



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO EN BOTÁNICA

**COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL
XILEMA PRIMARIO Y
SECUNDARIO DE CACTACEAE**

AGUSTÍN MACEDA RODRÍGUEZ

T E S I S
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO

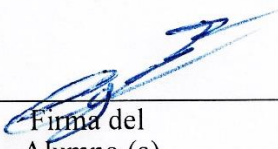
2019

CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALIAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACION


En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el que suscribe Agustín Maceda Rodríguez, Alumno (a) de esta Institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta institución, bajo la dirección del Profesor Dra. Teresa M. Terrazas Salgado, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis Composición química del xilema primario y secundario de Cactaceae

y de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre del colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, El Consejero o Director de Tesis y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Montecillo, Mpio. de Texcoco, Edo. de México, a 04 de noviembre de 2019



Firma del
Alumno (a)



Dra. Teresa M. Terrazas Salgado
Vo. Bo. del Consejero o Director de Tesis

La presente tesis titulada: **Composición química del xilema primario y secundario de Cactaceae**, realizada por el alumno: **Agustín Maceda Rodríguez** bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS
BOTÁNICA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



Dr. Ramón Marcos Soto Hernández

ASESORA



Dra. Teresa Margarita Terrazas Salgado

ASESORA



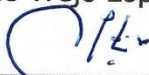
Dra. Cecilia Beatriz Peña Valdivia

ASESOR



Dr. Carlos Trejo López

ASESOR



Dr. Mariano Martínez Vázquez

Montecillo, Texcoco, Estado de México, octubre de 2019

COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL XILEMA PRIMARIO Y SECUNDARIO DE CACTACEAE

Agustín Maceda Rodríguez, Dr.
Colegio de Postgraduados, 2019

RESUMEN

La familia Cactaceae tiene aproximadamente 2000 especies distribuidas en cuatro subfamilias que presentan diversidad de formas, tamaños y anatomía. La anatomía del xilema y la composición química del xilema secundario principalmente de especies fibrosas se han estudiado. La composición química del xilema secundario y primario de Cactaceae, el uso potencial de *Opuntia* en la industria y el flujo de agua a través del xilema aún no se han investigado en las especies no fibrosas. La composición química del xilema secundario de especies no fibrosas y xilema primario de Cactaceae, el uso potencial de *Opuntia* en la industria y el flujo de agua a través del xilema de Cactaceae no se han analizado. Se utilizaron ocho especies de plántulas, el cilindro vascular de 25 especies adultas y cladodios maduros de tres especies de *Opuntia*. Las muestras se secaron, molieron y extrajeron secuencialmente con disolvente con base en la norma TAPPI T-222 om-02. Lignina Klason, celulosa y hemicelulosa se cuantificaron. Espectros de infrarrojo por Transformada de Fourier se obtuvieron para calcular índices de celulosa cristalina y relación siringilo/guayacilo de lignina. Oxidación con nitrobenzeno se utilizó para cuantificar la relación siringilo/guayacilo con HPLC. Mediante microscopía de fluorescencia con tres bandas de excitación se determinó la distribución de celulosa y lignina en tejidos vegetales teñidos con safranina O/verde rápido. En dos especies no fibrosas se dividió la raíz, mediante absorción por raíz se agregó fucsina ácida al 0.2 % y comparó el flujo de agua con microscopía de campo claro. La composición química de xilema primario y secundario tuvieron diferencias significativas en las variables de extraíbles y compuestos lignocelulósicos ($p < 0.05$). Mediante componentes principales se obtuvo que la lignina fue la variable que separa los grupos de xilema secundario y en xilema primario fueron la variable de tejido sin extraíbles y extraíbles en agua caliente. En xilema primario la proporción siringilo/guayacilo fue homogénea, en xilema secundario fue heterogénea y correspondió con la fluorescencia del tejido analizado. Los índices de cristalinidad variaron entre 60 y 93 %. El flujo de agua fue diferente entre las especies, los resultados reflejaron la heterogeneidad de Cactaceae, sus adaptaciones y uso potencial en la industria.

Palabras clave: Cactaceae, lignina, celulosa, *Opuntia*, flujo de agua.

CHEMICAL COMPOSITION OF PRIMARY AND SECONDARY XYLEM OF CACTACEAE

Agustín Maceda Rodríguez, Dr.
Colegio de Postgraduados, 2019

ABSTRACT

Cactaceae family has about 2000 species distributed in four subfamilies with different forms, sizes and anatomy. Mainly secondary xylem anatomy and chemical composition of fibrous species have been studied. Chemical composition of xylem of non-fibrous species and primary xylem of Cactaceae, the potential use of *Opuntia* in industry and the flow of water of Cactaceae have not been analyzed. The objectives of this study were to determine the chemical composition and anatomy of primary and secondary xylem of Cactaceae, chemical composition of *Opuntia* cladodes and study the water flow of two species of Cactaceae. Eight seedling species, the vascular cylinder of 25 adult plants and mature cladode species of three *Opuntia* species were used. The samples were dried, grounded and extracted sequentially with solvent based on the TAPPI T-222 om-02 standard. Lignin Klason, cellulose and hemicellulose were quantified. Fourier Transform Infrared spectra were obtained to calculate cellulose crystallinity index and lignin syringyl/guaiacyl ratio. Nitrobenzene oxidation was used to quantify the syringyl/guaiacyl ratio by HPLC. Fluorescence microscopy with three excitation bands determined the distribution of cellulose and lignin in plant tissues stained with safranin O/fast green. Two non-fibrous species with divided root, acid fuchsin 0.2% was added with absorption root and compared the water flow with light field microscopy. The chemical composition of primary and secondary xylem had significant differences in the variables of extractives and lignocellulosic compounds ($p < 0.05$). Through Principal Components Analysis it was obtained that lignin was the variable that separates the groups of secondary xylem and in primary xylem it was the free-extractive sample and extractives in hot water. In primary xylem the syringyl/guaiacyl ratio was homogeneous, in secondary xylem it was heterogeneous and corresponded to the fluorescence of the tissue analyzed. Crystallinity index varied between 60 to 93 %. The water flow was different among the species. Results reflected the heterogeneity of Cactaceae, their adaptations and potential use in the industry.

Keywords: Cactaceae, lignin, cellulose, *Opuntia*, water flow.

DEDICATORIA

A mis padres: gracias a sus enseñanzas, consejos, apoyo incondicional y ejemplo de vida. Esta tesis es resultado de su esfuerzo, con amor se las dedico. Muchas gracias.

A mi amada esposa Verónica: mi amiga y compañera, gracias por tus consejos y por escucharme en mis momentos de tensión. Gracias por todo tu apoyo.

A mis abuelitos paternos Felipe Maceda y Juana Vidal, a mis abuelitos maternos Emilio Rodríguez y Agustina Nolasco, que donde quiera que estén siempre llevo en mi mente su recuerdo. Gracias por sus experiencias y vivencias, esta tesis se las dedico con mucho cariño.

A mi hermano y su familia: por la ayuda que me brindaron, a mi sobrina Sofía por las alegrías vividas y a mi pequeño sobrino Emilio por su recién bienvenida a este mundo.

A mis compañeros y amigos de laboratorio: Mariana, Naybi, Humberto, Iván y especialmente con mucho cariño para Macri, Rosa, Nayelli, Caty y Ara. Gracias por su apoyo, amistad y cariño que me brindaron estos años.

Al Dr. Israel Castillo, por su amistad, consejos y pláticas amenas de la vida académica y política.

A mis mentores Maestro Rubén y Don Domingo por su orientación, explicación y ayuda en el laboratorio. A Mercedes, Cory y demás secretarias, por su paciencia y ayuda para los trámites durante mi doctorado.

A Alexandra Elbakyan y su cuervo con la llave, gracias a su trabajo esta tesis es posible.

A cada Doctor que me dio clases, me brindó su conocimiento y me orientó en cada momento.

A los Doctores de mi consejo: Dra. Cecilia Peña, Dr. Carlos Trejo y Dr. Mariano Martínez, por sus consejos, observaciones y paciencia. Mil gracias por todo.

A mi consejero Dr. Marcos Soto, mi mentor y amigo. Muchas gracias por sus consejos y experiencia que me permitieron obtener este título.

A mi Directora de tesis: Dra Teresa Terrazas, muchas gracias por su amistad, enseñanzas, dirección y total apoyo en cada etapa del doctorado. Usted es y será mi ejemplo a seguir, infinitas gracias por todo.

AGRADECIMIENTOS

Al Colegio de Postgraduados, cuerpo académico y administrativo del Programa en Botánica, campus Montecillo, por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios de doctorado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca que me otorgó e hizo posible mis estudios de doctorado.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación tecnológica, DGAPA, Universidad Nacional Autónoma de México, Proyectos IN209012 y IN210115 que permitieron el financiamiento de esta investigación.

A los miembros del Consejo Particular de la presente investigación que me orientaron durante la investigación, escrito y desarrollo de la tesis de doctorado:

Dra. Teresa M. Terrazas Salgado

Dr. R. Marcos Soto Hernández

Dra. Cecilia B. Peña Valdivia

Dr. Carlos Trejo López

Dr. Mariano Martínez Vázquez

Especialmente a la Dra. Teresa Terrazas y al Dr. Marcos Soto por todo el apoyo, consejos y orientaciones durante mis estudios de Doctorado.

CONTENIDO

RESUMEN.....	iv
ABSTRACT.....	v
LISTA DE FIGURAS.....	xii
LISTA DE CUADROS.....	xiv
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	2
2. OBJETIVOS.....	3
3. HIPÓTESIS.....	4
Hipótesis general.....	4
Hipótesis particulares.....	4
4. LITERATURA CITADA.....	4
REVISIÓN DE LITERATURA. LIGNINA: COMPOSICIÓN, SÍNTESIS Y EVOLUCIÓN.....	9
1 RESUMEN.....	9
2 ABSTRACT.....	9
3 INTRODUCCIÓN.....	10
4 TÉCNICAS PARA EL ESTUDIO DE LA LIGNINA.....	11
4.1 Técnicas analíticas.....	12
4.2 Métodos de detección de lignina por microscopía.....	14
5 CARACTERÍSTICAS DE LA LIGNINA.....	15
5.1 Molécula.....	15
5.2 Biosíntesis de la lignina.....	18
6 CONFORMACIÓN DE LOS COMPONENTES DE LA PARED CELULAR.....	20
6.1 Polimerización de polisacáridos.....	20
6.2 Polimerización de lignina.....	21
7 LIGNIFICACIÓN DE LA PARED CELULAR.....	24
7.1 Pared celular.....	24
7.2 Lignificación cooperativa.....	26
8 EVOLUCIÓN DE LA LIGNIFICACIÓN.....	28

9 CONSIDERACIONES FINALES	33
10 LITERATURA CITADA	35
CAPÍTULO I. CHEMICAL COMPOSITION OF CACTI WOOD AND COMPARISON WITH THE WOOD OF OTHER TAXONOMIC GROUPS	57
1.1 RESUMEN	57
1.2 ABSTRACT	57
1.3 INTRODUCTION	58
1.4 RESULTS	59
1.5 DISCUSSION	65
1.6 CONCLUSIONS	71
1.7 EXPERIMENTAL SECTION	71
1.8 ACKNOWLEDGEMENTS	75
1.9 AUTHOR CONTRIBUTION	75
1.10 APPENDIX	76
1.11 REFERENCES	77
CAPÍTULO II. DIFFERENCES IN THE STRUCTURAL CHEMICAL COMPOSITION OF THE PRIMARY XYLEM OF CACTACEAE: A TOPOCHEMICAL PERSPECTIVE	82
2.1 RESUMEN	82
2.2 ABSTRACT	83
2.3 INTRODUCTION	84
2.4 RESULTS	85
2.4.1 Structural chemical composition.....	85
2.4.2 Principal component analysis.....	86
2.4.3 Chemical composition of lignin of the primary xylem	89
2.4.4 Topochemistry of primary xylem.....	90
2.5 DISCUSSION	94
2.5.1 Chemical composition.....	94
2.5.2 Topochemistry of lignin	98
2.6 CONCLUSIONS	101
2.7 EXPERIMENTAL SECTION	101

2.7.1 Plant material	101
2.7.2 Standardization of the method	102
2.7.3 Syringyl/Guaiacyl ratio lignin.....	105
2.7.4 Statistical analysis	105
2.7.5 Anatomical and topochemical description of lignin	106
2.8 CONFLICT OF INTEREST	106
2.9 AUTHOR CONTRIBUTIONS.....	107
2.10 ACKNOWLEDGMENTS.....	107
2.11 APPENDIX.....	107
2.12 REFERENCES	110
CAPÍTULO III. CARACTERIZACIÓN QUÍMICA, CUANTIFICACIÓN DE LIGNOCELULÓSICOS E ÍNDICES DE CRISTALINIDAD EN TRES ESPECIES DE <i>Opuntia</i> CON POTENCIAL INDUSTRIAL Y BIOCOMBUSTIBLES	121
3.1 RESUMEN	121
3.2 ABSTRACT	121
3.3 INTRODUCCIÓN	122
3.4 RESULTADOS	123
3.4.1 Composición química de cladodios	123
3.4.2 Relación S/G	125
3.4.3 Cristalinidad de la celulosa	126
3.5 DISCUSIÓN.....	128
3.5.1 Composición química de cladodios	128
3.5.2 Proporción S/G de lignina e índices de celulosa cristalina	131
3.6 CONCLUSIONES	133
3.7 SECCIÓN EXPERIMENTAL	133
3.8 REFERENCIAS.....	137
CAPÍTULO IV. DISTRIBUCIÓN Y COMPOSICIÓN DE LA LIGNINA Y CELULOSA EN EL XILEMA SECUNDARIO DE CACTACEAE	147
4.1 RESUMEN	147
4.2 ABSTRACT	147
4.3 INTRODUCCIÓN	148

4.4 RESULTADOS	150
4.4.1 Celulosa cristalina	150
4.4.2 Proporción S/G.....	152
4.4.3 Microscopía de fluorescencia.....	155
4.5 DISCUSIÓN	164
4.5.1 Celulosa cristalina	164
4.5.2 Proporción S/G.....	165
4.5.3 Distribución de la lignina	166
4.6 CONCLUSIONES	168
4.7 SECCIÓN EXPERIMENTAL	169
4.7.1 Celulosa cristalina	169
4.7.2 Proporción S/G.....	170
4.7.3 Microscopía de fluorescencia.....	171
4.8 REFERENCIAS	173
CAPÍTULO V. VISUALIZACIÓN Y COMPARACIÓN DEL FLUJO DE AGUA	
ENTRE <i>Mammillaria bocasana</i> Y <i>Echinocereus reinchenbachii</i> var. <i>fitchii</i>	183
5.1 RESUMEN	183
5.2 ABSTRACT	183
5.3 INTRODUCCIÓN	184
5.4 RESULTADOS	185
5.4.1 Técnica de tinción	185
5.4.2 Análisis del flujo de agua.....	186
5.5 DISCUSIÓN	191
5.5.1 Técnica de tinción	191
5.5.2 Análisis del flujo de agua.....	192
5.6 CONCLUSIONES	194
5.7 SECCIÓN EXPERIMENTAL	194
5.7.1 Técnica de tinción	194
5.7.2 Análisis del flujo de agua.....	196
5.8 REFERENCIAS	197
CONCLUSIONES GENERALES	204

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ruta biosintética de la lignina. PAL.....	17
Figura 2. Principales enlaces que se presentan durante la polimerización de la lignina. S.	18
Figura 3. A) Representación de una molécula de lignina de madera de gimnospermas..	23
Figura 4. Representación esquemática de los sitios de nucleación de la lignina.....	26
Figura 5. Representación de la lignificación cooperativa y semicooperativa en el tejido vascular.	27
Figura 6. Productos derivados de la ruta metabólica del ácido shikímico y como precursor la fenilalanina.....	29
Figure 1.1. Wood of some Cactaceae. A–F, cross-sections, A’–F’, tangential sections.	62
Figure 1.2. Three-plot resulting of the principal component analysis of 25 species of Cactaceae	66
Figure 2.1. Mean of the percentages for each type of extractive in eight Cactaceae species.	87
Figure 2.2. Mean of the percentages for each lignocellulosic compound in eight Cactaceae species.....	87
Figure 2.3. Principal components analysis.	88
Figure 2.4. FTIR-ATR spectrum of lignin in the primary xylem of seedlings of eight Cactaceae species.....	89
Figure 2.5. Comparison of brightfield illumination and fluorescence microscopy with triple band excitation of seedling stems.	91
Figure 2.6. Image seedlings stems of fibrous species with triple band excitation fluorescence	92
Figure 2.7. Image seedlings stems of fibrous, non-fibrous, and dimorphic species with triple band excitation fluorescence.....	93
Figure 2.8. WBT and VEs of <i>Opuntia streptacantha</i> , where differences in fluorescence intensity were be observed with the triple band excitation.....	99
Figure S2.9. Seedlings of Cactaceae.....	107

Figura 3.1. Media de los porcentajes de cada tipo de extraíble y madera libre de extraíble para las tres especies de <i>Opuntia</i>	124
Figura 3.2. Media de los porcentajes de cada tipo de compuesto lignocelulósico para las tres especies de <i>Opuntia</i>	125
Figura 3.3. Espectro FTIR de la huella dactilar de tres especies de <i>Opuntia</i>	126
Figura 3.4. Espectro FTIR para la obtención de los índices de cristalinidad de celulosa para las tres especies de <i>Opuntia</i>	127
Figura 4.1. Espectro FTIR utilizados para calcular los índices de cristalinidad de celulosa de 25 especies de Cactaceae	150
Figura 4.2. Comparación de imágenes en campo claro con imágenes de fluorescencia con triple banda excitación.	156
Figura 4.3. Comparación de imágenes en campo claro con imágenes de fluorescencia con triple banda excitación.	157
Figura 4.4. Emisión de fluorescencia del xilema secundario de especies fibrosas de Cactaceae.	159
Figura 4.5. Emisión de fluorescencia del xilema secundario de especies dimorfas de Cactaceae.	160
Figura 4.6. Emisión de fluorescencia del xilema secundario de especies no fibrosas de Cactaceae.	162
Figura 5.1. Comparación de las técnicas para marcar el flujo de agua. A. <i>Echinocereus</i> . B. <i>Mammillaria</i> . A. Técnica de inyección. B. Técnica de absorción por raíz.....	186
Figura 5.2. Imágenes del tejido fresco de <i>Echinocereus</i>	188
Figura 5.3. Imágenes del tejido fresco de <i>Mammillaria</i>	189
Figura 5.4. Comparación de la tinción del xilema y haces corticales entre <i>Echinocereus</i> (A) y <i>Mammillaria</i> (B). CV: cilindro vascular. HC: Haces corticales.	193
Figura 5.5. Representación del proceso de división y tinción de xilema de <i>Mammillaria</i> y <i>Echinocereus</i>	195

LISTA DE CUADROS

Table 1.1. Kruskal-Wallis analysis for chemical composition variables to species and genera.	60
Table 1.2. Partial chemical composition (% of dry biomass) of 25 fibrous, non-fibrous and dimorphic species of Cactaceae.	61
Table 1.3. Content of cellulose, lignin and hemicellulose (% of dry biomass) of 25 fibrous, non-fibrous and dimorphic species of Cactaceae.....	63
Table 1.4. Mean, standard deviation and Duncan's multiple range test of the seven genera of Cactaceae studied. Different letters in each line indicate significant differences ($p < 0.05$).....	64
Table 1.5. Vectors, eigenvalues and cumulative proportion of the variation explained by each variable.....	65
Table 1.6. Species studied by subfamily and tribe with collection number	72
Table A1.7. Percentage of wood chemical components in species of different taxonomic groups available in the literature.....	76
Table A1.8. Percentage of wood chemical components in cacti species available in the literature.	76
Table 2.1. Average of the extractives in seedlings of eight species of Cactaceae.....	85
Table 2.2. Average of the lignocellulose percentages in seedlings of eight Cactaceae species.	86
Table 2.3. Eigenvectors, eigenvalues and accumulated proportion of the explained variation by each variable	88
Table 2.4. Syringyl and guaiacyl values for primary xylem compared to secondary xylem of eight Cactaceae species.....	90
Table 2.5. Morphology and stem characteristics of eight Cactaceae species.	102
Table S2.6. Percentages of the extractives and lignocellulosic compounds of species with primary xylem.	108
Table S2.7. Kruskal-Wallis values for each variable.....	109

Cuadro 3.1. Media, desviación estándar y comparación de medias de los tamaños de cladodio de las tres especies de <i>Opuntia</i> . Las letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas en cada línea (Tukey, $p < 0.05$).....	124
Cuadro 3.2. Porcentajes de siringilo, guayacilo y proporción de S/G	126
Cuadro 3.3. Índices de cristalinidad para determinar la celulosa cristalina de las tres especies de <i>Opuntia</i>	128
Cuadro 3.4. Porcentajes de extraíbles y compuestos lignocelulósicos de <i>O. ficus-indica</i> y otras especies de <i>Opuntia</i> reportados en la literatura.....	130
Cuadro 4.1. Índices de cristalinidad para determinar la celulosa cristalina de las 25 especies de Cactaceae.....	151
Cuadro 4.1. Porcentajes de siringilo, guayacilo y la proporción S/G para las 25 especies de Cactaceae	153
Cuadro 4.3. Porcentajes de siringilo, guayacilo y proporción S/G de 13 especies reportadas por Reyes-Rivera et al. ^[21,39]	154
Cuadro 4.4. Emisión de fluorescencia de las paredes de los elementos traqueales y su posible proporción de S/G	163
Cuadro 4.5. Especies de las 25 especies de Cactaceae y sus características anatómicas y del tallo incluidas en el presente estudio.....	170
Cuadro 5.1. Comparación de medias con U de Mann-Whitney de diámetro total, diámetro lumen y conductividad hidráulica teórica relativa entre cada elemento conductor y entre EV y TBA en <i>Echinocereus</i> y <i>Mammillaria</i>	190
Cuadro 5.2. Comparación de la conductividad hidráulica teórica entre elementos conductores teñidos y no teñidos para cada tratamiento de dos especies de Cactaceae	190

INTRODUCCIÓN GENERAL

El estudio de la composición química del xilema de las plantas se debe al uso potencial industrial ^[1,2], medicinal ^[3], en la producción de combustibles ^[4,5] y a las implicaciones biológicas en el tejido vascular ^[6-8]. La lignina, celulosa y hemicelulosas se han analizado por su importancia estructural de la pared celular de plantas ^[9-11]. La lignina es el heteropolímero que provee rigidez estructural al tejido vascular para soportar las variaciones de tensión y presión hídrica ^[12]. Su acumulación se da en fibras, esclereidas, parénquima y elementos conductores ^[13]. La celulosa y hemicelulosas son polisacáridos estructurales que conforman la lámina media, la pared primaria y secundaria y le confieren resistencia, soporte y porosidad para el intercambio de gases, nutrientes y señales intercelulares ^[14,15].

La molécula de lignina se compone por tres monómeros principales: *p*-hidroxifenilos, guayacilos y siringilos. La variación en la acumulación de éstos monómeros se ha estudiado por las implicaciones evolutivas en las plantas ^[8], en gimnospermas se ha detectado la presencia de lignina de tipo guayacilo y pocos monómeros de *p*-hidroxifenilo ^[16]. En angiospermas se ha reportado heterogeneidad en la composición, algunas especies acumulan porcentaje mayor de monómeros de siringilo mientras que otras tienen porcentaje mayor de guayacilo ^[17,18].

