de varias especies pueden tener una tercera placa de perforación simple y en posición lateral (Gibson 1973), como aquellas reportadas en algunos miembros de la tribu Cactaceae donde, además, otros forman vasos circulares (Fig. 1C, F, G; Reyes-Rivera 2010).

En el xilema secundario, los vasos pueden ser solitarios, como en *Pachycereus pecten-aboriginum* donde casi el 50 % lo son (Arias y Terrazas 2001), o en pequeños grupos de 2 a 10 vasos como en la mayoría de las especies (Metcalf y Chalk 1950, Bailey y Srivastava 1962, Gibson 1973, Terrazas y Mauseth 2002; Mauseth 2006a).

Frecuentemente los vasos son acompañados de parénquima paratraqueal escaso que los protege de la cavitación, pero en especies de Opuntioideae como *Cylindropuntia ganderi*, *C. imbricata*, *C. ramosissima* los vasos pueden estar rodeados de numerosos vasos angostos más que de parénquima paratraqueal (Mauseth 2006b). Aunque llegan a encontrarse tílides, éstas generalmente no tienen significancia taxonómica (Gibson 1973).

Comparados con los del resto de las dicotiledóneas, los elementos de vaso en Cactaceae son usualmente angostos, con diámetros oscilando entre 10 - 60  $\mu\text{m}$  (Terrazas y Mauseth 2002). Los elementos de vaso más anchos se observan en las especies con tallos altos (los más anchos son aquellos de *Pereskia*), mientras que los más angostos están presentes en el género epífita *Rhipsalis* (Bailey y Srivastava 1962, Gibson 1973, Gibson y Nobel 1986, Terrazas y Mauseth 2002). En los elementos de vaso más anchos la inclinación de los extremos terminales es casi transversal. Por el contrario, en los elementos más angostos el ángulo de inclinación es más prolongado (Bailey y Srivastava 1962, Gibson 1973).

La longitud de los elementos de vaso es variable y está correlacionada con la altura de las especies (p. ej. en las especies de talla pequeña tiende a reducirse. Ver sección *Correlaciones*), pero, en general, se pueden considerar como elementos cortos en comparación con aquellos de otras dicotiledóneas (Terrazas y Mauseth 2002).

De acuerdo con lo señalado por Gibson (1973) las Cactaceae probablemente tienen en el xilema secundario el mayor rango de tipos de punteaduras de cualquier familia de dicotiledóneas. En esta familia las punteaduras intervasculares pueden ser rebordeadas o no

rebordeadas, alternas, poligonales, opuestas, escalariformes o pseudoescalariformes (Figs. 1, 2) (Bailey y Srivastava 1962, Gibson 1973, Arias y Terrazas 2001, Terrazas y Loza-Cornejo 2003, Romero–Godofredo y Melo-de-Pinna 2008, Reyes-Rivera 2010). Además, en *E. platyacanthus* también se observan elementos de vaso con punteaduras alargadas (similares al tipo escalariforme) en algunas zonas del elemento de vaso, pero en otras la inclinación de la punteadura es perpendicular (Fig. 1E). Por otro lado, en especies de *Pereskia* las punteaduras vaso-parénquima tienen una tendencia a alargarse horizontalmente y reducir o perder los rebordes (Fig. 2F; Bailey y Srivastava 1962). Frecuentemente en los géneros de hábito arbóreo se ha encontrado que las punteaduras vaso-parénquima tienden a ser grandes y simples, tal como las punteaduras no bordeadas entre células adyacentes de parénquima; se ha propuesto que este arreglo permite mejorar el contacto de los vasos con las células adyacentes de parénquima axial o radial (Bailey y Srivastava 1962, Gibson 1973, Carlquist 2001, Terrazas y Loza-Cornejo 2003).

En las especies con abundancia de TBAs en el xilema secundario, como aquellas de la tribu Cacteeae, los espacios en la pared celular secundaria de los elementos de vaso, los cuales corresponderían a las punteaduras, están delimitados únicamente por los engrosamientos helicoidales o anulares, consecuentemente la región comprendida por la membrana de la punteadura es muy amplia (Fig. 1A). Recientemente, Grego-Valencia *et al.* (2015) mostraron que en los elementos de vaso de especies con madera de TBAs la membrana de la punteadura es no porosa, y que la pared celular secundaria presenta forma anular, o bien, forma de hélice (refiriéndose al patrón anular o helicoidal, respectivamente) tanto en las TBAs como los elementos de vaso. No obstante, otras especies con predominancia de TBAs con engrosamientos helicoidales, como aquellas de *C. clavata*, también desarrollan elementos de vaso con engrosamientos doble-helicoidales, y otros menos abundantes con punteaduras pseudoescalariformes (Fig. 1B; Reyes-Rivera 2010).

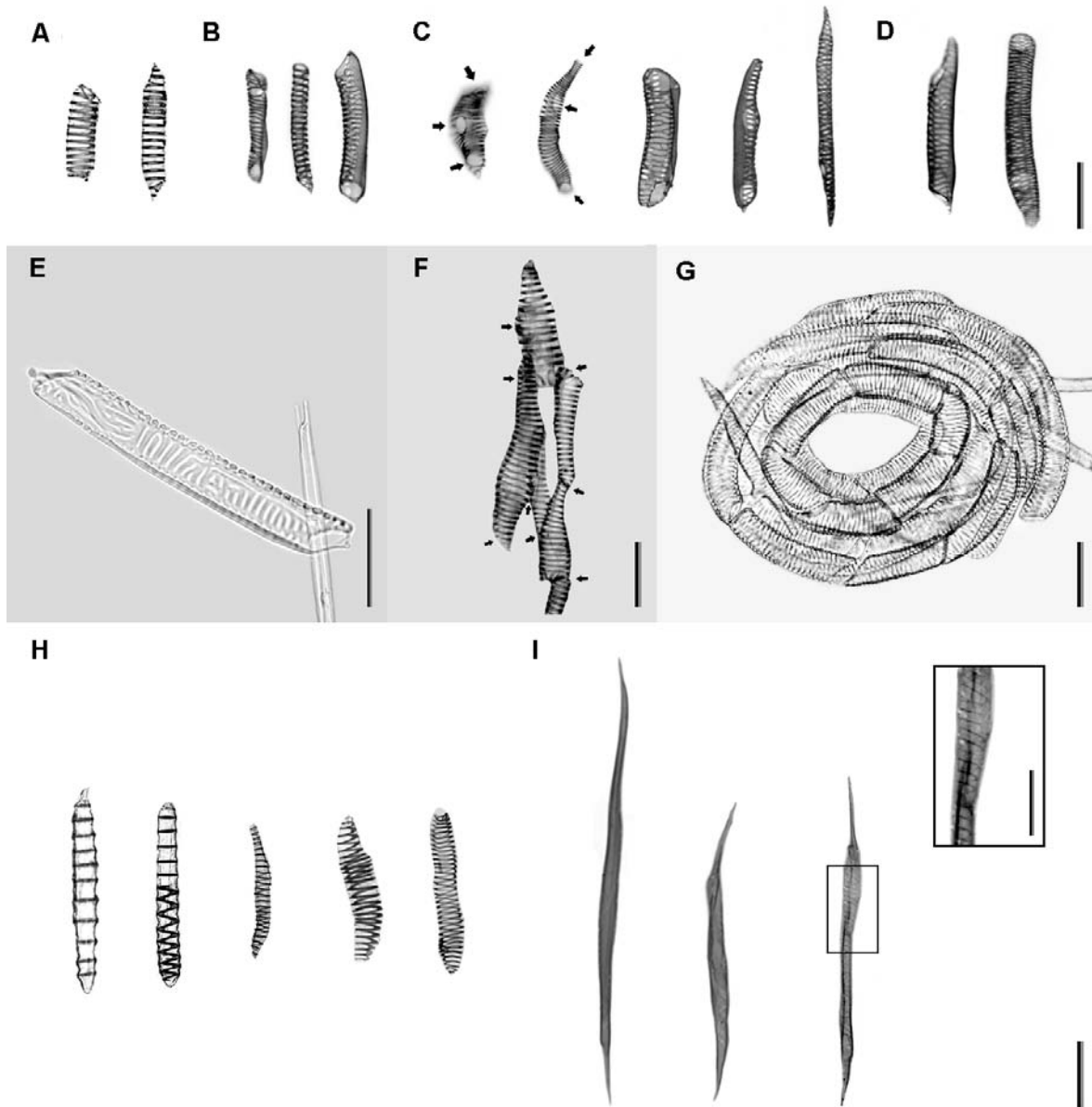
Aunque los elementos de vaso con paredes celulares secundarias muy desarrolladas, con punteaduras alternas, escalariformes y pseudoescalariformes son los más comunes dentro del xilema secundario de Cactaceae, en las especies pequeñas predominan los elementos parecidos a los del xilema primario (Fig. 1A, B), con paredes celulares secundarias poco desarrolladas, en forma de engrosamientos con patrón ya sea helicoidal, anular, helicoidal-anular o doble-helicoidal (Bailey y Srivastava 1962, Bailey 1964, Gibson



1973, Gibson y Horak 1978, Terrazas y Mauseth 2002, Mauseth 2004; 2006, Reyes-Rivera 2010, Vázquez-Sánchez y Terrazas 2011). La presencia de elementos de vaso con engrosamientos helicoidales o anulares en la pared celular secundaria es generalmente inusual en el xilema secundario de las dicotiledóneas (Gibson 1973). Sin embargo, dentro de Cactaceae estas características están correlacionadas con las formas de crecimiento pequeñas y con los mecanismos de evolución de las especies (*ver sección Correlaciones, y Capítulo 5*).

### **Traqueidas de Banda Ancha (TBAs)**

Las TBAs son células especializadas no perforadas, con paredes celulares primarias delgadas no lignificadas y paredes celulares secundarias lignificadas desarrolladas como engrosamientos anulares, helicoidales, anulares-helicoidales o doble-helicoidales (comúnmente denominadas bandas; [Fig. 1](#)), que se proyectan profundamente hacia el interior del lumen celular (Preston 1901, Darbishire 1904, Gibson 1973, Mauseth 1993, Mauseth *et al.* 1995, Mauseth y Landrum 1997, Landrum 2001, Terrazas y Mauseth 2002, Mauseth 2004, Landrum 2006, Mauseth 2006a, Romero–Godofredo y Melo-de-Pinna 2008, Reyes-Rivera 2010; Grego-Valencia *et al.* 2015). A veces se puede confundir a las TBAs con los elementos de vaso con engrosamientos helicoidales o anulares. Distinguir entre unas y otros puede ser difícil en vista longitudinal, a menos que la placa de perforación de los elementos de vaso sea evidente (Gibson 1973). Dado que las TBAs son células no perforadas, su función principal es la conducción de agua por difusión (Terrazas y Mauseth 2002). A diferencia de las células de parénquima, los engrosamientos en la pared celular secundaria de las TBAs mantienen la integridad celular y protegen a la célula de la cavitación (Carlquist 1975, Landrum 2006, Landrum 2008). La cavitación o el colapso de estas células parecen virtualmente imposibles ya que la amplitud de los reforzamientos secundarios (desde el borde externo) es mayor a la amplitud de la pared primaria (distancia entre anillo y anillo), lo que impide que el lumen celular se obstruya, y al mismo tiempo confiere gran flexibilidad a la célula durante la deshidratación-rehidratación. Además, reduce considerablemente el riesgo de fractura por cizallamiento, tal como ha sido propuesto anteriormente por Carlquist (1975) para los elementos de vaso con engrosamientos helicoidales o anulares.



**Figura 1.** Morfología de los tipos celulares en la madera de las especies de la tribu Cacteeae. A-D) Elementos de vaso con diferentes grados de desarrollo de la pared celular secundaria. A y B) elementos de vaso en *A. retusus* y *C. clavata* de talla pequeña con madera predominantemente de TBAs y tallos globosos deprimidos o cilíndricos. C y D) Elementos de vaso en especies con tallos columnares y madera dimorfa: *E. platyacanthus* y *F. pilosus* respectivamente. E-G) Elemento de vaso con punteaduras alargadas perpendiculares y vasos circulares en *E. platyacanthus*. H) TBAs con diferentes tipos de engrosamientos secundarios. I) Fibras; aquellas con engrosamientos helicoidales están presentes en *E. platyacanthus*. Las flechas indican las placas de perforación y las uniones entre elementos de vaso. Escalas= 100  $\mu$ m. Escala aumento en fibra= 50  $\mu$ m. Preparaciones y fotografías por Jorge Reyes.

Las plantas donde predominan las TBAs en el xilema secundario se sostienen principalmente por la presión de turgencia más que por algún tejido de sostén (Mauseth 2006a). Durante los periodos de estrés hídrico prolongados la reducción del volumen de los individuos puede ser muy grande, por lo que un xilema secundario con abundantes TBAs (células no perforadas) es más resistente a la pérdida de agua comparado con un xilema secundario donde predominan las fibras y los elementos de vaso (Mauseth 1995, Romero–Godofredo y Melo-de-Pinna 2008). Al mismo tiempo, este arreglo confiere mayor flexibilidad en sentido vertical y permite la contracción de los individuos durante los periodos de sequía y consecuentemente los tallos permanecen casi siempre al nivel del suelo; de esta manera evitan alcanzar temperaturas letales al ser sombreadas por las rocas circundantes, como se propuso para *Ariocarpus fissuratus* (Garrett *et al.* 2010).

Las TBAs están presentes en tres familias de Cariofilales: Aizoaceae (Ruschioideae), Portulacaceae (*Anacampseros*) y Cactaceae (Preston 1901, Gibson 1973, Conde 1975, Terrazas y Mauseth 2002, Terrazas y Arias 2003, Mauseth 2004, 2006a, b, Landrum 2006, Landrum 2008, Romero–Godofredo y Melo-de-Pinna 2008, Reyes-Rivera 2010). Sin embargo, la presencia de TBAs en el xilema secundario de Cactaceae parece ser un rasgo único dentro de las dicotiledóneas (*ver Capítulo 5*), relacionado con la adaptación al estrés hídrico (Carlquist 1961, 1975, Gibson 1973, Mauseth 2004, Landrum 2006; 2008, Romero–Godofredo y Melo-de-Pinna 2008).

## **Fibras**

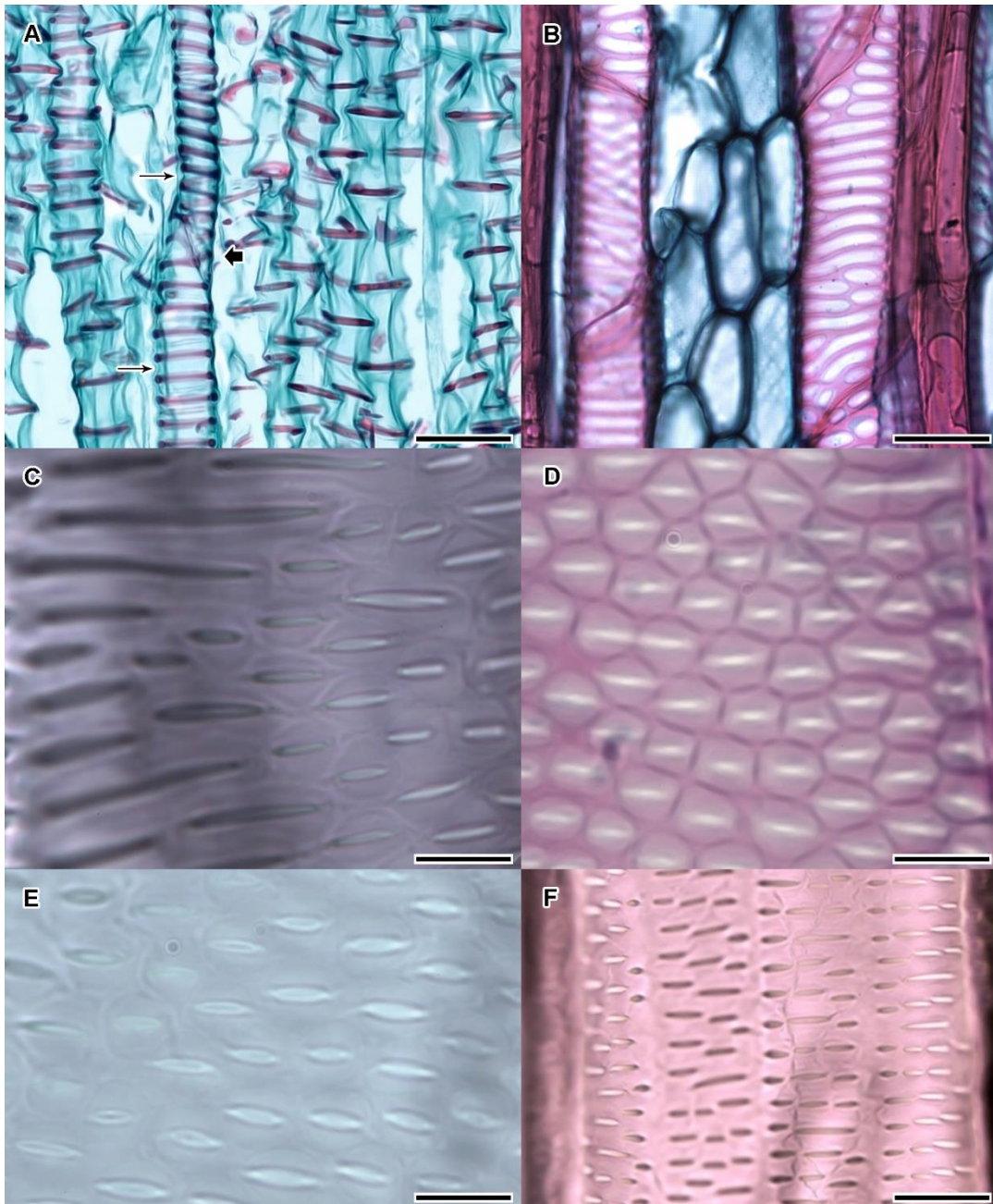
Las fibras pueden ser libriformes con punteaduras simples y paredes relativamente delgadas; septadas, con uno o más septos (un núcleo por septo), o no septadas y vivas (Bailey y Srivastava 1962, Bailey 1964, Gibson 1973, Mauseth 1993, Mauseth y Landrum 1997, Arias y Terrazas 2001, Terrazas y Mauseth 2002, Terrazas y Loza-Cornejo 2003, Bernal-Salazar y Terrazas 2005, Mauseth 2006a). Pueden desarrollarse en el xilema y floema tanto primarios como secundarios; las fibras xilemáticas, aunque raramente, pueden estar en los haces corticales y medulares de algunas especies (Terrazas y Mauseth 2002).

En el xilema secundario, las fibras no sufren muerte celular programada por lo que quedan vivas en la madurez (Mauseth y Plemons 1995, Mauseth y Plemons-Rodriguez 1997; 1998). Pueden ser gelatinosas en los nodos de los tallos en algunas especies de

*Cylindropuntia* y *Opuntia* (Bobich y Nobel 2001; 2002); dentro de Cactoideae sólo se han observado fibras gelatinosas en *Harrisia bonplandii*, *H. martinii* y *Discocactus speciosus*, especies con hábitos epífitos o arbustivos (Gibson 1973). Por otro lado, en la madera de *Echinocactus platyacanthus* se desarrollan fibras libriformes no septadas con engrosamientos helicoidales en la pared celular (Fig. 11; Reyes-Rivera 2010). La presencia de engrosamientos helicoidales en las fibras de estos individuos se ha relacionado con la resistencia mecánica que le proveen a la célula y a la madera en general.

Las características morfológicas de las fibras (longitud celular y grosor de la pared), comúnmente se relacionan con la resistencia mecánica que le confieren a los tejidos y al tallo en general. No obstante, se ha comprobado que en Cactaceae otras características pueden contribuir también al soporte del tallo. Por ejemplo, se ha demostrado que la cantidad de madera acumulada en las bases de los tallos juega un papel importante al momento de conferir resistencia y flexibilidad a los individuos, incluso más que el grosor de la pared celular de las fibras (Gibson 1973, Niklas 1999, 2000). Además, la lignificación y las interacciones célula-célula también son relevantes para el soporte del tallo: en las especies no suculentas donde la madera es completamente fibrosa y con una acumulación relativamente grande (como *Pereskia lychnidiflora*), el contenido de lignina es menor al de las especies con tallos suculentos que poseen madera más blanda, compuesta por una matriz de fibras con manchones de TBAs (como en *Ferocactus hamatacanthus*). Esto sugiere que entre las especies de Cactaceae la variabilidad morfológica ha llevado a desarrollar diferentes estrategias para ofrecer soporte al tallo y que las características anatómicas del xilema secundario juegan un papel importante (ver [Capítulo 3](#)).

La distribución de las fibras dentro del xilema secundario puede variar (ver [sección Acumulación del xilema secundario](#)): en las especies con tallas grandes como *Carnegiea*, *Neobuxbaumia*, *Pachycereus*, *Pereskia* o *Stenocereus*, las fibras son el componente mayoritario de la madera (Gibson 1973, Mauseth y Landrum 1997, Arias y Terrazas 2001, Terrazas y Mauseth 2002, Terrazas y Loza-Cornejo 2003, Bernal-Salazar y Terrazas 2005). Tienden a ser anchas y tener paredes celulares secundarias relativamente gruesas. Sin embargo, en algunas especies el lumen es lo suficientemente amplio para jugar un papel importante, junto con los radios, en el almacenamiento de agua, además de contribuir al soporte del tallo (Terrazas y Mauseth 2002).



**Figura 2.** Tipos de punteaduras y estructura de la pared secundaria en los elementos de vaso del xilema secundario en Cactaceae: A) *Astrophytum asterias*, elementos de vaso parecidos a los del protoxilema. Flecha gruesa= placa de perforación. Flechas delgadas= patrón de la pared celular secundaria helicoidal y anular. B) *F. pilosus*, punteaduras pseudoescalariformes y escalariformes en elementos de vaso de la madera madura. C-F) *Pereskia lychnidiflora*: C) punteaduras rebordeadas pseudoescalariformes, D) punteaduras alternas poligonales, E) punteaduras rebordeadas alternas y F) punteaduras opuestas con rebordes reducidos. Escalas: A, B= 50  $\mu\text{m}$ ; C-F= 10  $\mu\text{m}$ . Fotografías, y preparaciones A y B, por Jorge Reyes; preparaciones C-F por Dalia Grego.

En otras especies la madera es más flexible ya que consta de una matriz fibrosa donde hay manchones de TBAs, como en *Ferocactus hamatacanthus*, mientras en Opuntioideae las fibras raramente se desarrollan asociadas a las TBAs (Mauseth 2006b). Por otro lado, en algunas especies con abundancia de TBAs como aquellas de *Echinocereus*, *Echinopsis* y *Ferocactus* se pueden localizar escasas fibras en las zonas más externas del xilema secundario (Gibson 1973), o en los márgenes de los fascículos vasculares, como en *Coryphantha clavata* (Reyes-Rivera 2010); probablemente esos diferentes arreglos ayudan a mantener la integridad de los fascículos vasculares. En las especies con formas de crecimiento pequeñas es común que las fibras estén ausentes (Terrazas y Mauseth 2002, Terrazas y Arias 2003, Mauseth 2004; 2006a).

### **Parénquima axial**

El parénquima axial dentro de Cactaceae puede ser del tipo paratraqueal escaso como en Pereskioideae, Opuntioideae y las especies fibrosas de Cactoideae (Bailey 1964, Gibson 1973, Terrazas y Arias 2003, Terrazas y Loza-Cornejo 2003, Mauseth 2006b). Este tipo de arreglo en el parénquima reduce el riesgo de cavitación ya que funciona como un suministro continuo de agua, más accesible para los vasos que el agua que se almacena en la médula o el córtex, o el que se conduce desde las raíces (Gibson 1973, Mauseth y Plemons-Rodriguez 1997; Mauseth y Stone-Palmquist 2001, Terrazas y Mauseth 2002, Mauseth 2006a; 2006b). Además, en las especies con predominio de TBAs, donde la cavitación es poco probable, puede presentarse parénquima del tipo marginal o difuso (Gibson 1973). Por otro lado, los bordes de los elementos de vaso en las uniones con las células del parénquima generalmente no están bien desarrollados o están ausentes, un rasgo que se considera adquirido secundariamente dentro de Cactaceae y que mejora el contacto entre ambos tipos celulares (Bailey y Srivastava 1962, Gibson 1973, Terrazas y Loza-Cornejo 2002).

### **Radios vasculares**

Una de las adaptaciones que han desarrollado los miembros de la familia Cactaceae a los ambientes xéricos es la gran amplitud de los radios. Generalmente son más amplios que en el resto de las dicotiledóneas, lo que facilita el almacenamiento de agua en las zonas

cercanas a los elementos conductores (Gibson y Nobel 1986, Arias y Terrazas 2001). En algunas especies se han observado perforaciones en las paredes celulares de las células radiales, por lo que se ha propuesto que este tejido también participa en el movimiento lateral del agua (Gibson 1973, Terrazas 2000).

En *Pereskia*, el sistema radial del xilema secundario consiste de radios tanto primarios como secundarios, sin diferencias obvias en cuanto a su composición celular o amplitud; la mayoría son células lignificadas, con paredes celulares secundarias ligeramente engrosadas y con pequeñas punteaduras redondeadas, pueden presentar cristales de oxalato de calcio (Bailey 1961, Mauseth y Landrum 1997). En Opuntioideae las células del parénquima radial son cuadradas con paredes celulares lignificadas en todas las especies de *Cylindropuntia*, en *Tacinga funalis* y en varias especies de hábito arbóreo; en especies de *Brasiliopuntia*, *Consolea*, *Nopalea* y en *Opuntia quimilo* las paredes celulares son delgadas no lignificadas (Mauseth 2006b). En Cactoideae la mayoría de especies tiene radios multiseriados, compuestos predominantemente de células cuadradas o erectas, con paredes celulares que pueden ser lignificadas o no lignificadas (Gibson 1973, Terrazas y Mauseth 2002, Terrazas y Arias 2003). Sin embargo, en las especies arbóreas con madera fibrosa también puede haber células procumbentes cortas muy prominentes, como en *Cephalocereus columna-trajani*, *Cereus fricii*, *Pilosocereus piauhyensis*, *Myrtillocactus cochal*, *M. geometrizzans*, *Neoabbottia paniculata* (Gibson 1973) y varias especies de *Stenocereus* (Loza-Cornejo *et al.* 2003). Es común que las especies con hábitos arbóreos como las anteriores tengan radios lignificados, por el contrario, los radios no lignificados se correlacionan con la presencia de TBAs en el xilema secundario (Terrazas y Arias 2003). Tanto en Cactoideae como en Opuntioideae las células del parénquima radial pueden tener paredes celulares no lignificadas, onduladas o plegadas. Sin embargo, sólo en los radios de algunas especies de Opuntioideae se desarrollan TBAs, las cuales actúan como las células parenquimatosas de paredes plegadas donando fácilmente casi la totalidad de su volumen de agua (Mauseth 2006b).

La cantidad de parénquima radial puede variar dependiendo de las especies; por ejemplo, en Opuntioideae la fracción de volumen del parénquima radial es baja en algunas especies fibrosas como *Pereskiaopsis rotundifolia* (31.6%), pero en otras con tallos cortos *sensu* Mauseth (2006b), la fracción de volumen varía de muy elevada (95.5 %) a ausente en

especies con poca acumulación de madera (<1.0 mm), tales como *Corynopuntia grahamii*, *Pterocactus kuntzei* y *Tephrocactus molinensis*. Por otro lado, en algunas especies de Cactoideae como *Lophocereus schottii* y *Peniocereus greggii* se han registrado radios relativamente reducidos, pero en *Wilcoxia* (*Echinocereus leucanthus* y *E. poselgeri*) la reducción de los radios llega a tal extremo que prácticamente se pierden (Gibson 1973, Terrazas y Arias 2003). Según Gibson (1973) algunas causas de este fenómeno son: 1) la reducción de la actividad cambial, 2) tendencia a cambiar el hábito herbáceo, 3) presencia de células fusiformes iniciales relativamente cortas, 4) una alta especialización en las células del xilema secundario, 5) modificación o enanismo en relación a los ambientes xéricos o desfavorables, y 6) desarrollo de paedomorfosis en el xilema secundario. Ambas condiciones, tanto la pérdida de radios como la presencia de radios amplios y altos, son consideradas como producto de eventos heterocrónicos (paedomorfosis) en la evolución del xilema secundario (Carlquist 2009).

## **FLOEMA**

El floema primario está compuesto por escasos miembros del tubo criboso y sus células acompañantes, parénquima floemático no conductor y fibras (Gibson y Horak 1978, Mauseth y Landrum 1997, Terrazas y Mauseth 2002, Mauseth 2006a). Dependiendo de las especies pueden presentarse algunas características particulares. Por ejemplo, en las especies con tallos alargados, los haces vasculares jóvenes del estele pueden presentar un casquete de fibras en el floema primario, las cuales son septadas, nucleadas y tienen paredes celulares delgadas (Terrazas y Mauseth 2002, Mauseth 2006a). La ausencia de estos casquetes de fibras es comúnmente asociada a las especies que desarrollan TBAs en el xilema secundario (Mauseth *et al.* 1998). El desarrollo de fibras de floema primario en el estele es retardado en algunas especies de *Anisocereus*, *Armatocereus*, *Carnegiea*, *Cephalocereus*, *Escontria*, *Lophocereus*, *Mitrocereus*, *Myrtillocactus*, *Pachycereus*, *Polaskia*, *Pterocereus* y *Stenocereus*, pero precoz en otras como *Stenocereus stellatus*, *Pachycereus weberi* y algunas de *Acanthocereus* y *Bergerocactus* (Gibson y Horak 1978). Por otro lado, en especies de Cactoideae se presentan fibras de floema primario en los haces corticales (*ver secciones Haces corticales*, y *Haces medulares*). En *Pereskia* y algunas especies de *Browningieae*, *Cereeae* y *Echinocereeae* las células de parénquima pueden



rediferenciarse en esclereidas (Mauseth 1996, Mauseth *et al.* 1998, Terrazas y Loza-Cornejo 2002, Terrazas y Mauseth 2002); en las especies con tallos cortos y globosos no se desarrollan fibras de floema, ni esclereidas (Gibson y Nobel 1986, Loza-Cornejo y Terrazas 1996, Mauseth *et al.* 1998, Mauseth 1999, Terrazas y Mauseth 2002).

El floema secundario comúnmente comprende una región estrecha no colapsada con células funcionales y una región colapsada donde los miembros del tubo criboso y sus células acompañantes se colapsan formando un patrón que puede variar de acuerdo a la especie (Mauseth y Landrum 1997, Terrazas y Arias 2003): en especies de *Acanthocereus*, *Leptocereus* y *Peniocereus* el floema colapsado es delimitado por un casquete de fibras (Mauseth y Ross 1988, Mauseth *et al.* 1998, Herrera-Cárdenas *et al.* 2000); otras como *Neobuxbaumia* y *Neoraimondia hezogiana* no desarrollan esclerénquima en el floema colapsado (Terrazas y Arias 2003).