La cuantificación de la proporción de siringilo/guayacilo (S/G) se ha realizado con técnicas como espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) ^[19,20], cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) ^[20,21], pirólisis con cromatografía de gases y espectrometría de masas (Py-GC/MS) ^[22] y resonancia magnética nuclear (NMR) ^[23]. La proporción S/G se ha utilizado como indicador para identificar especies aprovechables en la industria papelera, proporción menor a 1 de S/G indica acumulación mayor al 50 % de guayacilo. Proporción mayor a 1 de S/G indica acumulación mayor al 50 % de siringilo ^[24,25]. Las especies que acumulan porcentajes mayores de siringilo son las más utilizadas en la producción de papel ^[26]. Las especies estudiadas han sido arbóreas, herbáceas y algunas suculentas como *Agave tequilana* ^[27] y *Opuntia ficus-indica* ^[28], ésta última perteneciente a la familia Cactaceae.

La familia Cactaceae tiene aproximadamente 2000 especies en total ^[29] y se dividen en cuatro subfamilias: Pereskioideae, Mhuinoideae, Opuntioideae y Cactoideae ^[30,31]. Las cactáceas se distinguen por la anatomía del xilema de las especies que se relaciona con las formas de vida que presentan: especies con forma globosa o globosa deprimida, presentan matrices celulares con

abundantes elementos de vaso y traqueidas de banda ancha con engrosamientos de la pared secundaria de tipo helicoidal o anular y parénquima no lignificado [32,33]. Especies con forma columnar, arbustiforme o arbórea, presentan elementos de vaso, fibras y parénquima con paredes lignificadas [33-35]. Las especies de porte mediano y forma columnar o cilíndrica, tienen una transición de matriz celular, en etapas juveniles el xilema es de tipo no fibroso mientras que en etapa adulta, la anatomía es de tipo fibroso [36,37].

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La composición química de las cactáceas ha sido estudiada en 13 especies por Reyes-Rivera et al. [20,38], quienes obtuvieron que hay una heterogeneidad en la composición química del xilema secundario mediante FTIR y acumulación mayor de monómeros de siringilo mediante HPLC en las especies no fibrosas y dimorfas. En especies fibrosas obtuvieron que su composición es homogénea y acumulan mayores porcentajes de guayacilo. Las 13 especies analizadas, dos fueron no fibrosas, por lo que estudiar un mayor número de especies no fibrosas permitiría identificar si la heterogeneidad en la composición química se mantiene.

La utilización de métodos cuantitativos se debe acompañar con métodos cualitativos como microscopía de campo claro [39,40] y microscopía de fluorescencia [41,42], permiten comprender visualmente la distribución, diferencias y topoquímica de los componentes estructurales como la lignina y celulosa de la pared celular del tejido vascular [41,43,44]. La tinción de safranina O/verde rápido en conjunto con microscopía de campo claro y de fluorescencia permiten identificar las diferencias en la distribución de la lignina del tejido vascular [11,45], por lo tanto, es necesario su uso en el análisis del xilema de Cactaceae.

La composición química de *Opuntia ficus-indica* ha sido estudiada y se ha propuesto su uso potencial en la industria papelera y de biocombustibles [46,47], sin embargo, en México existen aproximadamente 83 especies [48] de las cuales *O. streptacantha* y *O. robusta* se consumen los frutos [49,50], pero no se han utilizado industrialmente.

Con respecto al papel que tienen las traqueidas de banda ancha en la conducción de agua se ha mencionado que mueven el agua acropetamente de manera similar a los vasos, además de ser reservorios de agua [51,52]. El estudio del flujo de agua en Cactaceae no se ha analizado

experimentalmente por lo que encontrar una técnica adecuada para marcar el flujo de agua permitiría delimitar las regiones conductivas de las no conductivas.

2. OBJETIVOS

Objetivo general

Analizar la composición química y anatomía del xilema primario y secundario de Cactaceae.

Objetivos particulares

Realizar una revisión de las técnicas utilizadas para el estudio de la lignina, su biosíntesis, polimerización e hipótesis evolutivas del proceso de lignificación.

Determinar la composición química de la matriz celular de 25 especies de cactáceas e identificar diferencias entre las mismas.

Determinar los índices de cristalinidad de la celulosa, la proporción siringilo/guayacilo e identificar la distribución de celulosa y lignina en el xilema secundario de 25 especies de Cactaceae.

Determinar la composición química del xilema primario en plántulas de 8 especies de Cactaceae, calcular la proporción siringilo/guayacilo y compararla con el xilema secundario, así como describir el tejido vascular con microscopía de fluorescencia.

Cuantificar la composición química de los cladodios, la proporción siringilo/guayacilo, calcular el porcentaje de celulosa cristalina de tres especies de *Opuntia* con potencial industrial y de biocombustibles.

Evaluar las técnicas de tinción del xilema *in vivo*, caracterizar el flujo de agua a través del xilema secundario e identificar las diferencias en el flujo de agua y relacionarlas con las medidas de EV, TBA y conductividad hidráulica relativa de Cactaceae.

3. HIPÓTESIS

Hipótesis general

Las especies de Cactaceae difieren en la composición química y anatómica del xilema primario y secundario.

Hipótesis particulares

Entre las 25 especies de Cactaceae hay diferencias significativas en la composición química.

La proporción de siringilo/guayacilo, el porcentaje de celulosa cristalina y la distribución de la celulosa y lignina en el xilema es diferente en las 25 especies de Cactaceae.

La proporción de siringilo/guayacilo y su distribución anatómica en las 8 especies de plántulas de Cactaceae es diferente entre las especies y entre xilema primario y secundario.

Los cladodios de las tres especies de *Opuntia* tienen diferencias en la composición química.

El flujo de agua es diferente entre las especies no fibrosas.

4. LITERATURA CITADA

- [1] G. Marques, J. Rencoret, A. Gutiérrez, J. C. del Río, 'Evaluation of the Chemical Composition of Different Non-Woody Plant Fibers Used for Pulp and Paper Manufacturing', *Open Agric. J.* **2014**, 4, 93–101.
- [2] B. Janissen, T. Huynh, 'Chemical composition and value-adding applications of coffee industry by-products: A review', *Resour. Conserv. Recycl.* **2018**, 128, 110–117.
- [3] F. Laher, A. O. Aremu, J. Van Staden, J. F. Finnie, 'Evaluating the effect of storage on the biological activity and chemical composition of three South African medicinal plants', *South African J. Bot.* **2013**, 88, 414–418.
- [4] S. Szczukowski, J. Tworkowski, A. Klasa, M. Stolarski, 'Productivity and chemical composition of wood tissues of short rotation willow coppice cultivated on arable land', *Rostl. Vyroba* **2002**, 48, 413–417.
- [5] F. Grau, H. Choo, J. W. Hu, J. Jung, 'Engineering behavior and characteristics of wood ash and sugarcane bagasse ash', *Materials (Basel)*. **2015**, 8, 6962–6977.

- [6] A. Lourenço, J. Rencoret, C. Chemetova, J. Gominho, A. Gutiérrez, J. C. Del Río, H. Pereira, ‘Lignin Composition and Structure Differs between Xylem, Phloem and Phellem in *Quercus suber* L.’, *Front. Plant Sci.* **2016**, *7*, 1612.
- [7] J.-K. Weng, J. A. Banks, C. Chapple, ‘Parallels in lignin biosynthesis: A study in *Selaginella moellendorffii* reveals convergence across 400 million years of evolution.’, *Commun. Integr. Biol.* **2008**, *1*, 20–22.
- [8] J. K. Weng, C. Chapple, ‘The origin and evolution of lignin biosynthesis’, *New Phytol.* **2010**, *187*, 273–285.
- [9] G. Costa, I. Plazanet, ‘Plant Cell Wall, a Challenge for Its Characterisation’, *Adv. Biol. Chem.* **2016**, *6*, 70–105.
- [10] X. Kang, A. Kirui, M. C. Dickwella Widanage, F. Mentink-Vigier, D. J. Cosgrove, T. Wang, ‘Lignin-polysaccharide interactions in plant secondary cell walls revealed by solid-state NMR’, *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 347.
- [11] Y. Zeng, M. E. Himmel, S.-Y. Ding, ‘Visualizing chemical functionality in plant cell walls’, *Biotechnol. Biofuels* **2017**, *10*, 263.
- [12] H. Renault, D. Werck-Reichhart, J. K. Weng, ‘Harnessing lignin evolution for biotechnological applications’, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2019**, *56*, 105–111.
- [13] N. G. Lewis, E. Yamamoto, ‘Lignin: occurrence, biogenesis and biodegradation.’, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **1990**, *41*, 455–96.
- [14] N. C. Carpita, M. C. McCann, ‘The functions of cell wall polysaccharides in composition and architecture revealed through mutations’, *Plant Soil* **2002**, *247*, 71–80.
- [15] M. Ochoa-Villarreal, E. Aispuro-Hernández, I. Vargas-Arispuro, M. Ngel, in *Polymerization* (Ed.: A. De Souza-Gomes), InTech, London, **2012**. pp. 63-86.
- [16] J. Ralph, ‘Hydroxycinnamates in lignification’, *Phytochem. Rev.* **2010**, *9*, 65–83.
- [17] M. M. Campbell, R. R. Sederoff, ‘Variation in lignin content and composition: Mechanisms of control and implications for the genetic improvement of plants’, *Plant Physiol.* **1996**, *110*, 3–13.
- [18] A. Lourenço, H. Pereira, in *Lignin - Trends Appl.* (Ed.: M. Poletto), InTech, London, **2018**, pp. 65–98.
- [19] K. K. Pandey, ‘Study of the effect of photo-irradiation on the surface chemistry of wood’, *Polym. Degrad. Stab.* **2005**, *90*, 9–20.

- [20] J. Reyes-Rivera, G. Canché-Escamilla, M. Soto-Hernández, T. Terrazas, ‘Wood chemical composition in species of Cactaceae the relationship between lignification and stem morphology’, *PLoS One* **2015**, *10*, e0123919.
- [21] R. Prado, L. Weigand, S. M. S. N. S. Zahari, X. Erdocia, J. P. Hallett, J. Labidi, T. Welton, ‘An easy and reliable method for syringyl: Guaiacyl ratio measurement’, *Tappi J.* **2017**, *16*, 145–152.
- [22] C. A. Nunes, C. F. Lima, L. C. A. Barbosa, J. L. Colodette, A. F. G. Gouveia, F. O. Silvério, ‘Determination of Eucalyptus spp lignin S/G ratio: A comparison between methods’, *Bioresour. Technol.* **2010**, *101*, 4056–4061.
- [23] J. L. Wen, S. L. Sun, B. L. Xue, R. C. Sun, ‘Recent advances in characterization of lignin polymer by solution-state nuclear magnetic resonance (NMR) methodology’, *Materials* **2013**, *6*, 359–391.
- [24] A. Alves, R. Simoes, D. J. Stackpole, R. E. Vaillancourt, B. M. Potts, M. Schwanninger, J. Rodrigues, ‘Determination of the syringyl/guaiacyl ratio of Eucalyptus globulus wood lignin by near infrared-based partial least squares regression models using analytical pyrolysis as the reference method’, *J. Near Infrared Spectrosc.* **2011**, *19*, 343–348.
- [25] R. B. Santos, E. A. Capanema, M. Y. Balakshin, H. M. Chang, H. Jameel, ‘Effect of hardwoods characteristics on kraft pulping process: Emphasis on lignin structure’, *BioResources* **2011**, *6*, 3623–3637.
- [26] J. Rencoret, A. Gutiérrez, L. Nieto, J. Jiménez-Barbero, C. B. Faulds, H. Kim, J. Ralph, Á. T. Martínez, J. C. del Río, ‘Lignin composition and structure in young versus adult eucalyptus globulus plants’, *Plant Physiol.* **2011**, *155*, 667–682.
- [27] H. M. Núñez, L. F. Rodríguez, M. Khanna, ‘Agave for tequila and biofuels: An economic assessment and potential opportunities’, *GCB Bioenergy* **2011**, *3*, 43–57.
- [28] L. Yang, M. Lu, S. Carl, J. A. Mayer, J. C. Cushman, E. Tian, H. Lin, ‘Biomass characterization of Agave and Opuntia as potential biofuel feedstocks’, *Biomass and Bioenergy* **2015**, *76*, 43–53.
- [29] C. L. Jiménez-Sierra, ‘Las cactáceas mexicanas y Los riesgos que enfren-tan’, *Rev. Digit. Univ.* **2011**, *12*, 3–22.
- [30] R. Nyffeler, ‘Phylogenetic relationships in the cactus family (Cactaceae) based on evidence from trnK/ matK and trnL-trnF sequences.’, *Am. J. Bot.* **2002**, *89*, 312–326.

- [31] M. P. Griffith, J. M. Porter, ‘Phylogeny of Opuntioideae (Cactaceae)’, *Int. J. Plant Sci.* **2009**, *170*, 107–116.
- [32] M. Vázquez-Sánchez, T. Terrazas, D. Grego-Valencia, S. Arias, ‘Growth form and wood evolution in the tribe Cactaeae (Cactaceae)’, *Willdenowia* **2017**, *47*, 49–67.
- [33] A. Maceda, M. Soto-Hernández, C. B. Peña-Valdivia, T. Terrazas, ‘Chemical Composition of Cacti Wood and Comparison with the Wood of Other Taxonomic Groups’, *Chem. Biodivers.* **2018**, *15*, e1700574.
- [34] S. Arias, T. Terrazas, ‘Variación en la anatomía de la madera de *Pachycereus pecten-aboriginum* (Cactaceae)’, *An. del Inst. Biol. Univ. Nac. Autónoma México* **2001**, *72*, 157–169.
- [35] T. Terrazas, S. Loza-Cornejo, H. J. Arreola-Nava, ‘Anatomía caulinar de las especies del género *Stenocereus* (Cactaceae)’, *Acta Botánica Venez.* **2005**, *28*, 321–336.
- [36] J. D. Mauseth, ‘Comparative structure-function studies within a strongly dimorphic plant, *Melocactus intortus* (Cactaceae)’, *Bradleya* **1989**, *7*, 1–12.
- [37] J. D. S. Garcia, E. Scremin-Dias, P. Soffiatti, ‘Stem and root anatomy of two species of *Echinopsis* (Trichocereae: Cactaceae)’, *Rev. Mex. Biodivers.* **2012**, *83*, 1036–1044.
- [38] J. Reyes-Rivera, M. Soto-Hernández, G. Canché-Escamilla, T. Terrazas, ‘Structural characterization of lignin in four cacti wood: Implications of lignification in the growth form and succulence’, *Front. Plant Sci.* **2018**, *871*, 1518.
- [39] J. H. D. Bryan, ‘Differential staining with a mixture of safranin and fast green FCF’, *Biotech. Histochem.* **1955**, *30*, 153–157.
- [40] Y. Ma, V. K. Sawhney, T. A. Steeves, ‘Staining of paraffin-embedded plant material in safranin and fast green without prior removal of the paraffin’, *Can. J. Bot.* **1993**, *71*, 996–999.
- [41] G. Angeles, S. A. Owens, F. W. Ewers, ‘Fluorescence shell: a novel view of sclereid morphology with the Confocal Laser Scanning Microscope’, *Microsc. Res. Tech.* **2004**, *63*, 282–288.
- [42] J. Bond, L. Donaldson, S. Hill, K. Hitchcock, ‘Safranin fluorescent staining of wood cell walls.’, *Biotech. Histochem.* **2008**, *83*, 161–171.
- [43] L. A. Donaldson, ‘Lignification and lignin topochemistry - An ultrastructural view’, *Phytochemistry* **2001**, *57*, 859–873.

- [44] L. A. Donaldson, J. Paul Knox, ‘Localization of cell wall polysaccharides in normal and compression wood of radiata pine: Relationships with lignification and microfibril orientation’, *Plant Physiol.* **2012**, *158*, 642–653.
- [45] V. De Micco, G. Aronne, ‘Combined histochemistry and autofluorescence for identifying lignin distribution in cell walls’, *Biotech. Histochem.* **2007**, *82*, 209–216.
- [46] J. C. Cushman, S. C. Davis, X. Yang, A. M. Borland, ‘Development and use of bioenergy feedstocks for semi-arid and arid lands’, *J. Exp. Bot.* **2015**, *66*, 4177–4193.
- [47] M. Q. Marin-Bustamante, J. J. Chanona-Pérez, N. Güemes-Vera, R. Cásarez-Santiago, M. J. Pereaflares, I. Arzate-Vázquez, G. Calderón-Domínguez, ‘Production and characterization of cellulose nanoparticles from nopal waste by means of high impact milling’, *Procedia Eng.* **2017**, *200*, 428–433.
- [48] J. Reyes-Agüero, J. Aguirre-Rivera, H. M. Hernández, ‘Systematic notes and a detailed description of *Opuntia ficus-indica* (L) Mill. (CACTACEAE)’ **2005**, 395–408.
- [49] X. Aparicio-Fernández, S. Loza-Cornejo, M. G. Torres-Bernal, N. J. Velázquez-Placencia, H. J. Arreola-Nava, ‘Características físico-químicas de frutos de variedades silvestres de *Opuntia* de dos regiones semiáridas de Jalisco, México Physicochemical characteristics of fruits from wild *Opuntia* species from two semiarid regions of Jalisco, Mexico’, *Polibotánica* **2017**, *43*, 1–26.
- [50] Ş. Kivrak, İ. Kivrak, E. Karababa, ‘Analytical evaluation of phenolic compounds and minerals of *Opuntia robusta* J.C. Wendl. and *Opuntia ficus-barbarica* A. Berger’, *Int. J. Food Prop.* **2018**, *21*, 244–256.
- [51] J. D. Mauseth, ‘Collapsible water-storage cells in cacti’, *Bull. Torrey Bot. Club* **1995**, *122*, 145–151.
- [52] J. D. Mauseth, ‘Wide-band tracheids are present in almost all species of Cactaceae’, *J. Plant Res.* **2004**, *117*, 69–76.

REVISIÓN DE LITERATURA. LIGNINA: COMPOSICIÓN, SÍNTESIS Y EVOLUCIÓN

1 RESUMEN

La lignina forma parte y da resistencia a la pared celular. La estructura de la lignina es compleja y con diferentes monómeros en su estructura que varían con respecto a los grupos taxonómicos de las plantas. El objetivo de este estudio fue revisar las técnicas que se utilizan para su estudio, la composición de la lignina, las propuestas evolutivas de su variación y el proceso de lignificación en las plantas. En cada objetivo se revisó la literatura existente y las principales hipótesis evolutivas. Un análisis y explicación de cada tema se llevó a cabo para finalizar con una propuesta de hipótesis evolutiva del proceso de lignificación en angiospermas. Las técnicas para el análisis de la composición de lignina abarcan métodos cuantitativos y métodos cualitativos. El conocimiento de la diversidad de monómeros de la lignina fue por la estandarización de las técnicas. La biosíntesis de la lignina ocurre en los plastidios y retículo endoplasmático, varias enzimas participan en la polimerización de la lignina en la pared celular donde se forman dos monómeros principales: siringilo y guayacilo. Durante la evolución de las plantas se desarrollaron los sistemas de genéticos y enzimáticos para la biosíntesis de los monómeros. El guayacilo se acumula en los elementos conductores de helechos y gimnospermas; en angiospermas se presenta la acumulación de siringilo y guayacilo. La presencia de siringilo en especies de *Isoetes*, *Selaginella*, Lycophyta y algas por convergencia evolutiva confirió resistencia a patógenos y rayos UV. La presencia de enzimas promiscuas catalíticamente funcionales propició la aparición de lignina, suberina y cutina. La diversificación anatómica y química de la pared celular en angiospermas permitió su distribución y adaptación a diferentes condiciones ambientales.

Palabras clave: Lignina, convergencia, siringilo, guayacilo, diversificación.

2 ABSTRACT

Lignin is part and gives resistance to the cell wall. The structure of lignin is complex and with different monomers in its structure that vary with respect to taxonomic groups of plants. The objective of this study was to review the techniques used for its study, the composition of lignin, the evolutionary proposals of its variation and the lignification process in plants. In each objective, the existing literature and the main evolutionary hypotheses were reviewed. An analysis and explanation of each topic was carried out to conclude with a proposal of evolutionary hypothesis

of the lignification process in angiosperms. The techniques for the analysis of the composition of lignin encompass quantitative methods and qualitative methods. The knowledge of the diversity of lignin monomers was by standardization of techniques. The biosynthesis of lignin occurs in plastids and endoplasmic reticulum; several enzymes participate in the polymerization of lignin in the cell wall where two main monomers are formed: syringyl and guaiacyl. During the evolution of the plants, the genetic and enzymatic systems for the biosynthesis of the monomers were developed. The guaiacyl accumulates in the conductive elements of ferns and gymnosperms; in angiosperms the accumulation of syringyl and guaiacyl is presented. The presence of syringyl in Isoetes, Selaginella, Lycophyta and algae species due to evolutionary convergence conferred resistance to pathogens and UV rays. The presence of catalytically functional promiscuous enzymes led to the appearance of lignin, suberine and cutin. The anatomical and chemical diversification of the cell wall in angiosperms allowed its distribution and adaptation to different environmental conditions.

Keywords: Lignin, convergence, syringyl, guayacilo, diversification.

3 INTRODUCCIÓN

La lignina es un heteropolímero que es parte de la pared celular del tejido vascular de las plantas ^[1] y provee rigidez estructural con la que soporta las variaciones de tensión y presión hídricas del tejido vascular ^[2]. La lignina se ha detectado también en células especializadas en sostén y almacenamiento (fibras, esclerenquima y parénquima) ^[3] y en la corteza en conjunto con la suberina y la cutina ^[4,5].

El estudio de la lignina y de la pared celular se ha enfocado en aspectos económicos en la producción de papel ^[6,7] y biocombustibles ^[8,9], principalmente en especies arbóreas y herbáceas ^[10-12]; además se han evaluado los procesos evolutivos ^[13-16], que permiten entender la forma en que las plantas modificaron anatómicamente y químicamente los tejidos conductores ^[17]. La composición de la lignina se conoce y también su papel fundamental en la conformación de las paredes celulares, los tipos de lignina de los grupos taxonómicos y la complejidad en las enzimas y genes que participan en su síntesis y polimerización.

La composición de la lignina varía entre especies y entre tejidos ^[18], de manera general se consideran dos principales grupos de plantas, uno que presenta lignina de tipo guayacilo e hidroxifenilo ^[19], y el que presenta lignina de tipo siringilo, guayacilo e hidroxifenilo ^[17]. El primer

grupo se ha detectado principalmente en briofitas, licofitas y gimnospermas; el segundo grupo se observa principalmente en angiospermas ^[20,21]; sin embargo, actualmente se consideran a los ferulatos y ésteres como componentes monoméricos de la lignina además de precursores ^[19].

La variación en la composición de la lignina resulta de las adaptaciones de cada especie al ambiente en el que se desarrolla ^[22] y por la historia evolutiva de las traqueofitas; así, su composición es variada entre los grupos taxonómicos ^[17]. La lignina es un polímero fenólico natural cuya composición puede ser variada y estar unida por enlaces diversos ^[23], con enzimas diversas que participan en su biosíntesis ^[21,24] durante la polimerización en la pared celular ^[13], y en formación de los tipos de enlaces que unen a los monolignoles, dilignoles y oligolignoles entre sí ^[13,23].

Por lo anterior, los estudios integrales permiten entender cada aspecto relacionado con la composición, síntesis de la lignina y la evolución del proceso de lignificación de las plantas; desde antes del surgimiento de los elementos traqueales, hasta la presencia de las angiospermas, que son el grupo de plantas más diverso y distribuido actualmente. Esta revisión se realizó sin cometer el error que menciona Olson ^[25], que consiste en “generar una tendencia y considerar la evolución química de las plantas de manera lineal y pretender que las angiospermas son las especies más evolucionadas”. El objetivo de esta revisión fue documentar las técnicas para el estudio de la lignina, las características sobresalientes de la molécula de lignina, su biosíntesis y polimerización en la pared celular, así como las hipótesis en el desarrollo evolutivo del proceso de lignificación.

4 TÉCNICAS PARA EL ESTUDIO DE LA LIGNINA

El estudio de la composición de la lignina se ha realizado desde hace varias décadas, mediante técnicas analíticas cualitativas y cuantitativas; esto ha permitido avanzar en el conocimiento del polímero, su biosíntesis y acumulación en la pared celular de las plantas. La conformación de la lignina se califica como compleja ^[26] por la cantidad de monómeros posibles presentes en el polímero, los diferentes enlaces que unen estos monómeros, las diferencias en composición entre células ^[27] dentro de un individuo ^[28], entre individuos ^[13] y entre las especies ^[17]. Lo anterior ha permitido concluir que la conformación de la molécula de lignina no es única ^[29], ya que varía con el tipo de tejido del que forma parte, las características propias de la planta, los ritmos circadianos y las condiciones ambientales en las que se desarrolla ^[18,30-32]. Por su gran variabilidad, la selección de las muestras debe ser representativa, pues algunos compuestos pueden distribuirse

asimétricamente en la planta ^[28]; esto incluye, el muestreo adecuado del individuo completo y técnicas específicas para identificar los compuestos ^[22,33]. Lu y Ralph ^[23] documentaron los métodos para purificar y cuantificar los monómeros de lignina. De tal manera, que aquí describimos únicamente las técnicas que parecen tener mayor relevancia y uso actual de análisis directo.

4.1 Técnicas analíticas

Los métodos para el análisis de lignina permiten reconocer, por su composición, las facetas de la síntesis del polímero. La lignina de madera molida (MWL) es una de las técnicas más utilizadas porque permite separar la lignina de las paredes celulares y el uso de disolventes para eliminar los extraíbles, lo que, a la vez, permite aislar los compuestos lignocelulósicos ^[23]. La lignina que se extrae es componente de la pared secundaria y con la preparación de la muestra, como el molido, afecta su composición ^[34,35]. La molienda, del material a analizar, con vibración y balines de metal no altera la estructura de la lignina; en contraste, con la presencia de nitrógeno en el ambiente de extracción ^[36]. En general, el método MWL, aunque se modifique durante el proceso, es el más confiable para preparar el tejido, extraer y purificar la lignina ^[23].

Los métodos de Klason y Acetilbromuro (AcBr) se utilizan para obtener el porcentaje de lignina ^[15,37-39]. El método de tioacidólisis y el de óxido cúprico permiten cuantificar los monómeros, los valores pueden ser similares, aunque cada uno tiene restricciones. El método Klason puede subestimar los valores; en contraste AcBr los sobreestima ^[37]. También se utiliza la oxidación mediante óxido cúprico (CuO); sin embargo, con este método, los fenoles siringilo y cinamilo son propensos a oxidarse, por lo que las concentraciones de los fenoles de la lignina podrían subestimarse ^[40].

El método de tioacidólisis extrae principalmente monómeros conectados por enlaces β -O-4, que representan solo el 20 a 40% de la lignina ^[41,42]. Con oxidación por nitrobenzeno se obtienen unidades de *p*-hidroxibencilo, similar al método de tioacidólisis ^[15]. Esta última técnica, aunque no es un método exhaustivo para identificar la huella dactilar de la lignina ^[43], permite identificar los componentes fenólicos inusuales en la molécula, principalmente en las unidades con terminales O-4 ^[13,44]. En cualquiera de las técnicas debe evitarse usar acetatos para evitar acetilar los monómeros de lignina y sobrestimar los monómeros acetilados ^[45-47], ya que así están naturalmente en la molécula de lignina ^[46].

El espectro de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) se ha utilizado para determinar en forma semicuantitativa y cualitativa ^[48,49]. FTIR permite conocer la pureza de la lignina extraída mediante los patrones en las bandas de los espectros y espectros y la cantidad de muestra para el análisis pueden ser unos miligramos ^[50]. No obstante, otras técnicas analíticas, como resonancia magnética nuclear (RMN) y pirolisis acoplada a cromatografía de gases y espectro de masas (Py-GC/MS) muestran resultados similares a FTIR y entre ellas ^[51]. La técnica FTIR permite cuantificar en unos minutos las proporciones de los monómeros de sirringilo y guayacilo, mediante las bandas a 1270 cm⁻¹ y 1325 cm⁻¹ que permiten conocer el porcentaje de guayacilo y de sirringilo ^[52].

La técnica más precisa y recomendada para el análisis e identificación de los monómeros de lignina es la de RMN, la cual permite identificar los componentes con precisión ^[53-55], específicamente si se utiliza el análisis 2D y la espectroscopía de coherencia cuántica simple heteronuclear (HSQC) ^[51,56]. Esta técnica ha permitido identificar los monómeros de alcohol catequilo (C) en la testa de semillas de vainilla y de cactáceas ^[57,58]. Ralph y Landucci ^[59] revisaron exhaustivamente el uso de la técnica RMN y expusieron las ventajas del uso de esta técnica.

El uso de Py-GC/MS permite identificar los monómeros de guayacilo y sirringilo mediante su separación a temperaturas altas ^[60-62]. Py-GC/MS produce una mezcla de fenoles simples, que se forman de la ruptura de ciertos enlaces C-C y éteres ^[61]. Con cromatografía de gases se determina la masa de los componentes detectados. Este método se ha utilizado para identificar los componentes de diversas especies ^[51,62,63]. Algunas desventajas, es que con esta técnica se pueden subestimar los resultados debido a la reacción de descarboxilación durante el proceso ^[64]. Por ello se recomienda utilizar Py-GC/MS en conjunto con otras técnicas, como la termoquemolisis, que es procedimiento mixto y analiza reacciones hidrolíticas, metiolíticas y pirolíticas (TMAH/Py-GC/MS) ^[65].

Otro método menos utilizado para estudiar la lignina es la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), cuyo funcionamiento deriva en la separación de los monómeros de la lignina mediante una columna analítica y una fase móvil que es principalmente acetonitrilo y agua (14:86 v/v), ajustado el pH con un amortiguador de pH de ácido trifluoroacético ^[38]. La proporción de sirringilo y guayacilo se determina con una curva de calibración estándar de vainillina y sirringaldehído; los cálculos se basan en el valor teórico de transformación de 30 % de las unidades

de guayacilo a vainillina y 90 % de siringilo (S) a siringaldehído. Este método se utiliza después de la oxidación por nitrobenzeno y los resultados concuerdan con los que se obtienen mediante Py-GC/MS [66].

4.2 Métodos de detección de lignina por microscopía

Existen diferentes métodos que se han desarrollado para la detección y presencia de la lignina tanto en el tejido vascular como en residuos del procesamiento del papel, cuya finalidad es detectar su presencia, composición y distribución. Los principales métodos son microscopía de absorción de UV, microscopía de fluorescencia, tinción de permanganato de potasio asociado a microscopía de transmisión electrónica, inmunohistoquímica, espectrometría de dispersión de energía de rayos X, microscopía Raman, espectrometría de masas de iones secundarios de tiempo de vuelo (TOF-SIMS), además de técnicas de tinción con reactivos de fluoroglucinol [15,28], reactivo de Maule [67,68] y la tinción safranina-verde rápido [69,70].

La tinción con safranina-verde rápido es el método ampliamente utilizado para diferenciar tejido vascular lignificado del no lignificado el primero se identifica por sus tonalidades rojizas y el segundo tendrá tonalidades verde-azuladas, las observaciones se hacen directamente en microscopio de campo claro [69,70]. Otro método se basa en la tinción de Maule, que permite discernir, microscopio de campo claro, entre lignina siringilo (S) y lignina guayacilo (G), ya que la primera tiene tonalidad roja y la segunda presenta tonalidad castaño [67,68]. También, se ha empleado el método de fluoroglucinol para detectar la presencia de lignina, mediante su unión con los enlaces terminales 4-O de los *p*-hidroxi-cinamaldehídos y *p*-hidroxi-benzaldehídos [15,28,71]. Las tinciones también se utilizan para detectar la actividad de peroxidasas con tetrametilbencidina (TMB) [15,72].

La microscopía de fluorescencia es otro método que se utiliza frecuentemente ya que la lignina puede emitir autofluorescencia [73,74]. La emisión de fluorescencia la presenta aproximadamente a los 360 nm cuando se excita entre los 240 a 320 nm, debido a la presencia de cromóforos, en menor medida de fenilcumarona, y a la presencia de grupos carbonilo aril-conjugados dentro de la molécula de lignina con emisión de fluorescencia de 370-465 nm [75,76]. La emisión de fluorescencia de la lignina con tinciones se da entre los 500 a 570 nm, con una coloración apreciable en tonalidades de azuladas a verdosas [77,78], aunque también se pueden emplear tinciones como acriflavina, safranina y sulfato de berberina [79-81]. En cambio, la celulosa

también pueda detectarse mediante fluorescencia con tinciones con rojo Congo (emisión entre 570-620 nm) y enzimas Dylight (emisión entre 560-750 nm) [77].

Para la microscopía de UV la muestra debe cubrirse con oro y posteriormente obtener los cortes con cuchillo de diamante [82]; aunque este procedimiento puede tomar cierto tiempo, permite determinar la composición y topoquímica de los elementos traqueales [83]. También, para identificar variaciones en la acumulación de lignina de tipo guayacilo se ha utilizado espectrometría de masas de iones secundarios de tiempo de vuelo (TOF-SIMS) [84]. Con estas técnicas analíticas y de detección en tejido fijado se produce una imagen sobre la composición de la lignina y su diversificación entre los taxones.

5 CARACTERÍSTICAS DE LA LIGNINA

5.1 Molécula

La lignina es un heteropolímero, compuesto principalmente por tres monómeros: alcohol *p*-cumarílico, coniferílico y sinapílico [47,85]. Una vez son polimerizados dentro de la molécula de lignina, se denominan como *p*-hidroxifenilo, guayacilo y siringilo [23]. Algunos compuestos intermediarios en la biosíntesis de los monómeros de la lignina también son parte estructural de la misma, por lo que debe considerarse como monómeros de lignina a los monolignoles acetilados (ésteres de coniferilo y ésteres de sinapilo), a los hidroxicinamatos (ácido *p*-cumárico, ferulato y sinapato) y también a coniferaldehído, sinapaldehído, ácido ferúlico y alcohol 5-hidroxiconiferaldehído [19,23,86]. Una vez que los monómeros se activan dentro de la pared celular, mediante la acción de fenoloxidasas, la carga radical es desplazada a la región insaturada conjugada; esto permite formas diferentes de resonancia mesomérica, que pueden ir acumulando lateralmente nuevos monómeros (Figura 1). Esto genera polímeros de la molécula de lignina con composición distinta [23].

Los monolignoles de lignina se unen principalmente por enlaces de éteres y carbón-carbón, lo que conforma a las estructuras de guayacilglicerol- β aril éter, fenilcumaranos, diarilpropanos, resinol, bifenil y difenil éter [87]. El principal enlace que se presenta en la lignina es β -O-4, aunque es más débil en comparación de los enlaces β -5, β -1, β - β , 5-5, y 5-O-4 (Figura 2), que son más resistentes a la degradación [13,23].

Los hidroxycinamatos presentes durante la lignificación son copolimerizados dentro del polímero de la lignina, y en el caso de los pastos, pueden acetilar a los arabinoxilanos ^[88]. En cambio, los ferulatos, cumplen la función principal de unir los monómeros de la lignina (siringilo y guayacilo) con los polisacáridos estructurales mediante enlaces de tipo 8-O-4', 5-β, 4-O-β', β-5', 5-5' y 8-β' ^[89] (Figura 2). La unión de estos incluye principalmente enlaces covalentes, principalmente entre xilanos y pectinas ^[90]. Los ferulatos por lo tanto, sirven como sitios de nucleación de los cuales la lignina se va acumulando, situación documentada para pastos ^[19] y gimnospermas ^[89,91,92]. Los ferulatos se unen activamente a la lignina, por lo que se mantienen unidos incluso aún después de separar los monómeros de lignina; por esto son componentes relevantes en la organización de la lignina ^[19].

Los enlaces de tipo éster, principalmente entre monolignoles ferulados (F-MG o MS), facilita la separación de los monómeros, ya que son enlaces débiles. La lignina de tipo siringilo-guayacilo presenta mayor número de enlaces ésteres de tipo β-O-4 (Figura 3), en comparación con la lignina de tipo guayacilo, por lo que muestra resistencia menor a la hidrólisis que la lignina de las gimnospermas, la que solo tienen guayacilo ^[19].

La lignina de tipo C (alcohol catequilo) se ha detectado en la cubierta de las semillas de especies como vainilla y en cactáceas ^[58,93]. La lignina de tipo C confiere dureza y resistencia a la cubierta de las semillas; sin embargo, no se ha confirmado la presencia de alcohol catequilo en el tejido vascular. Además, en plantas mutantes, en las que se acumula lignina de tipo C, el desarrollo se atrofia y el xilema se desarrolla anormalmente ^[94].

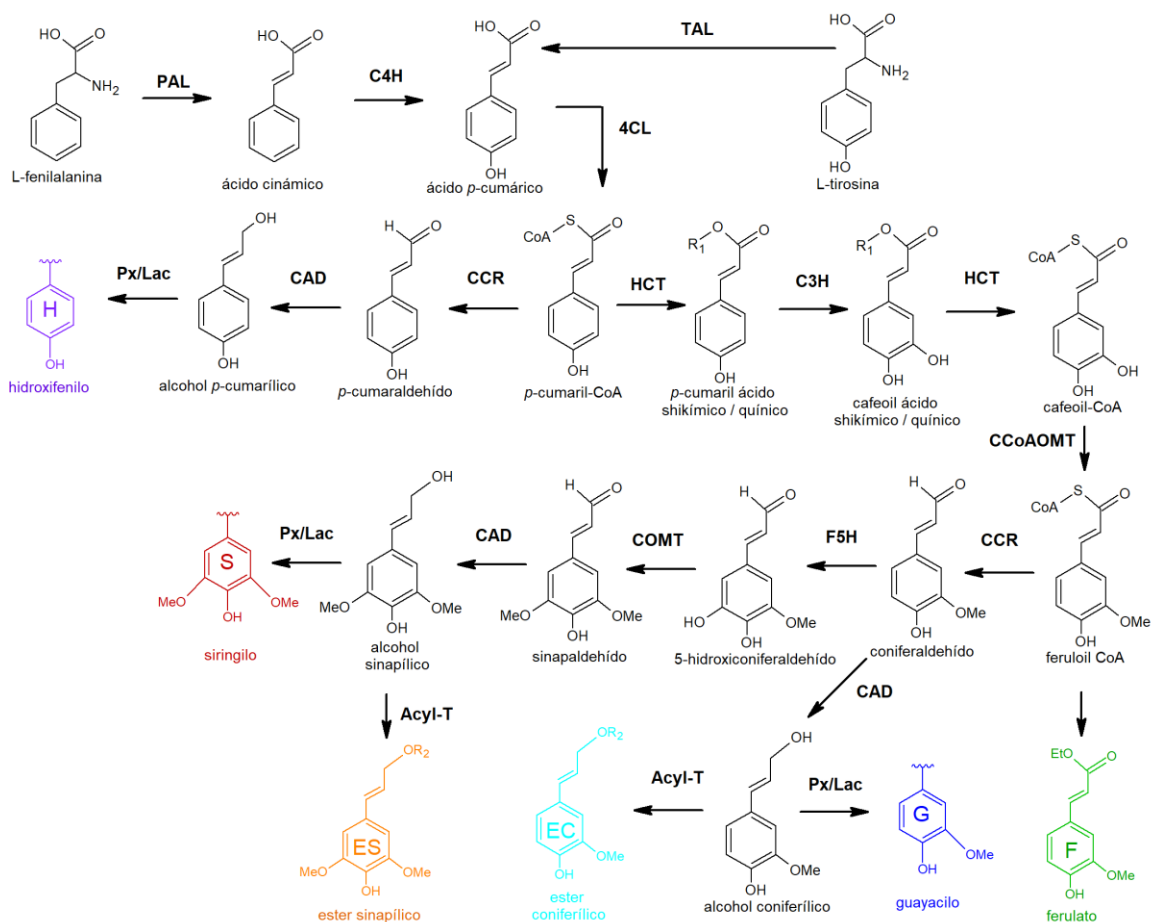


Figura 1. Ruta biosintética de la lignina. PAL: fenilalanina amoníaco liasa, TAL: tirosina amoníaco liasa, C4H: cinamato 4-hidroxilasa, 4CL: 4-cumarato, CoA ligasa, HCT: *p*-hidroxicinamoil-CoA, quinato shikimato *p*-hidroxicinamoiltransferasa, C3H: *p*-cumarato 3-hidroxilasa, CCoAOMT: cafeoil-CoA *O*-metiltransferasa, CCR: cinamoil-CoA reductasa, COMT: ácido caféico / 5-hidroxiciniferaldehído *O*-metiltransferasa, CAD: alcohol cinámico dehidrogenasa, F5H: ferulato 5-hidrolasa, Acyl-T, aciltransferasa, Px: peroxidasa y Lac: lacasa (Modificado de Lu y Ralph [23]).

Los dilignoles, trilignoles y otros compuestos fenólicos presentes en el medio extracelular pueden ser intermediarios en la biosíntesis de lignina; en caso contrario, falta explicar su función, ya que son tóxicos para la planta. Esos compuestos son poco solubles en agua [85,95,96]. Los monolignoles glucósidos son introducidos por transportadores dependientes de ATP al tejido vascular; sin embargo, para su incorporación en el proceso de lignificación, es necesaria la catálisis por la enzima β -glucosidasa [97–99]), relacionada con el crecimiento radial en coníferas [100].

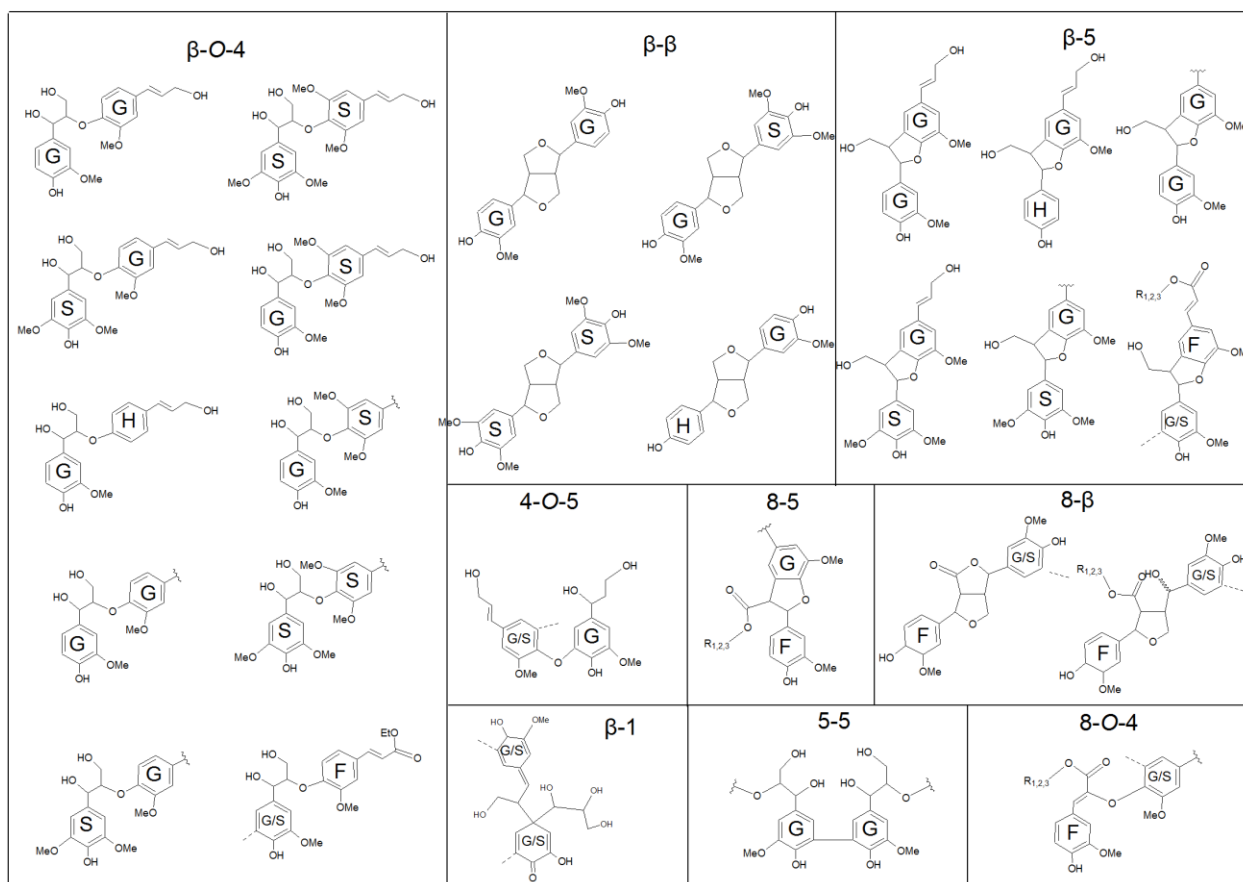


Figura 2. Principales enlaces que se presentan durante la polimerización de la lignina. Se presenta la unión entre monómeros de guayacilo y siringilo con los ferulatos y estos a su vez con los polisacáridos de la pared celular. S: siringilo. G: Guayacilo. F: ferulato (Modificado de Lu ^[23]).

5.2 Biosíntesis de la lignina

El principal precursor de la lignina es la fenilalanina, aunque en algunas monocotiledóneas, también se utiliza como precursor a la tirosina ^[101–103]. En la ruta metabólica del ácido shikímico (ruta de los fenilpropanoides) ^[104] se producen los monómeros de la lignina y el proceso ocurre en los plastidios ^[105]. En la ruta de los fenilpropanoides, para la biosíntesis de la lignina (Figura 1) la fenilalanina se transforma en ácido cinámico, luego en ácido *p*-cumárico y después en *p*-cumaril CoA. Esta molécula es sustrato en dos rutas, la que formará al alcohol *p*-cumarílico (o monómero H) y la más compleja que producirá los monómeros de la lignina: ácido ferúlico (ferulatos), ácido sinápico, alcohol catequilo (lignina C), alcohol coniferílico (lignina G) y alcohol sinapílico (lignina S) (Figura 1) ^[21].