## **XILEMA**

El xilema primario consiste de elementos traqueales angostos y una matriz asociada. El protoxilema es el primero en formarse y generalmente está asociado a una matriz de parénquima. El metaxilema se forma subsecuentemente, en las plantas con tallos globosos es asociado a una matriz de parénquima, mientras que en las plantas con tallos alargados la matriz consiste de fibras (Terrazas y Mauseth 2002, Mauseth 2006a). Además, en casi todas las especies el xilema primario contiene una combinación de elementos de vaso y TBAs (*ver más adelante las características de cada tipo celular*), excepto en *Pereskia*, *Leptocereus*, *Dendrocereus*, *Epiphyllum* y *Rhipsalis* (Mauseth y Landrum 1997, Terrazas y Arias 2003, Mauseth 2004, 2006a; 2006b, Romero-Godofredo y Melo-de-Pinna 2008).

Dada la complejidad del xilema secundario se discutirá por separado en las secciones subsecuentes.

## **EL CÁMBIUM VASCULAR Y SUS DERIVADOS**

El cámbium vascular es un meristemo lateral que da origen al xilema y floema secundarios (por convención descriptiva esta sección estará enfocada al xilema secundario). Las células que lo componen son las células iniciales fusiformes, las cuales dan origen al sistema axial y las células iniciales de radio que dan origen al sistema radial (Larson 1994). Al principio

los dos tipos de células iniciales se dividen sin diferenciación, posteriormente y mediante divisiones periclinales, dan lugar a las células madre de xilema, hacia el interior del tallo, y las células madre de floema, hacia el exterior. Conforme las células madre de xilema y floema sufren rondas consecutivas de divisiones periclinales sus derivados sufren diferenciación terminal; finalmente cada uno adquiere una identidad específica de un tipo celular maduro y completamente diferenciado (Esau 1977, Larson 1994). En el xilema secundario de Cactaceae el sistema axial consiste de células de parénquima, fibras, elementos de vaso y TBAs (*ver sección Tipos celulares del sistema vascular*), mientras que el sistema radial sólo posee células de parénquima (en algunas Opuntioideae también TBAs), y en algunos géneros de Cactoideae también células perforadas de radio.

En las dicotiledóneas se reconocen varios signos de especialización en los derivados del cámbium vascular; por ejemplo, la longitud corta de los elementos de vaso, las placas de perforación simples (involucran incluso mayor significancia evolutiva que la orientación de la placa de perforación), y la pérdida de los bordes de las punteaduras de las células no perforadas (Bailey 1944). La alta especialización evolutiva que han alcanzado los derivados del cámbium vascular en la familia Cactaceae ha sido reconocida incluso en los géneros más ancestrales como *Pereskia*, *Pereskopsis*, y *Quiabentia* (Bailey y Srivastava 1962). Entre los rasgos más especializados están: 1) las dimensiones y la forma de las fusiformes iniciales del cámbium (comparativamente son más cortas; oscilan entre 150 – 400  $\mu\text{m}$ ); 2) placas de perforación simples y punteaduras laterales de los vasos que frecuentemente son no bordeadas en las zonas adyacentes al parénquima; 3) fibras nucleadas capaces de almacenar almidón; 4) los patrones de distribución del parénquima y los elementos de vaso; 5) radios multiseriados, altos y amplios (Bailey 1960; 1964, Bailey y Srivastava 1962, Gibson 1973). Además, en los géneros más derivados de Cactoideae se pueden encontrar algunos rasgos adicionales, como: 6) presencia (retención) de elementos de vaso morfológicamente similares a los del proto y metaxilema; 7) presencia de TBAs, un tipo celular presente en las subfamilias más derivadas Opuntioideae y Cactoideae (Bailey 1960; 1964, Gibson 1973, Mauseth y Landrum 1997, Mauseth 2004, Terrazas y Mauseth 2002, Terrazas y Arias 2003, Terrazas y Loza-Cornejo 2003, Carlquist 2009, Reyes-Rivera 2010).

Las implicaciones de estas características anatómicas se discutirán más adelante (*ver sección Correlaciones*, y *Capítulo 5*), pero en general, están más relacionadas con la

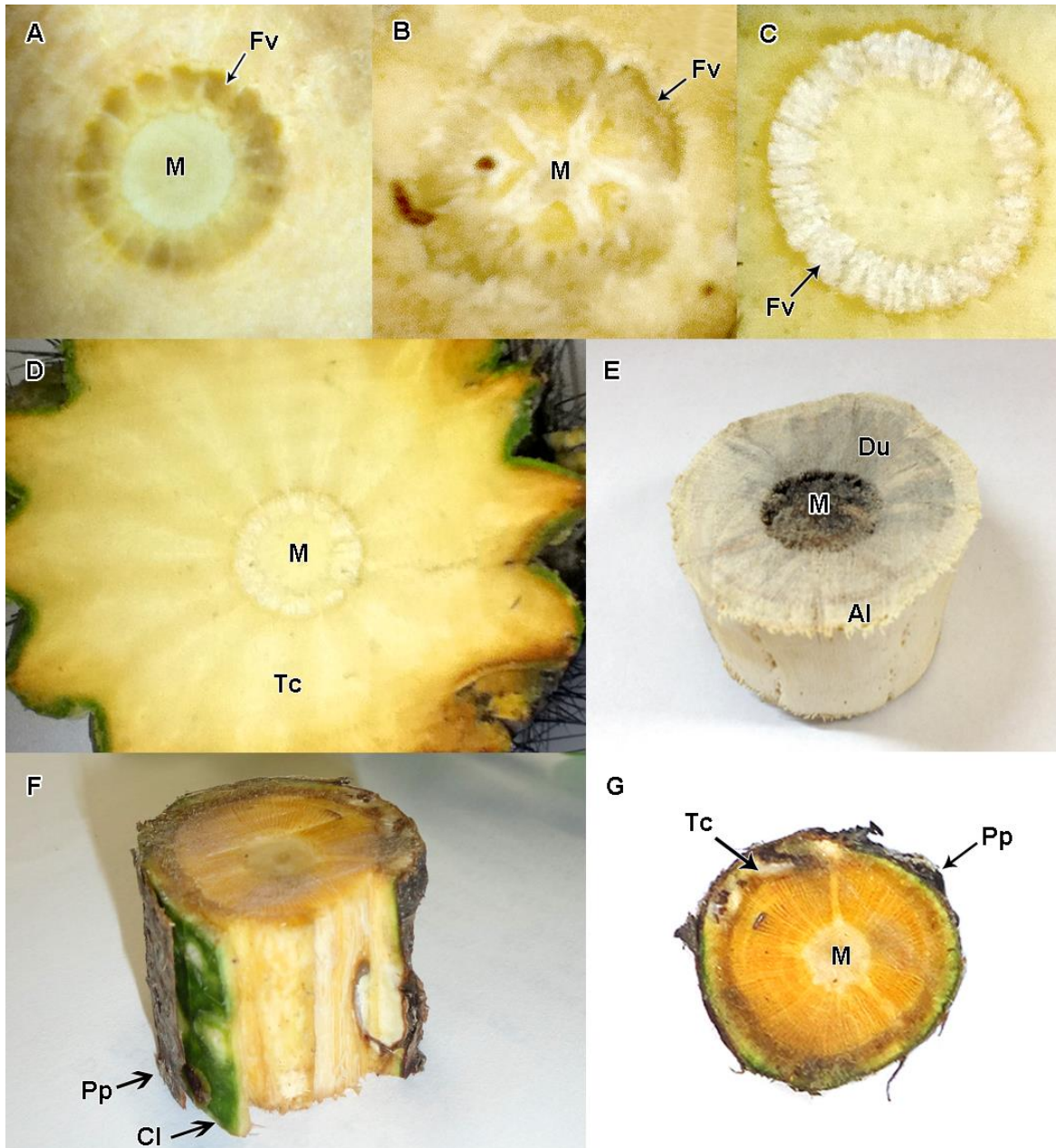
evolución de las formas de crecimiento y la biomecánica, que con las relaciones filogenéticas dentro de la familia Cactaceae (Bailey y Srivastava 1962, Gibson 1973, Gibson y Horak 1978, Terrazas y Mauseth 2002, Terrazas y Arias 2003, Griffith 2004, Edwards *et al.* 2005, Mauseth 2006a, Carlquist 2009, Griffith y Porter 2009, Arakaki *et al.* 2011, Bárcenas *et al.* 2011, Hernández-Hernández *et al.* 2011, Vázquez-Sánchez y Terrazas 2011, Vázquez-Sánchez *et al.* 2013).

### **ACUMULACIÓN DEL XILEMA SECUNDARIO**

En Cactaceae es evidente la enorme diversificación que ha ocurrido en el xilema secundario (madera). A lo largo de esta familia se pueden observar desde las especies con rasgos ordinarios, como aquellas de *Pereskia* donde la madera y el cámbium vascular son muy similares al de otras dicotiledóneas arbóreas, hasta aquellas que han alcanzado un alto grado de especialización, como las de *Ariocarpus* o *Mammillaria*, especies donde la madera carece de fibras y en su lugar desarrollan una matriz de TBAs (Bailey y Srivastava 1962, Bailey 1964, Gibson y Nobel 1986, Mauseth y Plemons 1995, Mauseth y Plemons-Rodriguez 1998, Arnold y Mauseth 1999, Terrazas y Mauseth 2002, Terrazas y Arias 2003, Mauseth 2004, 2006a, b).

De manera general, se puede decir que el xilema secundario comparado con los tejidos fundamentales es a menudo de escaso a moderado (Fig. 3), sin embargo, en *Pereskia* y otros géneros con tallos grandes la acumulación del xilema secundario puede ser considerable (Fig. 3E-G; Benson 1969, Gibson 1973). Ningún miembro de esta familia presenta crecimiento secundario anómalo, y sólo raramente forman marcas que se asemejan a los anillos de crecimiento de otras especies leñosas (Mauseth y Plemons 1995, Mauseth y Plemons-Rodriguez 1997; 1998, Anderson 2001, Mauseth 2006a). Aunque Mauseth (2006) señala que en Cactaceae no se forma duramen, algunas especies como *Pilosocereus chrysacanthus* pueden desarrollar este tejido (Fig. 3E).

Por otro lado, en muchas especies es común que algunas regiones del cámbium vascular produzcan cantidades considerables de parénquima, lo que resulta en un euestele con fascículos vasculares delimitados por grandes radios (Fig. 3A, C; Mauseth y Plemons 1995, Mauseth y Plemons-Rodriguez 1997; 1998, Anderson 2001, Mauseth 2006a).



**Figura 3.** Acumulación del xilema secundario en algunas Cactaceae. En *Echinocactus platyacanthus* la madera juvenil presenta fascículos pequeños (A); en los adultos hay fascículos más amplios, pero no forman un anillo continuo (B). En *Ferocactus hamatacanthus* (C, D), la madera adulta conserva los fascículos pequeños y constituye una fracción menor del tallo. En *Pilosocereus chrysacanthus* (E), especie con hábito arbóreo, la acumulación de madera es considerable y se forma un cilindro continuo de más de 4 cm de espesor. En *Pereskia lychnidiflora* (F, G) la peridermis se desarrolla en estados tempranos y la médula alcanza una fracción de volumen considerable dentro del tallo. Abreviaturas: Albura= Al; Clorénquima= Cl; Córtex= Tc; Duramen= Du; Médula= M; Fascículos vasculares= Fv; Peridermis= Pp. Preparaciones y fotografías por Jorge Reyes.

Frecuentemente el número de fascículos está en función del diámetro del tallo, el número de costillas y el diámetro de la médula (Gibson 1973, Gibson y Horak 1978). Además, de acuerdo con Gibson (1973), el xilema secundario en Cactoideae puede acumularse de diferentes maneras: 1) un cámbium continuo que se desarrolla tempranamente y da origen a un cilindro uniforme de xilema secundario, como en *Lophocereus schottii*, *Peniocereus greggii*, *Pilosocereus chrysacanthus* (Fig. 3E), y las especies de *Stenocereus* y *Acanthocereus*. Dada las características del xilema secundario en *Pereskia* (Bailey y Srivastava 1962), es muy probable que en esa subfamilia se dé este tipo de acumulación. 2) cuando el desarrollo del cámbium vascular es retardado, tanto el xilema secundario juvenil como el maduro aparecen como una red anastomozada de tejido vascular con muchos radios lenticulares primarios prominentes; a medida que el cámbium interfascicular se desarrolla, los radios primarios son gradualmente reemplazados por radios multiseriados y, algunas veces, por elementos axiales, dando lugar finalmente a un cilindro vascular completo. Las especies no fibrosas a menudo retienen indefinidamente el patrón bandeado, ya que el crecimiento es algo limitado, y la actividad cambial puede estar restringida a los haces vasculares. 3) un tercer patrón se da en especies de *Carnegiea* y *Neobuxbaumia* cuando el xilema secundario se forma inicialmente como un sistema discreto de bandas delgadas (fascículos) arregladas en forma de anillo. Los radios medulares parecen ser continuos desde el ápice de la planta hasta su base. Conforme los fascículos individuales aumentan de tamaño con crecimiento secundario adicional eventualmente se forma un cilindro en la base de la planta por desarrollo de cámbium interfascicular. Aunque los radios primarios son gradualmente eliminados en la base del tallo la parte superior conserva la estructura juvenil. Además, los adultos de algunas especies conservan los rasgos juveniles en la estructura del estele: en especies de *Ariocarpus*, *Astrophytum*, *Echinocactus*, *Ferocactus* y *Mammillaria* no se forma un cilindro completo, en su lugar se desarrollan una serie de fascículos de xilema secundario, variables en tamaño, dispuestos en forma circular pero sin formar un anillo completo de madera (Fig. 3B-D). Altesor *et al.* (1994) han considerado este rasgo como un signo importante de pedomorfosis en la madera de Cactaceae.

La madera de Cactaceae se puede clasificar de acuerdo a la matriz de tejido vascular predominante como fibrosa, parenquimatosa o con TBAs, o bien, de acuerdo a la

uniformidad del desarrollo de la madera como monomorfa o polimorfa (Terrazas y Mauseth 2002). Por convención descriptiva, en esta sección se abordarán las dos clasificaciones para procurar un mejor entendimiento de los procesos ontogenéticos implicados en la formación de la madera dentro de la familia Cactaceae.

### **Madera fibrosa**

La madera fibrosa generalmente se desarrolla en las especies con tallos grandes, frecuentemente con hábitos arbóreos, en las cuales la presión de turgencia no es suficiente para mantener erguido el tallo (Terrazas y Mauseth 2002). Algunos ejemplos típicos de madera fibrosa se pueden encontrar en especies como *Cylindropuntia imbricata*, *Neobuxbaumia tetezo*, *Pereskia lychnidiflora*, *Pachycereus pecten-aboriginum* y *Stenocereus dumortieri* (Bailey y Srivastava 1962, Gibson 1973, Mauseth y Landrum 1997, Terrazas 2001, Arias y Terrazas 2001, Terrazas y Loza-Cornejo 2003, Bernal-Salazar y Terrazas 2005, Mauseth 2006b).

La madera fibrosa es altamente homogénea; su composición química es similar a la de otras dicotiledóneas (*ver Capítulo 3*), y gran parte de su variación se correlaciona con la altura del tallo (*ver sección Correlaciones*) (Gibson 1973, Gibson y Nobel 1986, Mauseth y Plemons-Rodriguez 1998, Arias y Terrazas 2001, Terrazas y Mauseth 2002, Terrazas y Arias 2003). Este tipo de madera se caracteriza por tener una matriz de fibras, en la cual están embebidos los vasos y el parénquima paratraqueal (Bailey y Srivastava 1962, Bailey 1964, Terrazas y Mauseth 2002, Terrazas y Arias 2003, Mauseth 2006a, b); la porosidad es difusa y los radios se componen de células de parénquima con paredes celulares relativamente delgadas, frecuentemente lignificadas (Benson 1969, Gibson 1973, Gibson y Nobel 1986, Mauseth y Landrum 1997); las células perforadas de radio son raras pero están presentes en al menos siete géneros de Cactoideae (Terrazas 2000). La esclerificación de los radios muchas veces se relaciona con la dureza de la madera: aquellas especies con una madera muy dura y fibras con paredes extremadamente gruesas a menudo tienen células radiales esclerificadas, en tanto que las especies con maderas suaves y fibras con paredes delgadas frecuentemente poseen células radiales no esclerificadas (Mauseth 2006a). Por otro lado, en la mayoría de las especies la madera fibrosa se considera como mesomórfica, ya que no presenta el patrón típico de las plantas que se desarrollan en sitios donde la

limitante es el agua (Carlquist 1977, Arias y Terrazas 2001, Terrazas y Arias 2003, Terrazas y Loza-Cornejo 2003, Bernal-Salazar y Terrazas 2005).

En Cactoideae y Opuntioideae aún las especies fibrosas pueden producir TBAs durante los estadios tempranos de su desarrollo, sin embargo, la madera fibrosa predomina durante la mayor parte de la ontogenia (*ver sección Madera dimorfa*), como en especies de *Austrocylindropuntia pachypus* (Mauseth 2006b), *Pilosocereus aurisetus* (Romero–Godofredo y Melo-de-Pinna 2008), *Echinocactus platyacanthus* y *Ferocactus pilosus* (Reyes-Rivera 2010; Fig. 4). Únicamente en la madera de Pereskioideae las TBAs están totalmente ausentes (Bailey y Srivastava 1962, Gibson 1973, Mauseth y Landrum 1997, Mauseth 2004). La madera fibrosa es considerada plesiomórfica (*ver Capítulo 5*), ya que comparte características con los miembros de la subfamilia Pereskioideae, y estos a su vez comparten características con la mayoría de dicotiledóneas leñosas (Mauseth y Landrum 1997, Terrazas y Arias 2003).

### **Madera con TBAs**

Las especies con tallos cortos, cilíndricos, y globosos deprimidos, se caracterizan por tener una madera con vasos embebidos en una matriz de TBAs, donde las fibras están ausentes o son muy raras y los radios consisten enteramente de células de parénquima no lignificadas; algunas veces los vasos existen sólo como un componente de la madera temprana (Gibson 1973, Mauseth y Plemons 1995, Mauseth 1996, Mauseth y Plemons-Rodríguez 1997, 1998, Mauseth *et al.* 1998, Terrazas y Mauseth 2002, Terrazas y Arias 2003, Mauseth 2004). De acuerdo con Terrazas y Mauseth (2002), este tipo de madera parece ser altamente adaptativo para las especies que ocupan hábitats extremadamente xéricos. Dentro de Cactoideae se observa en varias especies de Cacteeae, y en uno o más géneros de Cereeeae, Echinocereeeae, Notocacteeae y Trichocereeeae (Terrazas y Arias 2003). En la tribu Cacteeae se presenta poco parénquima axial y los engrosamientos de las TBAs tienen una forma más hexagonal en vista transversal (Mauseth 2006a). Las TBAs forman una masa ordenada y estrechamente comprimida, como en *Coryphantha clavata*; en otras especies como *Ariocarpus retusus*, la matriz de TBAs se ve interrumpida por algunas cavidades de mucílago y los radios que suelen ser expandidos (Reyes-Rivera 2010). En la tribu Notocacteeae la regularidad de las TBAs en la madera tardía es interrumpida por el

abundante parénquima axial y los vasos; las TBAs tienden a ser más circulares en vista transversal, y su distribución es desordenada (Mauseth 2006a). En la mayoría de las especies la presencia de TBAs está correlacionada con el desarrollo de radios no lignificados y con la ausencia de esclerénquima en el floema secundario.

La madera con TBAs también se ha reportado en varias especies de Opuntioideae, donde las TBAs raramente se desarrollan con las fibras (Mauseth 2006b); en algunas especies de *Austrocylindropuntia*, *Maihueniopsis*, *Pterocactus*, *Puna* y *Tephrocactus* se desarrollan TBAs tanto en los radios como en el sistema axial, debido a esto, la distinción entre ambos sistemas no es muy clara, no obstante, la región axial es definida por la presencia de vasos y la radial por la ausencia de estos, además las TBAs radiales usualmente son más grandes que las axiales (Mauseth 2006a, b). Por otro lado, en *Cumulopuntia sphaerica* las TBAs sólo se observan en los radios y no en el sistema axial; los radios son muy amplios, únicamente con TBAs y parénquima. El sistema axial derivado de las fusiformes iniciales consiste solo de una o dos filas de vasos y poco parénquima axial, todas las células son muy cortas, mientras que las derivadas de las iniciales de radio son algo más alargadas (Mauseth 2006b).

Por otro lado, aunque la formación de marcas de crecimiento (comúnmente referidas como anillos de crecimiento) es rara en la madera de Cactaceae, algunos géneros con abundancia de TBAs pueden ser un claro ejemplo de madera de este tipo (Terrazas y Mauseth 2002). En estos géneros es común que la madera presuntamente temprana, rica en vasos, se distinga de la madera presuntamente tardía, con predominio de TBAs, haciendo evidente a simple vista la presencia de anillos en la madera. *Pterocactus valentini*, *Puna clavarioides*, varias especies de *Ferocactus*, *Echinocactus* y géneros relacionados, son especies con marcas de crecimiento de este tipo (Terrazas y Mauseth 2002, Mauseth 2006b).

### **Madera dimorfa**

En varias especies de Cactaceae los individuos comienzan produciendo un tipo de madera en las etapas juveniles de la ontogenia, posteriormente, conforme los individuos maduran, sufren un cambio de fase en la madera y se produce un tipo diferente al inicial; este fenómeno es único dentro de las angiospermas y se ha relacionado con el soporte que requiere el tallo (Gibson 1973, Mauseth y Plemons 1995, Mauseth 1998, Mauseth y



Plemons-Rodriguez 1998, Terrazas y Mauseth 2002, Loza-Cornejo *et al.* 2003, Terrazas y Arias 2003, Mauseth 2004, 2006a, Romero-Godofredo y Melo-de-Pinna 2008, Reyes-Rivera 2010). Un aspecto particularmente interesante de la madera dimorfa es que cuando la madera con TBAs está presente, ésta siempre es la primera en formarse (Terrazas y Mauseth 2002). No se conoce la presión selectiva que da origen a una madera con TBAs, pero están ausentes en *Pereskia*, algunas Opuntioideae, y pocas Cactoideae (*Leptocereus*, *Neoabbottia*, y las epífitas *Epiphyllum* y *Rhipsalis*; Mauseth 2004). Consecuentemente esas especies no presentan madera dimorfa y producen un solo tipo de madera a lo largo de toda su vida, igual que lo hacen otras dicotiledóneas de familias diferentes (Mauseth 2006a).

### **De madera con TBAs a madera fibrosa**

Sucede comúnmente en especies columnares. Cuando la planta es lo suficientemente joven y pequeña para ser soportada por la presión de turgencia el cámbium vascular comienza produciendo una madera con vasos embebidos en una matriz de TBAs y parénquima apotraqueal, las fibras pueden ser raras o pueden estar totalmente ausentes; conforme la planta se vuelve alta y pesada se hace necesaria una madera más fuerte, consecuentemente se produce la madera fibrosa (Mauseth y Plemons 1995, Terrazas y Mauseth 2002, Loza-Cornejo *et al.* 2003, Terrazas y Arias 2003, Romero-Godofredo y Melo-de-Pinna 2008, Reyes-Rivera 2010, Loza-Cornejo y Terrazas 2011). En la fase con TBAs casi la mitad de las células axiales puede ser diferenciada en parénquima, distribuido en pequeños grupos o células individuales entre los vasos y las TBAs. Sin embargo, en la madera fibrosa el parénquima axial se reduce al 5-12 % de tejido axial, todo distribuido como parénquima paratraqueal (Mauseth y Plemons 1995).

El comienzo y la duración del cambio de fase dependen de la forma del tallo adulto. Suele ocurrir muy rápido en aquellas especies que requieren tempranamente del soporte mecánico de una madera muy resistente (madera fibrosa) (Loza-Cornejo *et al.* 2003, Mauseth 2004, Romero-Godofredo y Melo-de-Pinna 2008, Loza-Cornejo y Terrazas 2011). Por ejemplo, en especies como *Neobuxbaumia polylopha*, *Rauhocereus riosaniensis* y *Weberbauerocereus albus*, el cambio ocurre cuando el tallo alcanza los 3 cm de altura, en otras especies como *Cephalocereus senilis*, *Cleistocactus fieldianus* y *Stenocereus thurberi*, ocurre más tarde, cuando el tallo alcanza los 10-16 cm de altura (Mauseth 2006a).

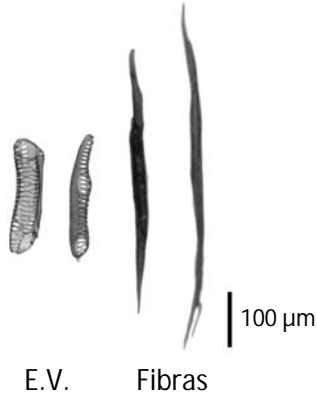
En cuanto a la duración del cambio de fase, en algunas especies como *Echinocactus platyacanthus* puede ser súbito y ocurrir a 1 cm de distancia a partir de la medula en dirección radial, o bien, ser gradual como en *Ferocactus pilosus*, donde el número de TBAs comienza a disminuir a 1 cm cerca de la medula y desaparecen totalmente después de 1.5 cm en dirección radial (Fig. 4; Reyes-Rivera 2010).

Algunos ejemplos de maderas dimorfas de este tipo se pueden encontrar en miembros de las tribus Cacteae, Cereae y Trichocereae de la subfamilia Cactoideae (Mauseth y Plemons 1995, Terrazas y Arias 2003, Romero-Godofredo y Melo-de-Pinna 2008, Reyes-Rivera 2010), y en algunas especies de *Echinocereus* (Sánchez y Terrazas, datos sin publicar). Además, se ha reportado en al menos dos especies de Opuntioideae (*Austrocylindropuntia pachypus* y *Opuntia penicilligera*), en las cuales el parénquima de la fase juvenil puede ser abundante (Mauseth 2004, 2006b). Por otro lado, dos especies de Maihuenioideae (*M. patagonica* y *M. poeppigii*) presentan un cambio de fase similar, sin embargo, la madera adulta no es completamente fibrosa ya que pueden desarrollarse pocas TBAs (Gibson 1977).

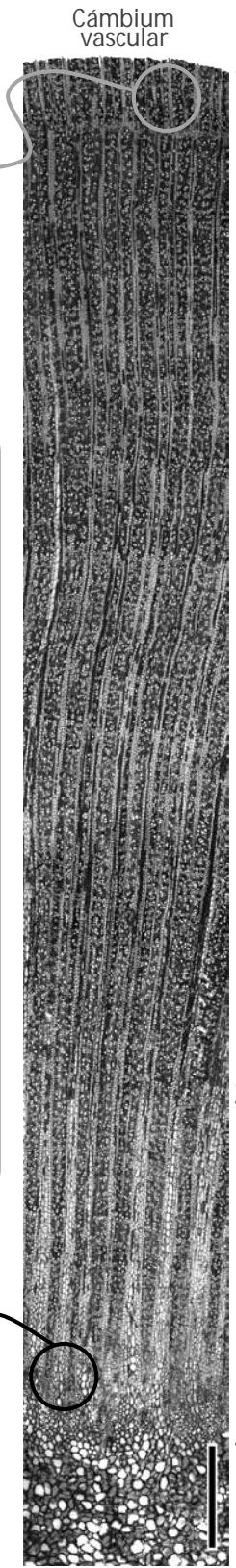
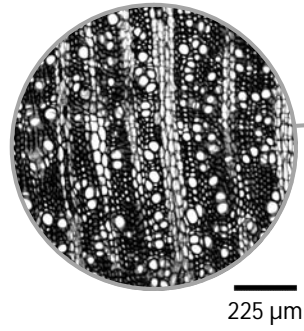
### **De madera con TBAs a madera parenquimatosa**

Usualmente sucede en especies con tallos globosos, procumbentes o inmersos en el suelo, ya sean con costillas o tubérculos. Al igual que la transición anterior, esta puede ser abrupta o gradual. La madera juvenil con vasos embebidos en una matriz de TBAs y parénquima es homogénea, sin embargo, la madera adulta parenquimatosa es más variable ya que también puede haber TBAs dispersas. Los vasos se caracterizan por la consistencia de su diámetro dentro de la madera: los vasos de la madera juvenil tienen en promedio el mismo diámetro que los vasos de la madera adulta (Mauseth y Plemons 1995). Dadas las características anatómicas de la fase parenquimatosa, ésta no ofrece mucha resistencia mecánica (Mauseth y Stone-Palmquist 2001, Stone-Palmquist y Mauseth 2002, Mauseth 2006a), ya que las fibras y TBAs están ausentes o son muy escasas. Ésta fase consiste de una matriz de células parenquimatosas con paredes primarias delgadas, no lignificadas, donde los vasos se encuentran embebidos (Terrazas y Mauseth 2002, Mauseth 2006a).

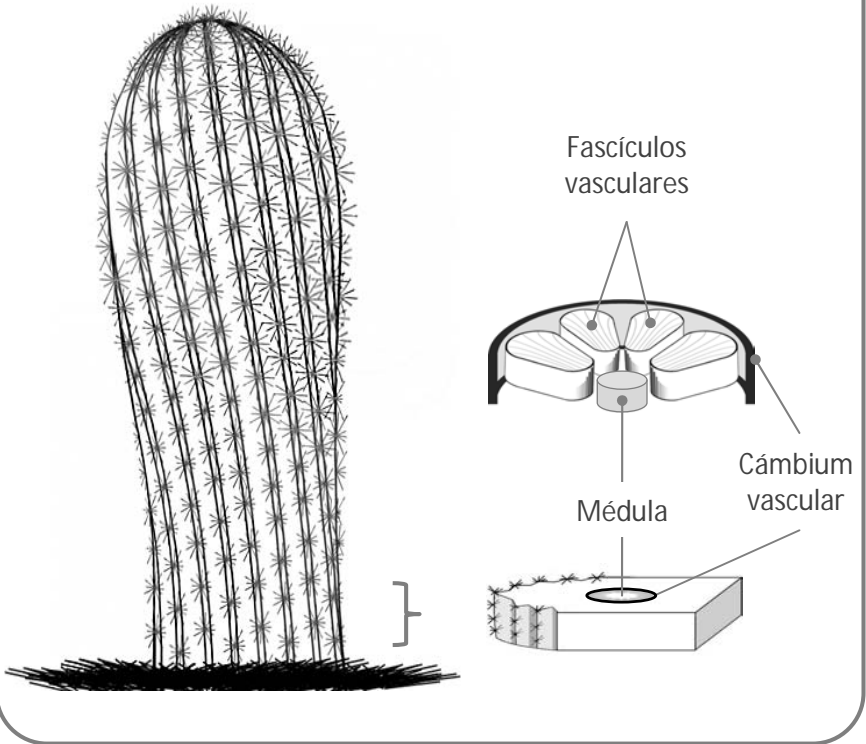
Tipos celulares en la madera adulta



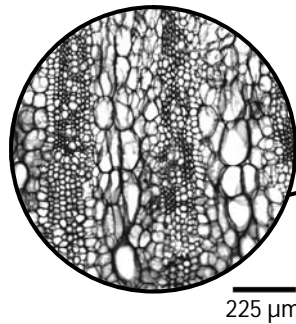
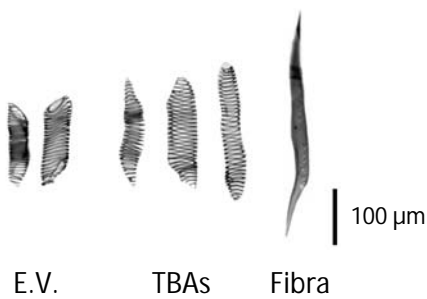
Cortes transversales de la madera



Organización de la madera



Tipos celulares en la madera juvenil



Madera adulta (Fibrosa)

Madera Juvenil (TBAs)

Los vasos tienen paredes celulares secundarias pseudohelicoidales, se distribuyen solitarios o en grupos de más de 100 vasos; cada vaso está en contacto con al menos una célula de parénquima (Mauseth 2006a). Este arreglo estrecho y cercano a las células de parénquima permite que los vasos sean más resistentes a la cavitación y, al mismo tiempo, ayuda a rellenar los que han cavitado (Terrazas y Mauseth 2002, Mauseth 2006a). Los radios tienden a ser altos y anchos, con células que carecen de paredes celulares secundarias (Mauseth 2006a). A menudo, la madera parenquimatosa tiende a acumularse escasamente, con solo unos milímetros de espesor (Terrazas y Mauseth 2002).