La composición de la lignina puede variar por la presencia de ciertas enzimas en la ruta metabólica de la lignina ^[106]. Las principales enzimas durante la formación de los monómeros son

la fenilalanina amonía liasa (PAL), cinamato 4-hidroxilasa (C4H), 4-cumarato coenzima A ligasa (4CL), *p*-cumarato 3-hidroxilasa (C3H), quinato *p*-hidroxicinamil-CoA (HCT), cinamil-CoA reductasa (CCR), alcohol cinámico deshidrogenasa (CAD), cafeoil-CoA O-metiltransferasa (CCoAOMT) y ácido caféico O-metiltransferasa (COMT) ^[21,24,107,108]. Dos principales factores en la diferenciación de los monolignoles, se dan por la presencia de la enzima F5H (sintetiza siringilo) y de los subsecuentes pasos catalizados por las enzimas OMT, 4CL, CCR y CAD ^[106]. La expresión enzimática va a depender de diversos factores como de los ciclos circadianos, condiciones estresantes tanto bióticas como abióticas ^[109,110] y de la estacionalidad (época de lluvia o sequía) ^[111].

El proceso de lignificación comienza en los plastidios y posteriormente se desarrolla tanto en el retículo endoplasmático (donde la citocromo P450 oxidoreductasa cumple su función), mientras que en el citoplasma actúan las demás enzimas como PAL, 4CL, CCoAOMT, CCR, CAD y COMT ^[21,112,113]. La actividad de las enzimas oxidoreductasas P450 está ligada con la actividad de algunas enzimas del citoplasma ^[57,114–116]. Los monolignoles sintetizados son transportados a la pared celular mediante tres posibles sistemas de transporte: difusión pasiva, exocitosis asociada a vesículas y transporte activo dependiente de ATP con transportadores ABC y/o antiportadores asociados a protones ^[21]. El primer tipo de transporte se ha considerado como el menos probable, pero se consideraba debido a las observaciones que se hicieron en la movilización de monómeros de lignina mediante bicapas lipídicas, lo que es poco factible que ocurra de manera natural ^[117,118].

La exocitosis se demostró *in vitro*, mediante este proceso las vesículas transportan los monómeros a la pared celular; cuando se eliminó este medio de transporte en algunos experimentos, el proceso de lignificación se mantuvo en menor medida, lo que sugirió que existen otros medios para el transporte de los monómeros ^[119–121]. El transporte activo ocurre principalmente para alcohol *p*-cumarílico y en algunas especies, su inhibición experimental, no afecta la polimerización de la lignina ^[99,118,122]. Además, algunos autores consideran que las diferencias en los transportadores ABC sería uno de los factores que permitiría la acumulación de cierto monómero dependiente del tipo de célula en el que se localiza ^[122,123], aunque aún se discute sobre este tipo de transporte ^[124]; por lo que posiblemente los mecanismos de transporte de monómeros se den por varios medios.

6 CONFORMACIÓN DE LOS COMPONENTES DE LA PARED CELULAR

6.1 Polimerización de polisacáridos

La polimerización de la celulosa y las hemicelulosas es diferente a lo que ocurre con la lignina, en el caso de las celulosas, ésta se sintetiza en la membrana plasmática donde se traslada la UDP-glucosa, la cual se une al citosol dextrina, posteriormente un complejo enzimático de seis unidades en forma de roseta (con seis unidades de celulosa sintasa), unen los monómeros de glucosa para formar las 36 cadenas de celulosa simultáneamente y obtener las microfibrillas de celulosa^[125,126] mediante enlaces (1→3), (1→4)-β-D-glucano (MLG)^[127] y posteriormente son extruidas directamente en la pared celular^[128]. Las diferencias en la conformación de las microfibrillas, depende del tipo de enzimas del complejo celulosa sintasa y de las interacciones con los demás polisacáridos como hemicelulosas, las cuales, al quedar inmersas, provocan la aparición de celulosa desordenada y no de tipo cristalina^[129]. El aumento de boro puede provocar la inhibición de celulosa y un incremento en la lignificación^[130]. Una vez finalizada la formación de celulosa, el complejo enzimático es reintroducido dentro de la membrana plasmática durante la acumulación de la celulosa en la pared celular^[131].

Las hemicelulosas y pectinas son sintetizadas en el retículo endoplasmático y el aparato de Golgi, posteriormente son secretadas a la vía del apoplasto mediante el tráfico de vesículas hacia la pared celular^[129,131]. La síntesis de los compuestos se da en las regiones *cis*-Golgi donde se localizan los complejos enzimáticos *CSL*, después se modifican en las regiones *trans*-Golgi, donde las hemicelulosas son trasladadas en las vesículas que se fusionan hasta formar la placa celular^[132,133]. Las moléculas peptídicas, como galactanos peptídicos, se acumulan en la pared estriada de las vesículas del aparato de Golgi, las cuales se reúnen en el citoplasma y posteriormente se fusionan con la membrana plasmática para dejar los contenidos por la vía del apoplasto. Este tipo de secreción mediante la acumulación de galactanos permite llenar los largos espacios del periplasma, lo que facilita el contacto entre los galactanos y las microfibrillas de celulosa cuando están en proceso de ensamblaje, lo que evita la interacción de la celulosa con otros compuestos y acumular galactanos peptídicos dentro de la matriz de celulosa^[134,135]. La gran heterogeneidad de enlaces entre pectinas y hemicelulosas dentro de la pared celular se atribuye a un gran número de genes de glicosil-transferasas, los cuales, mediante una diversidad de donadores de azúcares activados, forman varios enlaces glicocídicos^[136-138].

6.2 Polimerización de lignina

El proceso de polimerización de la lignina se da directamente en la pared celular mediante la polimerización oxidativa de los monómeros secretados. Los radicales de los monómeros de lignina, se unen entre sí y forman enlaces condensados C-C de tipo 5-5', β -5', β - β y β -1' (Figura 2) y no condensados C-O-C como β -O-4' [139]. La polimerización de la lignina es de tipo “endwise”, debido a que los nuevos monómeros se acumulan y entrelazan con los dímeros, trímeros y oligómeros que se formaron primero, por lo que se obtiene una molécula lineal que en ocasiones se ramifica por la presencia de enlaces de tipo 5-5 o 4-O-5 [23,95]. Esto ocurre independientemente de las enzimas, las cuales son de dos tipos, las lacasas dependientes de O₂ (Figura 3) y las peroxidasas dependientes de H₂O₂ [140-144].

Las enzimas lacasas actúan directamente en todos los monolignoles de la lignina, mediante la oxido-reducción de los *p*-difenoles al utilizar el O₂ [145,146]. La presencia de lacasas se ha detectado no solo en plantas, sino que también está presente en bacterias y hongos [147,148], aunque las funciones que cumplen son diferentes, ya que, en plantas su actividad está enfocada en la polimerización (Figura 3), mientras que en hongos y bacterias se utilizan en la separación de los monómeros [149-152]. Se encontró que estas enzimas formaban parte de la polimerización de la lignina, debido a que se detectó su actividad durante la lignificación del xilema, además de que la transcripción de lacasa está regulada de manera similar a la de los monómeros [153-156]. La presencia de diferentes isoformas de las lacasas se relaciona con el tipo celular donde se encuentran, incluso durante la polimerización de la lignina [155,157], se puede observar la actividad de dos o más lacasas al mismo tiempo [158].

Las peroxidasas son una familia multigénica [159], el número de isoformas de esta enzima es mucho mayor que las lacasas, y durante la evolución de las plantas se han incrementado hasta tener un aproximado de 138 enzimas de peroxidasa en las angiospermas [17]. Las peroxidasas son afines principalmente al alcohol coniferilo [37,160,161], aunque también se ha observado afinidad con el alcohol sinapílico [162,163] debido a que es propenso a la oxidación [164]. Sin embargo, pocas enzimas son capaces de oxidar al alcohol sinapílico debido al impedimento estérico que se forma entre el sitio de unión y los metoxilos del alcohol sinapílico [165-167] (Figura 3). Las enzimas capaces de oxidar los monómeros de siringilo, se presentan en las gimnospermas y plantas ancestrales [13]. La actividad de las peroxidasas en la unión de alcohol coniferilo da origen a neolignanós, pinosinol,

alcohol dehidrodiconiferilo y al éter etílico guaiacilglicerol- β -*O*-coniferilo ^[168,169]. Su presencia se da en el tejido vascular y su actividad se detectó al inhibir la formación de peroxidasas, al observarse una disminución en el proceso de lignificación sin afectar el tamaño de la planta ^[170-172].

Una tercera enzima que se ha detectado durante el proceso de lignificación es la NADPH oxidasa, la cual forma parte de una familia multigenética de enzimas, que se presentan en el desarrollo y defensa de las plantas ^[171,174,175]. Su participación dentro de la lignificación es principalmente de proveer a las plantas de oxígeno reactivo durante la lignificación. NADPH oxidasa funciona como enzima complementaria al proceso de polimerización de la lignina ^[176,177]. Trabaja en conjunto con tres dismutasas superoxidasas (CuZn-SOD, Fe-SOD y Mn-SOD), las cuales utilizan los radicales producidos por NADPH oxidasa y los transforman en O₂ y H₂O₂, que funcionan como sustrato para las lacasas y peroxidasas ^[178-180].

Lacasas y peroxidasas pueden tener especificidad en algunas células como la banda de Caspary (peroxidasas) y elementos traqueales (lacasas) durante la polimerización de la lignina ^[158], mientras que en algunas especies, ambas enzimas pueden actuar durante el proceso de lignificación de los elementos traqueales ^[140], por lo que se proponen tres posibles modelos para la acción de las enzimas: El primero, donde hay una diferencia secuencial en la intervención debido a la especificidad del sustrato, donde las lacasas producen primero oligolignoles y posteriormente las peroxidasas los ocuparían para seguir con la unión de más monómeros ^[21,181]. El segundo modelo menciona que hay una intervención secuencial debido a una expresión espacio-temporal diferente, donde ambas enzimas actuarían en diferentes sitios y en diferente momento, no solo en el tejido lignificado si no en las células cooperativas de la lignificación como el parénquima no lignificado ^[182]. El último modelo menciona que hay formación de diferentes complejos proteínicos, donde los monolignoles se unen a otros complejos proteínicos lo que restringe los sitios de unión ^[21,183,184]. Además, algunos factores de transcripción de tipo KNOX controlan la transcripción, abundancia y actividad enzimática durante la formación y polimerización de la lignina ^[185], así como la sobreexpresión de ciertos genes como *AmMYB308* o *AmMYB330* que disminuyen la acumulación de lignina ^[31].

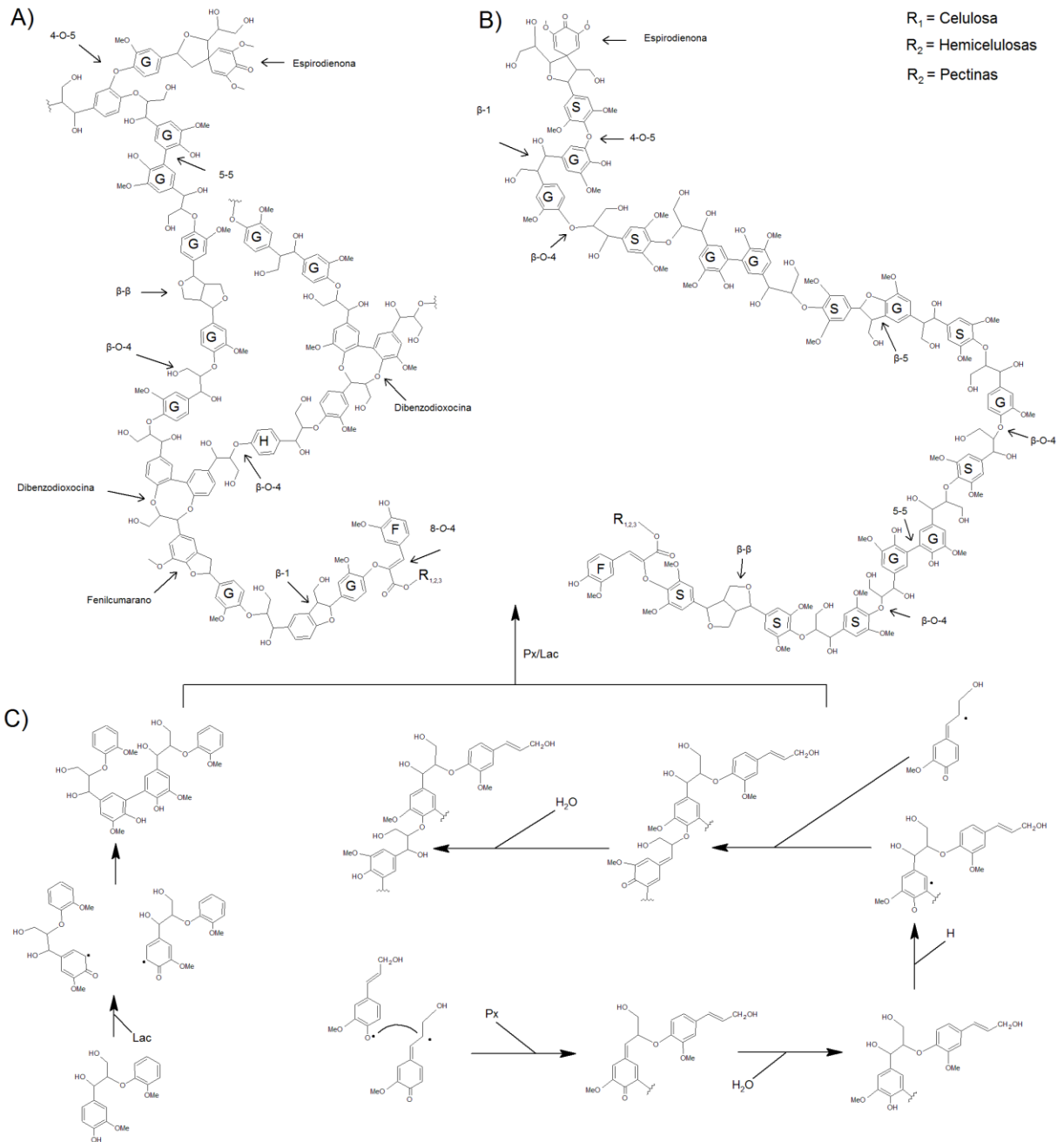


Figura 3. A) Representación de una molécula de lignina de madera de gimnospermas. B) Molécula típica de lignina de madera de angiospermas. C) Representación de la polimerización de monómeros de lignina mediante lacasas y peroxidasas. Lac: lacasa. Px: Peroxidasa. H: Hidroxifenilo. G: Guayacilo. S: Siringilo. F: ferulato. (Modificado de Ros Barceló et al. ^[13]; Liu et al. ^[131]; Hilgers et al. ^[173]).

7 LIGNIFICACIÓN DE LA PARED CELULAR

7.1 Pared celular

La formación de la pared celular comienza con la acumulación de los polisacáridos estructurales, posteriormente se acumula la lignina ^[186] debido a que la biosíntesis de lignina es energéticamente más costosa que la de celulosas y hemicelulosas ^[187]. Además, las plantas no tienen la capacidad de degradar la lignina, por lo que su síntesis está regulada y funciona como un reservorio de carbón ^[3,188]. La interacción entre lignina, hemicelulosas y celulosa, permite la distribución del estrés mecánico a lo largo de las fibras ^[189] además de soportar la tensión de compresión ^[190]. La molécula de la lignina tiene menor resistencia mecánica que la celulosa; sin embargo, su acumulación y adhesión entre la celulosa y las hemicelulosas, refuerza la estructura de la pared celular al proveer mayor fuerza de tensión (de 25 a 75 MPa) y un aumento en el módulo de Young (de 2.5 a 3.7 GPa) ^[191]. Adicionalmente, la lignina funciona como barrera física y química que separa la celulosa del agua; permite que la fuerza de tensión sea mayor debido a que la celulosa hidratada es más débil que la seca ^[192,193]. Debido a que la pared celular primaria está compuesta principalmente de microfibrillas de celulosa, hemicelulosas (xilanos, mananos y glucanos) y polisacáridos pépticos (homogalacturonanos, rhamnogalacturonanos I, rhamnogalacturonanos II y xilogalacturonanos), la acumulación de lignina en la pared primaria le confiere resistencia y permite soportar las diferencias en la presión de turgencia ^[194–196].

El tipo de lignina presente en las células, el tiempo de lignificación, las enzimas y substratos que ocupan y la forma en la deposición de la lignina, dependen principalmente de las funciones que presentan ^[21,27,197]. Las células donde se acumula la lignina son aquellas que necesitan reforzar las paredes celulares para soportar las diferentes presiones ^[198–200]. Por ejemplo, las células del tejido vascular conformadas por los elementos traqueales (elementos de vaso y traqueidas) deben soportar las diferencias en la presión hídrica y el ascenso de la savia ^[201–204]; las fibras y esclereidas acumulan lignina debido a que su principal función es la de conferir soporte y resistencia en los diferentes órganos de la planta donde se presentan (tallo, raíz, hojas, frutos) ^[21,205–207]; además de otras células que también acumulan lignina como las células de la endodermis presentes en la raíz y las células de la testa en la semilla, que funcionan como protección de ambos órganos ^[58,93,208].

La presencia de lignina de tipo G en los elementos de vaso se atribuye principalmente a la presencia de las enzimas de tipo CCoAOMT, mientras que las fibras presentan lignina

principalmente de tipo siringilo ^[21,42], la cual hipotéticamente se ha considerado que da mayor resistencia y soporte a la pared celular ^[112]. Otros autores sugieren que la lignina de tipo guayacilo es más dura debido a la metoxilación y unión entre guayacilo y enlaces β - β , por lo que el proceso químico de separación es difícil comparado con la lignina rica en siringilo ^[209].

La lignificación de la pared celular inicia en las esquinas ^[210], donde la lignina comienza a acumularse y conforme madura la célula se acumula en la pared secundaria de la misma ^[186,211] (Figura 4). Los ferulatos fungen como sitios de nucleación y la lignina comenzará su acumulación en las paredes celulares ^[212]. La unión entre lignina y polisacáridos mediante ferulatos se da por un mecanismo activo donde se forman enlaces de tipo β -O-4, 8- β , β -5 y 8-5 ^[19,23], permite que las células tengan una mayor rigidez y estabilidad ^[64]. En las monocotiledóneas se ha detectado la presencia de ferulatos en la lámina media y en las esquinas de la pared celular ^[213], para cactáceas Reyes-Rivera et al. ^[51] han propuesto que los ferulatos funcionan como enlaces entre la lignina de la pared primaria de las traqueidas de banda ancha y los polisacáridos de la pared primaria de las fibras. Sin embargo, hacen falta más investigaciones para entender mejor la posición de la unión entre ferulatos y lignina.

Durante el desarrollo del xilema primario, la acumulación de la lignina se da principalmente en la pared secundaria ^[214-216] y está compuesta principalmente de monómeros de guayacilo ^[112]. Mientras que durante la lignificación del xilema secundario, los guayacilos se presentan principalmente en pared primaria, aunque también se acumulan en pared secundaria principalmente en los elementos de vaso ^[217,218]. Los guayacilos se acumulan al inicio del proceso de lignificación de los elementos traqueales, ya que la madera rica en guayacilo engrosa más rápido pero lignifica lento aunque está fuertemente unida ^[219-221], por lo que los elementos conductores acumulan principalmente guayacilo ya que para ser funcionales, debe ocurrir la muerte celular programada ^[222], mientras que la lignina siringilo (S) engrosa y lignifica lento, por lo que su acumulación en las paredes secundarias, tarda más en desarrollarse ^[92,186,221].

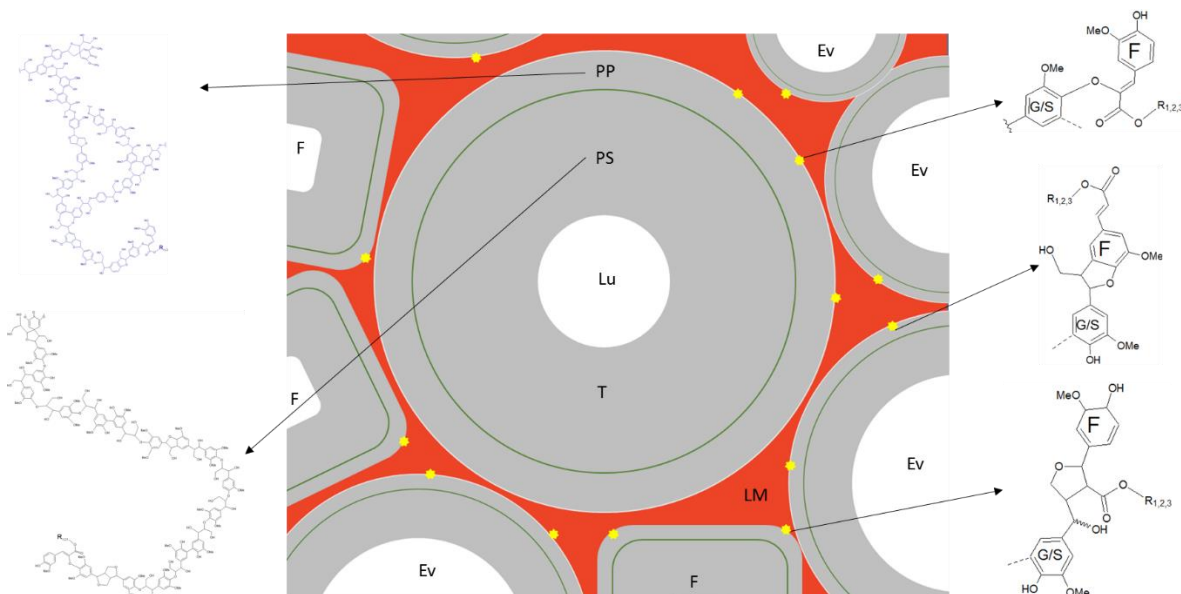


Figura 4. Representación esquemática de los sitios de nucleación de la lignina y los tipos de lignina comúnmente presentes en la pared primaria y pared secundaria de traqueidas, elementos de vaso y fibras. PP: pared primaria. PS: pared secundaria. Lu: lumen celular. T: traqueida. F: fibra. Ev: elemento de vaso.

Las fibras comienzan su lignificación en la lámina media y se acumula gradualmente a través de la pared primaria y la secundaria ^[92]. Sin embargo, para este proceso no es necesaria la muerte celular como ocurre con los elementos traqueales. La acumulación de lignina de tipo S, es la que predomina en la pared celular y su polimerización se da por lacasas y peroxidasas ^[155,158,170,172]. A pesar de evolucionar de una célula meristemática primitiva (fusiforme inicial) que dio origen a los elementos traqueales y a las fibras, existen diferencias en la composición y en la especialización del trabajo, ya que las fibras funcionan para dar sostén al tallo de la planta principalmente, mientras que los elementos traqueales se especializan en la conducción ^[223–225].

7.2 Lignificación cooperativa

Durante el proceso de lignificación de los elementos traqueales (ET), ocurre la muerte celular programada, que permite la conducción del agua a través del lumen celular ^[201,226,227]; sin embargo, el proceso de lignificación puede continuar incluso después de la muerte celular de los ET, debido a que durante el desarrollo de la planta, la presión puede aumentar dentro del tallo y es necesario el refuerzo del tejido vascular ^[228], por lo que la lignificación cooperativa, juega un papel fundamental ^[176,229].

La lignificación se presenta en las células que lignifican su pared celular y también ocurre en células que no contienen paredes lignificadas, a este evento se le conoce como lignificación cooperativa, o hipótesis del buen vecino y se presenta cuando las células parenquimáticas que rodean al tejido vascular, sintetizan monómeros de lignina y son transportados a los elementos traqueales, donde se acumularan en las paredes secundarias ^[176,230,231] (Figura 5).

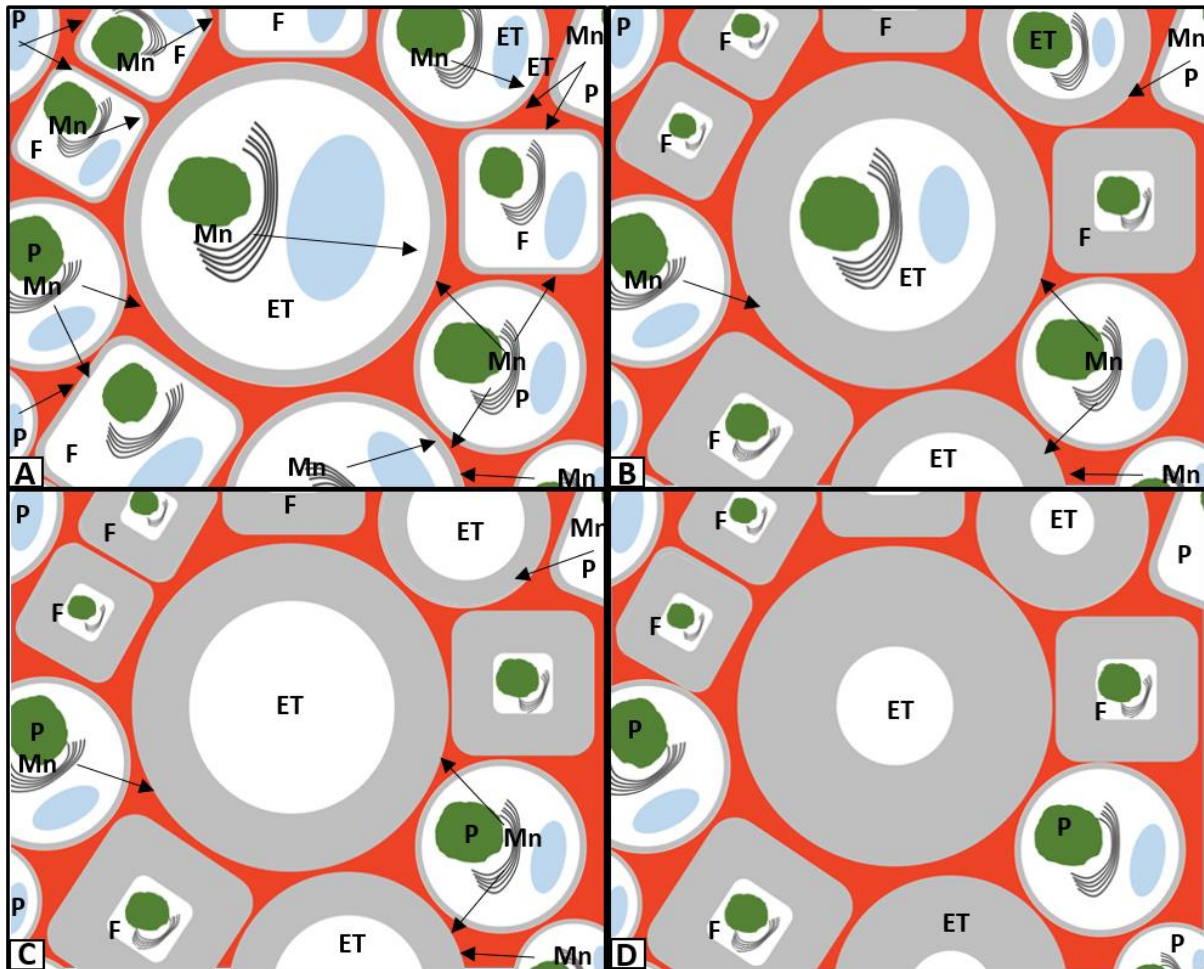


Figura 5. Representación de la lignificación cooperativa y semicooperativa en el tejido vascular. A) Después de la diferenciación celular empieza a producirse, transportarse y polimerizarse la lignina en la pared primaria y secundaria de ET y F. B) termina de acumularse la lignina por parte de los ET y F ayudado por el parénquima que los rodea. C) ocurre la muerte celular programada de ET, conforme madura la planta, el parénquima puede proporcionar monolignoles que se acumulen en las paredes de los ET para reforzar su pared y D) una vez reforzada la pared se detiene el proceso de lignificación en esta zona. ET: Elementos traqueales. F: Fibras. Mn: Monómeros. P: Parénquima. Las flechas indican el transporte de monómeros del sitio de biosíntesis al sitio de polimerización.

La cooperación en la lignificación puede variar en cada tejido, en el caso de los elementos traqueales es de tipo cooperativa, donde la cooperación se da entre elementos traqueales y fibras

y/o parénquima ^[232,233]. Además, las fibras pueden presentar una relación semiautónoma con el parénquima adyacente, esto se observó al silenciar algunos genes que producían la lignina en las fibras y que aun así acumulaban lignina en su pared celular ^[231,234]; mientras que en el caso de las células de la banda de Caspary presentan autonomía en el proceso de lignificación ^[122].

El proceso de cooperación se detectó mediante la inhibición de la lignificación y reactivación posterior a la muerte de los ET, por lo que se observó que se acumulaba lignina en las paredes celulares de los ET, debido a la actividad de las células no lignificadas que rodeaban estos elementos ^[96,176,230]. Es por eso, que se ha llegado a la conclusión que las fibras que rodean a los ET no vivos y el parénquima (radial y axial), están relacionadas con la lignificación de los ET y que el parénquima es el principal responsable de la lignificación de las paredes celulares. Este proceso de lignificación cooperativa podría ser un carácter reciente en la evolución de las plantas, principalmente en las angiospermas, donde la presencia de fibras y parénquima, pudo beneficiar y contribuir a la lignificación de los ET ^[216,222,235].

8 EVOLUCIÓN DE LA LIGNIFICACIÓN

La presencia de lignina en el tejido vascular de las plantas tuvo diferentes facetas evolutivas, su formación como ya se ha mencionado deriva de la ruta del ácido shikímico ^[185], la cual da origen a diferentes moléculas estructurales. La suberina, cutina y lignina, son compuestos que tienen similitudes en las funciones que realizan: resistencia a sequía y rigidez estructural, por lo que posiblemente comparten una ruta biosintética ancestral (Figura 6) ^[16,193,236].

Durante el desarrollo de los microorganismos fotosintetizadores, los genes involucrados en la ruta del shikimato, tuvieron varias mutaciones que permitieron la diversificación de la misma, además de que las enzimas funcionaron como enzimas promiscuas catalíticamente funcionales (MPEs), lo que permitió el surgimiento de diferentes polímeros fenólicos estructurales ^[2,193]. Por lo tanto se propuso la hipótesis que un polímero aromático de la cutícula de musgos fue el predecesor de la biosíntesis de suberina, lignina y cutina, debido a la similitud entre rutas metabólicas ya que la ruta de hidroxicinamoil-treonato (musgo) presenta como intermediario a hidroxycumaril-CoA, que es un precursor de la biosíntesis de lignina ^[2,16].

En algunos microorganismos, algas rojas y carófitas se ha descubierto que presentan amonias derivadas de fenilalanina y tirosina, además de monómeros similares a la lignina ^[237,238]. La

suberina presenta una similitud estructural con la lignina (Figura 6) debido a que el dominio aromático es similar [239–241], las peroxidasas involucradas en la polimerización son muy parecidas entre lignina y suberina [166,242,243] y los ferulatos se unen a la suberina de manera similar a la lignina [5,244,245].

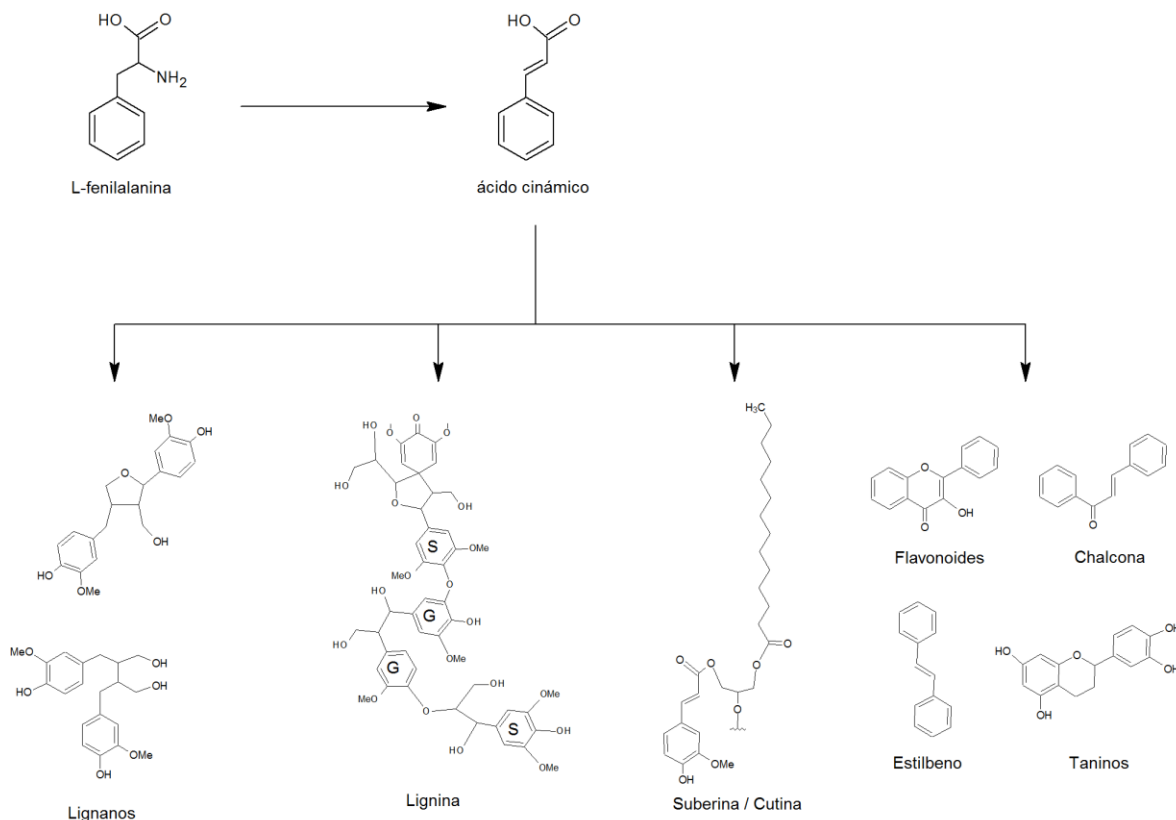


Figura 6. Productos derivados de la ruta metabólica del ácido shikímico y como precursor la fenilalanina.

La aparición del tejido vascular y los procesos de lignificación tuvieron consecuencias fisiológicas y anatómicas durante el desarrollo de las plantas, la *teoría de la tensión-cohesión* propuesta por Dixon y Joly en 1895, refiere que la pérdida de agua en las plantas se da por la transpiración debido a la demanda de agua por la atmósfera lo cual provoca una tensión (estiramiento) en la columna de agua en los conductos y la cual es soportada por la cohesión que es resultado de los puentes de hidrógeno entre las moléculas de agua [230,246], tiene costo energético bajo y es eficiente en el transporte interno del agua [247] por lo que se generan diferenciales en el potencial hídrico negativo en condiciones normales y estresantes, como sequía o incendios [248–250]. Este transporte genera una tensión xilemática, la cual, sin la presencia de una estructura firme y resistente en el tejido vascular provocaría el colapso de los elementos traqueales [251,252].

La resistencia y firmeza que le agregó la lignina a la pared celular, permitió el desarrollo de elementos de vaso con diámetros de lumen mayores, lo que incrementó el paso del agua ^[227]; como lo propone la ley de Hagen-Poiseuille, que menciona que el flujo a través del “tubo” es directamente proporcional a la presión y a la cuarta potencia del radio del “tubo” e inversamente proporcional al largo del “tubo” y a la viscosidad del líquido ^[253–255]. La pared secundaria lignificada en los elementos traqueales, en conjunto con la aparición de la cutícula y los estomas presentaron una ventaja adaptativa que promovió una diversificación de especies y la generación de nuevos estratos en la vegetación terrestre ^[230,256].

Durante el proceso de formación de los elementos traqueales intervinieron procesos principalmente hormonales. Se sugiere que, en este proceso, las células del mesófilo y del procambium se modificaran por efecto de las auxinas, brasinosteroides, xilógenos y citoquinina. Esto conllevó a una expansión y elongación celular, deposición de celulosa en la pared secundaria, muerte programada y digestión de la parte final de las células, además de la formación de un conducto vascular con flujo de agua ^[202,257–259]. La rigidez de la pared celular derivada de la acumulación de polifenoles, posiblemente surgió antes de la formación de las células conductoras, ya que se ha encontrado presencia de compuestos similares a la lignina (lignanós) ^[260]. Varios autores sugieren que el proceso de lignificación surgió en sus inicios con fines biomecánicos ^[15,261], contra patógenos ^[262] y protección contra rayos UV ^[17,263,264].

Durante las primeras etapas evolutivas del tejido vascular de plantas basales se observa un incremento en la complejidad y robustez mecánica de la pared celular de los elementos traqueales ^[265,266]. Se desarrollan las traqueidas de los helechos que en sus paredes celulares se acumula lignina de tipo guayacilo ^[267] y esta característica se mantiene en los grupos derivados como las gimnospermas, pero no en las Gnetales que presentan elementos de vaso (los cuales deben ser analizados a detalle para conocer su composición química) ^[268]. Es importante señalar que para *Selaginella* se presenta lignina de tipo S que es similar a la detectada en angiospermas ^[269]. La lignina S es derivada de una convergencia evolutiva ya que las enzimas que participan en la biosíntesis son diferentes entre ambos grupos ^[17,20,270].

Otra hipótesis indica que la acumulación abundante de lignina en el tejido vascular se derivó del aumento de O₂ durante el periodo Devónico Medio ^[271]. Además de que su presencia permitió que las plantas tuvieran mayores tallas (arbóreas) en longitud durante la evolución de las mismas

[272,273]. Posteriormente se mantuvo la presencia de lignina de tipo guayacilo durante el desarrollo de las gimnospermas; sin embargo, algunas especies de angiospermas primitivas y gimnospermas compartieron características en la proporción de guayacilo y de siringilo en los elementos traqueales [54]. Las enzimas involucradas en la formación de alcohol *p*-cumarilo se han detectado en diferentes especies fotosintéticas de las eucariotas, por lo que los genes involucrados en la formación de este precursor de lignina surgieron en las etapas basales de los microorganismos fotosintéticos posiblemente para dar rigidez y muy probablemente como defensa bioquímica [193].

Con el surgimiento de las angiospermas, la especialización de las células del tejido vascular (fibras, elementos de vaso, parénquima) [274,275] permitió que este grupo abarcara nuevos nichos ecológicos a lo largo del tiempo, ya que las primeras especies de angiospermas no presentaban elementos de vaso, solo traqueidas [276,277]. La especialización del tejido vascular en este grupo de plantas favoreció la aparición de estrategias para mitigar problemas de embolismos y cavitaciones (mucilago, gomas, traqueidas de banda ancha) [278–280], la diversificación en los engrosamientos de la pared celular secundaria (anulares, helicoidales, reticulares) [247] que permitieron una mayor humectabilidad y eficiencia en el ascenso del agua [281], la diversificación de las punteaduras que evitan embolismos [282,283] y cuya composición química es hidrofílica al interior e hidrófoba alrededor [284], la diversificación de las placas de perforación [285,286], así como la diversificación en la composición de las moléculas de lignina de la pared celular [15,17].

El cambio evolutivo en las angiospermas de traqueidas a elementos de vaso, no necesariamente fue una ventaja adaptativa en un inicio, ya que se comprometió la resistencia a sequía de las angiospermas y este fue a través de transiciones de la membrana de la punteadura [287]. Varios autores señalan que los primeros cambios pudieron surgir en la venación de las hojas, donde se desarrolló el tejido conductor con elementos de vasos [288,289]. Además de que estos cambios se dieron en condiciones ambientales estables que no comprometieron a las angiospermas [290], pero con el tiempo, la diversificación de los elementos de vaso, junto con la diversificación de la estructura de las plantas permitió que las angiospermas prevalecieran y abarcaran diferentes ambientes y nichos ecológicos [289,291].

La diversidad no solo fue anatómica, ya que también se presentó una diversificación en la composición química y en los complejos enzimáticos tanto de la lignina, como de otros compuestos, tal es el caso de las pectinas que ocupan aproximadamente 67 enzimas además de

glicociltransferasas ^[292]. El tipo de lignina presente en las plantas se modificó, *Lycopodium*, Monilophyta y Gimnospermas presentaron principalmente lignina de tipo guayacilo e hidroxifenilo, mientras que la lignina de tipo S/G se acumuló en angiospermas, y en el caso de las monocotiledóneas la lignina de tipo H se depositó de manera abundante en la pared celular ^[20,21].

La presencia de peroxidasas se da con el surgimiento de las plantas en la tierra y prevalece durante su evolución ya que les confiere rasgos adaptativos ^[293,294]. En el caso de las peroxidasas que oxidan a los monómeros de siringaldehído se han conservado a lo largo de la evolución de las plantas, mientras que las peroxidasas afines a guayacilo constituirían al estado más derivado de la familia de las peroxidasas ^[14]. La presencia de peroxidasas afines a siringilo surgió temprano en la evolución, pero fue hasta el surgimiento de las angiospermas, y a la propia diversificación de la composición de lignina en los elementos traqueales que permitió que estas enzimas prevalecieran, como ocurre con las proteínas altamente expresadas que evolucionan lento ^[14]. Por lo tanto, la diversificación genética y enzimática de las peroxidasas permitió que se conformara la molécula de lignina de una manera más compleja que la detectada en Gimnospermas y otros grupos basales de plantas ^[295], debido a que su composición no solo se basó en monómeros de guayacilo e hidroxifenol, sino que también se presentaron monómeros de siringilo, por lo que aparecieron nuevos enlaces, monómeros, dímeros y oligómeros lo que permitió que la molécula de la lignina, funcionara como una barrera física y química ^[296], ya que la especificidad de enzimas degradadoras de la madera de bacterias y hongos disminuyó al existir una aleatoriedad en la polimerización de la lignina ^[297]. Adicionalmente, la presencia de grandes acumulaciones de lignina de tipo S ayudó en la defensa contra bacterias y hongos ^[51,298,299], similar a lo que ocurre con los monómeros de guayacilo, cuya actividad no solo se restringe a la parte estructural de los elementos traqueales ^[300]; por lo que esta diversidad permitió que las angiospermas pudieran establecerse exitosamente en diferentes condiciones ambientales ^[289,301].

Durante la divergencia de angiospermas con respecto a las gimnospermas hubo cambios genéticos. Surgió un control maestro para la síntesis de lignina S asociado a la presencia de los genes F5H y NST, que solo se encuentran en las angiospermas ^[302] y posiblemente evolucionaron como método de defensa ante diferentes tipos de patógenos ^[303-305] y que incluso se ha preservado en angiospermas marinas, donde su acumulación se da para proteger los tejidos de patógenos a pesar del costo energético que conlleva ^[306]. En helechos y algunas especies con presencia de

monolignoles de siringilo presentan genes ortólogos de F5H, similar a lo que presenta *Selaginella moellenodorffii*, ya que el gen F5H ha tenido una evolución independiente [270].

Algunos estudios muestran que los monómeros de siringilo están presentes en una gran cantidad de grupos taxonómicos como *Isoetes*, *Selaginella*, Lycophyta, helechos acuáticos y gnetofitas [56,269,270], que como anteriormente se mencionó, la ruta metabólica del alcohol sinapílico sea resultado de una convergencia evolutiva, por lo que ha evolucionado independientemente varias veces durante la evolución de las plantas [15,307]. La biosíntesis de alcohol sinapílico puede ser una característica basal, pero pudo haberse suprimido durante la diversificación de las especies que presentan solo lignina de tipo guayacilo e hidroxifenilo [264,308]. Además, la lignificación no inició en el tejido vascular, si no que comenzó en los tejidos periféricos de las protraqueofitas [14,309–311]. Durante el devenir evolutivo se generaron mecanismos para mantener la lignificación en el xilema y evitar su proliferación en los tejidos periféricos [312–314], lo que sería un fenómeno de exaptación [315–317].

La diversificación en la composición química de las angiospermas va de la mano con los porcentajes de lignina que se acumulan en las plantas, por lo tanto, la proporción de S/G/H, varían de manera intraespecífica (posición en el tallo, tipo de célula, xilema o floema) [13,28] e interespecífica (tamaño de la planta, forma de crecimiento) [13,41]; además de que las diferencias pueden ser derivadas de los efectos ambientales en las que se desarrollan [18]. Esta hipótesis de diversificación anatómica y química de la pared celular, aún está en discusión, pero podría abrir la posibilidad para entender el por qué de la diversidad de las angiospermas.

9 CONSIDERACIONES FINALES

La lignina es un heteropolímero complejo en su estructura y evolución. Algunas conclusiones derivadas de los estudios en los que el tema central fue la evolución de la lignina son las siguientes:

Las técnicas analíticas deben acompañarse de métodos que permitan identificar la distribución y composición de la lignina en el tejido vascular, principalmente cuando el objetivo es conocer el funcionamiento del xilema de determinada especie. En enfoques industriales los métodos analíticos tienen otra dimensión.

Una visión integral de la molécula de la lignina debe incluir a los monolignoles acetilados, hidroxicinamatos, coniferaldehídos, sinapaldehídos, ácido ferúlico y alcohol 5-

hidroxiconiferaldehído, debido a que además de ser intermediarios de la ruta biosintética de la lignina son parte de la molécula. Durante la biosíntesis de la lignina participan complejos enzimáticos y genéticos, el gen F5H es el que determina la presencia del monómero de siringilo y únicamente se presenta en las angiospermas, aunque algunos genes ortólogos de F5H surgieron por convergencia evolutiva en Selaginella.

La polimerización de la lignina en la pared celular se da por la acción de dos grupos enzimáticos principales, las peroxidadas y las lacasas, cuya actividad es esencial en la formación de enlaces que unen los monómeros de la lignina, ellas pueden trabajar en conjunto o secuencialmente. El número de peroxidadas es mayor que el de lacasas y su diversificación fue mayor con el surgimiento de las angiospermas.

La pared celular del tejido vascular es reforzada con la presencia de la lignina al evitar el contacto de la celulosa con el agua, lo que permite soportar los cambios de tensión o presión hídrica. La lignina de tipo G es la que inicia a acumularse en paredes primarias al unirse a los ferulatos que funcionan como sitios de nucleación y unen la lignina con los polisacáridos estructurales. La lignina de tipo S/G se va a acumular en la pared secundaria conforme madura la célula.

El proceso de lignificación continúa después de la muerte celular de los elementos traqueales mediante la lignificación cooperativa, donde las células adyacentes como parénquima o fibras mantiene la biosíntesis de lignina la cual se va a acumular en las paredes de los elementos traqueales, para conferir resistencia a lo largo del desarrollo y maduración de la planta.

Durante la evolución del proceso de lignificación surgieron cambios importantes para las plantas, ya que permitieron la adaptación a diversidad de condiciones ambientales, principalmente terrestres. La aparición de la ruta biosintética de los monómeros de la lignina, surgió inicialmente como método de defensa contra patógenos y como protección contra rayos UV, posteriormente se acumuló en los elementos traqueales y permitió el desarrollo del xilema de las plantas. Las enzimas promiscuas catalíticamente funcionales (MPEs), permitieron el surgimiento de nuevos polímeros estructurales, lo que dio origen a la lignina, la suberina y la cutina.