La madera dimorfa de este tipo se ha reportado en *Echinopsis tubiflora*, *Gymnocalycium marsoneri*, *G. oenanthemum* (Trichocereae), *Parodia maassii* y *P. schumanniana* (Notocactaceae) (Mauseth y Plemons 1995). También sucede en *Opuntia rufida* (Opuntioideae), una especie con hábito arbustivo, donde la matriz dominante en la madera juvenil es de TBAs con parénquima y vasos, pero se observan regiones con fibras que perduran en la madera adulta, donde la matriz cambia a ser predominantemente de parénquima (Mauseth 2006b).

#### **De madera fibrosa a madera parenquimatosa**

Algunas especies hemiepífitas y trepadoras con tallos alargados presentan madera fibrosa en el centro del cilindro vascular, cerca de la médula, y madera parenquimatosa cerca del cámbium vascular; la madera fibrosa en los estadios más tempranos les sirve para crecer y mantenerse erguidas. Es común que después de cierto tiempo, y tras alcanzar determinada longitud, el tallo se postre sobre las ramas de otros árboles, cuando esto pasa la madera cambia a ser parenquimatosa (Terrazas y Mauseth 2002).

---

◀ **Figura 4.** Madera dimorfa en *F. pilosus*. La madera juvenil, cerca de la médula (parte inferior del diagrama), desarrolla elementos de vaso poco lignificados embebidos en una matriz predominantemente de TBAs; escasas fibras están presentes durante las etapas tempranas del desarrollo. En la madera adulta, cerca del cámbium vascular (parte superior), es fibrosa y las TBAs están totalmente ausentes. La organización de la madera es en fascículos vasculares (recuadro central): el grado de lignificación es mayor en la madera madura (cercana a cámbium vascular). La madera juvenil (cercana a la médula) y la madera cercana al ápice del tallo son menos lignificadas (*ver Capítulo 3*). Abreviaturas: E.V.= elementos de vaso; TBAs= traqueidas de banda ancha. Escala corte general= 1.925 mm. Preparaciones, fotografías y esquemas por Jorge Reyes.

En *Hylocereus venezuelensis* la madera fibrosa se caracteriza por tener vasos embebidos dentro de una matriz de fibras, distribuidos en pequeños grupos ( de 4 a 6), con parénquima paratraqueal escaso (<5 % de las células axiales). La madera parenquimatosa posee vasos y abundante parénquima axial (>89.9 % de las células axiales); las fibras están ausentes o son muy escasas (Mauseth y Plemons 1995). En otras especies como *Borzicactus humboldtii*, *Dendrocereus nudiflorus*, *Haageocereus australis*, *Morawetzia sericata*, *Samaipaticereus corroanus*, *Stephanocereus leucostele*, *Trichocereus schickendantzii* y *Weberocereus glaber* también se presenta este cambio, pero en algunas el tiempo de la transición es diferente, o bien, cambian a TBAs (Mauseth y Plemons 1995, Mauseth 2006b).

### **Madera Trimorfa (de madera con TBAs a fibrosa y después a madera con TBAs)**

Como ya se mencionó anteriormente, la madera dimorfa de distintos tipos puede estar presente en varias especies de Cactaceae, usualmente ninguna sufre cambios morfológicos externos aparentes cuando ocurre el cambio de fase en la madera (Mauseth y Plemons 1995). Sin embargo, en especies que desarrollan cefalio (una región, comúnmente apical, densamente cubierta de espinas y tricomas, especializada en la producción de flores; p. ej. *Melocactus intortus* y *Arrojadoa braunii*) el desarrollo de estas estructuras es acompañado por el cambio de fase de la madera (Mauseth 1989, Mauseth y Plemons 1995, Terrazas y Mauseth 2002, Mauseth 2006a).

En *Melocactus* el cámbium vascular produce una madera monomorfa fibrosa en la etapa juvenil de los individuos, cuando aún no comienzan a florecer. Una vez que el individuo es lo suficientemente maduro para desarrollar el cefalio, el cámbium vascular cambia a producir madera no fibrosa: parenquimatosa de acuerdo con algunos trabajos (Mauseth y Plemons 1995, Terrazas y Mauseth 2002) o con TBAs de acuerdo a otros trabajos del mismo autor (Mauseth 1989, Mauseth 2006a). La composición de la madera en *M. intortus* revela una madera monomorfa en secciones transversales del cefalio, mientras que la porción superior de la parte juvenil muestra una madera dimorfa del tipo TBAs/Fibrosa, además, la madera de la base del tallo es trimorfa del tipo TBAs/Fibrosa/TBAs (Mauseth 1989, Mauseth 2006a). La amplitud y espaciado de los radios es uniforme en todas las fases; tienen células con paredes celulares delgadas no

lignificadas. Sin embargo, en *A. braunii* la fase fibrosa tiene radios altos, con células de paredes celulares gruesas y lignificadas (Mauseth y Plemons 1995).

Aunque aún se desconoce la significancia filogenética y adaptativa de la madera polimorfa, se ha propuesto que el cambio de un tipo de madera a otro dentro de un solo individuo podría tener consecuencias ecológicas (Mauseth y Plemons 1995).

### **Cambio de fase según la edad del cámbium vascular (variación longitudinal y radial)**

Para algunas especies, el cambio de un tipo de madera a otro parece estar relacionado con la edad del cámbium en cada área en particular. Por ejemplo, la madera de la base del tallo puede haber sufrido el cambio de fase, pero la parte superior del tallo puede continuar con la madera inicial (Terrazas y Mauseth 2002).

Como se mencionó anteriormente, en *Melocactus intortus* la parte superior del tallo, correspondiente al cefalio, presenta madera monomorfa exclusivamente con TBAs, mientras que en la parte basal del tallo se presenta una madera trimorfa consistiendo de TBAs cerca de la médula / fibrosa en la parte media / TBAs cerca del cámbium vascular (Mauseth 2006a). En *P. aurisetus* se observa un fenómeno contrario (Romero-Godofredo y Melo-de-Pinna 2008): la madera de la parte media del tallo está compuesta de una matriz fibrosa con elementos de vaso y parénquima paratraqueal muy escaso, mientras que la madera de la parte basal del tallo consiste de madera dimorfa (escasas TBAs cerca de la médula / abundantes fibras cerca del cámbium vascular). Este cambio en la sucesión de la madera de *P. aurisetus* es extraño tomando en cuenta que en otras especies la madera superior del tallo comúnmente presenta características más juveniles que la madera de la base, no obstante, es justificable si se toma en cuenta que el cámbium en la zona superior del tallo ha madurado más rápido, produciendo de manera precoz la madera fibrosa. Además, en las especies cuyos adultos normalmente tienen talla pequeña y madera con TBAs, los adultos muy grandes pueden producir eventualmente una madera fibrosa cuando son viejos, tal como en los individuos de *Echinocactus*, *Echinocereus*, *Echinopsis* y *Ferocactus* (Terrazas y Mauseth 2002, Reyes-Rivera 2010).

## **CORRELACIONES**

Como ya se mencionó anteriormente, la mayoría de los caracteres anatómicos de la madera no tienen correlación con la sistemática de Cactaceae, no obstante, se ha notado la correlación de algunas características morfológicas de los componentes de la madera con el hábito y la forma de crecimiento de las especies o con otras características anatómicas (Bailey 1961, Gibson 1973, Altesor *et al.* 1994, Terrazas y Loza-Cornejo 2003, Bernal-Salazar y Terrazas 2005, Reyes-Rivera 2010, Vázquez-Sánchez y Terrazas 2011).

### **Lignificación de radios y composición de cristales**

Inicialmente Bailey (1961) notó la correlación entre el grado de lignificación y el grosor de las paredes celulares en los radios, con la presencia y el tipo de cristales: las sales de calcio (arenas) a menudo están presentes en especies que tienen células con paredes celulares secundarias engrosadas y altamente lignificadas, mientras que las drusas se encuentran frecuentemente en especies con células de paredes celulares delgadas y no lignificadas (sólo algunas se observan raramente en las células lignificadas de algunas especies en *Dendrocereus* y *Leptocereus*). Sin embargo, Gibson (1973) sugirió que el uso de los cristales con fines sistemáticos debía ser empleado con cautela dentro de Cactoideae ya que dentro de una sola especie los cristales pueden estar presentes en una muestra pero ausentes en otra, no obstante, estos podrían ayudar a resolver controversias sistemáticas.

De manera general, se ha mostrado que, además de la forma de los cristales, su composición también varía de acuerdo a la subfamilia: en Pereskioideae, Maihuenioideae y Opuntioideae los cristales encontrados están compuestos principalmente de monohidrato oxalato de calcio (whewellita), mientras que en Cactoideae prevalece un oxalato de calcio en estado más hidratado (weddellita) (Monje y Baran 2002, 2009, Hartl *et al.* 2007, Frausto-Reyes *et al.* 2014, Bárcenas-Argüello *et al.* 2015).

### **Forma de crecimiento, lluvia y hábitat**

Aunque no se ha encontrado una relación evidente entre el hábitat o la cantidad de lluvia con las características de la madera, la disponibilidad de agua ha jugado un papel relevante en la evolución de formas dentro de la familia Cactaceae (Gibson 1973). Por ejemplo, Bailey (1944) observó que en las plantas de talla corta, que habitan en zonas

extremadamente xéricas, se da una reducción en la talla de las fusiformes iniciales del cámbium vascular. Por otro lado, Cornejo y Simpson (1997) reportaron que la disminución en la frecuencia de ramificación de los tallos en miembros de la tribu *Pachycereeae* está asociada a grandes cantidades de precipitación anual. Asimismo, Terrazas y Mauseth (2002) señalaron que otros factores correlacionados con la reducción de la ramificación de los tallos en Cactaceae podrían ser la reducción tanto del número de meristemos apicales como de la succulencia: las especies con ramas muy succulentas como *Carnegiea gigantea* tienden a desarrollar un número reducido de ramas y madera más lignificada en comparación con las especies no succulentas, como aquellas de *Pereskia*. Este fenómeno se ha relacionado con el peso de las ramas y el soporte que aporta la lignificación de la madera (ver [Capítulo 3](#)).

### **Alometría**

Diferentes autores han abordado las características morfo-anatómicas, tanto de los componentes celulares como de la madera en general, y su correlación con la talla y forma de crecimiento de los individuos (Gibson 1973, Gibson y Nobel 1986, Niklas y Buchman 1994, Altesor *et al.* 1994, Niklas *et al.* 1999, 2000, 2003, Arias y Terrazas 2001, Terrazas y Loza-Cornejo 2003, Bernal-Salazar y Terrazas 2005, Reyes-Rivera 2010, Vázquez-Sánchez y Terrazas 2011). De manera general se puede resumir que las especies de mayor talla tienen mayor acumulación de madera ([Cuadro 1](#)), y ésta, a su vez, se correlaciona con el grado de succulencia (Gibson 1973, Altesor *et al.* 1994, Niklas y Buchman 1994, Niklas 1999; 2000, Reyes-Rivera 2010, Vázquez-Sánchez y Terrazas 2011). Lo que indica que, aunque la tendencia general para todas las especies es aumentar la proporción de xilema a medida que crecen, algunas especies incrementan sus tejidos leñosos a una tasa significativamente más alta: en las especies altamente succulentas la proporción de madera aumenta lentamente en relación con el tamaño del tallo, mientras que en aquellas especies no succulentas la relación es inversamente proporcional (neotenia alométrica *sensu* Altesor *et al.* 1994).



**Cuadro 1.** Cantidad de xilema secundario en individuos adultos de Cactoideae con diferentes formas de crecimiento y grados de succulencia.

<b>Especie</b>	<b>Madera (cm)</b>	<b>Forma de crecimiento</b>	<b>Altura (m)</b>
<i>Coryphantha clavata</i>	0.4	Cilíndrica	0.18
<i>Ferocactus hamatacanthus</i>	2.1	Cilíndrica	0.45
<i>Echinocactus platyacanthus</i>	2.6	Columnar	1.15
<i>Ferocactus pilosus</i>	3.1	Columnar	0.8
<i>Pilosocereus chrysacanthus</i>	5.0	Arbórea	5.9

La cantidad de madera acumulada se expresa como el espesor del xilema secundario (cm) en sentido radial: desde la madera juvenil (cercana a la médula), hasta la madera madura (cercana al cambium vascular). Datos por Jorge Reyes.

### **Longitud celular**

De acuerdo con Gibson (1973), el diámetro y la longitud de las fibras en Cactaceae se correlacionan con las correspondientes dimensiones de los elementos de vaso porque ambos tipos celulares derivan de las fusiformes iniciales, sin embargo, Bailey y Srivastava (1962) observaron que las fibras de algunos géneros con hojas (*Pereskia*, *Peresklopsis* y *Quiabentia*) se alargan heterogéneamente por crecimiento intrusivo durante la diferenciación, por lo cual se vuelven más largas que las fusiformes de las cuales se originaron. Este efecto a veces dificulta demostrar la correlación entre la longitud de las fibras y el tamaño de la planta, como recientemente se observó en especies de la tribu Cactaeae (Vázquez-Sánchez y Terrazas 2011). No obstante, dentro de Cactoideae, Gibson (1973) y Gibson y Nobel (1986) identificaron una correlación entre la longitud de los vasos con la forma de crecimiento.

Los elementos de vaso se pueden considerar indicadores más constantes ya que, a diferencia de las fibras, la cantidad de crecimiento intrusivo que presentan es mínima (Chattaway 1936, Bierhorst y Zamora 1965, Esau 1972). En este sentido Gibson (1973) reconoció dos categorías de elementos de vaso de acuerdo a su longitud, mismas que se correlacionan con la forma de crecimiento de las especies dentro de Cactoideae: 1) los elementos de vaso largos (> 600  $\mu\text{m}$ ), presentes en especies arbóreas o arbustivas de talla grande con madera fibrosa, como las de *Carnegiea*, *Cephalocereus*, *Cereus* y *Pachycereus*, que a su vez, coinciden con aquellas de otras subfamilias como Pereskioideae y varias de Opuntioideae (Gibson 1973; 1978, Gibson y Nobel 1986, Arias y Terrazas 2001, León

2002, Terrazas y Loza-Cornejo 2003). Las especies dentro de esta categoría se caracterizan por tener también las fibras con las longitudes más grandes dentro de la familia, a menudo tienen diámetros amplios y paredes engrosadas; los vasos con punteaduras predominantemente alternas o escalariformes; los radios predominantemente lignificados (Gibson 1973; 1978, Arias y Terrazas 2001, Terrazas y Loza-Cornejo 2003). 2) los elementos de vaso muy cortos ( $< 125 \mu\text{m}$ ), los cuales se pueden encontrar en las especies de talla pequeña globosas o globosas-deprimidas, con madera no fibrosa, como aquellas de *Ariocarpus*, *Astrophytum*, *Coryphantha* y *Mammillaria* (Gibson 1973, Reyes-Rivera 2010, Vázquez-Sánchez y Terrazas 2011). La madera de estas especies se caracteriza por la predominancia de TBAs; fibras libriformes ausentes, o muy raras distribuidas en las partes más externas de la madera; los elementos de vaso son relativamente muy cortos y angostos, con paredes celulares primarias muy delgadas y engrosamientos secundarios helicoidales o anulares; radios no lignificados (Gibson 1973, Reyes-Rivera 2010, Vázquez-Sánchez y Terrazas 2011).

Entre las dos categorías anteriores se pueden mencionar los elementos de vaso medianos (150 - 500  $\mu\text{m}$ ). Estos no están correlacionados con la forma de crecimiento ya que pueden estar presentes en las especies columnares medianas, arbóreas, algunas epífitas y en especies con tallos cilíndricos, como aquellas de *Acanthocereus*, *Echinocactus*, *Ferocactus*, *Leptocereus*, *Neobuxbaumia* y *Stenocereus* (Gibson 1973, Terrazas y Loza-Cornejo 2003, Bernal-Salazar y Terrazas 2005, Reyes-Rivera 2010, Vázquez-Sánchez y Terrazas 2011). Sin embargo, la correlación con la altura de la planta es positiva de acuerdo a especies estudiadas pertenecientes a la tribu Cacteeae, donde la media de la longitud de los elementos de vaso (100 - 400  $\mu\text{m}$ ) corresponde al rango comprendido por los elementos de vaso medianos (Reyes-Rivera 2010, Vázquez-Sánchez y Terrazas 2011, Escamilla-Molina 2013).

### **Forma de crecimiento y lignificación de la madera**

Como se mencionó anteriormente, Gibson (1973) y Gibson y Nobel (1986) notaron que la longitud de los derivados del cámbium vascular, principalmente de las fibras, se correlacionaba con las dimensiones de la planta como consecuencia del soporte que dichas células lignificadas le brindan al tallo. Además, en un estudio previo habíamos descrito el

cambio del patrón de las paredes secundarias de los elementos de vaso conforme la maduración cambial en algunas especies con madera dimorfa de la tribu Cacteae (Reyes-Rivera 2010): en los estados tempranos del desarrollo de la madera, cuando presenta TBAs exclusivamente y los individuos son pequeños aún, las fibras son escasas o están ausentes, los elementos de vaso predominantes en *F. pilosus* y *E. platyacanthus* son menos lignificados (similares a los del protoxilema y a aquellos presentes en la madera de las especies pequeñas como *A. retusus* y *A. asterias*). En las etapas más avanzadas del desarrollo, cuando la madera cambia a ser fibrosa y el tallo tiene mayor tamaño, los elementos predominantes presentan paredes secundarias más desarrolladas con punteaduras escalariformes o pseudoescalariformes, y en algunos casos también se observan engrosamientos helicoidales en las paredes de las fibras (Fig. 1). Consecuentemente estudiamos la lignificación en trece especies de Cactaceae con diferentes formas de crecimiento incluyendo ambas especies dimorfas y encontramos que, además de la talla celular, la lignificación de los elementos de la madera en general está correlacionada con las formas de crecimiento y el tamaño del tallo dentro de Cactaceae como consecuencia de la resistencia mecánica que confieren al tallo (ver *Capítulo 3*).

## Capítulo 3

### **SOBRETIRO DE ARTÍCULO PUBLICADO.**

#### **Wood Chemical Composition in Species of Cactaceae: The Relationship between Lignification and Stem Morphology.**

**Reyes-Rivera Jorge**, Canché-Escamilla Gonzalo, Soto-Hernández R. Marcos, Terrazas Teresa.

16 de Abril, 2015

[PLoS ONE 10\(4\): e0123919. DOI: 10.1371/journal.pone.0123919](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123919)

RESEARCH ARTICLE

# Wood Chemical Composition in Species of Cactaceae: The Relationship between Lignification and Stem Morphology

Jorge Reyes-Rivera<sup>1</sup>✉, Gonzalo Canché-Escamilla<sup>2‡</sup>, Marcos Soto-Hernández<sup>3‡</sup>, Teresa Terrazas<sup>1</sup>✉\*

**1** Departamento de Botánica, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico, **2** Unidad de Materiales, Centro de Investigación Científica de Yucatán, Mérida, Yucatán, Mexico, **3** Programa de Botánica, Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas, Montecillo, Estado de México, Mexico

✉ These authors contributed equally to this work.

‡ These authors also contributed equally to this work.

\* [terrazas@ib.unam.mx](mailto:terrazas@ib.unam.mx)



OPEN ACCESS

**Citation:** Reyes-Rivera J, Canché-Escamilla G, Soto-Hernández M, Terrazas T (2015) Wood Chemical Composition in Species of Cactaceae: The Relationship between Lignification and Stem Morphology. PLoS ONE 10(4): e0123919. doi:10.1371/journal.pone.0123919

**Academic Editor:** Haibing Yang, Purdue University, UNITED STATES

**Received:** August 29, 2014

**Accepted:** March 9, 2015

**Published:** April 16, 2015

**Copyright:** © 2015 Reyes-Rivera et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

**Funding:** The authors received funding from Project IN209012 Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, DGAPA, Universidad Nacional Autónoma de México TT and CONACYT (220343) to JRR. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

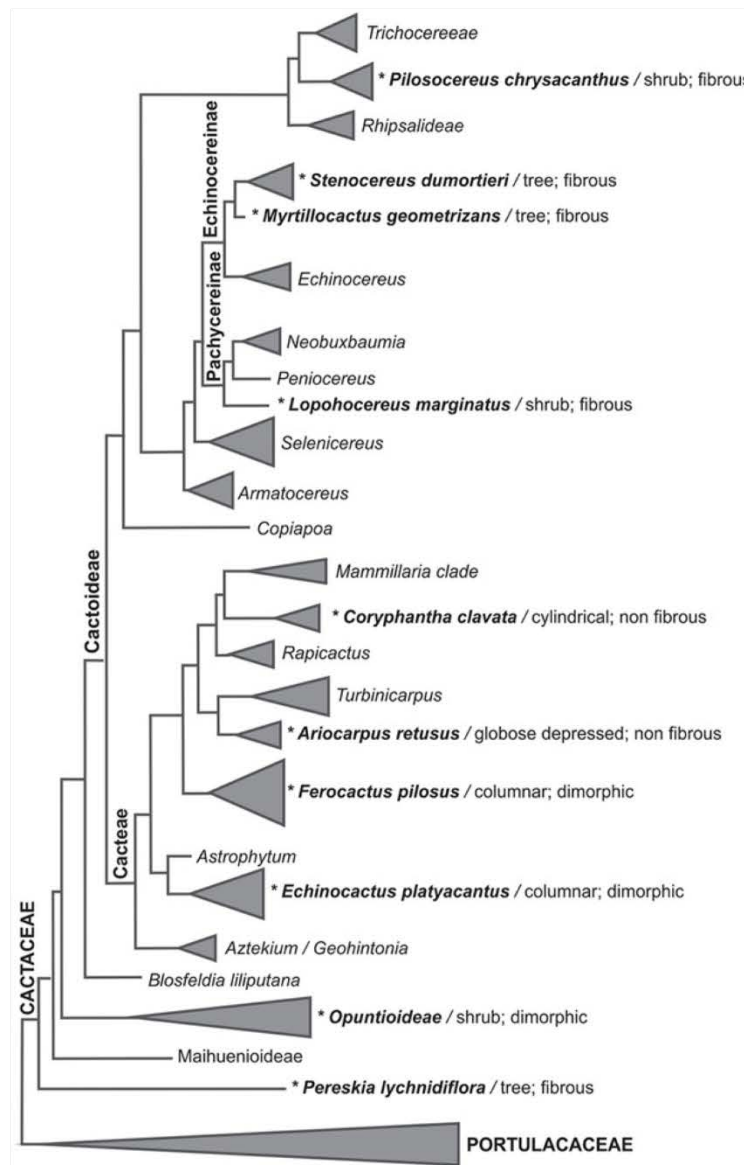
**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

## Abstract

In Cactaceae, wood anatomy is related to stem morphology in terms of the conferred support. In species of cacti with dimorphic wood, a unique process occurs in which the cambium stops producing wide-band tracheids (WBTs) and produces fibers; this is associated with the aging of individuals and increases in size. Stem support and lignification have only been studied in fibrous tree-like species, and studies in species with WBTs or dimorphic wood are lacking. In this study, we approach this process with a chemical focus, emphasizing the role of wood lignification. We hypothesized that the degree of wood lignification in Cactaceae increases with height of the species and that its chemical composition varies with wood anatomy. To test this, we studied the chemical composition (cellulose, hemicellulose, and lignin content) in 13 species (2 WBTs wood, 3 dimorphic, and 8 fibrous) with contrasting growth forms. We also analyzed lignification in dimorphic and fibrous species to determine the chemical features of WBTs and fibers and their relationship with stem support. The lignin contents were characterized by Fourier transform infrared spectroscopy and high performance liquid chromatography. We found that 11 species have a higher percentage (>35%) of lignin in their wood than other angiosperms or gymnosperms. The lignin chemical composition in fibrous species is similar to that of other dicots, but it is markedly heterogeneous in non-fibrous species where WBTs are abundant. The lignification in WBTs is associated with the resistance to high water pressure within cells rather than the contribution to mechanical support. Dimorphic wood species are usually richer in syringyl lignin, and tree-like species with lignified rays have more guaiacyl lignin. The results suggest that wood anatomy and lignin distribution play an important role in the chemical composition of wood, and further research is needed at the cellular level.

### Introduction

Within angiosperms, the Cactaceae family is one of the most variable in terms of morphology and stem size, and this diversity is correlated with the anatomical features of the wood (Fig 1). Members of Cactaceae have both fibrous and non-fibrous wood [1] and are also dimorphic in the Cactoideae subfamily [2]. Cactaceae have tree-like species (hereafter called taller species) that are primarily fibrous, as observed in *Pereskia lychnidiflora* A.P. de Candolle, *Stenocereus*



**Fig 1. Phylogeny of Cactaceae.** Asterisks indicate the analyzed species, which represent from the early derived taxa to the more derived ones, the different stem morphologies (tree, shrub, columnar, cylindrical, globose depressed) and the types of wood (fibrous, non fibrous, dimorphic). Topology based on and modified from references [58], [59].

doi:10.1371/journal.pone.0123919.g001

*dumortieri* (Scheidw.) Backeb., and *Opuntia streptacantha* Lemaire. The cylindrical, globose or globose-depressed species (hereafter called smaller species) have wood with abundant wide-band tracheids (WBTs) or with few fibers and parenchyma, such as *Coryphantha clavata* (Scheidw.) Backeb., as well as others with dimorphic wood (the change from WBTs to fibers as the predominant cell type) in medium-sized species such as *Echinocactus platyacanthus* Link & Otto and *Ferocactus histrix* (DC.) G.E. Linds. [3], [4].

The wood anatomy in Cactaceae is well documented, and several authors have noted a positive correlation between the characteristics of the wood (e.g., length and diameter of the fibers or vessel elements) and the plant morphology in terms of the support required to support the stem [4]–[8]. In some species of Cactaceae, the traits of secondary xylem and the cell types present in the wood vary with the size of the species [9]. WBTs play a key role in the biology of cacti because these specialized cells occur in almost all species and may or may not persist through the life of the plant: in species with dimorphic wood, the vascular cambium stops producing WBTs and produces fibers. This is a unique process to cacti and is related to the aging of individuals and the improvement of stem support [10], [11]. It is important to note that these cells are structurally different from tracheids or fiber-tracheids of other lineages because WBTs have thin primary walls and annular or helical secondary walls that project deeply into the tracheid lumen. It remains unknown if the chemical features of the wood in species with an abundance of WBTs or with dimorphic wood are similar to those of the fibrous species and if these are related to the stem morphology.

In recent years, studies have focused on the wood chemical composition of economically important species, and it is well documented that properties such as strength, rigidity and defense are principally enhanced by the lignin of the secondary cell walls and the anatomical features of the wood [12], [13]. In addition, previous studies have shown that the percentage and composition of lignin vary across different plant groups (i.e., 19–24% in angiosperms; 27–33% in gymnosperms) [14]–[17]. In dicots, lignin is usually composed of moieties of guaiacyl (G) and syringyl (S); in monocots, lignin also occurs as *p*-hydroxyphenyl (H) units. Lignin in gymnosperms and pteridophytes is richer in guaiacyl [13], [14], [18]. Similarly, the topochemical distribution of lignin in the wood varies with cell type. Previous research has shown that the fibers are richer in syringyl lignin (S), whereas guaiacyl lignin (G) is more concentrated in the secondary walls of vessels [19]–[21]. However, the variation in the lignification of the wood is influenced by anatomical characteristics. For example, the woody angiosperms have fibers, vessels and parenchyma and contain less lignin than gymnosperms whose wood contains only tracheids and scarce parenchyma [22], [23]. Because tracheids and fibers constitute the majority of wood cells in gymnosperms and angiosperms, respectively, they provide a significant contribution to the physical and chemical properties of the wood and stems [23]. However, the role of lignification in the support of the stem within Cactaceae is not currently well understood because most species develop WBTs that differ structurally from cells present in other lineages; to date, these WBTs have not been chemically analyzed. Here, we study the relationship between stem support and wood anatomy in Cactaceae with a chemical focus, emphasizing the role of wood lignification.

We hypothesized that the degree of wood lignification increases with the height of the species and that its chemical composition varies according to the anatomical characteristics of the wood in terms of the abundance of WBTs or fibers. To test this, we quantified the chemical components of wood in thirteen species of Cactaceae with different sizes and different growth forms. We characterized the lignin by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and high performance liquid chromatography (HPLC) and determined whether the percentage of lignin is related to the abundance of a specific cell type or stem morphology.

## Materials and Methods

We studied the chemical composition of wood in adult plants with contrasting growth forms belonging to thirteen species from three subfamilies of Cactaceae (Fig 1), representing from the early derived taxa to the more recent derived ones. According to the literature there is intraspecific variation in the chemical composition of wood [12]–[14], but it tends to be higher between taxa. We therefore evaluated interspecific variation with a reduce number of samples per species. Furthermore, a global analysis of wood details its chemical composition in species where the percentage of wood-forming cells is above 80% [23]. Within Cactaceae, wood anatomy in adults of the same species is very consistent [2], [3], [7], [12], [24]; therefore, the chemical composition is expected to be very similar.

In all species, the vascular cylinder was isolated, and the wood near the root (lower wood) was selected for chemical analyses because it has a greater accumulation of wood, as has been demonstrated for other cacti [4], [7], [8], [24]. For most taxa, we followed standard protocols to make transverse sections using the sliding microtome [7], [24]. For two species, *Ariocarpus retusus* and *Coryphantha clavata*, wood was embedded in paraffin according to the procedure of Loza-Cornejo and Terrazas [8]. All sections were double-stained with safranin-fast-green [8], to clearly differentiate the primary and secondary walls. In two dimorphic species (*E. platyacanthus* and *F. pilosus*), we examined the lignification in the radial and longitudinal directions to determine whether there was variation related to the different regions of the stem or the cell types within the wood. We separated the region near the pith and the region near the vascular cambium from the lower wood and analyzed them separately; we also analyzed the wood near the apex of the stem (upper wood). Because the wood is accumulated over the life of individuals to form the vascular cylinder, both the juvenile and adult stages of each individual are chronologically represented in the lower wood: the juvenile and mature wood is found closer to the pith and near the vascular cambium, respectively, *sensu* Panshin & De Zeeuw [25]. Similarly, the upper wood can be considered as a juvenile progression of maturity states [26]. Therefore, the lignification in the juvenile lower wood and mature lower wood represents the transition from WBTs to fibers in species with dimorphic wood, and the lignification of the upper and lower wood represents the juvenile and mature stages in fibrous species, respectively. Table 1 contains the morphological details and the wood regions sampled (i.e., upper, lower, juvenile and mature wood) for each species.

The wood samples (the whole cylinder for *A. retusus* and *C. clavata* and only the region near the vascular cambium in the other species) were air-dried for one week and subsequently oven-dried at 50°C for 48 h. Wood chips from samples of each individual were obtained, oven-dried, and ground into sawdust using a Willey mill with a 40–60 mesh size. The sawdust samples (2 g for triplicate, see S1 Dataset for details and number of replicates) were subjected to sequential Soxhlet extraction with benzene-ethanol (2:1), ethanol (96%) and distilled water [27]. The extractive-free fraction was used for chemical composition analysis [28], [29].

## Klason lignin analysis/FTIR

The isolation of acid-insoluble lignin was performed according to the TAPPI Standard T 222 om-02 [28]. The extractive-free wood (0.25 g) was treated with a solution of 72% sulfuric acid (3.5 mL) at 18°C by 2 h, then diluted with distilled water (140 mL) and boiled for 4 h at a constant volume. Lignin was separated using a filtration funnel (fine) and oven-dried at 105 ± 3°C until reaching a constant weight. IR spectra of lignins were obtained from a Nicolet Protege 460 FTIR Spectrometer (Thermo Scientific, San Jose, CA, USA), following previously published protocols [27], [30], [31]. MID-IR spectra of lignin samples (5% (w/w) lignin in KBr)



**Table 1. Characteristics of individuals studied from thirteen species of Cactaceae, the regions of wood that were studied are indicated.**

Individuals	Species	Height (m)	Wood Type	Stem	Region of wood	Category by size
2	<i>Ariocarpus retusus</i>	0.10 and 0.18	Non fibrous (WBT)	Depressed globose (T)	LW	Small
2	<i>Coryphantha clavata</i>	0.18 and 0.23	Non fibrous (WBT)	Cylindrical (T)	LW	Small
3	<i>Echinocactus platyacanthus</i>	0.26, 0.38 and 1.5	Dimorphic (transition*)	Columnar (R)	LWc,LWp and UW	Medium
1	<i>Ferocactus hamatacanthus</i>	0.7	Dimorphic	Cylindrical (TR)	LWc and UW	Medium
2	<i>Ferocactus pilosus</i>	0.36 and 0.63	Dimorphic (transition*)	Columnar (R)	LWc,LWp and UW	Medium
1	<i>Cylindropuntia imbricata</i>	3	Fibrous	Tree	LWc	Tall
1	<i>Lophocereus marginatus</i>	4.1	Fibrous	Tree (R)	LWc	Tall
2	<i>Myrtillocactus geometrizans</i>	2.7 and 4	Fibrous	Tree	LWc and UW	Tall
1	<i>Opuntia streptacantha</i>	5	Fibrous	Tree	LWc	Tall
2	<i>Pereskia lychnidiflora</i>	4	Fibrous	Tree	LWc, UW	Tall
1	<i>Pilosocereus alensis</i>	1.5	Fibrous	Columnar (R)	LWc	Medium
1	<i>Pilosocereus chrysacanthus</i>	5.9	Fibrous	Tree (R)	LWc	Tall
2	<i>Stenocereus dumortieri</i>	3.8 and 4.5	Fibrous	Tree (R)	LWc and UW	Tall

**Abbreviations.** Tuberculated (T), ribbed (R), tuberculated ribs (TR). Lower wood (LW): near to the vascular cambium (LWc), near to the pith (LWp). Upper wood (UW).

\* In these dimorphic species occurs a change from WBTs wood in juvenile stages to fibrous wood in the mature ones.

doi:10.1371/journal.pone.0123919.t001

were recorded between 400 and 4000  $\text{cm}^{-1}$  at a resolution of 4  $\text{cm}^{-1}$  [27]. Fifty spectra were averaged per sample and analyzed using the OMNIC 5.1 software (Thermo Scientific).

### Determination of the S/G ratio by nitrobenzene oxidation/HPLC

The determination of the S/G ratio of each extractive-free wood sample was obtained by nitrobenzene oxidation according to Nunes et al. [29]. Approximately 0.2 g (oven-dried) of each wood sample together with NaOH aqueous solution (7 mL; 2 mol  $\text{L}^{-1}$ ) and nitrobenzene (0.5 mL) was loaded into a stainless steel reactor and heated to 170°C for 2.5 h; the procedure was repeated twice. The oxidized material was then extracted with chloroform (6 x 30 mL). After the first extraction, HCl was added (2.5 mL; 4 mol  $\text{L}^{-1}$ ) to the aqueous phase. The combined organic phases were concentrated with a Buchi R-114 evaporator at 40°C. The sample was transferred to a 50 mL volumetric flask and the final volume was reached using an acetonitrile/water solution (1:1 v/v). The solution was filtered in a regenerated cellulose membrane with a pore size of 0.45  $\mu\text{m}$ . Next, this solution was analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC) in an Agilent 1100 apparatus equipped with a variable wavelength detector G1314A with standard flow cell operating at a 280 nm wavelength, a G1310A isocratic pump and a G1328A manual injector with a Lichrosorb RP-18 (250 x 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) reverse phase analytical column. The mobile phase was composed of acetonitrile/water (14:86 v/v), and the pH was adjusted to 2.6 with a trifluoroacetic acid (TFA) buffer. The column temperature was kept at 40°C, and a mobile phase flow of 1.5 mL  $\text{min}^{-1}$  was used. Vanillin and syringaldehyde standards (Aldrich, Milwaukee, WI, USA) were used for the quantification of the guaiacyl and syringyl unit derivatives, respectively. Calibration curves using vanillin and syringaldehyde standards were obtained in the concentrations of 0.375, 0.75, 1.125, and 1.5 mmol  $\text{L}^{-1}$  for vanillin, and 0.825, 1.65, 2.475, and 3.3 mmol  $\text{L}^{-1}$  for syringaldehyde. The solutions were prepared in an acetonitrile/water mixture (1:1 v/v) at a pH of 2.6. The S/G ratio was calculated

considering the yield suggested by Ohra-ahoa et al. [32], assuming that approximately 30% of the condensed guaiacyl units are converted to vanillin and that 90% of the syringyl units are converted to syringaldehyde due to its low proportion of condensation.

### Content of cell wall carbohydrates

Cellulose and hemicellulose were quantified following the method of Donnelly [33]. Glacial acetic acid (0.05 mL) and sodium chlorite (0.15 g) were added to a mixture of extractive-free milled wood (1 g) and water (14 mL) at 74°C with constant stirring. Carbon dioxide was bubbled through the mixture, and the addition of acetic acid and sodium chlorite was repeated every 15 min for a total of four additions. After 1 h, the mixture was cooled to room temperature, filtered through a medium pore filter, and washed with water until free of acid; lastly, the holocellulose was washed with acetone.

### Isolation of hemicellulose A

Holocellulose (0.60 g) was extracted with 10% potassium hydroxide (10 mL) by stirring overnight in an atmosphere of nitrogen; the extract was then filtered on a filter cloth and washed with water. The clear filtrate was adjusted to a pH of 5.0 with a 50% acetic acid solution and refrigerated overnight. Hemicellulose A was collected by centrifugation, and the supernatant liquid was removed and saved for isolation of hemicellulose B. The hemicellulose A was washed with water three times, suspended in water and freeze-dried. The alkali solubilization and reprecipitation of hemicellulose A was repeated twice. The final product was a white amorphous powder.

### Isolation of hemicellulose B

The supernatant liquid obtained in the separation of the HA was poured into three times its volume of 95% ethanol under stirring. The precipitate was collected as described for the hemicellulose A, except that the product was washed with 95% ethanol. The lyophilized product was reprecipitated twice by redissolving in alkali, adjusting the pH to 5.0 with 50% acetic acid, and precipitating with 95% ethanol.

The total hemicellulose (TH) was calculated by the sum of both yields ( $TH = HA + HB$ ). The yield of cellulose (Ce) was obtained by subtracting the total hemicellulose from the holocellulose obtained initially, expressed as (Ho) ( $Ce = Ho - TH$ ).

The wood chemical composition is shown in total percentage (% w/w). After each chemical analysis, the chemical composition of three replicates per sample of the lower wood was averaged; the standard deviation was within 10% of the mean in all cases (Table 2; S1 Dataset). Spearman's correlation analysis was performed to detect associations between the different variables: lignin content, plant size and S/G ratio.

## Results and Discussion

### Lignification variation between species of different sizes

As previously hypothesized, the lignin content was variable between species: it was similar within small species but was lower than the taller species (Table 2). Statistical analyses revealed an association between plant size and lignin content ( $r_s = 0.505$ ,  $P < 0.005$ ). Small species, with a predominance of WBTs, had low lignin content (13.7% in *A. retusus* and 14.2% in *C. clavata*); this result is lower than has been reported for other angiosperms reported previously, such as white birch (*Betula papyrifera*, 19%). Species with a predominance of fibers had a much higher percentage of lignin than has been reported from other angiosperms and gymnosperms [23].

**Table 2. Chemical composition of lower wood in mature individuals of thirteen species of Cactaceae.**

Species	Category by size	Wood type	Extractives	Lignin			Cellulose	Hemicelluloses	
				%	Syringyl	Guaiacyl			Ratio S/G
<i>Ariocarpus retusus</i>	Small	WBT	39.4	13.7	52	48	1.1	31	15.9
<i>Coryphantha clavata</i>	Small	WBT	22.7	14.2	80	20	3.9	41.7	21.4
<i>Echinocactus platyacanthus</i> *	Medium	Dimorphic	15.7	51.8	40	60	0.7	22	10.5
<i>Ferocactus hamatacanthus</i>	Medium	Dimorphic	28.6	54.4	92	8	11.7	12.2	4.8
<i>Ferocactus pilosus</i> *	Medium	Dimorphic	24.2	49.8	78	22	3.5	17.4	8.6
<i>Cylindropuntia imbricata</i>	Tall	Fibrous	12.4	51.3	30	70	0.4	23.8	12.6
<i>Lophocereus marginatus</i>	Tall	Fibrous	11.1	49.9	51	49	1.1	25.5	13.5
<i>Myrtillocactus geometrizans</i>	Tall	Fibrous	11.6	56.3	38	62	0.6	21	11.1
<i>Opuntia streptacantha</i>	Tall	Fibrous	28	45.1	53	47	1.1	17.6	9.3
<i>Pereskia lychnidiflora</i>	Tall	Fibrous	11.4	36	48	52	0.9	34.4	18.2
<i>Pilosocereus alensis</i>	Tall	Fibrous	20.6	53.1	57	43	1.3	17.2	9.1
<i>Pilosocereus chrysacanthus</i>	Tall	Fibrous	7.7	56.8	30	70	0.4	23.2	12.3
<i>Stenocereus dumortieri</i>	Tall	Fibrous	24.6	39.4	25	75	0.3	23.6	12.5

The contents are reported in the total dry weight percent (% w/w). The standard deviation in each case was less than 10% on average.

(S1 Table, S3 Dataset. Supporting information for the S/G ratios)

\* Species where the content of lignin in the lower wood was different between adult individuals, the difference in the lignin content in adults of *F. pilosus* was ≈ 19% and in *E. platyacanthus* was ≈ 23%, the other components of the wood vary proportionately. Moreover, in these dimorphic species occurs a change from WBTs wood in juvenile stages to fibrous wood in the mature ones.

doi:10.1371/journal.pone.0123919.t002

For example, the lignin percentage was 36–56.8% in the fibrous and dimorphic species in Cactaceae, compared with 24% in red maple (*Acer rubrum*) or 33% in canadian hemlock (*Tsuga canadensis*). The extent lignification in wood of Cactaceae confers a high chemical and mechanical resistance despite the lesser accumulation of wood relative to other woody plants. This is interpreted as a strategy related to the succulence and robustness of the stems. The lignin confers resistance to chemical degradation by fungi [34], [35] and provides the structural rigidity needed to the stem upright. It also provides resistance to the cell wall that counters the negative pressures generated in the conductive elements during transpiration [18], [36].

The lignin content of smaller species was similar to that of the lower wood from juvenile individuals of medium species (i.e., 13.7% and 9.7% in the lower wood of one adult of *A. retusus* and one juvenile of *E. platyacanthus*, respectively). The adult wood of *A. retusus* and the juvenile wood of *E. platyacanthus* are non fibrous with vessels in a matrix of WBTs. In smaller cacti, completely lignified cell walls are not needed because the turgor pressure plays a key role in supporting their stem [1]-[3], [10], [37], [38]. Thus, the low content of lignin, concentrated in the helical or annular thickenings of WBTs, is enough to ensure the integrity of cells under high turgor pressures and to confer flexibility and strength to the wood due to the expansion-contraction processes during long periods of water stress.

### Variation in individuals of different sizes belonging to the same species

In *E. platyacanthus*, we found that the proportion of lignin in the lower wood increased with the size of the individuals (26 cm = 9.7%, 38 cm = 28.8%, and 150 cm = 51.8%). Part of this drastic change in lignin content is associated with changes of wood as individuals increase in size. In species with dimorphic wood, such as *E. platyacanthus* and *F. pilosus*, a change occurs in the dominant cell type during the juvenile and adult stages: in the first stage there is predominance of WBTs and in the last stage the fibers are dominant; this change has been associated

with the increase in size accompanying plant aging [39]. The lower lignin content in smaller individuals compared with the largest individuals in the same species shows that the increase in lignification with the age/size of individuals is associated with the change from WBTs to fibers. This property is characteristic of some Cactaceae species with dimorphic wood [1], [2], [10], [39].

### Juvenile/mature wood and longitudinal variation

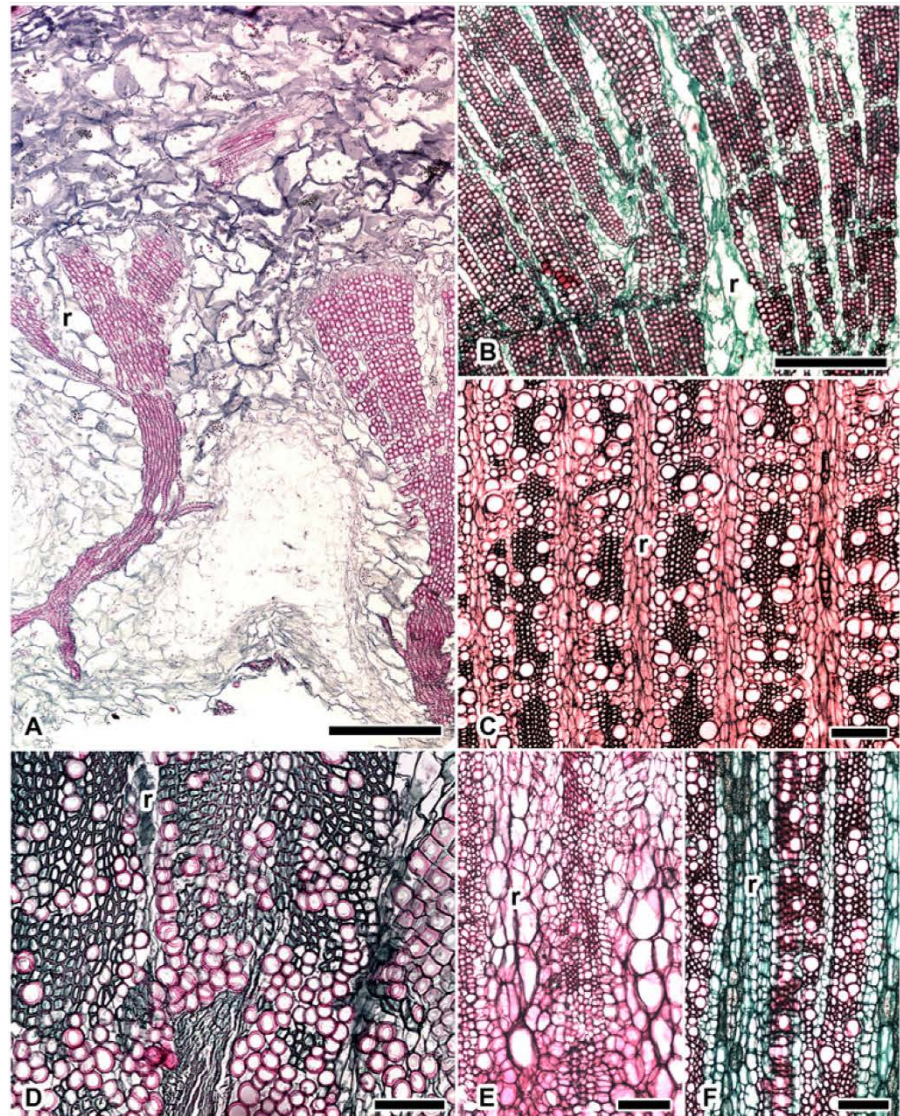
As previously mentioned, the transition from WBTs to fibers was studied in *E. platyacanthus* and *F. pilosus* because the change has been linked to development and morphology. We found a higher percentage of lignin in the mature lower wood compared with the juvenile lower wood (i.e., 28.8% and 49.8% in fibrous wood near the vascular cambium and 11.2% and 12.0% (from [S1 Dataset](#)), near the pith where WBTs are abundant). These results, in addition to the increase in lignification with the size/age of individuals, confirm that the change from WBTs to fibers occurs to enhance the stem support. The abundance of WBTs during the juvenile stages of dimorphic species, in addition to the turgor pressure, contributes to the loss of wood lignification.

Lower wood, which supports more weight, was more lignified than the upper wood in all cases. The difference between the values from the lower wood ([Table 2](#)) and those from the upper wood ([S1 Dataset](#)) were 3.6% in *P. lychnidiflora*, 11.2% in *M. geometrizans*, 17.9% in *S. dumortieri*, 36.4% in *E. platyacanthus*, 41.5% in *F. hamatacanthus*, and 44.1% in *F. pilosus*. Gibson [3] and Niklas et al. [6] have noted that the increase in the length or diameter of the fibers in the lower stems of species such as *M. geometrizans* and *P. pringlei* provides greater support for the heavy and succulent tissues of the branches. In the present study, we found that, in addition to the increase in cell size, the degree of lignification also increased in the lower wood. However, in taller fibrous species with non-succulent branches, such as *P. lychnidiflora*, the lignification of the lower wood was not necessarily as high as in other tree-like cacti with fibrous wood and succulent branches.

### Lignification and wood anatomy

Most of the species with an abundance of WBTs ([Fig 2](#)) were less lignified than the fibrous species ([Table 2](#)). However, in *F. hamatacanthus*, the lignin content was similar to that of fibrous tree-like species with succulent stems (e.g., *M. geometrizans* and *P. chrysacanthus*) and greater than that in fibrous tree-like species with non-succulent stems such as *P. lychnidiflora* ([Fig 3E](#)). One explanation can be found in the wood anatomy: *F. hamatacanthus* has a cylindrical stem with tuberculate ribs, the epidermis is very soft and the wood has patches of fibers interspersed in a matrix of WBTs ([Fig 2D](#)). These features offer little support to the stem, suggesting that high lignification in *F. hamatacanthus* could be a strategy to largely absorb the body weight of the vascular cylinder. However, *P. lychnidiflora* has a tree-like growth form with very fibrous wood ([Fig 3E](#)), little cortical tissue, and non-succulent branches, i.e., the weight-bearing ability of the base of the stem is minor compared to that of other species with succulent branches. Therefore, the rigidity of the wood in non-succulent species is more favored by the volume of the support tissue (in terms of the amount of wood) than by the degree of lignification. This is in contrast to what occurs in species of cacti with succulent branches, in which the lignification, in addition to the amount of wood, confers stiffness to the stems [6].

In addition to the anatomical features of wood, stem morphological traits also appear to contribute to the support of the individual. For example, in species such as *E. platyacanthus*, the wood is mildly lignified due to the predominance of fibers, the numerous ribs, and the thickness of the epidermis; further, the extremely hard periderm confers stiffness and general support to the individuals similar to that of other cacti species with ribs [40]–[42].



**Fig 2. Non fibrous wood in species of Cactaeae, cross sections near the vascular cambium.** (A) *Ariocarpus retusus*: less lignified wood with vessels embedded in a matrix of WBTs separated by non lignified dilated rays; (B) *Coryphantha clavata*: wood with vessels embedded in a matrix of WBTs and narrow non lignified rays; (C) *Echinocactus platyacanthus*: wood with vessels embedded in a matrix of fibers and axial parenchyma with wider lignified rays; (D) *Ferocactus hamatacanthus*: wood with vessels embedded in a matrix of WBTs and fibers in similar proportions and a few narrow non lignified rays; (E) *Ferocactus pilosus*: wood with vessels embedded in a matrix of WBTs and lignified rays near the pith; (F) *Ferocactus pilosus*: wood with vessels embedded in a matrix of fibers and non lignified rays near the vascular cambium. Bar is 550  $\mu\text{m}$  in A, B; 200  $\mu\text{m}$  in C, E, F; 100  $\mu\text{m}$  in D; r = ray.

doi:10.1371/journal.pone.0123919.g002

## Wood anatomy and chemical composition of lignin relationship

**Characterization of lignin by FTIR.** Bands previously assigned to guaiacyl (1030, 1285, 2930  $\text{cm}^{-1}$ ) and syringyl (1225 and 1325  $\text{cm}^{-1}$ ) lignins were observed in the FTIR spectra of Cactaceae (for references see Table 3). The bands in fibrous woods showed a uniform pattern;



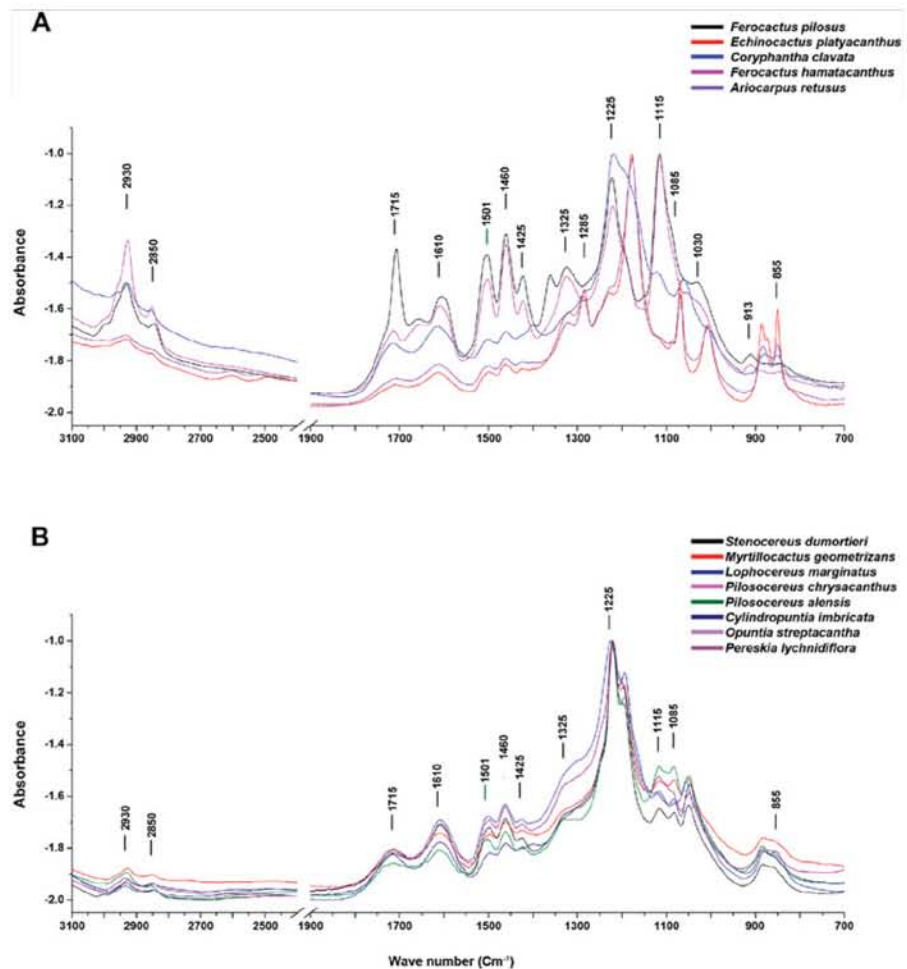
**Fig 3. Fibrous wood in species of Cactaceae, cross sections, near the vascular cambium.** Vessels embedded in a matrix of fibers with lignified rays except *Opuntia streptacantha*. (A) *Cyndropuntia imbricata*; (B) *Lophocereus marginatus*; (C) *Myrtillocactus geometrizans*; (D) *Opuntia streptacantha*: wood with vessels embedded in a matrix of fiber or parenchyma with intermixed WBTs and non lignified rays; (E) *Pereskia lychnidiflora*; (F) *Stenocereus dumortieri*. Bar is 200  $\mu\text{m}$ ; r = ray.

doi:10.1371/journal.pone.0123919.g003

**Table 3. Assignment of FTIR absorption bands in wood lignins.**

Wave number ( $\text{cm}^{-1}$ )	Assignments	References
2,930	CH <sub>2</sub> asymmetric vibration (guaiacyl-syringyl)	[30], [31]
2,850	C-H stretching in methyl and methylene groups	[43]
1,715	Carbonyl stretching in conjugated ketone and conjugated carboxylic groups	[43], [44]
1,610	C = C aromatic ring vibration	[43]
1,501	C = C aromatic ring vibration (guaiacyl-syringyl)	[30], [31]
1,460	C-H asymmetric deformation	[44], [45]
1,425	Aromatic skeletal vibrations	[43]
1,325	Syringil ring breathing with C-O stretching	[45], [46]
1,285	C-O and glucopyranosic cycle guaiacylic symmetric vibration	[30]
1,225	C-O and glucopyranosic cycle syringilic symmetric vibration	[30]
1,115	C-O-C stretching and symmetric vibration of the ester linkage	[47]
1,085	C-O deformation in secondary alcohol and aliphatic ether	[43]
1,030	C-H in-plane deformation in guaiacyl and C-O deformation in primary alcohol	[48], [43]
913	= CH out-of-plane deformation in aromatic ring (guaiacylic-syringylic).	[31]
855	Aromatic C-H out-of-plane deformation	[43], [45]

doi:10.1371/journal.pone.0123919.t003



**Fig 4. FTIR spectra of lignin in the lower wood of thirteen species of Cactaceae.** (A) non fibrous species and dimorphic species belonging to the Cactaceae tribe, showing varied lignin spectra; (B) fibrous species belonging from the early derived taxa to the more derived ones showing a highly conserved lignin spectra pattern. (S2 Dataset shows FTIR spectra matrix).

doi:10.1371/journal.pone.0123919.g004

however, in dimorphic and non-fibrous woods the patterns were variable (Fig 4). The band at  $1285\text{ cm}^{-1}$ , assigned to the aromatic ring guaiacyl, was observed as a noticeable peak in two species (*A. retusus* and *E. platyacanthus*). Similarly, a shoulder at  $1030\text{ cm}^{-1}$ , assigned to in-plane deformation of C-H (guaiacyl), was observed in both *Ferocactus* species, whereas it was absent in the remaining species. The intensity of the peak found at  $2930\text{ cm}^{-1}$ , indicating the asymmetric vibration of  $\text{CH}_2$  (guaiacyl-syringyl), was higher in both *Ferocactus* species and *C. clavata*, whereas it was lower in the other species. The band at  $1325\text{ cm}^{-1}$ , assigned to syringyl lignin, was observed as a peak in Cactaceae species except in *C. clavata*, in which it was observed as a shoulder similar to that in the fibrous species. The major peak at  $1225\text{ cm}^{-1}$ , assigned to the symmetric vibration of glucopiranosic ring (syringyl), was well defined in most species except for *E. platyacanthus* and *A. retusus*.

The heterogeneity of lignin composition in Cactaceae can be attributed to the variability of its anatomical features (Fig 2). These species may have dimorphic wood in which a transition

occurs from WBTs to fibers or a unique combination of cell types. Changes within species can occur in different ways: a) an abrupt change in the early stages of development, such as in *E. platyacanthus*; b) a gradual change including more advanced stages, such as in *F. pilosus*; c) a persistent change resulting in a combination of both cell types throughout the life of individuals, such as in *F. hamatacanthus*; or d) the rare occurrence of fibers scattered in the matrix of WBTs or in the fascicle margins as in *C. clavata*. The last are difficult to see in cross sections and can only be clearly detected in macerated wood [9]. By contrast, the fibrous woods, in which the WBTs are absent (Fig 3), had a homogeneous composition similar to that reported in other typical woody dicots [21], [30], [31], [43], [46]. This indicates that a high abundance of fibers in the wood of Cactaceae induces a chemical composition similar to that from other woody lineages, independent of their phylogenetic position. Furthermore, the presence of WBTs in dimorphic wood modifies its global composition at different levels. Thus, it would be expected that other cacti with dimorphic woods and a predominance of WBTs would have a heterogeneous chemical composition, such as in members of Cactaceae, and that species with highly fibrous woods would have patterns typical of other woody trees.

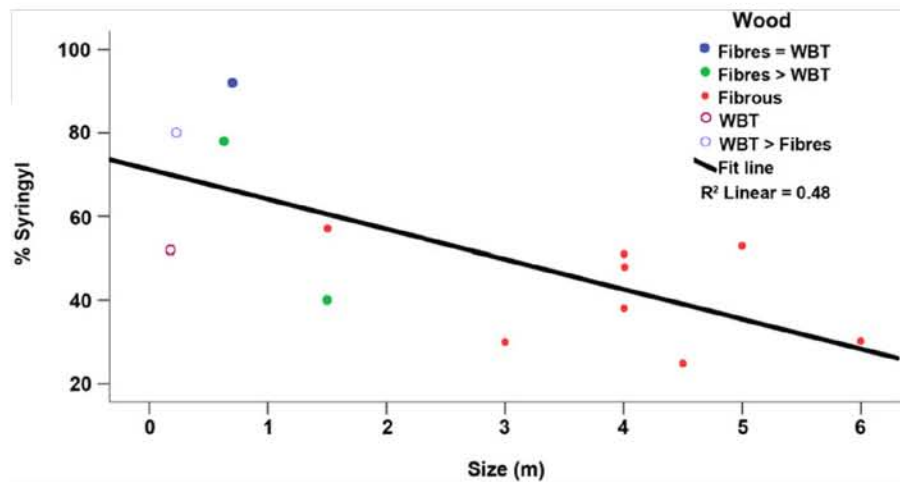
Variation in the lignin composition of species with dimorphic wood corresponds mainly to the bands associated with S (1225, 1325  $\text{cm}^{-1}$ ) and G (1285  $\text{cm}^{-1}$ ) lignins. In addition, there are very conspicuous bands that were not previously assigned in the analyses of lignins by FTIR, which appear to be related to fibrous (1194  $\text{cm}^{-1}$ ) and dimorphic (1115, 1178  $\text{cm}^{-1}$ ) woods. Specific chemical characterization studies are needed for these bands because they could be related to the composition of the secondary wall of the WBTs or be the result of an evolutionary process in the lignin biosynthetic pathway in Cactaceae, as has been suggested in studies of seed lignin in several species of this family [49].