La aparición de monómeros de siringilo a lo largo de la historia evolutiva de las plantas, nos muestra la convergencia evolutiva de los procesos biosintéticos; por lo que la diversificación

anatómica y química de la pared celular, fue una de las ventajas adaptativas de las angiospermas para distribuirse y adaptarse exitosamente a diferentes condiciones ambientales.

10 LITERATURA CITADA

- [1] W. J. Lucas, A. Groover, R. Lichtenberger, K. Furuta, S. R. Yadav, Y. Helariutta, X. Q. He, H. Fukuda, J. Kang, S. M. Brady, J. W. Patrick, J. Sperry, A. Yoshida, A. F. López-Millán, M. A. Grusak, P. Kachroo, ‘The Plant Vascular System: Evolution, Development and Functions’, *J. Integr. Plant Biol.* **2013**, *55*, 294–388.
- [2] H. Renault, D. Werck-Reichhart, J. K. Weng, ‘Harnessing lignin evolution for biotechnological applications’, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2019**, *56*, 105–111.
- [3] N. G. Lewis, E. Yamamoto, ‘Lignin: occurrence, biogenesis and biodegradation.’, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **1990**, *41*, 455–96.
- [4] E. A. Fich, N. A. Segerson, J. K. C. Rose, ‘The Plant Polyester Cutin: Biosynthesis, Structure, and Biological Roles’, *Annu. Rev. Plant Biol.* **2016**, *67*, 207–233.
- [5] A. V. Marques, J. Rencoret, A. Gutiérrez, J. C. Del Río, H. Pereira, ‘Ferulates and lignin structural composition in cork’, *Holzforschung* **2016**, *70*, 275–289.
- [6] P. F. Vena, J. F. Görgens, T. Rypstra, ‘Hemicelluloses Extraction from giant bamboo prior to Kraft and soda AQ pulping to produce paper pulps, value-added biopolymers and bioethanol’, *Cellul. Chem. Technol.* **2010**, *44*, 153–163.
- [7] K. A. Salmeia, M. Jovic, A. Ragaisiene, Z. Rukuiziene, R. Milasius, D. Mikuioniene, S. Gaan, ‘Flammability of cellulose-based fibers and the effect of structure of phosphorus compounds on their flame retardancy’, *Polymers (Basel)*. **2016**, *8*, DOI 10.3390/polym8080293.
- [8] I. Ekpo, R. Ogali, S. Ofodile, O. Achugasim, ‘Comparison of Biomass Content for the Evaluation of Cellulosic Ethanol Fuel Production from Predominant Perennial Grasses in South-South, Nigeria’, *Int. J. Appl. Sci. Technol.* **2016**, *6*, 38–46.
- [9] R. Kumarasamy, S. Uthandi, S. Thangappan, ‘Lignin Depolymerization Route Derived Commodities: Towards Tangible Bio-Economy’, *Madras Agric. J.* **2017**, *104*, 207.
- [10] L. O. Ekebafé, M. O. Ekebafé, F. A. O. Akpa, G. Erhuanga, B. W. Etiobhio, ‘Graft polymerization of polyacrylonitrile onto rubber (*Hevea brasiliensis*) seed shell-cellulosic and its utilization potential for heavy metal uptake from aqueous medium’, *Chem. Ind. Chem. Eng. Q.* **2011**, *17*, 133–140.
- [11] S. Cao, X. Ma, L. Lin, F. Huang, L. Huang, L. Chen, ‘Morphological and Chemical Characterization of Green Bamboo (*Dendrocalamopsis oldhami* (Munro) Keng f.) for Dissolving Pulp Production’, *BioResources*. **2014**, *9*, 4528–4539.
- [12] X. Li, C. Sun, B. Zhou, Y. He, ‘Determination of Hemicellulose, Cellulose and Lignin in Moso Bamboo by Near Infrared Spectroscopy’, *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 17210.
- [13] A. Ros Barceló, L. V. Gómez Ros, C. Gabaldón, M. López-Serrano, F. Pomar, J. S. Carrión,

- M. A. Pedreño, ‘Basic peroxidases: The gateway for lignin evolution?’, *Phytochem. Rev.* **2004**, *3*, 61–78.
- [14] L. V Gómez Ros, C. Gabaldón, F. Pomar, F. Merino, M. A. Pedreño, A. R. Barceló, ‘Structural motifs of syringyl peroxidases predate not only the gymnosperm-angiosperm divergence but also the radiation of tracheophytes.’, *New Phytol.* **2007**, *173*, 63–78.
- [15] J. M. Espiñeira, E. Novo Uzal, L. V Gómez Ros, J. S. Carrión, F. Merino, A. Ros Barceló, F. Pomar, ‘Distribution of lignin monomers and the evolution of lignification among lower plants.’, *Plant Biol. (Stuttg.)*. **2011**, *13*, 59–68.
- [16] H. Renault, A. Alber, N. A. Horst, A. Basilio Lopes, E. A. Fich, L. Kriegshauser, G. Wiedemann, P. Ullmann, L. Herrgott, M. Erhardt, E. Pineau, J. Ehlting, M. Schmitt, J. K. C. Rose, R. Reski, D. Werck-Reichhart, ‘A phenol-enriched cuticle is ancestral to lignin evolution in land plants’, *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 14713.
- [17] J. K. Weng, C. Chapple, ‘The origin and evolution of lignin biosynthesis’, *New Phytol.* **2010**, *187*, 273–285.
- [18] H. Le Gall, F. Philippe, J.-M. Domon, F. Gillet, J. Pelloux, C. Rayon, ‘Cell Wall Metabolism in Response to Abiotic Stress.’, *Plants (Basel, Switzerland)* **2015**, *4*, 112–66.
- [19] J. Ralph, ‘Hydroxycinnamates in lignification’, *Phytochem. Rev.* **2010**, *9*, 65–83.
- [20] J.-K. Weng, T. Akiyama, N. D. Bonawitz, X. Li, J. Ralph, C. Chapple, ‘Convergent evolution of syringyl lignin biosynthesis via distinct pathways in the Lycophyte, Selaginella and flowering plants.’, *Plant Cell* **2010**, *22*, 1033–45.
- [21] J. Barros, H. Serk, I. Granlund, E. Pesquet, ‘The cell biology of lignification in higher plants.’, *Ann. Bot.* **2015**, *115*, 1053–74.
- [22] A. Lourenço, J. Rencoret, C. Chemetova, J. Gominho, A. Gutiérrez, J. C. Del Río, H. Pereira, ‘Lignin Composition and Structure Differs between Xylem, Phloem and Phellem in *Quercus suber* L.’, *Front. Plant Sci.* **2016**, *7*, 1612.
- [23] F. Lu, J. Ralph, in *Cereal Straw as a Resour. Sustain. Biomater. Biofuels* (Ed.: Run-Cang), Elsevier, USA, **2010**, pp. 169–207.
- [24] R. Vanholme, B. Demedts, K. Morreel, J. Ralph, W. Boerjan, ‘Lignin biosynthesis and structure’, *Plant Physiol.* **2010**, *153*, 895–905.
- [25] M. E. Olson, ‘Linear Trends in Botanical Systematics and the Major Trends of Xylem Evolution’, *Bot. Rev.* **2012**, *78*, 154–183.
- [26] Y. Wang, M. Chantreau, R. Sibout, S. Hawkins, ‘Plant cell wall lignification and monolignol metabolism’, *Front. Plant Sci.* **2013**, *4*, 220.
- [27] J. P. Knox, ‘Revealing the structural and functional diversity of plant cell walls.’, *Curr. Opin. Plant Biol.* **2008**, *11*, 308–13.
- [28] F. Pomar, F. Merino, A. R. Barceló, ‘O-4-Linked coniferyl and sinapyl aldehydes in lignifying cell walls are the main targets of the Wiesner (phloroglucinol-HCl) reaction.’, *Protoplasma* **2002**, *220*, 17–28.

- [29] A. H. Ab Rahim, Z. Man, A. Sarwono, W. S. Wan Hamzah, N. M. Yunus, C. D. Wilfred, 'Extraction and Comparative Analysis of Lignin Extract from Alkali and Ionic Liquid Pretreatment', *J. Phys. Conf. Ser.* **2018**, *1123*, 012052.
- [30] P. Castro-Díez, P. Villar-Salvador, C. Pérez-Rontomé, M. Maestro-Martínez, G. Montserrat-Martí, 'Leaf morphology, leaf chemical composition and stem xylem characteristics in two *Pistacia* (Anacardiaceae) species along a climatic gradient', *Flora* **1998**, *193*, 195–202.
- [31] L. A. Rogers, M. M. Campbell, 'The genetic control of lignin deposition during plant growth and development', *New Phytol.* **2004**, *164*, 17–30.
- [32] R. Terzi, N. Saruhan Güler, N. Kutlu Çalışkan, A. Kadioğlu, 'Lignification response for rolled leaves of *Ctenanthe setosa* under long-term drought stress', *Turkish J. Biol.* **2013**, *37*, 614–619.
- [33] J. U. Fangel, P. Ulvskov, J. P. Knox, M. D. Mikkelsen, J. Harholt, Z. A. Popper, W. G. T. Willats, 'Cell wall evolution and diversity.', *Front. Plant Sci.* **2012**, *3*, 152.
- [34] A. Maurer, D. Fengel, 'On the Origin of Milled Wood Lignin: Part 1. The Influence of Ball-Milling on the Ultrastructure of Wood Cell Walls and the Solubility of Lignin', *Holzforschung* **1992**, *46*, 417–423.
- [35] N. Terashima, K. Fukushima, T. Imai, 'Morphological Origin of Milled Wood Lignin Studied by Radiotracer Method', *Holzforschung* **1992**, *46*, 271–276.
- [36] T. Ikeda, K. Holtman, J. F. Kadla, H. Chang, H. Jameel, 'Studies on the effect of ball milling on lignin structure using a modified DFRC method.', *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 129–35.
- [37] K. V Fagerstedt, E. M. Kukkola, V. V. T. Koistinen, J. Takahashi, K. Marjamaa, 'Cell wall lignin is polymerised by class III secretable plant peroxidases in Norway spruce.', *J. Integr. Plant Biol.* **2010**, *52*, 186–94.
- [38] J. Reyes-Rivera, G. Canché-Escamilla, M. Soto-Hernández, T. Terrazas, 'Wood chemical composition in species of Cactaceae the relationship between lignification and stem morphology', *PLoS One* **2015**, *10*, e0123919.
- [39] A. Maceda, M. Soto-Hernández, C. B. Peña-Valdivia, T. Terrazas, 'Chemical Composition of Cacti Wood and Comparison with the Wood of Other Taxonomic Groups.', *Chem. Biodivers.* **2018**, *15*, e1700574.
- [40] K. Kaiser, R. Benner, 'Characterization of lignin by gas chromatography and mass spectrometry using a simplified CuO oxidation method.', *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 459–64.
- [41] C. Lapierre, B. Pollet, C. Rolando, 'New insights into the molecular architecture of hardwood lignins by chemical degradative methods', *Res. Chem. Intermed.* **1995**, *21*, 397–412.
- [42] Y. Lee, E. O. Voit, 'Mathematical modeling of monolignol biosynthesis in *Populus* xylem.', *Math. Biosci.* **2010**, *228*, 78–89.

- [43] A. M. Anterola, N. G. Lewis, 'Trends in lignin modification: a comprehensive analysis of the effects of genetic manipulations/mutations on lignification and vascular integrity.', *Phytochemistry* **2002**, *61*, 221–94.
- [44] A. E. Harman-Ware, C. Foster, R. M. Happs, C. Doeppke, K. Meunier, J. Gehan, F. Yue, F. Lu, M. F. Davis, 'A thioacidolysis method tailored for higher-throughput quantitative analysis of lignin monomers.', *Biotechnol. J.* **2016**, *11*, 1268–1273.
- [45] J. Ralph, F. Lu, 'The DFRC Method for Lignin Analysis. 6. A Simple Modification for Identifying Natural Acetates on Lignins', *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 4616–4619.
- [46] J. C. del Río, A. Gutiérrez, A. T. Martínez, 'Identifying acetylated lignin units in non-wood fibers using Pyrolysis-Gas Chromatography/Mass spectrometry.', *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2004**, *18*, 1181–5.
- [47] J. H. Grabber, 'How Do Lignin Composition, Structure, and Cross-Linking Affect Degradability? A Review of Cell Wall Model Studies', *Crop Sci.* **2005**, *45*, 820–831.
- [48] K. M. Chen, F. Wang, Y. H. Wang, T. Chen, Y. X. Hu, J. X. Lin, 'Anatomical and chemical characteristics of foliar vascular bundles in four reed ecotypes adapted to different habitats', *Flora Morphol. Distrib. Funct. Ecol. Plants* **2006**, *201*, 555–569.
- [49] H. Ren, X. Dai, H. Zhai, Z. Liu, S. Omori, 'Comparison of Bamboo Native Lignin and Alkaline Lignin Modified by Phase-Method', *Cellulose Chem. Technol.* **2015**, *49*, 429-438.
- [50] G. Mouille, S. Robin, M. Lecomte, S. Pagant, H. Höfte, 'Classification and identification of Arabidopsis cell wall mutants using Fourier-Transform InfraRed (FT-IR) microspectroscopy.', *Plant J.* **2003**, *35*, 393–404.
- [51] J. Reyes-Rivera, M. Soto-Hernández, G. Canché-Escamilla, T. Terrazas, 'Structural characterization of lignin in four cacti wood: Implications of lignification in the growth form and succulence', *Front. Plant Sci.* **2018**, *871*, 1518.
- [52] S. Dinant, N. Wolff, F. De Marco, F. Vilaine, L. Gissot, E. Aubry, C. Sandt, C. Bellini, R. Le Hir, 'Synchrotron FTIR and Raman spectroscopy provide unique spectral fingerprints for Arabidopsis floral stem vascular tissues.', *J. Exp. Bot.* **2019**, *70*, 871–884.
- [53] B. Saake, D. S. Argyropoulos, O. Beinhoff, O. Faix, 'A comparison of lignin polymer models (DHPs) and lignins by ³¹P NMR spectroscopy', *Phytochemistry* **1996**, *43*, 499–507.
- [54] Z. Jin, S. Shao, K. S. Katsumata, K. Iiyama, 'Lignin characteristics of peculiar vascular plants', *J. Wood Sci.* **2007**, *53*, 520–523.
- [55] J. Rencoret, G. Marques, A. Gutiérrez, L. Nieto, J. I. Santos, J. Jiménez-Barbero, Á. T. Martínez, J. C. Del Río, 'HSQC-NMR analysis of lignin in woody (*Eucalyptus globulus* and *Picea abies*) and non-woody (*Agave sisalana*) ball-milled plant materials at the gel state', *Holzforschung* **2009**, *63*, 691–698.
- [56] D. S. Nawawi, W. Syafii, T. Akiyama, Y. Matsumoto, 'Characteristics of guaiacyl-syringyl lignin in reaction wood in the gymnosperm *Gnetum gnemon* L.', *Holzforschung* **2016**, *70*, 593–602.

- [57] H.-C. Chen, Q. Li, C. M. Shuford, J. Liu, D. C. Muddiman, R. R. Sederoff, V. L. Chiang, ‘Membrane protein complexes catalyze both 4- and 3-hydroxylation of cinnamic acid derivatives in monolignol biosynthesis.’, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2011**, *108*, 21253–21258.
- [58] F. Chen, Y. Tobimatsu, L. Jackson, J. Nakashima, J. Ralph, R. A. Dixon, ‘Novel seed coat lignins in the Cactaceae: structure, distribution and implications for the evolution of lignin diversity.’, *Plant J.* **2013**, *73*, 201–211.
- [59] J. Ralph, L. L. Landucci, in *Lignin Lignans; Adv. Chem.* (Eds.: C. Heitner, D.R. Dimmel, J.A. Schmidt), Taylor & Francis Group, USA, **2010**, pp. 137–234.
- [60] C. Saiz-Jimenez, J. W. De Leeuw, ‘Lignin pyrolysis products: Their structures and their significance as biomarkers’, *Org. Geochem.* **1986**, *10*, 869–876.
- [61] O. Faix, D. Meier, I. Fortmann, ‘Thermal degradation products of wood - Gas chromatographic separation and mass spectrometric characterization of monomeric lignin derived products’, *Holz als Roh- und Werkst.* **1990**, *48*, 281–285.
- [62] J. Ralph, R. D. Hatfield, ‘Pyrolysis-Gc-Ms Characterization of Forage Materials’, *J. Agric. Food Chem.* **1991**, *39*, 1426–1437.
- [63] J. Zhang, Y. S. Choi, C. G. Yoo, T. H. Kim, R. C. Brown, B. H. Shanks, ‘Cellulose-hemicellulose and cellulose-lignin interactions during fast pyrolysis’, *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2015**, *3*, 293–301.
- [64] J. C. del Río, A. Gutiérrez, I. M. Rodríguez, D. Ibarra, Á. T. Martínez, ‘Composition of non-woody plant lignins and cinnamic acids by Py-GC/MS, Py/TMAH and FT-IR’, *J. Anal. Appl. Pyrolysis* **2007**, *79*, 39–46.
- [65] A. V. Marques, H. Pereira, J. Rodrigues, D. Meier, O. Faix, ‘Isolation and comparative characterization of a Björkman lignin from the saponified cork of Douglas-fir bark’, *J. Anal. Appl. Pyrolysis* **2006**, *77*, 169–176.
- [66] T. Ohra-Aho, F. J. B. Gomes, J. L. Colodette, T. Tamminen, ‘S/G ratio and lignin structure among *Eucalyptus* hybrids determined by Py-GC/MS and nitrobenzene oxidation’, *J. Anal. Appl. Pyrolysis* **2013**, *101*, 166–171.
- [67] U. Kallavus, K. Kärner, K. Kärner, M. Elomaa, ‘Rapid semi-quantitative determination of aspen lignin in lignocellulosic products’, *Proc. Est. Acad. Sci.* **2015**, *64*, 105–112.
- [68] S. Hemmati, H. Seradj, N. Mehrabi, ‘Characterization of the lignin polymer in Brassicaceae family’, *Res. J. Pharmacogn.* **2017**, *4*, 1–13.
- [69] Y. Ma, V. K. Sawhney, T. A. Steeves, ‘Staining of paraffin-embedded plant material in safranin and fast green without prior removal of the paraffin’, *Can. J. Bot.* **1993**, *71*, 996–999.
- [70] S. Loza-Cornejo, T. Terrazas, ‘Anatomía del tallo y de la raíz de dos especies de Wilcoxia Britton & Rose (Cactaceae) del noreste de México’, *Bot. Sci.* **1996**, *59*, 13–23.
- [71] H. Kuroda, T. Higuchi, ‘O-Methyltransferase as a tool to evaluate the lignin evolution.’,

- Wood Res.* **1982**, *68*, 1–7.
- [72] A. Ros-Barceló, L. V. Gómez-Ros, M. A. Ferrer, J. A. Hernández, ‘The apoplastic antioxidant enzymatic system in the wood-forming tissues of trees’, *Trees - Struct. Funct.* **2006**, *20*, 145–156.
- [73] L. A. Donaldson, A. P. Singh, A. Yoshinaga, K. Takabe, ‘Lignin distribution in mild compression wood of *Pinus radiata*’, *Can. J. Bot.* **1999**, *77*, 41–50.
- [74] L. Donaldson, ‘Softwood and hardwood lignin fluorescence spectra of wood cell walls in different mounting media’, *IAWA J.* **2013**, *34*, 3–19.
- [75] K. Lundquist, B. Josefsson, G. Nyquist, ‘Analysis of Lignin Products by Fluorescence Spectroscopy’, *Holzforschung* **1978**, *32*, 27–32.
- [76] B. Albinsson, S. Li, K. Lundquist, R. Stomberg, ‘The origin of lignin fluorescence’, *J. Mol. Struct.* **1999**, *508*, 19–27.
- [77] L. Donaldson, A. Vaidya, ‘Visualising recalcitrance by colocalisation of cellulase, lignin and cellulose in pretreated pine biomass using fluorescence microscopy’, *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 44386.
- [78] L. Donaldson, N. Williams, ‘Imaging and Spectroscopy of Natural Fluorophores in Pine Needles.’, *Plants (Basel, Switzerland)* **2018**, *7*, 1–16.
- [79] M. C. Brundrett, D. E. Enstone, C. A. Peterson, ‘A berberine-aniline blue fluorescent staining procedure for suberin, lignin, and callose in plant tissue’, *Protoplasma* **1988**, *146*, 133–142.
- [80] L. A. Donaldson, ‘Abnormal lignin distribution in wood from severely drought stressed *Pinus radiata* trees’, *IAWA J.* **2002**, *23*, 161–178.
- [81] J. Bond, L. Donaldson, S. Hill, K. Hitchcock, ‘Safranin fluorescent staining of wood cell walls.’, *Biotech. Histochem.* **2008**, *83*, 161–71.
- [82] G. Koch, G. Kleist, ‘Application of scanning UV microspectrophotometry to localise lignins and phenolic extractives in plant cell walls’, *Holzforschung* **2001**, *55*, 563–567.
- [83] G. Koch, ‘Topochemical Characterization of Lignins and Phenolic Extractives in Wood Cell Walls’, **2004**, *83*, 6–12.
- [84] K. Saito, Y. Watanabe, M. Shirakawa, Y. Matsushita, T. Imai, T. Koike, Y. Sano, R. Funada, K. Fukazawa, K. Fukushima, ‘Direct mapping of morphological distribution of syringyl and guaiacyl lignin in the xylem of maple by time-of-flight secondary ion mass spectrometry.’, *Plant J.* **2012**, *69*, 542–52.
- [85] R. Whetten, R. Sederoff, ‘Lignin Biosynthesis.’, *Plant Cell* **1995**, *7*, 1001–1013.
- [86] R. Vanholme, K. Morreel, J. Ralph, W. Boerjan, ‘Lignin engineering’, *Curr. Opin. Plant Biol.* **2008**, *11*, 278–285.
- [87] J. Ralph, K. Lundquist, G. Brunow, F. Lu, H. Kim, P. F. Schatz, J. M. Marita, R. D. Hatfield, S. A. Ralph, J. H. Christensen, W. Boerjan, ‘Lignins: Natural polymers from oxidative

- coupling of 4-hydroxyphenyl- propanoids’, *Phytochem. Rev.* **2004**, *3*, 29–60.
- [88] T. B. Tuyet Lam, K. Iiyama, B. A. Stone, ‘Cinnamic acid bridges between cell wall polymers in wheat and phalaris internodes’, *Phytochemistry* **1992**, *31*, 1179–1183.
- [89] J. Ralph, J. H. Grabber, R. D. Hatfield, ‘Lignin-ferulate cross-links in grasses: active incorporation of ferulate polysaccharide esters into ryegrass lignins’, *Carbohydr. Res.* **1995**, *275*, 167–178.
- [90] X. Kang, A. Kirui, M. C. Dickwella Widanage, F. Mentink-Vigier, D. J. Cosgrove, T. Wang, ‘Lignin-polysaccharide interactions in plant secondary cell walls revealed by solid-state NMR’, *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 347.
- [91] S. M. Carnachan, P. J. Harris, ‘Ferulic acid is bound to the primary cell walls of all gymnosperm families’, *Biochem. Syst. Ecol.* **2000**, *28*, 865–879.
- [92] L. A. Donaldson, ‘Lignification and lignin topochemistry - An ultrastructural view’, *Phytochemistry* **2001**, *57*, 859–873.
- [93] F. Chen, Y. Tobimatsu, D. Havkin-Frenkel, R. A. Dixon, J. Ralph, ‘A polymer of caffeoyl alcohol in plant seeds’, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2012**, *109*, 1772–1777.
- [94] C.-T. Do, B. Pollet, J. Thévenin, R. Sibout, D. Denoue, Y. Barrière, C. Lapierre, L. Jouanin, ‘Both caffeoyl Coenzyme A 3-O-methyltransferase 1 and caffeic acid O-methyltransferase 1 are involved in redundant functions for lignin, flavonoids and sinapoyl malate biosynthesis in Arabidopsis.’, *Planta* **2007**, *226*, 1117–1129.
- [95] W. Boerjan, J. Ralph, M. Baucher, ‘Lignin biosynthesis’, *Annu. Rev. Plant Biol.* **2003**, *54*, 519–546.
- [96] N. Tokunaga, N. Sakakibara, T. Umezawa, Y. Ito, H. Fukuda, Y. Sato, ‘Involvement of extracellular dilignols in lignification during tracheary element differentiation of isolated *Zinnia mesophyll* cells.’, *Plant Cell Physiol.* **2005**, *46*, 224–232.
- [97] Y. Tsuji, K. Fukushima, ‘Behavior of monolignol glucosides in angiosperms.’, *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 7651–7659.
- [98] A. Chapelle, K. Morreel, R. Vanholme, P. Le-Bris, H. Morin, C. Lapierre, W. Boerjan, L. Jouanin, N. Demont-Caulet, ‘Impact of the absence of stem-specific β -glucosidases on lignin and monolignols.’, *Plant Physiol.* **2012**, *160*, 1204–1217.
- [99] T. Tsuyama, R. Kawai, N. Shitan, T. Matoh, J. Sugiyama, A. Yoshinaga, K. Takabe, M. Fujita, K. Yazaki, ‘Proton-dependent coniferin transport, a common major transport event in differentiating xylem tissue of woody plants.’, *Plant Physiol.* **2013**, *162*, 918–26.
- [100] K. Marjamaa, M. Lehtonen, T. Lundell, M. Toikka, P. Saranpää, K. V Fagerstedt, ‘Developmental lignification and seasonal variation in beta-glucosidase and peroxidase activities in xylem of Scots pine, Norway spruce and silver birch.’, *Tree Physiol.* **2003**, *23*, 977–86.
- [101] T. Higuchi, ‘Lignin biochemistry: Biosynthesis and biodegradation’, *Wood Sci. Technol.* **1990**, *24*, 23–63.