**S/G ratio by HPLC.** We found that the syringyl/guaiacyl (S/G) ratio had an inverse association with species size ( $r_s = -0.640$ ,  $P < 0.001$ ) and was variable among the studied species (see Table 2). It ranged from 0.3 to 1.3 in ten of the thirteen species studied; particularly high values (3.5–11.7) were observed in three species in which the wood comprises a combination of fibers and WBTs as in *Ferocactus* and *Coryphantha*. Published data indicate that within angiosperms, the S/G ratio varies by species. For example, in the coihue (*Nothofagus dombeyi*), the ratio is 86:14, but the ratio in some monocots, such as *Lilium sitatissimum*, is 20:80 [14]. Notably, three of the studied species (*C. clavata*, *F. hamatacanthus*, *F. pilosus*) exhibited the highest ratio for syringyl higher than in most dicots, whereas one fibrous species, *S. dumortieri*, had the lowest values for syringyl, similar to some monocots and Pteridophytes [14]. The S/G variation in Cactaceae is interpreted as being related to the anatomy of the secondary xylem.

Previous studies of lignin in other lineages have correlated the S/G ratio with the proportion of condensed structures in lignin; the S units are linked by relatively labile ether bonds, whereas the G units are predominantly linked by more stable bonds, such as the C-C and biphenyl bonds, forming a highly condensed lignin [50], [51]. Thus, a low S/G ratio results in a degradation-resistant chemical structure due to the low proportion of S units [32], [52]. In addition, a number of authors have found that the S/G ratio appears to change from one morphological region to another: the secondary cell walls of fibers are richer in S lignin, whereas the secondary walls of vessels and the middle lamella are richer in G lignin [14], [15], [17], [23], [53]–[55]. However, in species in which tracheids or fibers constitute over 80% of the cells found in the wood, a global analysis reveals the composition of these cell types [23].

In Cactaceae, the proportions of WBTs and fibers vary according to the species. In species of *Ferocactus* and *Coryphantha*, the presence of fibers and WBTs can persist into advanced stages of development; in the adult wood, one can find a combination of these cell types in different proportions. For example, in *F. pilosus*, rare WBTs can persist until later stages when the fibers are abundant; conversely, in *C. clavata*, the fibers are scarce and WBTs are abundant





**Fig 5. Relationship between plant species size and percentage of syringyl lignin.** Each dot represents the species size given in S2 Table.

doi:10.1371/journal.pone.0123919.g005

throughout the life of the individuals [9]. We observed similar S/G ratios in both *F. pilosus* and *C. clavata* (3.46 and 3.90, respectively). However, in *F. hamatacanthus*, the WBTs and fibers were interspersed in similar proportions (Fig 2D), which apparently led to a very high abundance of S lignin within the wood (Fig 5). The results indicate that the S/G ratio in these species is affected by the type of cell-cell interaction (i.e., the WBT-fiber junctions and their frequency throughout the wood). Thus, it is reasonable to observe similar S/G ratios in species in which the junction zones between WBTs and fibers are equally rare, such as in *C. clavata* and *F. pilosus*, and to observe high S/G ratios in species in which the junction zones between WBTs and fibers are most common, such as in *F. hamatacanthus*.

In fibrous species, the S/G ratio revealed that lignin consists of S and G moieties as observed in other woody dicots [29], [32], [52], [56]; however, in species with lignified rays, such as *C. imbricata*, *M. geometrizans*, and *S. dumortieri*, the G lignin is more abundant. It is important to note that *A. retusus*, a globose species with WBT's wood, has an S/G ratio similar to *L. marginatus* and other shrub or tree-like species with fibrous wood. It is likely that in *A. retusus*, highly condensed G lignin is distributed in the middle lamella between the WBT and the parenchyma and the WBT and WBT, thus the cell-cell junctions, as well as the wood, would be strong enough to resist the expansion-contraction processes. The presence of highly condensed lignin between cell-cell junctions indicates a high predominance of covalent bridges, such as those in lignin-carbohydrate complexes. These have been considered to be the compatibilizing agent between hydrophobic lignin macromolecules and hydrophilic carbohydrates, which enhance the physical and mechanical properties of wood [23].

In general, we suggest that the thick secondary walls of WBTs are richer in S lignins, which gives them sufficient flexibility to resist expansion-contraction processes caused by long periods of water stress described by other authors [1], [10], [57]. Moreover, the chemical characteristics of lignin in species with WBTs wood indicate that its main contribution is more related to the resistance to high water pressures within the cell and to the increase in flexibility rather than contributing directly to the mechanical support of the stem.

The degree of condensation in the lignin of fibrous species in Cactaceae suggests that these species have a high degradation-resistant chemical structure. However, most of dimorphic species could be more susceptible to damage caused by fungal degradation due to the high

predominance of labile links between units of lignin, which has been observed in other dicots [34], [35].

## Conclusions

Our results reveal that percentage of lignin is higher in most cacti studied than any other gymnosperm and angiosperm studied. Moreover, the chemical characterization by FTIR and HPLC show that the S/G ratio in dimorphic wood is different than that found in other dicots. Moreover, the variation in the chemical composition of wood may be related to the topochemistry of the lignin as well as the abundance of fibers or WBTs. The wood anatomy in this group is very complex, and specific chemical characterization studies at the cellular level are necessary to better understand the factors involved in the large variation of the chemical composition in secondary xylem.

## Supporting Information

**S1 Dataset. Complete dataset of chemical composition in Cactaceae wood.** Raw data and calculations.

(DOCX)

**S2 Dataset. Matrix for FTIR spectra.** Raw data.

(DOCX)

**S3 Dataset. Report of S/G ratio in thirteen Cactaceae species studied by HPLC.** Raw data.

(DOCX)

**S1 Table. Supporting information of the S/G ratio in thirteen Cactaceae species studied by HPLC.** Raw data and calculations.

(DOCX)

**S2 Table. Supporting information of the percentage of syringyl-size plant graphic.**

Raw data.

(DOCX)

## Acknowledgments

This study is part of the requirements for JRR to obtain the Doctor of Science degree from Posgrado en Ciencias Biológicas (PCB), Universidad Nacional Autónoma de México. We are grateful to Santiago Duarte Aranda and Rubén San Miguel Chávez for their excellent technical assistance, to our institutions for providing facilities, and to Julio Cesar Rojas Montero and Diana Martínez for art work. Authors also thank Sherwin Carlquist and one anonymous reviewer for valuable comments and suggestions to improve this manuscript.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: TT JRR. Performed the experiments: JRR GCE MSH. Analyzed the data: JRR TT GCE MSH. Contributed reagents/materials/analysis tools: TT GCE MSH. Wrote the paper: JRR TT. Reviewed and approved the manuscript: GCE MSH.

## References

1. Terrazas T, Mauseth JD (2002) Shoot anatomy and morphology. In: Nobel PS, editor. *Cacti: Biology and uses*. California: University of California Press. pp. 23–40.

2. Mauseth JD, Plemons BJ (1995) Developmentally variable, polymorphic woods in cacti. *Amer J Bot* 82: 1199–1205.
3. Gibson AC (1973) Comparative anatomy of secondary xylem in Cactoideae (Cactaceae). *Biotropica* 5: 29–65.
4. Vázquez-Sánchez M, Terrazas T (2011) Stem and wood allometric relationships in Cactaceae (Cactaceae). *Trees* 25: 755–767.
5. Gibson AC, Nobel PS (1986) *The cactus primer*. Massachusetts: Harvard University Press. pp. 286.
6. Niklas KJ, Molina FF, Tinoco CO, Paolillo DJ (2000) Wood biomechanics and anatomy of *Pachycereus pringlei*. *Amer J Bot* 87: 469–481. PMID: 10766718
7. Arias S, Terrazas T (2001) Variación en la anatomía de la madera de *Pachycereus pecten-aboriginum* (Cactaceae). *An Inst Biol Ser Bot* 72: 157–169.
8. Loza-Cornejo S, Terrazas T (1996) Anatomía del tallo y de la raíz de dos especies de *Wilcoxia* Britton & Rose (Cactaceae) del Noreste de México. *Bol Soc Bot Méx* 59: 13–23.
9. Reyes-Rivera J (2010) Ontogenia de la madera en tallos contrastantes de la tribu Cacteeae. M.Sc. Thesis. Universidad Nacional Autónoma de México. Available: <http://132.248.9.195/ptb2010/octubre/0663800/index.html>
10. Mauseth JD (2004) Wide-band tracheids are present in almost all species of Cactaceae. *J Plant Res* 117: 69–76. PMID: 14639504
11. Loza-Cornejo S, Terrazas T, López-Mata L, Trejo C (2003) Características morfo-anatómicas y metabolismo fotosintético de plántulas de *Stenocereus queretaroensis* (Cactaceae): su significado adaptativo. *Interciencia* 28:83–89.
12. Sarkanen KV, Ludwig CH (1971) *Lignin: Occurrence, formation, structure and reactions*. New York: Wiley-Interscience. pp 916.
13. Boerjan W, Ralph J, Baucher M (2003) Lignin biosynthesis. *Ann Rev Plant Biol* 54: 519–546. PMID: 14503002
14. Baucher M, Monties B, Montagu MV, Boerjan W (1998) Biosynthesis and genetic engineering of lignin. *Crit Rev Plant Sci* 17: 125–197.
15. Mellerowicz EJ, Baucher M, Sundberg B, Boerjan W (2001) Unraveling cell wall formation in the woody dicot stem. *Plant Mol Biol* 47: 239–274. PMID: 11554475
16. Mellerowicz EJ, Sundberg B (2008) Wood cell walls: biosynthesis, developmental dynamics and their implications for wood properties. *Curr Opin Plant Biol* 11: 293–300. doi: 10.1016/j.pbi.2008.03.003 PMID: 18434240
17. Vanholme R, Demedts B, Morreel K, Ralph J, Boerjan W (2010) Lignin biosynthesis and structure. *Plant Physiol* 153: 895–905. doi: 10.1104/pp.110.155119 PMID: 20472751
18. Bonawitz ND, Chapple C (2010) The genetics of lignin biosynthesis: connecting genotype to phenotype. *Annu Rev Genet* 44: 337–363. doi: 10.1146/annurev-genet-102209-163508 PMID: 20809799
19. Musha Y, Goring DA (1975) Distribution of syringyl and guaiacyl moieties in hardwoods as indicated by ultraviolet microscopy. *Wood Sci Technol* 9: 45–58.
20. Nuopponen MH, Wikberg HI, Birch GM, Jääskeläinen AS, Maunu SL, et al. (2006) Characterization of 25 tropical hardwood with Fourier transform infrared, ultraviolet resonance Raman, and <sup>13</sup>C-NMR cross-polarization/magic-angle spinning spectroscopy. *J Appl Polymer Sci* 102: 810–819.
21. Rana R, Langenfeld-Heyser R, Finkeldey F, Polle A (2010) FTIR spectroscopy, chemical and histochemical characterization of wood and lignin of five tropical timber wood species of the family of Dipterocarpaceae. *Wood Sci Technol* 44: 225–242.
22. Hoffmann GC, Timell TE (1972) Polysaccharides in ray cells of normal wood of red pine (*Pinus resinosa*). *Tappi* 55: 733–736.
23. Saka S (2001) Chemical composition of wood and distribution. In: Hon DN, Shiraishi N, editors. *Wood and cellulosic chemistry*. New York: Marcel Dekker. Inc. pp. 51–81.
24. Bernal-Salazar S, Terrazas T (2005) Wood anatomical variation of *Neobuxbaumia tetetzo*: A columnar Cactaceae. *J Arid Environ* 63: 671–685.
25. Panshin AJ, De Zeeuw C (1980) *Textbook of wood technology*. New York: McGraw-Hill. pp. 652.
26. Olson ME (2007) Wood ontogeny as a model for studying heterochrony, with an example of pedomorphosis in *Moringa* (Moringaceae). *Syst Biodiv* 2: 145–158.
27. Fonseca-Prieto F, Canché-Escamilla G, Chavarria-Hernandez JC, Duarte-Aranda S (2014) Characterization of lignocellulosic residues of henequen and their use as a bio-oil source. *Biomass Conv Bioref* 4: 95–104.

28. TAPPI (US Technical Association of Pulp and Paper Industry) (2002). T 222 om-02. Acid insoluble lignin in wood and pulp.
29. Nunes CA, Lima CF, Barbosa LC, Colodette JL, Gouveia AF, et al. (2010) Determination of *Eucalyptus* spp lignin S/G ratio: A comparison between methods. *Biores Technol* 101: 4056–4061. doi: [10.1016/j.biortech.2010.01.012](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.01.012) PMID: [20133130](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20133130/)
30. Carballo AL, Igarza OU, Cordero ME (2004) Composición química de tres maderas en la Provincia del Pinar del Río, Cuba a tres alturas del fuste comercial. Parte N° 1: *Corymbia citriodora*. *Rev Chapingo S Cienc Forest Amb* 10: 57–62.
31. Orea IU, Carballo AL, Cordero ME (2004) Composición química de tres maderas en la Provincia del Pinar del Río, Cuba a tres alturas del fuste comercial. Parte N° 2: *Eucalyptus pellita* F. Muell. *Rev Chapingo S Cienc Forest Amb* 10: 51–55.
32. Ohra-ahoa T, Gomesb FJ, Colodetteb JL, Tamminena T (2013) S/G ratio and lignin structure among *Eucalyptus* hybrids determined by Py-GC/MS and nitrobenzene oxidation. *J Anal Appl Pyrol* 101: 166–171.
33. Donnelly BJ (1973) The carbohydrate composition of corn cob hemicellulose. *J Am Assoc Cereal Chemists* 50: 548–552.
34. Kirk TK, Chang H, Lorenz LF (1975) Topochemistry of the fungal degradation of lignin in birch wood as related to the distribution of guaiacyl and syringyl lignins. *Wood Sci Technol* 2: 43–94.
35. Blanchette RA, Obst JR, Hedges JI, Weliky K (1988) Resistance of hardwood vessels to degradation by white rot Basidiomycetes. *Canadian J Bot* 9: 1841–1847.
36. Weng J K, Akiyama T, Bonawitz ND, Li X, Ralph J y, et al. (2010) Convergent evolution of syringyl lignin biosynthesis via distinct pathways in the lycophyte *Selaginella* and flowering Plants. *Plant Cell* 22:1033–45. doi: [10.1105/tpc.109.073528](https://doi.org/10.1105/tpc.109.073528) PMID: [20371642](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20371642/)
37. Mauseth JD, Stone-Palmquist ME (2001) Root wood differs strongly from shoot wood within individual plants of many Cactaceae. *Int J Plant Sci* 162: 767–776.
38. Vázquez-Sánchez M, Terrazas T, Arias S (2012) El hábito y la forma de crecimiento en la tribu Cactaceae (Cactaceae, Cactoideae). *Bot Sci* 90: 97–108.
39. Mauseth JD (2006) Structure-function relationships in highly modified shoots of Cactaceae. *Ann Bot* 98: 901–926. PMID: [16820405](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16820405/)
40. Cornejo DO, Simpson BB (1997) Analysis of form and function in North American columnar cacti (Tribe Pachycereeae). *Amer J Bot* 84: 1482–1501. PMID: [21708554](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21708554/)
41. Niklas KJ, Molina FF, Tinoco CO (1999) Biomechanics of the columnar cactus *Pachycereus pringlei*. *Amer J Bot* 86: 767–775. PMID: [10371718](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10371718/)
42. Mauseth JD (2000) Theoretical aspects of surface-to-volume Ratios and water-storage capacities of Succulent shoots. *Amer J Bot* 87: 1107–1115. PMID: [10947995](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10947995/)
43. Hergert HL (1971) Infrared spectra. In: Sarkanen KV, Ludwid, editors. *Lignins: Occurrence, formation, structure and reactions*. C.H. New York: Wiley-Interscience. pp. 267–297.
44. Faix O (1991) Classification of lignins from different botanical origins by FTIR spectroscopy. *Holzforsch* 45: 21–27.
45. Xu F, Sun JX, Sun RC, Fowler P, Baird MS (2006) Comparative study of organosolv lignins from wheat straw. *Ind Crop Prod* 23: 180–193.
46. Fengel D, Wegener G (2003) *Wood, chemistry and ultrastructure and reactions*. Ramagen: Kassel Verlag. pp. 613.
47. Brebu M, Cazacu G, Chirila O (2010) Pyrolysis of lignin—a potential method for obtaining chemicals and/or fuels. *Cellulose Chem Technol* 45: 43–50.
48. Derkacheva O, Sukhov D (2008) Investigation of lignins by FTIR spectroscopy. *Macromol Symp* 265: 61–68.
49. Chen F, Tobimatsu Y, Jackson L, Nakashima J, Ralph J, et al. (2013) Novel seed coat lignins in the Cactaceae: structure, distribution and implications for the evolution of lignin diversity. *Plant J* 73: 201–211.
50. Higuchi T (1990) Lignin biochemistry: biosynthesis and biodegradation. *Wood Sci Technol* 24: 23–63.
51. Eckardt NA (2002) Probing the mysteries of lignin biosynthesis: the crystal structure of caffeic acid 5-hydroxyferulic acid 3,5-O-methyltransferase provides new insights. *Plant Cell* 14: 1185–1189. PMID: [12084820](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12084820/)
52. Davison BH, Drescher SR, Tuskan GA, Davis MF, Nghiem NP (2006) Variation of S-G ratio and lignin content in a *Populus* family influences the release of xylose by dilute acid hydrolysis. *Appl Biochem Biotechnol* 129–132: 427–435.

53. Fergus BJ, Goring DA (1970) The location of guaiacyl and syringyl lignins in birch xylem tissue. *Holzfor*sch 24: 113–117.
54. Saka S, Goring DA (1985) Localization of lignins in wood cell walls. In: Higuchi T, editor. *Biosynthesis and biodegradation of wood components*. Florida: Academic Press. pp. 51–62.
55. Saka S, Goring DA (1988) The distribution of lignin in white birch wood as determined by bromination with TEM-EDXA. *Holzfor*sch 42: 149–153.
56. Kishimoto T, Chiba W, Saito K, Fukushima K, Uraki Y, et al. (2010) Influence of syringyl to guaiacyl ratio on the structure of natural and synthetic lignins. *J Agric Food Chem* 58: 895–901. doi: [10.1021/jf9035172](https://doi.org/10.1021/jf9035172) PMID: 20041658
57. Garrett TY, Huynh CV, North GB (2010) Root contraction helps protect the “living rock” cactus *Ariocarpus fissuratus* from lethal high temperatures when growing in rocky soil. *Amer J Bot* 97: 1951–1960.
58. Hernández-Hernández T, Hernández HM, De-Nova JA, et al. (2011) Phylogenetic relationships and evolution of growth form in Cactaceae (Caryophyllales, Eudicotyledoneae). *Amer J Bot* 98: 44–61.
59. Vázquez-Sánchez M, Terrazas T, Arias S, Ochoterena H (2013) Molecular phylogeny, origin, and taxonomic implications of the tribe Cacteae (Cactaceae). *Syst Biodiv* 11: 103–116.

# Capítulo 4

## COMUNICACIÓN CORTA:

**Un ortólogo putativo de *KNAT1* se expresa durante el crecimiento secundario en especies de Cactaceae con madera fibrosa, no fibrosa y dimorfa**

Jorge Reyes-Rivera, Teresa Terrazas, Francisco Vergara-Silva, Alejandra Vasco,  
Svetlana Shishkova, Gustavo Rodríguez-Alonso

## **Un ortólogo putativo de *KNATI* se expresa durante el crecimiento secundario en especies de Cactaceae con madera fibrosa, no fibrosa y dimorfa**

Jorge Reyes-Rivera<sup>1</sup>, Teresa Terrazas<sup>1</sup>, Francisco Vergara-Silva<sup>2</sup>, Alejandra Vasco<sup>1</sup>, Svetlana Shishkova<sup>3</sup>, Gustavo Rodríguez-Alonso<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Botánica, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-233, C.P. 04510, Ciudad Universitaria, D.F., México.

<sup>2</sup> Jardín Botánico, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-614, C.P. 04510, Ciudad Universitaria, D.F., México.

<sup>3</sup> Departamento de Biología Molecular de Plantas, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Apartado Postal 510-3, C.P. 62250, Cuernavaca, Morelos, México.

### **INTRODUCCIÓN**

Recientemente se ha atribuido gran importancia a los meristemas, especialmente al cambium vascular, como principales protagonistas en la radiación de formas dentro de las angiospermas, señalando que los derivados del cambium vascular influyen en los eventos de especiación y diversificación (Groover 2005, Carlquist 2009; 2010, Spicer y Groover 2010, Lucas *et al.* 2013, Růžička *et al.* 2015). En Cactaceae las características del xilema secundario han llevado a considerar su evolución por medio de procesos heterocrónicos (Gibson 1973, Altesor *et al.* 1994, Altesor y Ezcurra 2003, Carlquist 2009; 2010). En este grupo de plantas suculentas, el xilema secundario en los adultos de las especies con talla pequeña generalmente es no fibroso, tiene elementos de vaso parecidos a los elementos típicos del proto y metaxilema (paredes celulares primarias delgadas con engrosamientos lignificados helicoidales o anulares en la pared celular secundaria, Fig. 1), además, es poco lignificado (Reyes-Rivera *et al.* 2015), con abundantes traqueidas de banda ancha (TBAs) (Terrazas y Mauseth 2002, Mauseth 2004), las cuales difieren morfológicamente de las traqueidas o las fibrotraqueidas de otros linajes (Friedman y Cook 2000). Por otro lado, las especies con tallas grandes ( $\geq 1.5$  m de altura) tienen xilema secundario fibroso, con elementos de vaso similares a aquellos típicamente derivados de cámbium vascular (paredes secundarias más desarrolladas y lignificadas con punteaduras escalariformes,

pseudoescalariformes o alternas), lo que hace que su composición química sea similar a otras dicotiledóneas (Reyes-Rivera *et al.* 2015).

En varias especies de Cactaceae los individuos comienzan produciendo un tipo de madera en las etapas juveniles de la ontogenia, posteriormente, conforme los individuos maduran, sufren un cambio de fase en la madera y se produce un tipo diferente al inicial; este fenómeno es único dentro de las angiospermas y se ha relacionado con el soporte que requiere el tallo y el crecimiento de los individuos (Gibson 1973, Mauseth y Plemons 1995, Mauseth y Plemons-Rodriguez 1998, Terrazas y Mauseth 2002, Loza-Cornejo *et al.* 2003, Terrazas y Arias 2003, Mauseth 2004; 2006, Romero–Godofredo y Melo-de-Pinna 2008, Reyes-Rivera 2010). Un aspecto particularmente interesante de la madera dimorfa es que cuando la madera con TBAs está presente, ésta siempre es la primera en formarse y posteriormente se da el cambio a madera fibrosa o parenquimatosa (Terrazas y Mauseth 2002).

La diferencia en las proporciones de los tipos celulares (fibras, elementos de vaso, TBAs y parénquima) confiere diferentes arreglos a la madera dependiendo de la especie, lo que se traduce en diferentes propiedades químicas relacionadas con la morfología del tallo y el soporte que requiere. Las maderas con abundantes TBAs contienen 13-14% de lignina y 31-41% de celulosa; por el contrario, en las maderas fibrosas el contenido de lignina es casi dos veces mayor. Además, la composición de la lignina también es diferente entre las distintas especies de esta familia: la relación S/G, la cual denota la proporción de las subunidades Siringilo y Guayacilo, está relacionada con la anatomía de la madera (Reyes-Rivera *et al.* 2015). Aún se desconocen los factores que determinan el comportamiento del cambium vascular y sus derivados en Cactaceae, no obstante, algunos autores han atribuido la amplia variación anatómica de la madera a una posible modificación de los mecanismos morfogenéticos por medio de la inactivación de genes que controlan la deposición y la lignificación de la pared celular secundaria, o por la acción de genes homeóticos característicos de un tipo de tejido en particular que se tornan activos en sitios o tiempos atípicos, dando como resultando un tejido con una mezcla de características (Mauseth y Plemons 1995).

Estudios recientes en plantas modelo, como *Arabidopsis* y *Populus*, han mostrado que diferentes factores regulan la actividad del cambium vascular, destacando el papel de



reguladores de crecimiento, como las auxinas y las citocininas, así como de genes que regulan la diferenciación celular, la lignificación y la deposición de la pared celular secundaria (Kubo *et al.* 2005, Groover *et al.* 2006, Li *et al.* 2010, Du *et al.* 2009, Spicer y Groover 2010, Xu *et al.* 2013, Liu *et al.* 2014, Lucas *et al.* 2013, Zhong y Ye 2015, Ye y Zhong 2015, Růžička *et al.* 2015). Asimismo, se ha demostrado que los genes que modulan el desarrollo de los meristemos primarios tienen homólogos que actúan durante el crecimiento secundario, como aquellos que codifican para factores de transcripción con homeodominio: los ortólogos de *ARBORKNOX1* [*ARK1*] / *SHOOT MERISTEMLESS* [*STM*] y *ARK2* / *BREVIPEDICELLUS* [*BP*] de *Populus* / *Arabidopsis* (Groover *et al.* 2006, Du *et al.* 2009).

Particularmente el factor de transcripción *ARK2* (ortólogo de *BP*, también conocido como *KNOTTED LIKE FROM ARABIDOPSIS THALIANA 1* [*KNAT1*] en *Arabidopsis*) modifica el fenotipo de la madera en mutantes de *Populus* por regulación de series complejas de genes, y su expresión se correlaciona con cambios en la amplitud de la zona cambial y el desarrollo de los tejidos lignificados (Du *et al.* 2009). En los mutantes que sobreexpresan *ARK2* se observó un retardo en la diferenciación celular y una regulación defectuosa de los genes relacionados con la formación de la pared celular y la biosíntesis de la lignina, afectando consecuentemente el contenido global de lignina, el desarrollo del xilema secundario y la relación S/G (Du *et al.* 2009).

Hasta ahora no se sabe con certeza si los ortólogos de genes como *ARK2/KNAT1* tienen influencia en la enorme variabilidad del xilema secundario en Cactaceae, y consecuentemente en sus mecanismos de evolución. Por esa razón estamos interesados en investigar si el ortólogo del gen *ARK2* en las especies de Cactaceae está involucrado en la determinación y establecimiento de la variación morfológica de los derivados del cambium vascular y, consecuentemente, en la determinación de las características anatómicas de la madera y sus mecanismos de evolución.

Aquí reportamos que un ortólogo putativo de *ARK2/KNAT1* se expresa en el cambium vascular de especies de Cactaceae con madera fibrosa, no fibrosa y dimórfica (*Pereskia lychnidiflora* y *Pilosocereus alensis*; *Ariocarpus retusus*; *Ferocactus pilosus*, respectivamente). Mostramos también el análisis filogenético de los homólogos de *ARK2* de Cactaceae que estamos reportando, así como aquellos reportados en la literatura.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras del cambium vascular de individuos adultos de cuatro especies pertenecientes a diferentes linajes de la familia Cactaceae (*Pereskia lychnidiflora* A.P. de Candolle y *Pilosocereus alensis* (FAC Weber) Byles & GD Rowley con madera fibrosa; *Ariocarpus retusus* Scheidw, no fibrosa; *Ferocactus pilosus* (DC.) G.E. Linds, dimórfica), fueron colectadas, inmediatamente congeladas en nitrógeno líquido, y almacenadas a -80 °C hasta la extracción de ARN total.

### Aislamiento de ARN total, síntesis de ADNc y amplificación

El ARN total fue extraído usando *Trizol® Reagent (Invitrogen)* siguiendo el protocolo del fabricante e incluyendo como obligatorio el paso opcional de centrifugación antes de la separación de fases: las muestras de cambium vascular fueron pulverizadas de manera breve, utilizando nitrógeno líquido en un mortero libre de RNasas. 1 mL de Trizol por cada 100 mg de tejido inicial fue agregado y el sobrenadante recuperado después de la centrifugación (12,000 x g, durante 10 min a 4 °C). Las muestras se dejaron reposar durante 5 min a temperatura ambiente, posteriormente se adicionó una mezcla de cloroformo:alcohol isoamílico (49:1 (v:v); 0.2 mL). Después de agitar vigorosamente, las muestras se dejaron reposar durante 3 min y después fueron centrifugadas nuevamente (12,000 x g, durante 15 min a 4 °C). Se recuperó la fase acuosa y el ARN fue precipitado con isopropanol (0.5 mL). Las muestras se incubaron 30 min a temperatura ambiente, posteriormente se centrifugaron (12,000 x g, durante 10 min a 4 °C). El pellet de ARN fue lavado al menos dos veces con etanol al 70% (1 mL). Finalmente el ARN fue disuelto en 50 µL de agua libre de RNasas y almacenado a -80 °C.

El ADNc fue sintetizado usando el kit *SuperScript® II Reverse Transcriptase (Invitrogen)* siguiendo las instrucciones del fabricante. Los PCRs se realizaron utilizando cebadores degenerados anteriormente reportados por Du *et al.* (2009): P1-A: 5'-GCYTACWTGGAYTGYCAAARGRKG-3' y P1-B: 5'-CCRTCCATHACCATRAAYTGCATGTC-3' (donde Y = C o T; R = A o G; H = A, C o T; W = A o T). Los productos de la amplificación fueron analizados mediante geles de agarosa al 1 %.

## Secuenciación

La secuenciación de los productos amplificados fue realizada en el Laboratorio de Secuenciación Genómica de la Biodiversidad y de la Salud, del Instituto de Biología (UNAM). Las muestras fueron purificadas con columnas de *Sephadex* (*Centrisep*, *ThermoFisher Scientific*) siguiendo las especificaciones del fabricante. Los productos purificados se prepararon para secuenciar con 1  $\mu$ L de *big dye* (*ThermoFisher Scientific*), 3  $\mu$ L de buffer 2.5X, 1  $\mu$ L de primer, 2  $\mu$ L de agua y 3  $\mu$ L del purificado. Para la PCR fue utilizado el siguiente programa: 96 °C durante 10 seg, 50 °C durante 5 seg, 60 °C durante 4 min. Posteriormente, se purificaron las reacciones de secuencia con placas de *Sephadex* (*Centrisep*, *ThermoFisher Scientific*) de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Una vez purificados se agregaron 10  $\mu$ L de formamida y se colocaron en un secuenciador 3500XL (*Genetic Analyzer*) de 24 capilares.

## Alineamiento de secuencias y análisis filogenético

Se hicieron búsquedas de genes homólogos de *ARK2* y *KNAT1* por medio de blastn, blastp, blastx y tblastn ([BVSEQ](#), [NCBI-BLAST](#), [Phytozome v10.3](#)); en algunos casos, las secuencias de proteínas fueron deducidas de la secuencias de nucleótidos (secuencias de ADNc de Cactaceae; ver Anexos 1, 2). Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos se alinearon usando software para alineamiento múltiple ([Clustal Omega](#), EMBL-EBI). Los porcentajes de identidad y similitud fueron obtenidos con alineamientos pareados para proteínas y nucleótidos ([EMBOSS Needle](#), EMBL-EBI), para ello fueron usadas únicamente las regiones de las secuencias de *ARK2* y *KNAT1* alineadas con las secuencias de las especies de Cactaceae (comprendidas entre los aminoácidos 160 y 367).

Para realizar los análisis filogenéticos se usó una matriz con secuencias conservadas de aminoácidos, correspondientes a la familia de genes KNOX, clases I y II, la cual incluyó regiones que codifican para los dominios KNOX1, KNOX2, ELK, y el HOMEODOMINIO. La matriz incluyó 40 secuencias y 208 aminoácidos alineados: algunas secuencias fueron deducidas de las secuencias de nucleótidos (Anexos 1, 2). Las relaciones filogenéticas fueron inferidas desde las secuencias de aminoácidos usando el método de máxima verosimilitud. Los análisis de los alineamientos de proteínas por máxima verosimilitud fueron realizados en el portal 2 teragrid (<http://www.phylo.org>) de

*Cyberinfrastructure for Phylogenetic Research (CIPRES)* (Miller *et al.* 2010). Las búsquedas del mejor árbol por el método de máxima verosimilitud y las estimaciones de *bootstrap* se realizaron mediante 1000 réplicas usando RAxML v.7.2.8 (Stamatakis 2006; Stamatakis *et al.* 2008). Los análisis fueron realizados con los datos particionados por codón, usando la 1era, 2da, y 3ra posición para cada partición. Se utilizó la secuencia de la proteína Bell1 de *Arabidopsis thaliana* para enraizar el árbol.

## RESULTADOS

Entre los productos de la amplificación, utilizando el par de los cebadores degenerados P1-A y P2-B, hubo una banda cercana a los 620 pb (Fig. 2), además, se amplificaron bandas inespecíficas que varían de 80 a 200 pb.

Se comprobó por secuenciación, que la banda cercana a los 620 pb corresponde al factor *ARK2* en las cuatro especies estudiadas. Se observó en los alineamientos de las secuencias de aminoácidos que las secuencias de Cactaceae abarcan más del 60% de las proteínas *ARK2* y *KNAT1*: todas se alinean con el HOMEODOMINIO, los dominios ELK y *KNOX2*, y parcialmente el dominio *KNOX1* (Fig. 3A).

Con base en los alineamientos pareados entre las secuencias de *A. thaliana* y *P. trichocarpa* se encontró que en la región alineada, correspondiente al HOMEODOMINIO, los dominios ELK, *KNOX2* y parte del *KNOX1* (Fig. 3), son 79.7% idénticas y 91.3% similares entre sí, a nivel de aminoácidos (Cuadro 1). No obstante, las secuencias de *Pilosocereus alensis* y *Populus trichocarpa* son 85.9% idénticas y 94.1% similares. La especie con valores de identidad y similitud más bajos con respecto a la proteína de *Populus* fue *Ariocarpus retusus* con 62.4% y 74.6%, respectivamente.

A nivel de nucleótidos las secuencias de *Populus trichocarpa* (*ARK2*) y *Arabidopsis thaliana* (*KNAT1*) son 73.8% idénticas en la región alineada, mientras que el porcentaje de homología de las secuencias nucleotídicas de Cactaceae comparadas con las de *Populus* varía entre el 67.2% y el 75.4% en *A. retusus* y *P. alensis*, respectivamente (Cuadro 1).

En el análisis filogenético se observó que las secuencias de Cactaceae son más similares a las proteínas *ARK2/KNAT1* que a cualquier otra proteína *KNOX* (Fig. 3B), lo que sugiere que las secuencias de Cactaceae son ortólogas de *ARK2/KNAT1*.

## DISCUSIÓN

Nuestros resultados mostraron que en el cambium vascular de cuatro especies de Cactaceae se expresa un ortólogo putativo de *ARK2/KNAT1*. Los niveles de expresión diferenciales de *ARK2* en mutantes de *Populus* se han correlacionado con cambios en el desarrollo de los tejidos lignificados (Du *et al.* 2009, Xu *et al.* 2013, Ye y Zhong 2015). En las plantas sobreexpresoras de *ARK2* se vio inhibida la regulación de genes que codifican enzimas clave implicadas en la biosíntesis de la lignina (F5H, COMT, C3'H, 4CL, C4H, CAD y lacasas); consecuentemente se redujo el contenido total de lignina. Por el contrario, en aquellos mutantes en los cuales los transcritos de *ARK2* fueron subregulados por miARN artificiales la relación S/G se incrementó significativamente y el contenido global de lignina aumentó cerca del 10% (Du *et al.* 2009). En Cactaceae una expresión diferencial de *ARK2* a nivel de cambium vascular podría ser la explicación a la amplia variación de la relación S/G encontrada por Reyes-Rivera *et al.* (2015) en el xilema secundario.

Con respecto a la lignificación en Cactaceae, recientemente encontramos que la composición global de la lignina en la madera mostró una relación S/G variable en diferentes especies (0.3 - 11.7), correlacionada con el tamaño de la planta y la abundancia de TBAs-fibras (Reyes-Rivera *et al.* 2015). Además, recientemente Chen *et al.* (2013) reportaron la presencia de dos nuevos tipos de lignina (catequilo [C] y 5-hidroxiyuayacilo [5H]) en las semillas de Cactaceae, sugiriendo que la presencia de ambos tipos es debida a procesos evolutivos en la biosíntesis de la lignina que aún están teniendo lugar en Cactaceae y que su presencia en los tejidos vasculares podría posiblemente afectar el crecimiento de la planta debido a la reactividad química de sus monolignoles.

Actualmente se sabe que la actividad del cambium vascular está controlada por redes regulatorias de genes, y que la diferenciación celular involucra la coordinación de diferentes procesos (Li *et al.* 2010, Spicer y Groover 2010, Lucas *et al.* 2013, Xu *et al.* 2013, Liu *et al.* 2014, Růžička *et al.* 2015, Taylor-Teeples *et al.* 2015). Por ejemplo, la formación de los elementos traqueales implica la coordinación de la muerte celular programada, la síntesis de la pared celular secundaria y consecuentemente la biosíntesis de la lignina (Ye y Zhong 2015, Růžička *et al.* 2015). Debido a que estos procesos están estrechamente relacionados se ha propuesto que son controlados bajo los mismos programas genéticos de diferenciación (Escamez y Tuominen 2014). Por lo tanto, la

evolución de las vías de formación de la pared celular secundaria y la lignificación han sido paralelas a la evolución del xilema y consecuentemente a la evolución de las plantas terrestres (Li *et al.* 2010, Lucas *et al.* 2013, Xu *et al.* 2013; Barros *et al.* 2015). Por ello es probable que procesos de evolución en la regulación de las vías de biosíntesis de la lignina, y consecuentemente en los programas de diferenciación celular, estén teniendo lugar también a nivel de cambium vascular en los miembros de Cactaceae.

La escasa acumulación de madera en Cactaceae es una de las principales características que ha llevado a considerar la evolución de este grupo por medio de eventos heterocrónicos (paedomorfosis, o neotenia alométrica *sensu* Altesor *et al.* (1994)). Las tasas de crecimiento denotadas por la acumulación de madera en los miembros de Cactaceae son variables dependiendo de la especie y generalmente la velocidad de acumulación es inversamente proporcional al grado de succulencia. En los géneros menos succulentos, como *Pereskia*, la acumulación de la madera es más rápida (la proporción de xilema secundario en el tallo aumenta con mayor rapidez que el tamaño de la planta) que en los géneros succulentos como *Mammillaria* o *Ferocactus* (Altesor *et al.* 1994). Se ha demostrado que *ARK2* es un factor de transcripción que modifica diferentes series de genes y se ha reconocido como un modulador del crecimiento secundario en *Populus*, resultando su sobreexpresión en una menor acumulación de xilema secundario por inhibición de la diferenciación celular (Du *et al.* 2009). Por otro lado, se ha propuesto que la condición que determina la identidad leñosa de una especie es una medida gradual (p. ej. los niveles de expresión génica), más que la presencia-ausencia de algún rasgo dentro de las especies (Groover *et al.* 2005). Lo anterior sugiere que los genes reguladores del crecimiento secundario y la diferenciación, como el *ARK2*, en conjunto con otros genes clave, como los *YABBY* y los de la clase-III HD ZIP, tienen posiblemente diferentes niveles de expresión en Cactaceae a nivel de cambium vascular, provocando un retardo en el desarrollo secundario y tasas de crecimiento diferenciales entre sus linajes.

Además de la escasa acumulación de madera, la morfología de los elementos de vaso se ha interpretado como paedomórfica en el xilema secundario de Cactaceae (juvenilismo *sensu* Gibson (1973) y Carlquist (2009)). Éste fenotipo de los elementos de vaso (Fig. 1), cuyas características son similares a los elementos del xilema primario, hacen suponer que además de factores como el *ARK2* que regulan la diferenciación y

lignificación, también intervienen aquellos interruptores maestros que modulan la formación de la pared celular como los *VND6* y *VND7* (Kubo *et al.* 2005, Zhong y Ye 2014) y otros como los *MAP70* los cuales delimitan las zonas donde no se formará la pared celular secundaria (Oda y Fukuda 2012).

## **CONCLUSIONES**

La presencia de transcritos de los ortólogos de *ARK2/KNAT1* (*Populus trichocarpa* y *Arabidopsis thaliana*, respectivamente) en el cambium vascular de Cactaceae sugiere que los factores de transcripción maestros que regulan la diferenciación celular y la lignificación a nivel de cambium vascular en los sistemas modelo, también tienen actividad en otros linajes independientemente de su posición filogenética, el grado de especialización, o las características adaptativas de las especies. Se requieren estudios adicionales para la caracterización funcional de *ARK2* dentro de Cactaceae. Los resultados aquí mostrados son un preámbulo para el estudio de las interacciones entre *ARK2* e interruptores maestros como los *NAC* (incluyendo *NST*, *SND*, *VND*) y otros factores involucrados con la delimitación de la pared celular secundaria, como los *MAP70*. Anteriormente se ha reconocido la influencia de estos genes en la diferenciación celular a nivel de cambium vascular. Por ello, estos podrían ocasionar la variabilidad en el fenotipo de los elementos del xilema secundario en Cactaceae y, consecuentemente, podrían estar relacionados con los procesos evolutivos que han ocurrido dentro del xilema secundario de este grupo.

## **AGRADECIMIENTOS**

Los autores agradecemos al Dr. Jorge Nieto Sotelo del Jardín botánico del Instituto de Biología (UNAM), por sus valiosos comentarios para enriquecer este trabajo. También agradecemos la ayuda de la M. C. Laura M. Márquez Valdelamar, responsable del laboratorio de secuenciación genómica de la biodiversidad y de la salud del Instituto de Biología (UNAM).

## REFERENCIAS

1. Altesor A, Silva C, Ezcurra E. (1994). Allometric neoteny and the evolution of succulence in cacti. *Bot. J. Linn. Soc.* 114: 283–292.
2. Altesor A, Ezcurra E. (2003) Functional morphology and evolution of stem succulence in cacti. *J. Arid Environ.* 53: 557–567.
3. Barros J, Henrik S, Grandlund I, Pesquet E. (2015) The cell biology of lignification in higher plants. *Ann. Bot.* 115: 1053-1074.
4. BVSEQ. The *Beta vulgaris* Resource. Sugar beet genetics and genomics. Max Planck Institute for Molecular Genetics. [<http://bvseq.molgen.mpg.de/blast/>]
5. Carlquist S. (2009). Xylem heterochrony: An unappreciated key to angiosperm origin and diversifications. *Bot. J. Linn. Soc.* 161: 25-65.
6. Carlquist S. (2010). Caryophyllales: a key group for understanding wood anatomy character states and their evolution. *Bot. J. Linn. Soc.* 164: 342-393.
7. Clustal Omega, EMBL-EBI. Multiple Sequence Alignment. European Molecular Biology Laboratory. The European Bioinformatics Institute. [<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>].
8. Chen F, Tobimatsu Y, Jackson L, Nakashima J, Ralph J, Dixon R A. (2013). Novel seed coat lignins in the Cactaceae: structure, distribution and implications for the evolution of lignin diversity. *Plant J*, 73(2), 201-211.
9. Du J, Mansfield S D y Groover A T. (2009). The *Populus* homeobox gene ARBORKNOX2 regulates cell differentiation during secondary growth. *Plant J.* 52: 17–27.
10. EMBOSS Needle, EMBL-EBI. Pairwise Sequence Alignment (PROTEIN). European Molecular Biology Laboratory. The European Bioinformatics Institute. [[http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss\\_needle/](http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/)]
11. Escamez S, Tuominen H. (2014) Programmes of cell death and autolysis in tracheary elements: when a suicidal cell arranges its own corpse removal. *J. Exp. Bot.* doi:10.1093/jxb/eru057



12. Friedman W E, Cook M E. (2000) The Origin and Early Evolution of Tracheids in Vascular Plants: Integration of Palaeobotanical and Neobotanical Data. *Phil. TransR. Soc. Lond.* 355(1398):857-68. doi: 10.1098/rstb.2000.0620
13. Gibson AC (1973) Comparative anatomy of secondary xylem in Cactoideae (Cactaceae). *Biotropica*. 5:29–65.
14. Groover A T. (2005). What genes make a tree a tree?. *Trends in plant science*, 10(5), 210-214.
15. Groover A, Mansfield S, DiFazio S, Dupper G, Fontana J, Millar R y Wang Y. (2006). The *Populus* homeobox gene ARBORKNOX1 reveals overlapping mechanisms regulating the shoot apical meristem and the vascular cambium. *Plant Mol. Biol.* 61: 917–932.
16. Kubo M, Udagawa M, Nishikubo N, Horiguchi G, Yamaguchi M, Ito J, Mimura T, Fukuda H, Demura T. (2005). Transcription switches for protoxylem and metaxylem vessel formation. *Genes Dev.* 19(16), 1855-1860.
17. Li X, Harry X W, Southerton S G. (2010) Comparative genomics reveals conservative evolution of the xylem transcriptome in vascular plants. *BMC Evol. Biol.* 10: 190. doi: 10.1186/1471-2148-10-190.
18. Liu L, Filkov V, Groover A. (2014) Modeling transcriptional networks regulating secondary growth and wood formation in forest trees. *Physiol Plant.* 151(2):156-63. doi: 10.1111/ppl.12113
19. Loza-Cornejo S, Terrazas T, López-Mata L, Trejo C. (2003). Características morfo-anatómicas y metabolismo fotosintético en plántulas de *Stenocereus queretaroensis* (Cactaceae): su significado adaptativo. *INCI.* 28: 83-89.
20. Lucas W J, Groover A, Lichtenberger R, Furuta K, Yadav S R, Helariutta Y, He X Q, Fukuda H, Kang J, Brady S M, Patrick J W, Sperry J, Yoshida A, López-Millán A F, Grusak M A, Kachroo P. (2013) The plant vascular system: evolution, development and functions. *J. Integr. Plant Biol.* 55(4):294-388. doi: 10.1111/jipb.12041
21. Mauseth J D. (2004) Wide-band tracheids are present in almost all species of Cactaceae. *J. Pl. Res.* 117: 69-76.

22. Mauseth J D. (2006) Structure-function relationships in highly modified shoots of Cactaceae. *Ann. Bot.* 98: 901-926.
23. Mauseth J D, Plemons B J. (1995) Developmentally variable, polymorphic woods in cacti. *Am. J. Bot.* 82: 1199–1205.
24. Mauseth J D, Plemons-Rodriguez B J. (1997) Presence of paratracheal water storage tissue does not alter vessel characters in cactus wood. *Am. J. Bot.* 84:815–822.
25. Miller MA, Pfeiffer W, Schwartz T (2010) Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. En *Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE)*, 14 Nov. 2010, New Orleans, LA, 1–8.
26. NCBI-BLAST. Basic Local Alignment Search Tool. National Center for Biotechnology Information. [<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>]
27. Oda Y, Fukuda K. (2012) Secondary cell wall patterning during xylem differentiation. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2012, 15:38–44.
28. Phytozome v 10.3. The plant genomics resource. Joint Genome Institute. [<http://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#!search?show=BLAST>]
29. Reyes-Rivera J. (2010). Ontogenia de la madera en tallos contrastantes de la tribu Cactaeae. Tesis de Maestría. Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. Disponible en: <http://132.248.9.195/ptb2010/octubre/0663800/Index.html>
30. Reyes-Rivera J, Canché-Escamilla G, Soto-Hernández M, Terrazas T (2015) Wood chemical composition in species of Cactaceae: the relationship between lignification and stem morphology. *PLoS ONE* 10:1-17. doi:10.1371/journal.pone.0123919
31. Romero–Godofredo V, Melo–de–Pinna G F. (2008) Occurrence of wide–band tracheids in Cactaceae: wood variation during *Pilosocereus aurisetus* development. *J. Torrey Bot. Soc.* 135:94–102.
32. Růžička K, Ursache R, Hejátko J, Helariutta Y. (2015) Xylem development - from the cradle to the grave. *New Phytol.* doi: 10.1111/nph.13383.
33. Spicer R, Groover A. (2010). Evolution of development of vascular cambia and secondary growth. *New Phytol.* 186: 577–592.

34. Stamatakis A (2006) RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* 22:2688–2690.
35. Stamatakis A, Hoover P, Rougemont J (2008) A rapid bootstrap algorithm for the RAxML Web Servers. *Syst. Biol.* 57:758–771.
36. Taylor-Teeple, Lin L, de Lucas M, Turco G, Toal T W, Gaudinier A, Young N F, Trabucco G M, Veling M T, Lamothe R, Handakumbura P P, Xiong G, Wang C, Corwin J, Tsoukalas A, Zhang L, Ware D, Pauly M, Kliebenstein D J, Dehesh K, Tagkopoulos I, Breton G, Pruneda-Paz J L, Ahnert S E, Kay S A, Hazen S P, Brady S M. (2015) An Arabidopsis gene regulatory network for secondary cell wall synthesis. *Nature*. 517:571–575. doi:10.1038/nature14099
37. Terrazas, T. y Mauseth, J. D. 2002. Shoot anatomy and morphology. *En Nobel*, P. S. Ed. *Cacti: biology and uses*. pp. 23–40. Univ. California Press. Berkeley.
38. Xu P, Kong Y, Li X, Li L. (2013) Identification of molecular processes needed for vascular formation through transcriptome analysis of different vascular systems. *BMC Genom.* 14:217.
39. Ye Z-H, Zhong R. (2015). Molecular control of wood formation in trees. *J. Exp. Bot.* doi:10.1093/jxb/erv081
40. Zhong R, Ye Z-H. (2015) Secondary Cell Walls: Biosynthesis, Patterned Deposition and Transcriptional Regulation. *Plant Cell Physiol.* 56(2): 195–214. doi:10.1093/pcp/pcu140

**Cuadro 1.** Matrices de identidad/similitud para las secuencias de nucleótidos y proteínas correspondientes a los genes KNAT1 y sus ortólogos en el cambium vascular de *Populus* y las Cactaceae estudiadas.

		IDENTIDAD ENTRE SECUENCIAS DE NUCLEOTIDOS					
		KNAT1		ARK2			
		<i>A. thaliana</i>	<i>P. trichocarpa</i>	<i>A. retusus</i>	<i>F. pilosus</i>	<i>P. alensis</i>	<i>P. lychnidiflora</i>
KNAT1	<i>A. thaliana</i>	<b>100.0%</b>	<b>73.8%</b>	61.0%	66.2%	69.4%	68.0%
	<i>P. trichocarpa</i>	<b>73.8%</b>	<b>100.0%</b>	67.2%	69.5%	<b>75.4%</b>	71.7%
ARK2	<i>Ariocarpus retusus</i>	61.0%	67.2%	<b>100.0%</b>	<b>90.8%</b>	<b>86.4%</b>	81.8%
	<i>Ferocactus pilosus</i>	66.2%	69.5%	<b>90.8%</b>	<b>100.0%</b>	<b>92.0%</b>	86.5%
	<i>Pilosocereus alensis</i>	69.4%	<b>75.4%</b>	<b>86.4%</b>	<b>92.0%</b>	<b>100.0%</b>	87.2%
	<i>Pereskia lychnidiflora</i>	68.0%	71.7%	81.8%	86.5%	87.2%	<b>100.0%</b>
		IDENTIDAD ENTRE SECUENCIAS DE PROTEINAS					
KNAT1	<i>A. thaliana</i>	<b>100.0%</b>	79.7%	54.1%	66.2%	76.8%	65.4%
	<i>P. trichocarpa</i>	79.7%	<b>100.0%</b>	62.4%	75.1%	<b>85.9%</b>	<b>73.0%</b>
ARK2	<i>Ariocarpus retusus</i>	54.1%	62.4%	<b>100.0%</b>	<b>83.4%</b>	74.6%	69.9%
	<i>Ferocactus pilosus</i>	66.2%	75.1%	<b>83.4%</b>	<b>100.0%</b>	<b>86.8%</b>	<b>76.1%</b>
	<i>Pilosocereus alensis</i>	76.8%	<b>85.9%</b>	74.6%	<b>86.8%</b>	<b>100.0%</b>	<b>85.6%</b>
	<i>Pereskia lychnidiflora</i>	65.4%	<b>73.0%</b>	69.9%	76.1%	<b>85.6%</b>	<b>100.0%</b>
		SIMILITUD ENTRE SECUENCIAS DE PROTEINAS					
KNAT1	<i>A. thaliana</i>	<b>100.0%</b>	<b>91.3%</b>	70.0%	79.7%	<b>88.9%</b>	76.5%
	<i>P. trichocarpa</i>	<b>91.3%</b>	<b>100.0%</b>	74.6%	84.4%	<b>94.1%</b>	<b>80.5%</b>
ARK2	<i>Ariocarpus retusus</i>	70.0%	74.6%	<b>100.0%</b>	85.9%	80.5%	76.1%
	<i>Ferocactus pilosus</i>	79.7%	84.4%	85.9%	<b>100.0%</b>	<b>90.2%</b>	80.3%
	<i>Pilosocereus alensis</i>	<b>88.9%</b>	<b>94.1%</b>	80.5%	<b>90.2%</b>	<b>100.0%</b>	<b>87.1%</b>
	<i>Pereskia lychnidiflora</i>	76.5%	<b>80.5%</b>	76.1%	80.3%	<b>87.1%</b>	<b>100.0%</b>

Para calcular los porcentajes de similitud e identidad se utilizaron sólo los fragmentos alineados (Fig. 3) de las siguientes secuencias: AEE82597.1 (KNAT1 de *Arabidopsis thaliana*); Potri.002G113300.1 (ARK2 de *Populus trichocarpa*); ARK2\_Ar\_41 (*Ariocarpus retusus*); ARK2\_Fp\_42 (*Ferocactus pilosus*); ARK2\_Pa\_27 (*Pilosocereus alensis*); ARK2\_Pl (*Pereskia lychnidiflora*). La información general y números de acceso de las secuencias se muestran en los Anexos 1 y 2.

\* De acuerdo con los resultados, los porcentajes de identidad y similitud para las secuencias de nucleótidos fueron iguales, por ello sólo se muestran aquellos correspondientes a la similitud de las secuencias.

**Fig. 1.** Morfología de los derivados del cambium vascular en adultos de la tribu Cactaceae. Tomado y modificado de Reyes-Rivera (2010). Fila A: *Ariocarpus retusus*, especie que mide menos de 15 cm de altura, sin fibras, con predominancia de TBAs. Fila B: *Ferocactus pilosus*, especie con madera dimorfa; durante la ontogenia temprana predominan las TBAs, pero con la maduración de los individuos el cambium deja de producir TBAs para producir fibras, este cambio es gradual, la madera adulta es más lignificada y los elementos traqueales tienden a presentar paredes celulares secundarias más desarrolladas (j=elementos predominantes en la madera juvenil; m=elementos predominantes en la madera adulta). Escala 100  $\mu$ m.

**Fig. 2.** Gel de agarosa al 1%. Se muestran los productos de amplificación por PCR. A) *Ariocarpus retusus*; B) *Ferocactus pilosus*; C) *Pereskia lychnidiflora*; D) *Pilosocereus alensis*; E) control negativo; F) *100 bp DNA Ladder (Invitrogen TM)*. Las bandas cercanas a los 620 pb corresponden a los ortólogos de *ARK2/KNAT1*. Las bandas cercanas a los 80 y 200 pb corresponden a productos inespecíficos debidos a los cebadores degenerados.

**Fig. 3.** A) Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de *ARK2* de Cactaceae obtenidas en este trabajo, y proteínas KNOX clase I de *Populus trichocarpa* y *Arabidopsis thaliana*. La región utilizada en los alineamientos pareados y los análisis filogenéticos se muestra delimitada por flechas (aminoácidos 160 y 367). B) Árbol filogenético de proteínas KNOX clase I y II, obtenido por el método de máxima verosimilitud.

Fig. 1

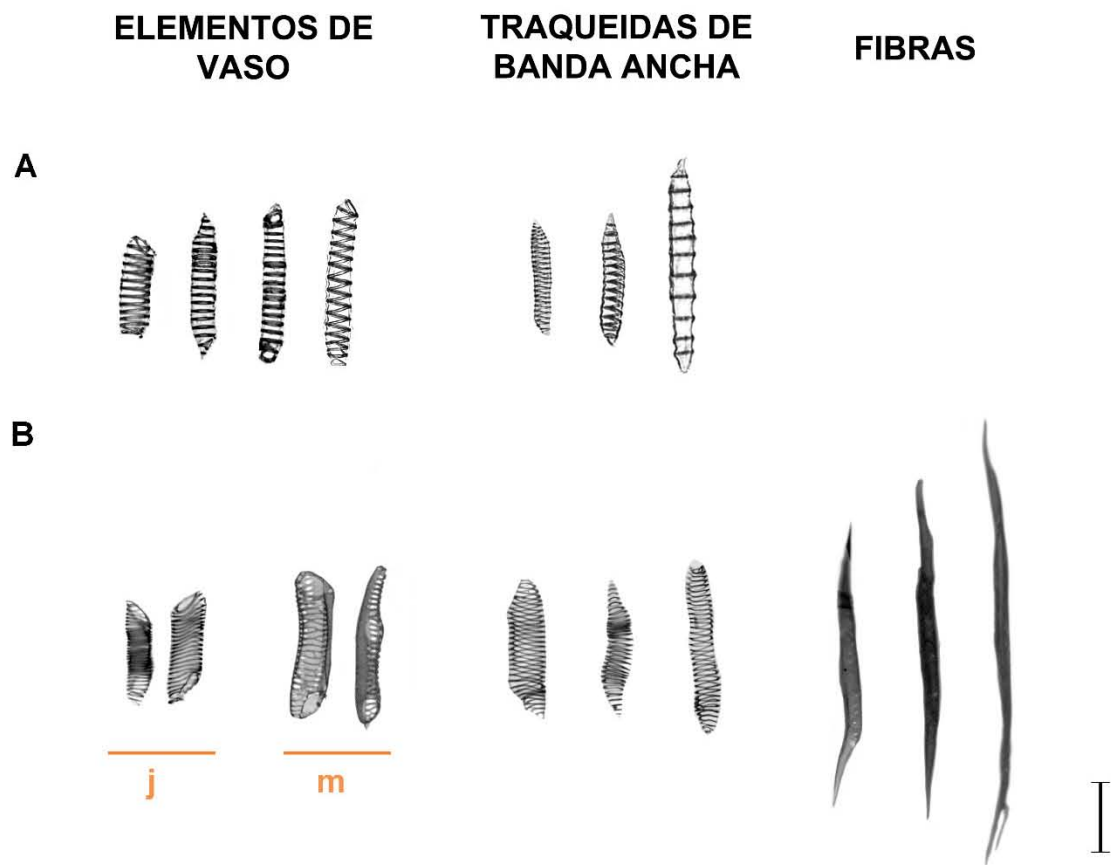
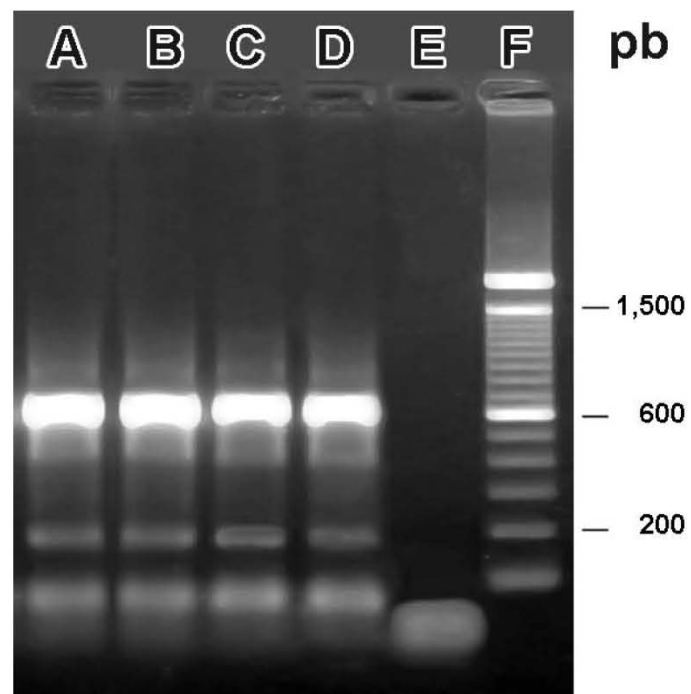


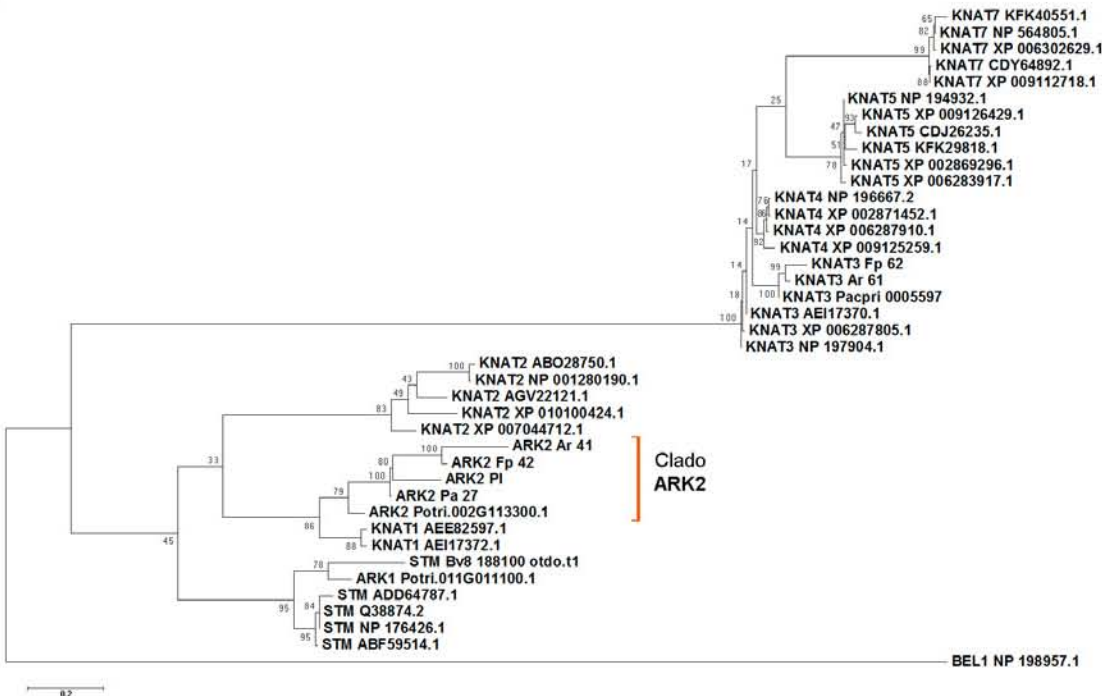
Fig. 2



**Fig. 3**  
**A**



**B**



# **Capítulo 5**

**Discusión general**

**Conclusiones generales y expectativas**



## **Caracteres ancestrales y especialización del xilema secundario en Cactaceae**

Aunque la morfología ancestral de *Pereskia* ha sido puesta a discusión recientemente (Griffith 2004), Arakaki *et al.* (2011) estimaron que *Pereskia* fue de los primeros linajes divergentes en Cactaceae, incluso varios millones de años antes de que emergieran las formas verdaderamente suculentas. Además, los datos moleculares apoyan la hipótesis de que al menos una parte del género es la más tempranamente diversificada dentro de Cactaceae (Nyffeler 2002, Hernández-Hernández *et al.* 2011, Vázquez-Sánchez *et al.* 2013). Asimismo, algunos autores han señalado diversos rasgos del xilema secundario de *Pereskia* que son definitivamente primitivos para la familia Cactaceae en general (Gibson 1973, Mauseth y Landrum 1997).