- [102] H. A. Maeda, ‘Lignin biosynthesis: Tyrosine shortcut in grasses’, *Nat. Plants* **2016**, *2*, 1–2.
- [103] M. Xie, J. Zhang, T. J. Tschaplinski, G. A. Tuskan, J. G. Chen, W. Muchero, ‘Regulation of lignin biosynthesis and its role in growth-defense tradeoffs’, *Front. Plant Sci.* **2018**, *9*, 1427.
- [104] R. A. Dixon, F. Chen, D. Guo, K. Parvathi, ‘The biosynthesis of monolignols: a “metabolic grid”, or independent pathways to guaiacyl and syringyl units?’, *Phytochemistry* **2001**, *57*, 1069–1084.
- [105] P. Rippert, J. Puyaubert, D. Grisolle, L. Derrier, M. Matringe, ‘Tyrosine and phenylalanine are synthesized within the plastids in *Arabidopsis*.’, *Plant Physiol.* **2009**, *149*, 1251–1260.
- [106] M. M. Campbell, R. R. Sederoff, ‘Variation in lignin content and composition: Mechanisms of control and implications for the genetic improvement of plants’, *Plant Physiol.* **1996**, *110*, 3–13.
- [107] N. D. Bonawitz, C. Chapple, ‘The genetics of lignin biosynthesis: connecting genotype to phenotype.’, *Annu. Rev. Genet.* **2010**, *44*, 337–363.
- [108] B. Vanholme, P. Kast, A. Haegeman, J. Jacob, W. Grunewald, G. Gheysen, ‘Structural and functional investigation of a secreted chorismate mutase from the plant-parasitic nematode *Heterodera schachtii* in the context of related enzymes from diverse origins.’, *Mol. Plant Pathol.* **2009**, *10*, 189–200.
- [109] L. A. Rogers, C. Dubos, I. F. Cullis, C. Surman, M. Poole, J. Willment, S. D. Mansfield, M. M. Campbell, ‘Light, the circadian clock, and sugar perception in the control of lignin biosynthesis’, *J. Exp. Bot.* **2005**, *56*, 1651–1663.
- [110] J. C. M. S. Moura, C. A. V. Bonine, J. de Oliveira Fernandes Viana, M. C. Dornelas, P. Mazzafera, ‘Abiotic and biotic stresses and changes in the lignin content and composition in plants’, *J. Integr. Plant Biol.* **2010**, *52*, 360–376.
- [111] Y. Watanabe, Y. Kojima, T. Ona, T. Asada, Y. Sano, K. Fukazawa, ‘Histochemical study on heterogeneity of lignin in Eucalyptus species II. The distribution of lignins and polyphenols in the walls of various cell types’, *IAWA J.* **2004**, *25*, 283–295.
- [112] L. Li, Xiao Fei Cheng, J. Leshkevich, T. Umezawa, S. A. Harding, V. L. Chiang, ‘The last step of syringyl monolignol biosynthesis in angiosperms is regulated by a novel gene encoding sinapyl alcohol dehydrogenase’, *Plant Cell* **2001**, *13*, 1567–1585.
- [113] Y. Osakabe, K. Nanto, H. Kitamura, K. Osakabe, S. Kawai, N. Morohoshi, Y. Katayama, ‘Immunological detection and cellular localization of the phenylalanine ammonia-lyase of a hybrid aspen’, *Plant Biotechnol.* **2006**, *23*, 399–404.
- [114] L. Achnine, E. B. Blancaflor, S. Rasmussen, R. A. Dixon, ‘Colocalization of L-phenylalanine ammonia-lyase and cinnamate 4-hydroxylase for metabolic channeling in phenylpropanoid biosynthesis’, *Plant Cell* **2004**, *16*, 3098–3109.
- [115] J. E. Bassard, L. Richert, J. Geerinck, H. Renault, F. Duval, P. Ullmann, M. Schmitt, E. Meyer, J. Mutterer, W. Boerjan, G. de Jaeger, Y. Mely, A. Goossens, D. Werck-Reichhart, ‘Protein-protein and protein-membrane associations in the lignin pathway w oa’, *Plant Cell*

- 2012**, *24*, 4465–4482.
- [116] L. Sundin, R. Vanholme, J. Geerinck, G. Goeminne, R. Höfer, H. Kim, J. Ralph, W. Boerjan, ‘Mutation of the inducible *Arabidopsis thaliana* CYTOCHROME P450 REDUCTASE2 alters lignin composition and improves saccharification.’, *Plant Physiol.* **2014**, *166*, 1956–1971.
- [117] E. Boija, A. Lundquist, K. Edwards, G. Johansson, ‘Evaluation of bilayer disks as plant cell membrane models in partition studies.’, *Anal. Biochem.* **2007**, *364*, 145–152.
- [118] Y.-C. Miao, C.-J. Liu, ‘ATP-binding cassette-like transporters are involved in the transport of lignin precursors across plasma and vacuolar membranes.’, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107*, 22728–22733.
- [119] J. D. Pickett-Heaps, ‘Xylem wall deposition - Radioautographic investigations using lignin precursors’, *Protoplasma* **1968**, *65*, 181–205.
- [120] Y. Ito, N. Tokunaga, Y. Sato, H. Fukuda, ‘Transfer of phenylpropanoids via the medium between xylem cells in *Zinnia* xylogenic culture’, *Plant Biotechnol.* **2004**, *21*, 205–213.
- [121] M. Kaneda, K. H. Rensing, J. C. T. Wong, B. Banno, S. D. Mansfield, A. L. Samuels, ‘Tracking monolignols during wood development in lodgepole pine’, *Plant Physiol.* **2008**, *147*, 1750–1760.
- [122] S. Alejandro, Y. Lee, T. Tohge, D. Sudre, S. Osorio, J. Park, L. Bovet, Y. Lee, N. Geldner, A. R. Fernie, E. Martinoia, ‘AtABCG29 is a monolignol transporter involved in lignin biosynthesis’, *Curr. Biol.* **2012**, *22*, 1207–1212.
- [123] R. Vanholme, V. Storme, B. Vanholme, L. Sundin, J. H. Christensen, G. Goeminne, C. Halpin, A. Rohde, K. Morreel, W. Boerjana, ‘A systems biology view of responses to lignin biosynthesis perturbations in *Arabidopsis*’, *Plant Cell* **2012**, *24*, 3506–3529.
- [124] R. Sibout, H. Höfte, ‘Plant cell biology: The ABC of monolignol transport’, *Curr. Biol.* **2012**, *22*, R533–R535.
- [125] R. A. Festucci-Buselli, W. C. Otoni, C. P. Joshi, ‘Structure, organization, and functions of cellulose synthase complexes in higher plants’, *Brazilian J. Plant Physiol.* **2007**, *19*, 1–13.
- [126] S. Turner, M. Kumar, ‘Cellulose synthase complex organization and cellulose microfibril structure.’, *Philos. Trans. A. Math. Phys. Eng. Sci.* **2018**, *376*, 1–11.
- [127] I. Sørensen, D. Domozych, W. G. T. Willats, ‘How have plant cell walls evolved?’, *Plant Physiol.* **2010**, *153*, 366–372.
- [128] S. Park, A. L. Szumlanski, F. Gu, F. Guo, E. Nielsen, ‘A role for CSLD3 during cell-wall synthesis in apical plasma membranes of tip-growing root-hair cells.’, *Nat. Cell Biol.* **2011**, *13*, 973–80.
- [129] L. Taiz, E. Zeiger, in *Plant Physiol.* (Eds.: L. Taiz, E. Zeiger), Sinauer Associates, Sunderland, **2002**, pp. 313–338.
- [130] M. Li, Z. Zhao, Z. Zhang, W. Zhang, J. Zhou, F. Xu, X. Liu, ‘Effect of boron deficiency on anatomical structure and chemical composition of petioles and photosynthesis of leaves in

- cotton (*Gossypium hirsutum* L.)', *Sci. Rep.* **2017**, 7, 4420.
- [131] Z. Liu, S. Persson, C. Sánchez-Rodríguez, 'At the border: the plasma membrane-cell wall continuum.', *J. Exp. Bot.* **2015**, 66, 1553–63.
- [132] M. Pauly, S. Gille, L. Liu, N. Mansoori, A. de Souza, A. Schultink, G. Xiong, 'Hemicellulose biosynthesis.', *Planta* **2013**, 238, 627–642.
- [133] A. Salazar, A. Gamboa, 'Importancia de las pectinas en la dinámica de la pared celular durante el desarrollo vegetal', *Rev. Educ. Bioquímica* **2013**, 61, 263–289.
- [134] C. Rautengarten, D. Birdseye, S. Pattathil, H. E. McFarlane, S. Saez-Aguayo, A. Orellana, S. Persson, M. G. Hahn, H. V Scheller, J. L. Heazlewood, B. Ebert, 'The elaborate route for UDP-arabinose delivery into the Golgi of plants.', *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2017**, 114, 4261–4266.
- [135] M. Pakdel, J. von Blume, 'Exploring new routes for secretory protein export from the trans-Golgi network.', *Mol. Biol. Cell* **2018**, 29, 235–240.
- [136] S. C. Fry, B. H. W. A. Nesselrode, J. G. Miller, B. R. Mewburn, 'Mixed-linkage (1→3,1→4)-β-D-glucan is a major hemicellulose of *Equisetum* (horsetail) cell walls', *New Phytol.* **2008**, 179, 104–115.
- [137] R. A. Burton, M. J. Gidley, G. B. Fincher, 'Heterogeneity in the chemistry, structure and function of plant cell walls', *Nat. Chem. Biol.* **2010**, 6, 724–732.
- [138] A. W. Roberts, J. Lahnstein, Y. S. Y. Hsieh, X. Xing, K. Yap, A. M. Chaves, T. R. Scavuzzo-Duggan, G. Dimitroff, A. Lonsdale, E. Roberts, V. Bulone, G. B. Fincher, M. S. Doblin, A. Bacic, R. A. Burton, 'Functional characterization of a glycosyltransferase from the moss *Physcomitrella patens* involved in the biosynthesis of a novel cell wall arabinoglucan', *Plant Cell* **2018**, 30, 1293–1308.
- [139] N. Terashima, K. Fukushima, 'Heterogeneity in formation of lignin-XI: An autoradiographic study of the heterogeneous formation and structure of pine lignin', *Wood Sci. Technol.* **1988**, 22, 259–270.
- [140] R. Sterjiades, J. F. D. Dean, G. Gamble, D. S. Himmelsbach, K. E. L. Eriksson, 'Extracellular laccases and peroxidases from sycamore maple (*Acer pseudoplatanus*) cell-suspension cultures - Reactions with monolignols and lignin model compounds', *Planta* **1993**, 190, 75–87.
- [141] J. F. D. Dean, K. E. L. Eriksson, 'Laccase and the deposition of lignin in vascular plants', *Holzforschung* **1994**, 48, 21–33.
- [142] M. L. Mattinen, T. Suortti, R. Gosselink, D. S. Argyropoulos, D. Evtuguin, A. Suurnäkki, E. De Jong, T. Tamminen, 'Polymerization of different lignins by laccase', *BioResources* **2008**, 3, 549–565.
- [143] T. Warinowski, S. Koutaniemi, A. Kärkönen, I. Sundberg, M. Toikka, L. K. Simola, I. Kilpeläinen, T. H. Teeri, 'Peroxidases bound to the growing lignin polymer produce natural like extracellular lignin in a cell culture of Norway spruce', *Front. Plant Sci.* **2016**, 7, 1523.

- [144] Y. Tobimatsu, M. Schuetz, ‘Lignin polymerization: how do plants manage the chemistry so well?’, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2019**, *56*, 75–81.
- [145] U. Takahama, T. Oniki, H. Shimokawa, ‘A possible mechanism for the oxidation of sinapyl alcohol by peroxidase-dependent reactions in the apoplast: Enhancement of the oxidation by hydroxycinnamic acids and components of the apoplast’, *Plant Cell Physiol.* **1996**, *37*, 499–504.
- [146] M. Liang, E. Davis, D. Gardner, X. Cai, Y. Wu, ‘Involvement of AtLAC15 in lignin synthesis in seeds and in root elongation of *Arabidopsis*.’, *Planta* **2006**, *224*, 1185–1196.
- [147] T. D. H. Bugg, M. Ahmad, E. M. Hardiman, R. Rahmanpour, ‘Pathways for degradation of lignin in bacteria and fungi’, *Nat. Prod. Rep.* **2011**, *28*, 1883–1896.
- [148] I. Ayuso-Fernández, A. L. De Lacey, F. J. Cañada, F. J. Ruiz-Dueñas, A. T. Martínez, ‘Increase of Redox Potential during the Evolution of Enzymes Degrading Recalcitrant Lignin’, *Chem. - A Eur. J.* **2019**, *25*, 2708–2712.
- [149] M. R. Coy, T. Z. Salem, J. S. Denton, E. S. Kovaleva, Z. Liu, D. S. Barber, J. H. Campbell, D. C. Davis, G. W. Buchman, D. G. Boucias, M. E. Scharf, ‘Phenol-oxidizing laccases from the termite gut.’, *Insect Biochem. Mol. Biol.* **2010**, *40*, 723–732.
- [150] C. Crestini, M. Crucianelli, M. Orlandi, R. Saladino, ‘Oxidative strategies in lignin chemistry: A new environmental friendly approach for the functionalisation of lignin and lignocellulosic fibers’, *Catal. Today* **2010**, *156*, 8–22.
- [151] U. N. Dwivedi, P. Singh, V. P. Pandey, A. Kumar, ‘Structure-function relationship among bacterial, fungal and plant laccases’, *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2011**, *68*, 117–128.
- [152] C. M. Rivera-Hoyos, E. D. Morales-Álvarez, R. A. Poutou-Piñales, A. M. Pedroza-Rodríguez, R. Rodríguez-Vázquez, J. M. Delgado-Boada, ‘Fungal laccases’, *Fungal Biol. Rev.* **2013**, *27*, 67–82.
- [153] B. Gavnholt, K. Larsen, ‘Molecular biology of plant laccases in relation to lignin formation’, *Physiol. Plant.* **2002**, *116*, 273–280.
- [154] A. Kärkönen, S. Koutaniemi, M. Mustonen, K. Syrjänen, G. Brunow, I. Kilpeläinen, T. H. Teeri, L. K. Simola, ‘Lignification related enzymes in *Picea abies* suspension cultures’, *Physiol. Plant.* **2002**, *114*, 343–353.
- [155] S. Berthet, N. Demont-Caulet, B. Pollet, P. Bidzinski, L. Cézard, P. le Bris, J. Herve, E. Blondet, S. Balzergue, C. Lapierre, L. Jouanin, ‘Disruption of LACCASE4 and 17 results in tissue-specific alterations to lignification of *Arabidopsis thaliana* stems’, *Plant Cell* **2011**, *23*, 1124–1137.
- [156] S. Koutaniemi, H. A. Malmberg, L. K. Simola, T. H. Teeri, A. Kärkönen, ‘Norway spruce (*Picea abies*) laccases: characterization of a laccase in a lignin-forming tissue culture.’, *J. Integr. Plant Biol.* **2015**, *57*, 341–348.
- [157] A. Driouich, A. - C Lainé, B. Vian, L. Faye, ‘Characterization and localization of laccase forms in stem and cell cultures of sycamore’, *Plant J.* **1992**, *2*, 13–24.

- [158] Q. Zhao, J. Nakashima, F. Chen, Y. Yin, C. Fu, J. Yun, H. Shao, X. Wang, Z. Y. Wang, R. A. Dixon, 'LACCASE is necessary and nonredundant with PEROXIDASE for lignin polymerization during vascular development in *Arabidopsis*', *Plant Cell* **2013**, *25*, 3976–3987.
- [159] L. Valério, M. De Meyer, C. Penel, C. Dunand, 'Expression analysis of the *Arabidopsis* peroxidase multigenic family.', *Phytochemistry* **2004**, *65*, 1331–1342.
- [160] Y. Sato, T. Demura, K. Yamawaki, Y. Inoue, S. Sato, M. Sugiyama, H. Fukuda, 'Isolation and characterization of a novel peroxidase gene ZPO-C whose expression and function are closely associated with lignification during tracheary element differentiation.', *Plant Cell Physiol.* **2006**, *47*, 493–503.
- [161] N. Demont-Caulet, C. Lapierre, L. Jouanin, S. Baumberger, V. Méchin, 'Arabidopsis peroxidase-catalyzed copolymerization of coniferyl and sinapyl alcohols: kinetics of an endwise process.', *Phytochemistry* **2010**, *71*, 1673–1683.
- [162] A. R. Barceló, F. Pomar, 'Oxidation of cinnamyl alcohols and aldehydes by a basic peroxidase from lignifying *Zinnia elegans* hypocotyls', *Phytochemistry* **2001**, *57*, 1105–1113.
- [163] W. Aoyama, S. Sasaki, S. Matsumura, T. Mitsunaga, H. Hirai, Y. Tsutsumi, T. Nishida, 'Sinapyl alcohol-specific peroxidase isoenzyme catalyzes the formation of the dehydrogenative polymer from sinapyl alcohol', *J. Wood Sci.* **2002**, *48*, 497–504.
- [164] W. R. Russell, A. R. Forrester, A. Chesson, M. J. Burkitt, 'Oxidative coupling during lignin polymerization is determined by unpaired electron delocalization within parent phenylpropanoid radicals.', *Arch. Biochem. Biophys.* **1996**, *332*, 357–366.
- [165] L. Ostergaard, K. Teillum, O. Mirza, O. Mattsson, M. Petersen, K. G. Welinder, J. Mundy, M. Gajhede, A. Henriksen, 'Arabidopsis ATP A2 peroxidase. Expression and high-resolution structure of a plant peroxidase with implications for lignification.', *Plant Mol. Biol.* **2000**, *44*, 231–243.
- [166] M. Quiroga, C. Guerrero, M. A. Botella, A. Barceló, I. Amaya, M. I. Medina, F. J. Alonso, S. M. De Forchetti, H. Tigier, V. Valpuesta, 'A tomato peroxidase involved in the synthesis of lignin and suberin', *Plant Physiol.* **2000**, *122*, 1119–1127.
- [167] J. Holst Christensen, S. Overney, A. Rohde, W. Ardiles Diaz, G. Bauw, P. Simon, M. Van Montagu, W. Boerjan, 'The syringaldazine-oxidizing peroxidase PXP 3-4 from poplar xylem: cDNA isolation, characterization and expression', *Plant Mol. Biol.* **2001**, *47*, 581–593.
- [168] A. Ros Barceló, 'Lignification in plant cell walls', *Int. Rev. Cytol.* **1997**, *176*, 87–132.
- [169] D. Fournand, B. Cathala, C. Lapierre, 'Initial steps of the peroxidase-catalyzed polymerization of coniferyl alcohol and/or sinapyl aldehyde: Capillary zone electrophoresis study of pH effect', *Phytochemistry* **2003**, *62*, 139–146.
- [170] J. Herrero, F. Fernández-Pérez, T. Yebra, E. Novo-Uzal, F. Pomar, M. Á. Pedreño, J. Cuello, A. Guéra, A. Esteban-Carrasco, J. M. Zapata, 'Bioinformatic and functional characterization of the basic peroxidase 72 from *Arabidopsis thaliana* involved in lignin