Asumiendo que *Pereskia* es un grupo relictual con características morfo-anatómicas remarcablemente constantes, Mauseth y Landrum (1997) señalaron algunas características consideradas como ancestrales dentro de la familia: por ejemplo, madera fibrosa con porosidad difusa, parénquima paratraqueal escaso, vasos relativamente amplios distribuidos en pequeños grupos, miembros de vaso con placas de perforación simples pero punteaduras muy variables ([Capítulo 2: Fig. 2](#)) y TBAs ausentes. El sistema radial constituye un pequeño porcentaje del volumen de la madera, tiene radios primarios y secundarios, frecuentemente angostos (León 2002), pueden ser lignificados o no. La médula con drusas y células de mucílago, pero sin haces medulares. No obstante, algunos de esos rasgos también son reconocidos como signos de alta especialización evolutiva del xilema secundario dentro de las angiospermas en general, así como en aquellas especies con hojas no reducidas de los grupos más ancestrales de Cactaceae (Bailey 1944, Bailey y Srivastava 1962, Bailey 1964), lo que indica que los primeros representantes de Cactaceae (especies con madera fibrosa típica y con hojas no reducidas, como los miembros de *Pereskia*), ya habían alcanzado un alto grado de especialización anatómica en la madera antes de desarrollar la suculencia y otros cambios morfo-anatómicos que condujeron a la diferenciación de las dos subfamilias más especializadas, Opuntioideae y Cactoideae (Bailey y Srivastava 1962, Gibson 1973, Arakaki *et al.* 2011). Además, Edwards y Donoghue (2006) señalaron que los miembros más derivados de Cactaceae no son por sí mismos directamente responsables de la adquisición de mecanismos fisiológicos como el uso eficiente del agua, sino que los elementos clave en las estrategias del uso de agua

fueron establecidos dentro de Cactaceae antes de la evolución de las formas suculentas y la pérdida evolutiva de las hojas funcionales.

En Opuntioideae pudo ser especialmente importante el incremento en la capacidad de almacenar agua en la madera misma ya que sus tallos carecen de las adaptaciones encontradas en Cactoideae (Mauseth 2006a). Otro de los estados incipientes de divergencia, y quizás el más significativo en la especialización anatómica de éstas dos subfamilias, fue la tendencia a incrementar la circunferencia del estele, con una concomitante expansión de la médula, para alcanzar y acentuar la suculencia en el tallo (Bailey 1964). El desarrollo de una médula más amplia en Cactoideae involucró la aparición, presuntamente adaptativa, de haces medulares (ausentes en las tres subfamilias más ancestrales), los cuales permitieron el almacenamiento-transporte de agua y carbohidratos a lo largo de la médula (Mauseth y Sajeve 1992, Mauseth 1993).

Por otro lado, el alto grado de suculencia en el córtex se pudo deber al desarrollo de los haces corticales, los cuales son considerados como una innovación clave para la evolución de muchas especies de Cactoideae: tener un sistema de haces que vasculariza el córtex les permitió adquirir evolutivamente un grosor poco usual, no observado en otras plantas suculentas sin haces corticales, como las euphorbias y stapelias, las cuales son un claro ejemplo de convergencia evolutiva (Mauseth 2006a). Al respecto, Edwards y Donogue (2006) señala que el papel de los haces corticales en la radiación de formas altamente suculentas dentro de Cactoideae queda por ser comprobado. No obstante, debido a que la vida promedio de los haces corticales es larga, comparada con aquella de las venas foliares de otras dicotiledóneas, se ha propuesto que estos se originaron independientemente en Cactaceae (Mauseth y Sajeve 1992, Terrazas y Mauseth 2002).

### **Hipótesis de la evolución del xilema secundario**

De acuerdo con las hipótesis evolutivas para la familia Cactaceae, el aumento de la suculencia está directamente relacionado con la evolución del xilema secundario (Carlquist 1962; 2009, Gibson 1973, Anderson 1986, Altesor *et al.* 1994, Mauseth 2004).

Inicialmente Gibson (1973) señaló que había una escasa o nula correlación entre los caracteres del xilema secundario con la taxonomía y el hábitat de las especies, por ello la vía más probable de evolución de los miembros de Cactaceae, en términos de las formas de

crecimiento y la arquitectura de la madera, podría haber sido la paedomorfosis (“juvenilismo” *sensu* Gibson (1973)). De acuerdo con sus observaciones en Cactoideae, Gibson (1973) notó que en las especies globosas de talla pequeña, cuyos tallos no requieren soporte mecánico o éste ha sido asumido por la presión de turgencia, las fibras se han perdido evolutivamente y el xilema secundario retiene caracteres juveniles (presencia de TBAs y elementos de vaso parecidos a los del protoxilema, menos lignificados); por el contrario, algunas especies con tallos más grandes y suculentos que aquellos de las especies ancestrales con hojas (p. ej. las especies de *Pereskia*), muestran un mayor grosor de la pared celular de las fibras y elementos de vaso con paredes celulares secundarias más desarrolladas. Por ello propuso que las especies con madera no fibrosa han evolucionado por el aumento de la longevidad y una eliminación filogenética gradual de las fibras, mientras que la evolución de las formas de crecimiento arbóreas grandes pudo haber sido acompañada por el aumento en las dimensiones de las fibras y que la madera fibrosa podría ser más adulta que la madera no fibrosa (Gibson 1973). En este sentido, señaló que la paedomorfosis es pronunciada en las especies no fibrosas ya que la resistencia mecánica de la madera disminuye en favor de una mayor eficiencia en la conducción. Además, dentro de Cactoideae las especies de talla pequeña (no fibrosas, o escasamente fibrosas), acumulan menor cantidad de madera ([Capítulo 2: Cuadro 1](#)), a menudo dispuesta en forma de fascículos vasculares, como en el xilema primario; mientras que en las especies de talla mayor (fibrosas) la acumulación llega a ser considerable y la madera puede formar un cilindro vascular continuo ([Capítulo 2: Fig. 3E](#)).

De manera general, la acumulación de madera en las especies de Cactaceae es comparativamente escasa (Benson 1969, Gibson 1973, Mauseth y Plemons 1995, Terrazas y Arias 2002, Terrazas y Loza-Cornejo 2003, Mauseth 2006b, Romero–Godofredo y Melo-de-Pinna 2008, Reyes-Rivera 2010, Vázquez-Sánchez y Terrazas 2011, Escamilla-Molina 2013) lo cual ha sido considerado como un signo de paedomorfosis (Carlquist 1970). En este sentido, Altesor *et al.* (1994) observaron en algunas especies de Cactaceae el mismo patrón que Gibson (1973) había descrito sobre la acumulación del xilema secundario en Cactoideae y demostraron mediante un análisis alométrico que el retardo en la velocidad de acumulación del xilema secundario es el principal mecanismo para la evolución de la suculencia dentro de Cactaceae. De acuerdo con estos autores, el desarrollo de la suculencia

implicó también la selección de caracteres juveniles en el xilema secundario; por ejemplo, la disminución o retardo en la lignificación de la madera, la retención de elementos de vaso parecidos a los del protoxilema, y la presencia de TBAs (Altesor *et al.* 1994).

Se ha propuesto que la presencia de TBAs en el xilema secundario de Cactaceae representa un carácter juvenil (Gibson 1973, Mauseth 2004) y que las TBAs derivan filogenéticamente de un elemento de vaso verdadero por la falla en el desarrollo de la placa de perforación (Carlquist 1961, Bailey 1966, Gibson 1973). Además, varios autores coinciden en que surgieron como una adaptación al estrés hídrico ya que están presentes en grupos con representantes suculentos (Mauseth 2004, Landrum 2006, Romero–Godofredo y Melo-de-Pinna 2008). Particularmente para Cactaceae, Mauseth (2004) propuso cuatro escenarios posibles de origen: 1) que las TBAs se originaron sólo una vez en Cactaceae y están universalmente presentes; su ausencia en algunos linajes sería debida a su escasez o al muestreo de los tejidos; 2) que las TBAs se han originado sólo una vez y se han perdido evolutivamente en varios linajes; algo que no parece imposible ya que muchas especies desarrollan TBAs por periodos tan breves que son casi indetectables; 3) que las TBAs tengan un solo origen; esto implicaría una diferente clasificación y filogenia; 4) que las TBAs se originaron muchas veces dentro de Cactaceae; las especies sin TBAs serían partes de líneas evolutivas donde las TBAs nunca se originaron (Mauseth 2004). De los cuatro escenarios parece más probable que las TBAs se hayan originado sólo una vez en Cactaceae, y que pudieran haber tenido un origen independiente para cada clado: Cactaceae/Portulacaceae y Aizoaceae (Landrum 2001; 2006, Mauseth 2004, Romero–Godofredo y Melo-de-Pinna 2008).

El interés del origen ontogenético y evolutivo de las TBAs radica en las implicaciones adaptativas que han conferido a las especies de Cactaceae. Como se ha mencionado anteriormente, algunos de los grupos más derivados como *Ariocarpus* y *Mammillaria* poseen madera no fibrosa con predominancia de TBAs, mientras que en los más ancestrales como *Pereskia* estas células están completamente ausentes. Por otro lado, es bien sabido que en las especies con madera dimorfa y polimorfa que desarrollan alguna fase con TBAs, ésta es siempre la primera en ocurrir y posteriormente se da el cambio a madera fibrosa o parenquimatosa (Terrazas y Mauseth 2002). De acuerdo con Mauseth y Plemons (1995), la madera fibrosa es presuntamente ancestral en aquellas especies

polimorfas con alguna fase fibrosa, mientras que aquellas con madera sin fibras, o con TBAs exclusivamente, son altamente derivadas; por ello, propusieron que las especies con madera monomorfa de TBAs han evolucionado a partir de las especies con madera polimorfa mediante la pérdida de la última fase, fibrosa o parenquimatosa, en una vía paedomórfica (Mauseth y Plemons 1995).

### **Morfogénesis**

Como han señalado los autores anteriormente citados, parece que la evolución de formas dentro de Cactaceae está relacionada con la especialización del xilema secundario (el principal sistema de vascularización del tallo) y el asentamiento de la succulencia, mediante el retardo de las tasas de desarrollo (paedomorfosis, juvenilismo o neotenia alométrica). Existen evidencias que sugieren que dicho retardo incluye no sólo el desarrollo del xilema secundario, sino también otros tejidos incluso de origen primario; por ejemplo, el desarrollo de la epidermis en Cactaceae está relacionado con la longevidad celular: en algunas especies de *Pereskia*, al igual que en las angiospermas en general, la epidermis y gran parte del córtex son reemplazados rápidamente por la corteza (Edwards y Donoghue 2006, Ogburn y Edwards 2009), pero en la mayoría de las especies de Cactaceae, con tallos succulentos y fotosintéticos, la epidermis permanece viva por largos periodos, incluso cientos de años (Mauseth y Landrum 1997). Al respecto, Edwards y Donoghue (2006) señalan que para la evolución de los grupos más derivados en Cactaceae, los tallos como órganos fotosintéticos no son suficientes para llevar a cabo una fotosíntesis significativa, por lo que se hicieron necesarias las modificaciones en el tejido cortical. Además, de acuerdo con la relación de tejido tallo-hoja y la eficiencia de uso del agua mostrada por los grupos ancestrales como *Pereskia*, las hojas de esas especies son sobre-abastecidas de agua (Edwards y Donoghue 2006). Por otro lado, Altesor *et al.* (1994) mostraron que en las especies más succulentas de Cactaceae la acumulación de madera es escasa, lo que supone un suministro de agua menor a través del sistema vascular, pero con la ventaja de tener un tejido cortical que asegura el continuo abastecimiento de agua requerido por la transpiración en los tallos fotosintéticos. Esto indica fuertemente que la evolución de los miembros de Cactaceae, además de involucrar la especialización morfo-anatómica del tallo, está relacionada en general con una compleja reorganización de su estructura, metabolismo

y los mecanismos morfogenéticos que los controlan (Mauseth 1995, Edwards y Donoghue 2006, Ogburn y Edwards 2009).

En general es evidente el retardo en la duración de las características juveniles en el xilema secundario de Cactaceae, principalmente en las especies de talla pequeña con un alto grado de succulencia, sin embargo, hasta ahora no se han logrado conocer los factores morfogenéticos que determinan el comportamiento del desarrollo del xilema secundario a nivel de cámbium vascular. Mauseth y Plemons (1995) propusieron algunas hipótesis sobre el desarrollo del xilema secundario: 1) es posible que la diferenciación de una matriz parenquimatosa, o de TBAs, pudieran haber derivado de un mecanismo morfogenético que controla la formación de una matriz fibrosa por medio de la inactivación de genes que controlan la deposición y la lignificación de la pared celular secundaria; 2) las transiciones abruptas de un tipo de madera a otro pueden ser producto de homeosis, donde los genes (homeóticos) que caracterizan un tipo de tejido en particular se tornan activos en sitios o tiempos atípicos, de tal manera que estos alteran la morfogénesis de los tejidos, usualmente controlados por otros genes, resultando en un tejido con una mezcla de ambas características.

No existen estudios previos sobre los factores que controlan la morfogénesis a nivel del cámbium vascular en Cactaceae. No obstante, recientemente se han hecho estudios moleculares, genéticos y genómicos en las plantas modelo como *Populus* y *Arabidopsis* donde se han conocido algunos genes responsables de la función y desarrollo del cámbium vascular y el crecimiento leñoso. Se ha observado que, aunque algunos genes homeóticos regulan el crecimiento secundario, estos no son exclusivos de las plantas leñosas. Asimismo, los genes reguladores de los meristemos apicales, tienen homólogos, como los genes homeóticos que estudiamos en este trabajo (Capítulo 4), que se expresan también en el cámbium vascular durante el crecimiento secundario (Mellerowicz *et al.* 2001, Schrader *et al.* 2004, Groover 2005, Groover *et al.* 2006, Spicer y Groover 2010). La presencia de genes homeóticos, como los genes *ARK2*, en especies de Cactaceae, los cuales regulan tanto el crecimiento primario como el desarrollo del xilema secundario en las plantas modelo, confirma que la homeosis anteriormente propuesta por otros autores sí tiene lugar en el xilema secundario de Cactaceae. Además, es muy probable que la amplia variación en el xilema secundario dentro de Cactaceae esté relacionada con la expresión diferencial de

dichos genes, o su expresión diferencial en conjunto con otros genes que regulan la formación de la pared celular, como aquellos mencionados en el [Capítulo 4](#).

### **Lignificación de los elementos de vaso como indicador de la evolución del xilema secundario en Cactaceae**

En Cactaceae sólo algunas especies desarrollan una madera auténticamente fibrosa, y existen otras donde las fibras están completamente ausentes ya que la madera consiste predominantemente de TBAs. Consecuentemente, los elementos de vaso y las células parenquimatosas son los únicos tipos celulares omnipresentes en la madera de esta familia. Como se mencionó anteriormente, hay una correlación entre la morfología de los elementos de vaso (en términos del grado de desarrollo de la pared celular secundaria), la forma de crecimiento de las especies y el tipo de madera que desarrollan. Además, algunos autores han remarcado las características morfológicas juveniles de los elementos traqueales en Cactaceae y las han vinculado con procesos de evolución paedomórficos y alométricos (Gibson 1973, Altesor *et al.* 1994). Por ello, el estudio de la lignificación del xilema secundario y las tendencias ontogenéticas de los elementos de vaso son altamente recíprocos. En este sentido, la variación en el grado de desarrollo de la pared celular secundaria de los elementos de vaso, debida a la deposición variable de lignina, podría indicar cambios en los procesos evolutivos del xilema secundario y de las especies en general.

Se ha reportado que los genes que intervienen en las vías biosintéticas de la pared celular se han encontrado en un gran número de especies, tanto angiospermas como gimnospermas, y se considera que son bien conservados a lo largo de las plantas y las algas (Baucher *et al.* 1998; Bonawitz y Chapple 2010; Vanholme *et al.* 2010; Tohge *et al.* 2013a; 2013b). Además, los genes que modifican el fenotipo del xilema secundario en algunos mutantes, ya sea por la alteración de la diferenciación celular o por la activación de otros genes que influyen en el desarrollo de los derivados del cámbium vascular, tienen acción directa en alguno de los puntos de la ruta biosintética de la lignina (Kubo *et al.* 2005, Groover *et al.* 2006, Zhong *et al.* 2006, Mitsuda *et al.* 2007, Zhong y Ye 2007, Du *et al.* 2009).

Los resultados del estudio global de la lignificación de la madera en Cactaceae (Capítulo 3), donde se encontró que la composición química de la lignina en las especies de los grupos más derivados es muy variable en general, sugieren que las tasas en los procesos evolutivos podrían ser altas dentro del xilema secundario de Cactaceae. Por ejemplo, se ha propuesto que la variabilidad en los monómeros de la lignina en semillas de Cactaceae es debida a los procesos evolutivos que están teniendo lugar en las vías biosintéticas de la lignina (Chen *et al.* 2013). Asimismo, Ogburn y Edwards (2009) han propuesto que las altas tasas de evolución pueden promover la acumulación de una gran combinación de nuevos caracteres (en términos de labilidad/variación), los cuales a su vez pueden ser una fuente primaria de innovación evolutiva dentro de los linajes de Cactaceae.

### **CONCLUSIONES GENERALES Y EXPECTATIVAS**

Los resultados aquí mostrados indican que la amplia variabilidad de formas de crecimiento dentro de Cactaceae está correlacionada tanto con las características anatómicas de la madera como con su composición química. En este sentido, consideramos que las características de los elementos de vaso (en términos del desarrollo y lignificación de la pared celular secundaria), son buenos indicadores de los procesos evolutivos del desarrollo dentro del xilema secundario de Cactaceae. Estudios posteriores de caracterización química a nivel celular ayudarían a entender el papel de la lignificación en la diferenciación celular de los derivados del cambium vascular dentro de Cactaceae.

Dado que los genes que controlan el desarrollo del xilema secundario de las plantas modelo también tienen acción en el control de la actividad del cambium vascular de las Cactaceae, es posible que conociendo los mecanismos de acción de estos genes y sus relaciones filogenéticas se pueda conocer el origen de la amplitud de variantes cambiales y su relación con la evolución de formas dentro de Cactaceae. Por ello, se hace necesario caracterizar funcionalmente los genes ortólogos aquí reportados. Además, el uso de nuevas herramientas, tales como los análisis comparativos de transcriptomas, podría ayudar a entender los mecanismos moleculares por medio de los cuales ha evolucionado el desarrollo del xilema secundario.



## REFERENCIAS GENERALES

- Anderson E F. (2001) *The Cactus Family*. Timber Press, Portland.
- Altesor A, Silva C, Ezcurra E. (1994) Allometric neoteny and the evolution of succulence in cacti. *Bot. J. Linn. Soc.* 114: 283–292.
- Arakaki M, Christin P A, Nyffeler R, Lendel A, Eggli U, Ogburn R M, Elizabeth S M, Moore J y Edwards E J. (2011) Contemporaneous and recent radiations of the world's major succulent plant lineages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108(20), 8379-8384.
- Arias S, Terrazas T. (2001) Variación en la anatomía de la madera de *Pachycereus pecten-aboriginum* (Cactaceae). *An. Inst. Biol. Univ. Nac. Aut. México Bot.* 72:157–169.
- Arnold D H, Mauseth J D. (1999) Effects of environmental factors on development of wood. *Am. J. Bot.* 86: 367–371.
- Bailey I W. (1944) The development of vessels in angiosperms and its significance in morphological research. *Am. J. Bot.* 31: 421-428.
- Bailey I W. (1960) Comparative anatomy of the leaf-bearing Cactaceae, I. Foliar vasculature of *Pereskia*, *Peresklopsis* and *Quiabentia*. *J. Arnold Arbor.* 41: 341-356.
- Bailey I W. (1962) Comparative anatomy of the leaf-bearing Cactaceae, VI. The xylem of *Pereskia sacharosa* and *Pereskia aculeata*. *J. Arnold Arbor.* 43: 376-388.
- Bailey I W. (1963) Comparative anatomy of the leaf-bearing Cactaceae. VIII. The xylem of pereskias from southern Mexico and Central America. *J. Arnold Arbor.* 44: 211–216.
- Bailey I W. (1964) Comparative anatomy of the leaf-bearing Cactaceae, XI. The xylem of *Peresklopsis* and *Quibentia*. *J. Arnold Arbor.* 45: 140-157.
- Bailey I W. (1966) The significance of the reduction of vessels in the Cactaceae. *J. Arnold Arbor.* 47: 288-292.
- Bailey I W, Srivastava L M. (1962) Comparative anatomy of the leaf-bearing Cactaceae, IV. The fusiform initials of the cambium and the form and structure of their derivatives. *J. Arnold Arbor.* 43: 187-202.
- Bárcenas R T, Yesson C, Hawkins J A. (2011) Molecular systematics of the Cactaceae. *Cladistics* 27: 470–489.
- Bárcenas-Argüello M L, Gutiérrez-Castorena M C, Terrazas T. (2015) The polymorphic weddellite crystals in three species of *Cephalocereus* (Cactaceae). *Micron.* 77:1-8.
- Barthlott W, Porembski S. (1996) Ecology and morphology of *Blossfeldia liliputana* (Cactaceae): A poikilohydric and almost astomate succulent. *Bot. Acta.* 109: 161-166.

- Baucher M, Monties B, Montagu M V y Boerjan W. (1998) Biosynthesis and genetic engineering of lignin. *Crit. Rev. Plant Sci.* 17: 125-197.
- Benson L. (1969) The native cacti of California. Stanford University Press, Stanford.
- Bernal-Salazar S, Terrazas T. (2005) Wood anatomical variation of *Neobuxbaumia tetetzo*: a columnar Cactaceae. *J. Arid Environ.* 63: 671-685.
- Bierhorst D W, Zamora P M. (1965) Primary xylem elements and element associations of angiosperms. *Am. J. Bot.* 52: 657-710.
- Bobich E G, Nobel P S. (2001) Biomechanics and anatomy of cladode junctions for two *Opuntia* (Cactaceae) species and their hybrid. *Am. J. Bot.* 88: 391–400.
- Bobich E G, Nobel P S. (2002) Cladode junctions regions and their biomechanics for arborescent platyopuntias. *Int. J. Plant Sci.* 163:507–517.
- Boke, N. H. 1954. Organogenesis of the vegetative shoot in *Pereskia*. *Am. J. Bot.* 41: 619–637.
- Bonawitz N D y Chapple C. 2010. The genetics of lignin biosynthesis: connecting genotype to phenotype. *Ann. Rev. Genet.* 44: 337-363.
- Bravo-Hollis H. (1978) Las Cactáceas de México. Vol. I Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.
- Buxbaum F. (1950) Morphology of cacti. Section I. Roots and stems. Abbey Garden Press, Pasadena, California.
- Carlquist S. (1961) Comparative plant anatomy. Holt, Rinehart and Winston, New York.
- Carlquist S. (1962) A theory of pedomorphosis in dicotyledonous woods. *Phytomorph.* 12:30–45.
- Carlquist S. (1975) Ecological strategies of xylem evolution. University of California Press, Berkeley, California. 259 p.
- Carlquist S. (1977) Ecological factors in wood evolution: a floristic approach. *Am. J. Bot.* 64: 887-896.
- Carlquist S. (2001) Comparative wood anatomy, Springer-Verlag, Berlin.
- Carlquist S. (2009) Xylem heterochrony: An unappreciated key to angiosperm origin and diversifications. *Bot. J. Linn. Soc.* 161: 25-65.
- Carlquist S. (2010) Caryophyllales: a key group for understanding wood anatomy character states and their evolution. *Bot. J. Linn. Soc.* 164: 342-393.

- Coleman H D, Ji-Young P, Ramesh N, Clint C, Mansfield S D. (2008) RNAi-mediated suppression of p-coumaroyl-CoA 3-hydroxylase in hybrid poplar impacts lignin deposition and soluble secondary metabolism. *PNAS*. 105: 4501–4506.
- Conde L F. (1975) Anatomical comparisons of five species of *Opuntia* (Cactaceae). *Ann. Missouri Bot. Gard.* 62: 425–473.
- Cornejo D O, Simpson B B. (1997) Analysis of form and function in North American columnar cacti (tribe Pachycereae). *Am. J. Bot.* 84: 1482– 1501.
- Creighton R H, Hibbert H. (1944) Studies on lignin and related compounds. LXXVI. Alkaline nitrobenzene oxidation of corn stalks. Isolation of p-hydroxybenzaldehyde. *J. Amer. Chem. Soc.* 66:37-38.
- Creighton R H, Gibbs R D, Hibbert H. (1944) Studies on Lignin and related compounds LXXV. Alkaline nitrobenzene oxidation of plant materials and application to taxonomic classification. *J. Amer. Chem. Soc.* 66:32-37.
- Chattaway M M. (1936) The relation between fibre and cambial initial length in dicotyledonous woods. *Trop. Woods.* 46: 16-20.
- Darbishire O V. (1904) Observations on *Mamillaria elongata*. *Ann. Bot.* 18: 375-416.
- Du J, Groover A T. (2010) Transcriptional Regulation of Secondary Growth and Wood Formation. *J. Integrative Plant Biol.* 52: 17–27.
- Du J, Mansfield S D, Groover A T. (2009) The *Populus* homeobox gene ARBORKNOX2 regulates cell differentiation during secondary growth. *Plant J.* 52: 17–27.
- Edwards E J, Nyffeler R, Donoghue M J. (2005) Basal cactus phylogeny: implications of *Pereskia* (Cactaceae) paraphyly for the transition to the cactus life forms. *Am. J. Bot.* 92: 1177-1188.
- Eggl U. (1984) Stomatal types. *Plant Systematics and Evolution* 146: 197–214.
- Esau K. (1977) Anatomy of seed plants, 2nd ed. Wiley. New York.
- Escamilla-Molina R. (2013) Análisis comparativo de los elementos traqueales del tallo y tubérculo de seis especies de *Coryphantha* (Cactaceae). Tesis de Maestría. Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.
- Franke R, Hemm M R, Denault J W, Ruegger M O, Humphreys J M, Chapple C. (2002) Changes in secondary metabolism and deposition of an unusual lignin in the *ref8* mutant of *Arabidopsis*. *Plant J.* 30:47-59.
- Frausto-Reyes C, Loza-Cornejo S, Terrazas T, Miranda-Beltrán M de L, Aparicio-Fernández X, López-Macías BM, Morales-Martínez SE, Ortiz-Morales M. (2014)

- Raman spectroscopy study of calcium oxalate extracted from cacti stems. *Appl. Spectrosc.* 68:1260-5.
- Garrett T Y, Huynh C-V, North G B. (2010) Root contraction helps protect the "living rock" cactus *Ariocarpus fissuratus* from lethal high temperatures when growing in rocky soil. *Am. J. Bot.* 97:1951-1960.
- Gibson A C. (1973) Comparative anatomy of secondary xylem in Cactoideae (Cactaceae). *Biotropica.* 5: 29–65.
- Gibson A C. (1977) Vegetative anatomy of *Maihuenia* (Cactaceae) with some theoretical discussions of ontogenetic changes in xylem cell types. *Bull. Torrey Bot. Club.* 104: 35–48.
- Gibson A C. (1978) Wood anatomy of *Platyopuntias*. *Aliso.* 9: 279–307.
- Gibson A C, Horak K E. (1978) Systematic anatomy and phylogeny of Mexican columnar cacti. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 65: 999–1057.
- Gibson A C, Nobel P S. (1986) The cactus primer. Harvard University Press, Cambridge, MA. 286 p.
- Goicoechea M, Lacombe E, Legay S, Mihaljevic S, Rech P, Jauneau A, Lapierre C, Pollet B, Verhaegen D, Chaubet-Gigot N, Grima-Pettenati J. (2005) EgMYB2, a new transcriptional activator from *Eucalyptus* xylem, regulates secondary cell wall formation and lignin biosynthesis. *Plant J.* 43:553–567.
- Griffith P. (2004) What Did the First Cactus Look like? An Attempt to Reconcile the Morphological and Molecular Evidence. *Taxon.* 53:493-499.
- Griffith P, Porter J M. (2009) Phylogeny of Opuntioideae (Cactaceae). *Int. J. Plant Sci.* 170:107–116.
- Groover A T. (2005) What genes make a tree a tree? *Trends Plant Sci.* 10(5), 210-214.
- Groover A y Jones A M. (1999). Tracheary Element differentiation uses a novel mechanism coordinating programmed cell death and secondary cell wall synthesis. *Plant Physiol.* 119: 375–384.
- Groover A, Mansfield S, DiFazio S, Dupper G, Fontana J, Millar R y Wang Y. (2006) The *Populus* homeobox gene ARBORKNOX1 reveals overlapping mechanisms regulating the shoot apical meristem and the vascular cambium. *Plant Mol. Biol.* 61: 917–932.
- Hartl W P, Klapper H, Barbier B, Ensikat H J, Dronskowski R, Müller P, Ostendorp G, Tye A, Bauer R, Barthlott W. (2007) Diversity of calcium oxalate crystals in Cactaceae. *Can. J. Bot.* 85: 501-517.

- Hernández-Hernández T, Hernández H M, De-Nova J A, Puente R, Eguiarte L E, Magallón S. (2011) Phylogenetic relationships and evolution of growth form in Cactaceae (Caryophyllales, Eudicotyledoneae). *Am. J. Bot.* 98: 44–61.
- Herrera-Cardenas R, Terrazas T, Loza-Cornejo S. (2000) Anatomía comparada del tallo y de la raíz de las especies del genero *Neoevansia* Marshall (Cactaceae). *Bol. Soc. Bot. Mexico.* 67: 7-15.
- Hirakawa Y, Kondo Y, Fukuda H. (2010) Regulation of Vascular Development by CLE Peptide-receptor Systems. *J. Integrative Plant Biol.* 52: 17–27.
- Huang F L, Qiu H, Guo W. (2014) Microstructures and mechanical properties of fiber cells from *Echinocactus grusonii* cactus spine. *Sci. China Technol. Sci.* 57: 706–712.
- Kiesling R. (1984) Estudios en Cactaceae de Argentina: *Maihueniopsis*, *Tephrocactus* y géneros afines (Opuntioideae). *Darwiniana.* 25: 171–215.
- Kubo M, Udagawa M, Nishikubo N, Horiguchi G, Yamaguchi M, Ito J, Mimura T, Fukuda H y Demura T. (2005) Transcription switches for protoxylem and metaxylem vessel formation. *Genes Dev.* 19(16), 1855-1860.
- Landrum J V. (2001) Wide-band tracheids in leaves of genera in Aizoaceae: the systematic occurrence of a novel cell type and its implications for the monophyly of the subfamily Ruschioideae. *Plant Syst Evol.* 227:49–61.
- Landrum J V. (2006) Wide-band tracheids in genera of Portulacaceae: novel, non xylary tracheids possibly evolved as an adaptation to water stress. *J. Plant Res.* 119: 497-504.
- Landrum J V. (2008) Wide-band tracheids from a southern African succulent and their responses to varying light intensities: a preadaptation for future water stress? *Int. J. Bot.* 4:99–103.
- Larson P R. (1994) The vascular cambium. Springer-Verlag. New York.
- León W J. (2002) Anatomía xilemática del tronco de *Pereskia guamacho* (Cactaceae) procedente del estado de Mérida-Venezuela. *Pitteria.* 31:41–49.
- Li X, Harry X W, Southerton S G. (2010) Comparative genomics reveals conservative evolution of the xylem transcriptome in vascular plants. *BMC Evol. Biol.* 10: 190. doi: 10.1186/1471-2148-10-190.
- Liu L, Filkov V, Groover A. (2014) Modeling transcriptional networks regulating secondary growth and wood formation in forest trees. *Physiol Plant.* 151(2):156-63. doi: 10.1111/ppl.12113
- Loza-Cornejo S, Terrazas T. (1996) Anatomía del tallo y de la raíz de dos especies de *Wilcoxia* Britton & Rose (Cactaceae) del noroeste de México. *Bol. Soc. Bot. México.* 59: 13–23.

- Loza-Cornejo S, Terrazas T. (2003). Epidermal and hypodermal characteristics in North American Cactoideae (Cactaceae). *J. Plant Res.* 116: 27–35.
- Loza-Cornejo S, Terrazas T, López-Mata L, Trejo C. (2003). Características morfo-anatómicas y metabolismo fotosintético en plántulas de *Stenocereus queretaroensis* (Cactaceae): su significado adaptativo. *INCI.* 28: 83-89.
- Loza–Cornejo S, Terrazas Teresa. (2011) Morfo–anatomía de plántulas en especies de Pachycereeae: ¿hasta cuándo son plántulas? *Bol. Soc. Bot. México.* 88:1-13.
- Lucas W J, Groover A, Lichtenberger R, Furuta K, Yadav S R, Helariutta Y, He X Q, Fukuda H, Kang J, Brady S M, Patrick J W, Sperry J, Yoshida A, López-Millán A F, Grusak M A, Kachroo P. (2013) The plant vascular system: evolution, development and functions. *J. Integr. Plant Biol.* 55(4):294-388. doi: 10.1111/jipb.12041
- Mauseth J D. (1977) Cytokinin- and gibberellic acid-induced effects on the determination and morphogenesis of leaf primordia in *Opuntia polyacantha* (Cactaceae). *Am. J. Bot.* 64: 337–346.
- Mauseth J D. (1978) The structure and development of an unusual type of articulated laticifer in *Mammillaria* (Cactaceae). *Am. J. Bot.* 65: 415–420.
- Mauseth J D. (1980) Release of whole cells of *Nopalea* (Cactaceae) into secretory canals. *Bot. Gazette.* 141: 15–18.
- Mauseth J D. (1989) Comparative structure-function studies within a strongly dimorphic plant, *Melocactus intortus* (Cactaceae). *Bradleya.* 7: 1–11.
- Mauseth J D. (1993) Medullary bundles and the evolution of cacti. *Am. J. Bot.* 80: 928–932.
- Mauseth J D. (1995) Collapsible water-storage cells in cacti. *Bull. Torrey Bot. Club.* 122: 145–151.
- Mauseth J D. (1996) Comparative anatomy of tribes Cereeae and Browningieae (Cactaceae). *Bradleya* 14: 66–81.
- Mauseth J D. (1999) Anatomical adaptations to xeric conditions in *Maihuenia* (Cactaceae), a relictual, leaf-bearing cactus. *J. Plant Res.* 112: 307–315.
- Mauseth J D. (2000) Theoretical aspects of surface-to-volume ratios and water-storage capacities of succulent shoots. *Am. J. Bot.* 88: 1107–1115.
- Mauseth J D. (2004) Wide-band tracheids are present in almost all species of Cactaceae. *J. Plant Res.* 117: 69-76.
- Mauseth J D. (2005) Anatomical features, other than wood, in subfamily Opuntioideae (Cactaceae). *Haseltonia.* 11: 2–14.
- Mauseth J D. (2006a) Structure-function relationships in highly modified shoots of Cactaceae. *Ann. Bot.* 98: 901-926.

- Mauseth J D. (2006b) Wood structure in the cactus subfamily Opuntioideae has extremely diverse structure. *Bradleya*. 24: 93-106.
- Mauseth J D, Landrum J V. (1997) Relictual vegetative anatomical characters in Cactaceae: The genus *Pereskia*. *J. Plant Res.* 110: 55–64.
- Mauseth J D, Plemons B J. (1995) Developmentally variable, polymorphic woods in cacti. *Am. J. Bot.* 82: 1199–1205.
- Mauseth J D, Plemons-Rodriguez B J. (1997) Presence of paratracheal water storage tissue does not alter vessel characters in cactus wood. *Am. J. Bot.* 84:815–822.
- Mauseth J D, Plemons-Rodriguez B J. (1998) Evolution of extreme xeromorphic characters in wood: A study of nine evolutionary lines in Cactaceae. *Am. J. Bot.* 85:209–218.
- Mauseth J D, Ross R G. (1988) Systematic anatomy of the primitive ceroid cactus *Leptocereus quadricostatus*. *Bradleya*. 6: 49–64.
- Mauseth J D, Sajeva M. (1992). Cortical bundles in the persistent, photosynthetic stems of cacti. *Ann. Bot.* 70: 317–324.
- Mauseth J D, Stone-Palmquist M E. (2001) Root wood differs strongly from shoot wood within individual plants of many Cactaceae. *Int. J. Plant Sci.* 162:767–776.
- Mauseth J D, Terrazas T, Loza-Cornejo S. 1998. Anatomy of relictual members of subfamily Cactoideae IOS group 1a (Cactaceae). *Bradleya*. 16: 41–43.
- Mele G, Ori N, Sato Y, Hake S. (2003) The Knotted1-like homeobox gene BREVIPEDICELLUS regulates cell differentiation by modulation metabolic pathways. *Genes Dev.* 17: 2088–2093.
- Mellerowicz E J, Baucher M, Sundberg B, Boerjan W. (2001) Unraveling cell wall formation in the woody dicot stem. *Plant Mol. Biol.* 47: 239–274.
- Metcalf C R, Chalk L. (1950) Anatomy of the dicotyledons. Clarendon Press, Oxford.
- Mitsuda N, Iwase A, Yamamoto H, Yoshida M, Seki M, Shinozaki K, y Ohme-Takagi M. (2007) NAC transcription factors, NST1 and NST3, are key regulators of the formation of secondary walls in woody tissues of Arabidopsis. *Plant Cell.* 19: 270-280.
- Monje P V, Baran E J. (2002) Characterization of Calcium Oxalates Generated as Biominerals in Cacti. *Plant Physiol.* 128: 707–713.
- Monje P V, Baran E J. (2009) Characterization of Calcium Oxalate biominerals in *Pereskia* species (Cactaceae). *Z Naturforsch C.* 64:763-766.
- Niklas K L, Buchman Y S L. (1994) The allometry of saguaro height. *Am. J. Bot.* 81: 1161– 1168.

- Niklas K L, Molina-Freaner F, Tinoco-Ojanguren C. (1999) Biomechanics of the columnar cactus *Pachycereus pringlei*. *Am. J. Bot.* 86: 688–695.
- Niklas K L, Molina-Freaner F, Tinoco-Ojanguren C, Paolillo Jr. D J. (2000) Wood biomechanics and anatomy of *Pachycereus pringlei*. *Am. J. Bot.* 87: 469–481.
- Niklas K J, Molina-Freaner F, Tinoco-Ojanguren C, Hogan Jr. C J, Paolillo Jr. D J. (2003) On the mechanical properties of the rare endemic cactus *Stenocereus eruca* and the related species *S. gummosus*. *Am. J. Bot.* 90:663–674.
- Nobel P S. (1999) *Physicochemical and Environmental Plant Physiology*, 2nd ed. Academic Press, San Diego, California.
- Nyffeler R. (2002) Phylogenetic relationships in the cactus family (Cactaceae) based on evidence from trnK/matK and trnL-trnF sequences. *Am. J. Bot.* 89:312–326.
- Nyffeler R, Eggli U, Leuenberger B E. (1997) Noteworthy idioblastic sclereids in the stems of *Eulychnia* (Cactaceae). *Am. J. Bot.* 84: 1192–1197.
- Patzlaff A, McInnis S, Courtenay A, Surman C, Newman L J, Smith C, Bevan M W, Mansfield S, Whetten R W, Sederoff R R, Campbell M M. (2003). Characterisation of a pine MYB that regulates lignification. *Plant J.* 36:743–754.
- Preston C E. (1901) Structural studies on southwestern Cactaceae. *Bot. Gaz.* 32: 35-55.
- Ralph J, Akiyama T, Kim H, Lu F, Schatz P F, Marita J M, Ralph S A, Reddy M S S, Chen F, Dixon R A. (2006) Effects of coumarate-3-hydroxylase downregulation on lignin structure. *J. Biol. Chem.* 281: 8843-8853.
- Reyes-Rivera J. (2010) Ontogenia de la madera en tallos contrastantes de la tribu Cactaeae. Tesis de Maestría. Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. Disponible en: <http://132.248.9.195/ptb2010/octubre/0663800/Index.html>
- Romero–Godofredo V, Melo–de–Pinna G F. (2008) Occurrence of wide–band tracheids in Cactaceae: wood variation during *Pilosocereus aurisetus* development. *J. Torrey Bot. Soc.* 135:94–102.
- Růžička K, Ursache R, Hejátko J, Helariutta Y. (2015) Xylem development - from the cradle to the grave. *New Phytol.* doi: 10.1111/nph.13383.
- Sajeva M, Mauseth J D. (1991). Leaf-like structure in the photosynthetic, succulent stems of cacti. *Ann. Bot.* 68: 405–411.
- Salisbury F B, Ross C W. (1992). *Plant physiology*, 4th ed. Wadsworth Publishing Company, Belmont, California. pp. 80-81.
- Schrader J, Nilsson J, Mellerowicz E, Berglund A, Nilsson P, Hertzberg M y Sandberg G. (2004) A high-resolution transcript profile across the wood-forming meristem of



poplar identifies potential regulators of cambial stem cell identity. *Plant Cell*. 16: 2278–2292.

Spicer R, Groover A. (2010) Evolution of development of vascular cambia and secondary growth. *New Phytol*. 186: 577–592.

Stone-Palmquist M, Mauseth J D. (2002) The structure of enlarged storage roots in cacti. *Int. J. Plant. Sci.* 163:89–98.

Taylor-Teeples, Lin L, de Lucas M, Turco G, Toal T W, Gaudinier A, Young N F, Trabucco G M, Veling M T, Lamothe R, Handakumbura P P, Xiong G, Wang C, Corwin J, Tsoukalas A, Zhang L, Ware D, Pauly M, Kliebenstein D J, Dehesh K, Tagkopoulos I, Breton G, Pruneda-Paz J L, Ahnert S E, Kay S A, Hazen S P, Brady S M. (2015) An Arabidopsis gene regulatory network for secondary cell wall synthesis. *Nature*. 517:571–575. doi:10.1038/nature14099

Terrazas T. (2000) Perforated ray cells in genera of Pachycereeae (Cactoideae). *IAWA J.* 21: 457–462.

Terrazas T, Arias S. (2003) Comparative stem anatomy in the subfamily Cactoideae. *Bot. Rev.* 68: 444-473.

Terrazas T, Loza-Cornejo S. (2002). Phylogenetic relationships of Pachycereeae: A cladistic analysis based on anatomical-morphological data. En *Evolution, Ecology, and Conservation of the Columnar Cacti and their Mutualists* (T. H. Fleming y A. Valiente-Banuet, eds.). University of Arizona Press, Tucson.

Terrazas T, Loza-Cornejo S, Arreola-Nava H J. (2005) Anatomía caulinar de las especies del género *Stenocereus* (Cactaceae). *Acta Bot. Venez.* 28: 321-336.

Terrazas T, Mauseth J D. (2002) Shoot anatomy and morphology. En: Nobel PS (ed) *Cacti: biology and uses*. University of California Press, Berkeley. pp 23–40.

Vanholme R, Demedts B, Morreel K, Ralph J, y Boerjan W. (2010) Lignin biosynthesis and structure. *Plant Physiol*. 153: 895-905.

Vázquez-Sánchez M y Terrazas T. (2011) Stem and wood allometric relationships in Cactaceae (Cactaceae). *Trees*. 25: 755-767.

Vázquez-Sánchez M, Terrazas T, Arias S. (2012) El hábito y la forma de crecimiento en la tribu Cactaceae (Cactaceae, Cactoideae). *Bot. Sci.* 90: 97-108.

Vázquez-Sánchez M, Terrazas T, Arias S, Ochoterena H (2013) Molecular phylogeny, origin, and taxonomic implications of the tribe Cactaceae (Cactaceae). *Syst. Biodiv.* 11: 103–116.

Wittier G H, Mauseth J D. (1984) The ultrastructure of developing latex ducts in *Mammillaria heyderi* (Cactaceae). *Am. J. Bot.* 71: 100-110.

Tohge T, Watanabe M, Hoefgen R, y Fernie A R. (2013a) Shikimate and phenylalanine biosynthesis in the green lineage. *Front. in Plant Sci.* 4: 1-13.

Tohge T, Watanabe M, Hoefgen R, y Fernie A R. (2013b) The evolution of phenylpropanoid metabolism in the green lineage. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 48: 123-152.

Towers G H, Gibbs R. (1953) Lignin chemistry and the taxonomy of higher plants. *Nature.* 172:25-26.

Xu P, Kong Y, Li X, Li L. (2013) Identification of molecular processes needed for vascular formation through transcriptome analysis of different vascular systems. *BMC Genom.* 14:217.

Ye Z-H, Zhong R. (2015). Molecular control of wood formation in trees. *J. Exp. Bot.* doi:10.1093/jxb/erv081

Zhong R, Ye Z H. (2007) Regulation of cell wall biosynthesis. *Curr. Opin. Plant Biol.* 10: 564–572.

Zhong R, Ye Z-H. (2015) Secondary Cell Walls: Biosynthesis, Patterned Deposition and Transcriptional Regulation. *Plant Cell Physiol.* 56(2): 195–214. doi:10.1093/pcp/pcu140

Zhong R, Demura T y Ye Z H. (2006) SND1, a NAC domain transcription factor, is a key regulator of secondary wall synthesis in fibers of Arabidopsis. *Plant Cell.* 18: 3158-3170.

## ANEXOS

**Anexo 1.** Información general de las secuencias de proteínas utilizadas para los alineamientos y análisis filogenéticos.

<b>Acrónimo</b>	<b>Especie</b>	<b>Numero de acceso</b>	<b>Valor E</b>	<b>% identidad</b>	<b>Base de datos</b>
<b>BEL1_NP_198957.1</b>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_198957.1			GenBank, NCBI.
<b>STM_Q38874.2</b>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q38874.2	0	100%	GenBank, NCBI.
<b>STM_NP_176426.1</b>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_176426.1	0	100%	GenBank, NCBI.
<b>STM_ABF59514.1</b>	<i>Cardamine hirsuta</i>	ABF59514.1	0	95%	GenBank, NCBI.
<b>STM_ADD64787.1</b>	<i>Brassica napus</i>	ADD64787.1	0	100%	GenBank, NCBI.
<b>STM_Bv8_188100_otdo.t1</b>	<i>Beta vulgaris</i>	Bv8_188100_otdo.t1			The Beta vulgaris Resource
<b>ARK1_Potri.011G011100.1</b>	<i>Populus trichocarpa</i>	Potri.011G011100.1			Phytozome
<b>KNAT1_AEE82597.1</b>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AEE82597.1	0	100%	GenBank, NCBI.
<b>KNAT1_AEI17372.1</b>	<i>Arabidopsis lyrata</i>	AEI17372.1	0	94%	GenBank, NCBI.
<b>ARK2_Potri.002G113300.1</b>	<i>Populus trichocarpa</i>	Potri.002G113300.1	0	100%	Phytozome
<b>ARK2_Ar_41</b>	<i>Ariocarpus retusus</i>	----- [*]			Secuencias en el Anexo 2
<b>ARK2_Fp_42</b>	<i>Ferocactus pilosus</i>	----- [*]			Secuencias en el Anexo 2
<b>ARK2_Pa_27</b>	<i>Pilosocereus alensis</i>	----- [*]			Secuencias en el Anexo 2
<b>ARK2_Pi</b>	<i>Pereskia lychnidiflora</i>	----- [*]			Secuencias en el Anexo 2
<b>KNAT2_NP_001280190.1</b>	<i>Prunus mume</i>	NP_001280190.1	0	100%	GenBank, NCBI.
<b>KNAT2_ABO28750.1</b>	<i>Prunus persica</i>	ABO28750.1	0	98%	GenBank, NCBI.
<b>KNAT2_XP_007044712.1</b>	<i>Theobroma cacao</i>	XP_007044712.1	1.00E-161	68%	GenBank, NCBI.

**Continuación del Anexo 1**

<b>KNAT2_AGV22121.1</b>	<i>Betula luminifera</i>	AGV22121.1	2.00E-159	68%	GenBank, NCBI.
<b>KNAT2_XP_010100424.1</b>	<i>Morus notabilis</i>	XP_010100424.1	4.00E-156	66%	GenBank, NCBI.
<b>KNAT3_AEI17370.1</b>	<i>Arabidopsis lyrata</i>	AEI17370.1	0	100%	GenBank, NCBI.
<b>KNAT3_NP_197904.1</b>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_197904.1	0	96%	GenBank, NCBI.
<b>KNAT3_XP_006287805.1</b>	<i>Capsella rubella</i>	XP_006287805.1	0	93%	GenBank, NCBI.
<b>KNAT3_Pacpri 0005597</b>	<i>Pachycereus pringlei</i>	-----	Datos Dra. Shishkova		
<b>KNAT3_Ar_61</b>	<i>Ariocarpus retusus</i>	----- [*]	Secuencias en el Anexo 2		
<b>KNAT3_Fp_62</b>	<i>Ferocactus pilosus</i>	----- [*]	Secuencias en el Anexo 2		
<b>KNAT4_NP_196667.2</b>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_196667.2	0	100%	GenBank, NCBI.
<b>KNAT4_XP_002871452.1</b>	<i>Arabidopsis lyrata</i>	XP_002871452.1	0	96%	GenBank, NCBI.
<b>KNAT4_XP_006287910.1</b>	<i>Capsella rubella</i>	XP_006287910.1	0	95%	GenBank, NCBI.
<b>KNAT4_XP_009125259.1</b>	<i>Brassica rapa</i>	XP_009125259.1	0	91%	GenBank, NCBI.
<b>KNAT5_NP_194932.1</b>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_194932.1	0	100%	GenBank, NCBI.
<b>KNAT5_XP_002869296.1</b>	<i>Arabidopsis lyrata</i>	XP_002869296.1	0	98%	GenBank, NCBI.
<b>KNAT5_XP_006283917.1</b>	<i>Capsella rubella</i>	XP_006283917.1	0	95%	GenBank, NCBI.
<b>KNAT5_KFK29818.1</b>	<i>Arabis alpina</i>	KFK29818.1	0	92%	GenBank, NCBI.
<b>KNAT5_CDJ26235.1</b>	<i>Brassica oleracea</i>	CDJ26235.1	0	88%	GenBank, NCBI.
<b>KNAT5_XP_009126429.1</b>	<i>Brassica rapa</i>	XP_009126429.1	0	88%	GenBank, NCBI.

**Continuación del Anexo 1**

<b>KNAT7_NP_564805.1</b>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_564805.1	0	100%	GenBank, NCBI.
<b>KNAT7_XP_006302629.1</b>	<i>Capsella rubella</i>	XP_006302629.1	0	96%	GenBank, NCBI.
<b>KNAT7_XP_009112718.1</b>	<i>Brassica rapa</i>	XP_009112718.1	0	97%	GenBank, NCBI.
<b>KNAT7_CDY64892.1</b>	<i>Brassica napus</i>	CDY64892.1	0	97%	GenBank, NCBI.
<b>KNAT7_KFK40551.1</b>	<i>Arabis alpina</i>	KFK40551.1	0	94%	GenBank, NCBI.

**Nota.** Los porcentajes de identidad y los valores E fueron calculados en el portal de GenBank con base en los resultados de BLAST para la primera proteína de cada grupo (aquellas con 100% de identidad).

[\*] Proteínas deducidas a partir de secuencias de nucleótidos para las Cactaceae estudiadas; las secuencias obtenidas por amplificación-secuenciación a partir de muestras de cambium vascular se muestran en el anexo 2.

**Portales:** GenBank, NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>); Phytozome (<http://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>); The Beta Vulgaris Resource (<http://bvseq.molgen.mpg.de/blast/index.php>).

**Anexo 2.** Secuencias de nucleótidos de las cuales se obtuvieron las proteínas deducidas.

ARK2_Ar_41	<i>Ariocarpus retusus</i>
<p>GATTTTCAAAGGGGGGAGCTCCACCGGAGGTGGCGGCGAGGCTGGTGGCGGCA  CAGCAGGAATTCGAGGCGAGGCAAAGGGCTTCATTCACGACATGTATGGATGGC  TCCAAGGACCCAGAACTAGACCAATTCATGGAAGCGTACTATGACATGTTGGTG  AAATATAGAGAGGAATTAACAAGGCCAGTTCAAGAAGCCATGGATTTTCATGCGA  AGGATCGAAGCTCAGCTCAACGTCCTCAGCAATGGCCGTGTTTCGAGTCTTCTCTA  ATGATGACAAATCAGAGGGAGTGGGTTCGTCGGAAGAGGATCAAGAAAACAGC  GGAGGAGAGACAGAATTGCCTGAGATAGACCCTCGAGCGGAAGACCGAGAACT  GAAGAACCATCTCCTGAAGAAGTACAGCGGGTCTTCAGCTGTTTTAAGCGGGA  GGTCATCCAGTTAATGGTGAAGGGGGGCATGCAATTCAAGGTTCCCCAAAACCT  CCCCATTTGGGGGAATTTCCCCACCAAAGGGCTTTTCCCTTCGAAATCAAAAAA  GGGGGCTTTGGCCAAACCACCTGAATAAAACCAAACCAATAACCACTGGGTT  ATTAAACCAAACAAAACCCCCTTTGAAACCCTTCGAAAAA</p>	

ARK2_Fp_42	<i>Ferocactus pilosus</i>
<p>GATGTCTCAAAGGGGGGAGCTCCACCGGAGGTGGCAGCGAGGCTGGTGGCGGCA  CAGCAGGAATTCGAGGCGAGGCAAAGGGCTTCATTCACGACATGTATGGATGGC  TCCAAGGACCCAGAACTAGACCAATTCATGGAAGCGTACTATGACATGTTGGTG  AAATATAGAGAGGAATTAACGAGGCCAGTTCAAGAAGCCATGGATTTTCATGCGA  AGGATCGAAGCTCAGCTCAACGTCCTCAGCAATGGCCGCGTTCGAGTCTTCTCTA  ATGATGACAAATCAGAGGGAGTGGGTTCGTCGGAAGAGGATCAAGAAAACAGC  GGAGGAGAGACAGAATTGCCTGAGATAGACCCTCGAGCGGAGGACCGAGAACT  GAAGAACCATCTCCTGAAGAAGTACAGCGGCTACTTGAGCAGTCTTAAGCAGGA  GCTCTCCAAGAAGAAGAAGAAAGGGAAGCTCCCCAAAGAAGCTCCCCAAAACCT  CCTCCATTGGGGGGGAATTTGCCTTCCAATGGGCTTATCCTCCGAAACCAAACAAA  GGGGGCTTTGGCCAAACCACCGGATTTAAACCAAACCGAAAAACCACTGGGTT  TATAACCCAAAAAAACCCCCTTTGAAACCCTCCGAAGAC</p>	

ARK2_Pl_27	<i>Pereskia lychnidiflora</i>
<p>GGATTGCCAAAGGGGGGGGCTCCACCGGAGGTGGCGGCGAGGCTGGCGGCGGC  ACAGCAGGAGTTCGAGGCGAGGCAAAGAGCTTCATTCACGACATGTATGGATGG  CTCCAAGGACCCAGAACTAGACCAATTCATGGAAGCGTACTATGACATGTTGGTG  AAATATAGAGAGGAATTAACAAGGCCAGTTCAAGAAGCCATGGATTTTCATGCGA  AGGATCGAAGCTCAGCTCAACGTCCTCAGCAATGGCCGTGTTTCGAGTCTTCTCTA  ATGATGACAAATCAGAGGGAGTGGGTTCATCGGAAGAGGATCAAGAAAACAGTG  GAGGAGAGACAGAATTGCCTGAGATAGACCCTCGAGCGGAAGACCGAGAACTG  AAGAACCACCTCCTGAAGAAGTACAGCGGCTACTTGAGCAGTCTTAAGCAGGAG  CTCTCCAAGAAAAAGAAGAAAGGGAAGCTCCCCAAAGAAGCCCGCCAGAAACTC  CTCAGTTGGTGGGAGTTGCACTACAAATGGCCTTATCCTTCGGAATCAGAAAAGG  TGGCATTGGCCGAAACAACCTGGATTAACCCAAAACAATAACCAATTGGTTTAT  AAACCAAAGAAAACGCCCTTTGGGAGCCCTCTGAAGAC</p>	

**Continuación del Anexo 2**

KNAT3_Ar_61	<i>Ariocarpus retusus</i>
<p>GCAACGCCTGTGGATCAGCTGCCGAGGATCGACGCGCAGTTGGCGCAGTC  GCAGAACGTGGTGGCTAAATACTCGGCTCTTGGCAATGGGAATGGTCAAG  CCCCTACCATGGTTGGTGATGATAAGGAGCTTGATCAATTCATGACGCATT  ATGTTCTGTTGCTTTGTTTCATTTAAAGAGCAACTACAACAGCATGTCCGTGT  CCATGCAATGGAAGCTGTAATGGCTTGTGGGAAATTGAACAATCTCTTCA  AAGCTTGACAGGAGTCTCTCCTGGTGAGGGCACCGGGGCAACTATGTCAG  ATGACGATGATGATCCAGTAGATAGTGACAGTAACTTGTTTGATGGGAGTC  TGGATGGCCCTGACACCATGGGGTTTGGACCTCTCATCCCAACAGAGAGCG  AAAGGTCATTGATGGAGCGTTTGAGGCAAGA ACTTAAGCATGAGCTGAAA  CAGGGTTACAAGGAGAAAATCGTGGACATTAGAGAAGAAATCTTGCGCAA  AAGAAGAGCTGGAAA ACTTCCTGGTGACACCACCTCTGTGTTAAAGGCTTG  GTGGCAATCACATTCCAAATGGCCATACCCAACAGAGGAAGACAAGGCAA  GATTGGTACAGGAACTGGGTTACAGCTAAAGCAGATCAACA ACTGGTTT  ATTAATCAGAGAAGAGATCTTACC</p>	

KNAT3_Fp_62	<i>Ferocactus pilosus</i>
<p>GCAACGCCGGTGGATCAGCTGCCGAGGATCGACGCGCAGTTGGCGCAGTC  GCAGAACGTGGTGGCTAAATACTCGGCTCTTGGCAATGGGAACGGTCAAG  CCCCTACCATGGTTGGTGATGATAAGGAGCTTGACCAATTCATGACACATT  ATGTTCTGTTGCTTTGTTTCATTTAAAGAGCAACTACAACAGCATGTCCGTGT  TCATGCAATGGAAGCTGTAATGGCTTGTGGGAAATTGAACAATCTCTTCA  AAGCTTGACAGGAGTCTCTCCTGGTGAGGGCACAGGGGCAACTATGTCAG  ATGACGATGATGATCCAGTAGATAGTGACAGTAACTTGTTTGATGGGAGTC  TGGATGGCCCTGACACCATGGGGTTTCGGACCTCTCATCCCAACAGAGAGCG  AAAGGTCATTGATGGAGCGTTTGAGGCAAGA ACTTAAGCATGAGCTGAAA  CAGGGTTACTAGGAGAAAATCGTGGACATTAGAGAAGAAATCTTGCGCAA  AAGAAGAGCTGGAAA ACTTCCTGGTGACACCACCTCTGTGTTAAAGGCTTG  GTGGCAATCACATTCCAAATGGCCATACCCAACAGAGGAAGCCAAGGCAA  GATCGGTACCGGAACTGCGTTACAGTTAAAGCAGCTCAACAACAGGTAT  ACTATCAGACGAGAGTACGTCCGATGATCCAGTAGATAGTGACAGTAACTT  GTTTGATGGGAGTCTGGGATGGCCCTGACACCATGGGGCTTCGGACCTCCT  TCATTCCCAAGCAGAGAGTCGTAATCGGATCCACTTCGAATCGGCAAGTCG</p>	