- biosynthesis.’, *Planta* **2013**, 237, 1599–1612.
- [171] Y. Lee, M. C. Rubio, J. Alassimone, N. Geldner, ‘A mechanism for localized lignin deposition in the endodermis.’, *Cell* **2013**, 153, 402–412.
- [172] J. Shigeto, Y. Itoh, S. Hirao, K. Ohira, K. Fujita, Y. Tsutsumi, ‘Simultaneously disrupting AtPrx2, AtPrx25 and AtPrx71 alters lignin content and structure in *Arabidopsis* stem.’, *J. Integr. Plant Biol.* **2015**, 57, 349–356.
- [173] R. Hilgers, J.-P. Vincken, H. Gruppen, M. A. Kabel, ‘Laccase/Mediator Systems: Their Reactivity toward Phenolic Lignin Structures.’, *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2018**, 6, 2037–2046.
- [174] T. Kawasaki, K. Henmi, E. Ono, S. Hatakeyama, M. Iwano, H. Satoh, K. Shimamoto, ‘The small GTP-binding protein Rac is a regulator of cell death in plants’, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**, 96, 10922–10926.
- [175] M. Sagi, R. Fluhr, ‘Production of reactive oxygen species by plant NADPH oxidases’, *Plant Physiol.* **2006**, 141, 336–340.
- [176] E. Pesquet, B. Zhang, A. Gorzsás, T. Puhakainen, H. Serk, S. Escamez, O. Barbier, L. Gerber, C. Courtois-Moreau, E. Alatalo, L. Paulin, J. Kangasjärvi, B. Sundberg, D. Goffner, H. Tuominen, ‘Non-cell-autonomous postmortem lignification of tracheary elements in *Zinnia elegans*’, *Plant Cell* **2013**, 25, 1314–1328.
- [177] Y. Zhu, B. Du, J. Qian, B. Zou, J. Hua, ‘Disease resistance gene-induced growth inhibition is enhanced by rcd1 independent of defense activation in *Arabidopsis*.’, *Plant Physiol.* **2013**, 161, 2005–2013.
- [178] S. I. Liochev, I. Fridovich, ‘The role of O₂.- in the production of HO.: in vitro and in vivo’, *Free Radic. Biol. Med.* **1994**, 16, 29–33.
- [179] B. Karpinska, M. Karlsson, H. Schinkel, S. Streller, K. H. Süß, M. Melzer, G. Wingsle, ‘A novel superoxide dismutase with a high isoelectric point in higher plants. expression, regulation, and protein localization.’, *Plant Physiol.* **2001**, 126, 1668–1677.
- [180] S. S. Gill, N. Tuteja, ‘Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants.’, *Plant Physiol. Biochem.* **2010**, 48, 909–930.
- [181] P. Ranocha, G. McDougall, S. Hawkins, R. Sterjiades, G. Borderies, D. Stewart, M. Cabanes-Macheteau, A. M. Boudet, D. Goffner, ‘Biochemical characterization, molecular cloning and expression of laccases - A divergent gene family - In poplar’, *Eur. J. Biochem.* **1999**, 259, 485–495.
- [182] A. Ros Barceló, ‘Xylem parenchyma cells deliver the H₂O₂ necessary for lignification in differentiating xylem vessels’, *Planta* **2005**, 220, 747–756.
- [183] U. Temp, C. Eggert, ‘Novel Interaction between Laccase and Cellobiose Dehydrogenase during Pigment Synthesis in the White Rot Fungus *Pycnoporus cinnabarinus*’, *Appl. Environ. Microbiol.* **1999**, 65, 389.
- [184] R. S. Makkar, A. Tsuneda, K. Tokuyasu, Y. Mori, ‘*Lentinula edodes* produces a

- multicomponent protein complex containing manganese (II)-dependent peroxidase, laccase and beta-glucosidase.’, *FEMS Microbiol. Lett.* **2001**, *200*, 175–179.
- [185] E. Novaes, M. Kirst, V. Chiang, H. Winter-Sederoff, R. Sederoff, ‘Lignin and biomass: A negative correlation for wood formation and lignin content in trees’, *Plant Physiol.* **2010**, *154*, 555–561.
- [186] C. Grünwald, K. Ruel, U. Schmitt, ‘Differentiation of xylem cells in rolC transgenic aspen trees - A study of secondary cell wall development’, *Ann. For. Sci.* **2002**, *59*, 679–685.
- [187] J. S. Amthor, ‘Efficiency of lignin biosynthesis: a quantitative analysis.’, *Ann. Bot.* **2003**, *91*, 673–695.
- [188] A. Patzlaff, S. McInnis, A. Courtenay, C. Surman, L. J. Newman, C. Smith, M. W. Bevan, S. Mansfield, R. W. Whetten, R. R. Sederoff, M. M. Campbell, ‘Characterisation of a pine MYB that regulates lignification’, *Plant J.* **2003**, *36*, 743–754.
- [189] E. Bari, R. Oladi, O. Schmidt, C. A. Clausen, K. Ohno, D. D. Nicholas, M. G. Daryaei, M. Karim, ‘Influence of xylem ray integrity and degree of polymerization on bending strength of beech wood decayed by *Pleurotus ostreatus* and *Trametes versicolor*’, *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **2015**, *104*, 299–306.
- [190] D. G. Hepworth, J. F. V. Vincent, ‘Modelling the mechanical properties of xylem tissue from tobacco plants (*Nicotiana tabacum* ‘Samsun’) by considering the importance of molecular and micromechanisms’, *Ann. Bot.* **1998**, *81*, 761–770.
- [191] L. J. Gibson, ‘The hierarchical structure and mechanics of plant materials.’, *J. R. Soc. Interface* **2012**, *9*, 2749–2766.
- [192] M. Tutt, J. Olt, ‘Suitability of various plant species for bioethanol production’, *Agron. Res. Biosyst. Eng. Spec. Issue* **2011**, *1*, 261–267.
- [193] K. J. Niklas, E. D. Cobb, A. J. Matas, ‘The evolution of hydrophobic cell wall biopolymers: from algae to angiosperms.’, *J. Exp. Bot.* **2017**, *68*, 5261–5269.
- [194] K. H. Caffall, D. Mohnen, ‘The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides’, *Carbohydr. Res.* **2009**, *344*, 1879–1900.
- [195] J. Harholt, I. Sørensen, J. Fangel, A. Roberts, W. G. T. Willats, H. V. Scheller, B. L. Petersen, J. A. Banks, P. Ulvskov, ‘The glycosyltransferase repertoire of the spikemoss *Selaginella moellendorffii* and a comparative study of its cell wall’, *PLoS One* **2012**, *7*, e35846.
- [196] D. J. Cosgrove, M. C. Jarvis, ‘Comparative structure and biomechanics of plant primary and secondary cell walls.’, *Front. Plant Sci.* **2012**, *3*, 204.
- [197] J. P. Thornber, D. H. Northcote, ‘Changes in the chemical composition of a cambial cell during its differentiation into xylem and phloem tissue in trees. I. Main components.’, *Biochem. J.* **1961**, *81*, 449–455.
- [198] L. Jones, A. R. Ennos, S. R. Turner, ‘Cloning and characterization of irregular xylem4 (irx4): A severely lignin-deficient mutant of *Arabidopsis*’, *Plant J.* **2001**, *26*, 205–216.

- [199] C. K. Boyce, M. A. Zwieniecki, G. D. Cody, C. Jacobsen, S. Wirick, A. H. Knoll, N. M. Holbrook, 'Evolution of xylem lignification and hydrogel transport regulation', *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 17555–17558.
- [200] J. Thévenin, B. Pollet, B. Letarnec, L. Saulnier, L. Gissot, A. Maia-Grondard, C. Lapiere, L. Jouanin, 'The simultaneous repression of CCR and CAD, two enzymes of the lignin biosynthetic pathway, results in sterility and dwarfism in *Arabidopsis thaliana*', *Mol. Plant* **2011**, *4*, 70–82.
- [201] H. Fukuda, 'Tracheary Element Differentiation.', *Plant Cell* **1997**, *9*, 1147–1156.
- [202] S. Turner, P. Gallois, D. Brown, 'Tracheary Element Differentiation', *Annu. Rev. Plant Biol.* **2007**, *58*, 407–433.
- [203] X. Li, C. Chapple, 'Understanding lignification: challenges beyond monolignol biosynthesis.', *Plant Physiol.* **2010**, *154*, 449–52.
- [204] T. Demura, 'Tracheary element differentiation', *Plant Biotechnol. Rep.* **2014**, *8*, 17–21.
- [205] S. Lev-Yadun, 'Fibres and fibre-sclereids in wild-type *Arabidopsis thaliana*', *Ann. Bot.* **1997**, *80*, 125–129.
- [206] S. J. Liljegren, G. S. Ditta, Y. Eshed, B. Savidge, J. L. Bowman, M. F. Yanofsky, 'SHATTERPROOF MADS-box genes control seed dispersal in *Arabidopsis*.', *Nature* **2000**, *404*, 766–770.
- [207] F. B. Lopez, G. F. Barclay, in *Pharmacogn. Fundam. Appl. Strateg.*, Elsevier Inc., **2016**, pp. 45–60.
- [208] S. Naseer, Y. Lee, C. Lapiere, R. Franke, C. Nawrath, N. Geldner, 'Casparian strip diffusion barrier in *Arabidopsis* is made of a lignin polymer without suberin.', *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2012**, *109*, 10101–10106.
- [209] I. Cesarino, P. Araújo, A. Pereira, D. Júnior, P. Mazzafera, 'An overview of lignin metabolism and its effect on biomass recalcitrance', *Brazilian J. Bot.* **2012**, *35*, 303–311.
- [210] K. Iiyama, Lam Thi Bach Tuyet, B. A. Stone, 'Covalent cross-links in the cell wall', *Plant Physiol.* **1994**, *104*, 315–320.
- [211] V. De Micco, G. Aronne, 'Anatomical features, monomer lignin composition and accumulation of phenolics in 1-year-old branches of the Mediterranean *Cistus ladanifer* L.', *Bot. J. Linn. Soc.* **2007**, *155*, 361–371.
- [212] J. H. Grabber, J. Ralph, R. D. Hatfield, 'Model studies of ferulate-coniferyl alcohol cross-product formation in primary maize walls: implications for lignification in grasses.', *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 6008–6016.
- [213] L. He, N. Terashima, 'Formation and structure of lignin in monocotyledons. III. Heterogeneity of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) Lignin with respect to the composition of structural units in different morphological regions', *J. Wood Chem. Technol.* **1990**, *10*, 435–459.
- [214] J. G. Taylor, T. P. Owen, L. T. Koonce, C. H. Haigler, 'Dispersed lignin in tracheary

- elements treated with cellulose synthesis inhibitors provides evidence that molecules of the secondary cell wall mediate wall patterning', *Plant J.* **1992**, *2*, 959–970.
- [215] M. Schuetz, A. Benske, R. A. Smith, Y. Watanabe, Y. Tobimatsu, J. Ralph, T. Demura, B. Ellis, A. L. Samuels, 'Laccases direct lignification in the discrete secondary cell wall domains of protoxylem.', *Plant Physiol.* **2014**, *166*, 798–807.
- [216] H. Serk, A. Gorzsás, H. Tuominen, E. Pesquet, 'Cooperative lignification of xylem tracheary elements', *Plant Signal. Behav.* **2015**, *10*, 1–5.
- [217] N. Gierlinger, 'Revealing changes in molecular composition of plant cell walls on the micron-level by Raman mapping and vertex component analysis (VCA)', *Front. Plant Sci.* **2014**, *5*, 306.
- [218] S. Herbette, B. Bouchet, N. Brunel, E. Bonnin, H. Cochard, F. Guillon, 'Immunolabelling of intervessel pits for polysaccharides and lignin helps in understanding their hydraulic properties in *Populus tremula* × *alba*', *Ann. Bot.* **2015**, *115*, 187–199.
- [219] N. Yoshizawa, H. Ohba, J. Uchiyama, S. Yokota, 'Deposition of lignin in differentiating xylem cell walls of normal and compression wood of *Buxus microphylla* var. *insularis* Nakai', *Holzforschung* **1999**, *53*, 156–160.
- [220] M. Chabannes, K. Ruel, A. Yoshinaga, B. Chabbert, A. Jauneau, J. P. Joseleau, A. M. Boudet, 'In situ analysis of lignins in transgenic tobacco reveals a differential impact of individual transformations on the spatial patterns of lignin deposition at the cellular and subcellular levels', *Plant J.* **2001**, *28*, 271–282.
- [221] K. Ruel, M. D. Montiel, T. Goujon, L. Jouanin, V. Burlat, J. P. Joseleau, 'Interrelation between lignin deposition and polysaccharide matrices during the assembly of plant cell walls', *Plant Biol.* **2002**, *4*, 2–8.
- [222] B. Bollhöner, J. Prestele, H. Tuominen, 'Xylem cell death: Emerging understanding of regulation and function', *J. Exp. Bot.* **2012**, *63*, 1081–1094.
- [223] N. Chaffey, P. Barlow, B. Sundberg, 'Understanding the role of the cytoskeleton in wood formation in angiosperm trees: hybrid aspen (*Populus tremula* × *P. tremuloides*) as the model species.', *Tree Physiol.* **2002**, *22*, 239–249.
- [224] J. Pittermann, J. S. Sperry, J. K. Wheeler, U. G. Hacke, E. H. Sikkema, 'Mechanical reinforcement of tracheids compromises the hydraulic efficiency of conifer xylem', *Plant, Cell Environ.* **2006**, *29*, 1618–1628.
- [225] Y. Sano, H. Morris, H. Shimada, L. P. Ronse De Craene, S. Jansen, 'Anatomical features associated with water transport in imperforate tracheary elements of vessel-bearing angiosperms', *Ann. Bot.* **2011**, *107*, 953–964.
- [226] K. Roberts, M. C. McCann, 'Xylogenesis: The birth of a corpse', *Curr. Opin. Plant Biol.* **2000**, *3*, 517–522.
- [227] C. Kozela, S. Regan, 'How plants make tubes', *Trends Plant Sci.* **2003**, *8*, 159–164.
- [228] D. Ménard, E. Pesquet, 'Cellular interactions during tracheary elements formation and

- function', *Curr. Opin. Plant Biol.* **2015**, *23*, 109–115.
- [229] E. Pesquet, C. Lloyd, in *Plant Cytoskeleton*, Springer New York, 2011, pp. 277–306.
- [230] J. Pittermann, 'The evolution of water transport in plants: an integrated approach.', *Geobiology* **2010**, *8*, 112–139.
- [231] R. A. Smith, M. Schuetz, M. Roach, S. D. Mansfield, B. Ellis, L. Samuels, 'Neighboring parenchyma cells contribute to Arabidopsis xylem lignification, while lignification of interfascicular fibers is cell autonomous', *Plant Cell* **2013**, *25*, 3988–3999.
- [232] M. Hosokawa, S. Suzuki, T. Umezawa, Y. Sato, 'Progress of lignification mediated by intercellular transportation of monolignols during tracheary element differentiation of isolated *Zinnia* mesophyll cells', *Plant Cell Physiol.* **2001**, *42*, 959–968.
- [233] A. Gorzsás, H. Stenlund, P. Persson, J. Trygg, B. Sundberg, 'Cell-specific chemotyping and multivariate imaging by combined FT-IR microspectroscopy and orthogonal projections to latent structures (OPLS) analysis reveals the chemical landscape of secondary xylem.', *Plant J.* **2011**, *66*, 903–914.
- [234] F. Yang, P. Mitra, L. Zhang, L. Prak, Y. Verhertbruggen, J.-S. Kim, L. Sun, K. Zheng, K. Tang, M. Auer, H. V Scheller, D. Loqué, 'Engineering secondary cell wall deposition in plants.', *Plant Biotechnol. J.* **2013**, *11*, 325–335.
- [235] R. A. Smith, M. Schuetz, S. D. Karlen, D. Bird, N. Tokunaga, Y. Sato, S. D. Mansfield, J. Ralph, A. L. Samuels, 'Defining the diverse cell populations contributing to lignification in *Arabidopsis* stems', *Plant Physiol.* **2017**, *174*, 1028–1036.
- [236] J.-Y. Gou, X.-H. Yu, C.-J. Liu, 'A hydroxycinnamoyltransferase responsible for synthesizing suberin aromatics in *Arabidopsis*.', *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, *106*, 18855–18860.
- [237] I. Sørensen, F. A. Pettolino, A. Bacic, J. Ralph, F. Lu, M. A. O'Neill, Z. Fei, J. K. C. Rose, D. S. Domozych, W. G. T. Willats, 'The charophycean green algae provide insights into the early origins of plant cell walls.', *Plant J.* **2011**, *68*, 201–11.
- [238] J. Barros, J. C. Serrani-Yarce, F. Chen, D. Baxter, B. J. Venables, R. A. Dixon, 'Role of bifunctional ammonia-lyase in grass cell wall biosynthesis', *Nat. Plants* **2016**, *2*, 16050.
- [239] R. A. Dixon, L. Achnine, P. Kota, C.-J. Liu, M. S. S. Reddy, L. Wang, 'The phenylpropanoid pathway and plant defence—a genomics perspective.', *Mol. Plant Pathol.* **2002**, *3*, 371–390.
- [240] M. A. Bernards, 'Demystifying suberin', *Can. J. Bot.* **2002**, *80*, 227–240.
- [241] S. Santos, J. Graça, 'Glycerol- ω -hydroxyacid-ferulic acid oligomers in cork suberin structure', *Holzforschung* **2006**, *60*, 171–177.
- [242] M. Soler, O. Serra, M. Molinas, G. Huguet, S. Fluch, M. Figueras, 'A genomic approach to suberin biosynthesis and cork differentiation', *Plant Physiol.* **2007**, *144*, 419–431.
- [243] O. Serra, M. Soler, C. Hohn, V. Sauveplane, F. Pinot, R. Franke, L. Schreiber, S. Prat, M. Molinas, M. Figueras, 'CYP86A33-targeted gene silencing in potato tuber alters suberin

- composition, distorts suberin lamellae, and impairs the periderm's water barrier function.', *Plant Physiol.* **2009**, *149*, 1050–1060.
- [244] S. J. Vishwanath, C. Delude, F. Domergue, O. Rowland, 'Suberin: biosynthesis, regulation, and polymer assembly of a protective extracellular barrier.', *Plant Cell Rep.* **2015**, *34*, 573–586.
- [245] J. Graça, 'Suberin: the biopolyester at the frontier of plants.', *Front. Chem.* **2015**, *3*, 62.
- [246] T. Vesala, S. Sevanto, T. Grönholm, Y. Salmon, E. Nikinmaa, P. Hari, T. Hölttä, 'Effect of Leaf Water Potential on Internal Humidity and CO₂ Dissolution: Reverse Transpiration and Improved Water Use Efficiency under Negative Pressure.', *Front. Plant Sci.* **2017**, *8*, 54.
- [247] J. S. Sperry, 'Evolution of water transport and xylem structure', *Int. J. Plant Sci.* **2003**, *164*, 115–127.
- [248] A. D. Peuke, M. Rokitta, U. Zimmermann, L. Schreiber, A. Haase, 'Simultaneous measurement of water flow velocity and solute transport in xylem and phloem of adult plants of *Ricinus communis* over a daily time course by nuclear magnetic resonance spectrometry', *Plant, Cell Environ.* **2001**, *24*, 491–503.
- [249] U. C. Malavasi, A. S. Davis, M. de M. Malavasi, 'Lignin in woody plants under water stress: A review', *Floresta e Ambient.* **2016**, *23*, 589–597.
- [250] A. G. Lodge, M. B. Dickinson, K. L. Kavanagh, 'Xylem heating increases vulnerability to cavitation in longleaf pine', *Environ. Res. Lett.* **2018**, *13*, 055007.
- [251] F. Lens, C. Picon-Cochard, C. E. L. Delmas, C. Signarbieux, A. Buttler, H. Cochard, S. Jansen, T. Chauvin, L. C. Doria, M. Del Arco, S. Delzon, 'Herbaceous angiosperms are not more vulnerable to drought-induced embolism than angiosperm trees', *Plant Physiol.* **2016**, *172*, 661–667.
- [252] Q. Liu, L. Luo, L. Zheng, 'Lignins: Biosynthesis and biological functions in plants', *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 335.
- [253] M. T. Tyree, F. W. Ewers, 'The hydraulic architecture of trees and other woody plants', *New Phytol.* **1991**, *119*, 345–360.
- [254] J. B. Fisher, G. Goldstein, T. J. Jones, S. Cordell, 'Wood vessel diameter is related to elevation and genotype in the Hawaiian tree *Metrosideros polymorpha* (Myrtaceae)', *Am. J. Bot.* **2007**, *94*, 709–715.
- [255] J. A. Rosell, M. E. Olson, T. Anfodillo, 'Scaling of Xylem Vessel Diameter with Plant Size: Causes, Predictions, and Outstanding Questions', *Curr. For. Reports* **2017**, *3*, 46–59.
- [256] Y. Osakabe, A. Kawaoka, N. Nishikubo, K. Osakabe, 'Responses to environmental stresses in woody plants: key to survive and longevity.', *J. Plant Res.* **2012**, *125*, 1–10.
- [257] R. Aloni, M. H. Zimmermann, 'The control of vessel size and density along the plant axis: A new hypothesis', *Differentiation* **1983**, *24*, 203–208.
- [258] Z. A. Popper, 'Evolution and diversity of green plant cell walls', *Curr. Opin. Plant Biol.* **2008**, *11*, 286–292.

- [259] K. Růžička, R. Ursache, J. Hejátko, Y. Helariutta, ‘Xylem development - from the cradle to the grave.’, *New Phytol.* **2015**, *207*, 519–35.
- [260] T. J. Schmidt, S. Hemmati, M. Klaes, B. Konuklugil, A. Mohagheghzadeh, I. Ionkova, E. Fuss, A. Wilhelm Alfermann, ‘Lignans in flowering aerial parts of *Linum* species--chemodiversity in the light of systematics and phylogeny.’, *Phytochemistry* **2010**, *71*, 1714–28.
- [261] R. Ligrone, J. G. Duckett, K. S. Renzaglia, in *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.*, Royal Society, **2000**, pp. 795–813.
- [262] Z. A. Popper, G. Michel, C. Hervé, D. S. Domozych, W. G. T. Willats, M. G. Tuohy, B. Kloareg, D. B. Stengel, ‘Evolution and Diversity of Plant Cell Walls: From Algae to Flowering Plants’, *Annu. Rev. Plant Biol.* **2011**, *62*, 567–590.
- [263] C. F. Delwiche, L. E. Graham, N. Thomson, ‘Lignin-like compounds and sporopollenin coleochaete, an algal model for land plant ancestry.’, *Science* **1989**, *245*, 399–401.
- [264] P. T. Martone, J. M. Estevez, F. Lu, K. Ruel, M. W. Denny, C. Somerville, J. Ralph, ‘Discovery of Lignin in Seaweed Reveals Convergent Evolution of Cell-Wall Architecture’, *Curr. Biol.* **2009**, *19*, 169–175.
- [265] P. Kenrick, P. R. Crane, ‘The origin and early evolution of plants on land’, *Nature* **1997**, *389*, 33–39.
- [266] D. Edwards, ‘Xylem in early tracheophytes’, *Plant, Cell Environ.* **2003**, *26*, 57–72.
- [267] M. L. Luna, J. P. R. Giacosa, G. E. Giudice, P. V. Fernández, M. Ciancia, M. C. N. Saparrat, ‘Structure and chemistry of the xylem of arborescent species of *Blechnum* from South America’, *IAWA J.* **2015**, *36*, 3–21.
- [268] Y. Huang, Y. Han, L. Wei, J. Wang, ‘Comparative Studies of Tracheary Element Structure of Some Gymnosperms with Angiosperms’, *Am. J. Plant Sci.* **2017**, *08*, 959–984.
- [269] J.-K. Weng, J. A. Banks, C. Chapple, ‘Parallels in lignin biosynthesis: A study in *Selaginella moellendorffii* reveals convergence across 400 million years of evolution.’, *Commun. Integr. Biol.* **2008**, *1*, 20–2.
- [270] J.-K. Weng, X. Li, J. Stout, C. Chapple, ‘Independent origins of syringyl lignin in vascular plants.’, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, *105*, 7887–92.
- [271] R. A. Berner, J. M. VandenBrooks, P. D. Ward, ‘Oxygen and evolution’, *Science* **2007**, *316*, 557–558.
- [272] N. Rowe, T. Speck, in *Evol. Plant Physiol.*, Elsevier Inc., **2004**, pp. 297–325.
- [273] G. W. Koch, S. C. Stillet, G. M. Jennings, S. D. Davis, ‘The limits to tree height’, *Nature* **2004**, *428*, 851–854.
- [274] A. Scholz, D. Rabaey, A. Stein, H. Cochard, E. Smets, S. Jansen, ‘The evolution and function of vessel and pit characters with respect to cavitation resistance across 10 *Prunus* species.’, *Tree Physiol.* **2013**, *33*, 684–94.

- [275] L. Plavcová, S. Jansen, in *Funct. Ecol. Xylem Anat.*, Springer International Publishing, **2015**, pp. 209–234.
- [276] D. W. Bierhorst, P. M. Zamora, ‘Primary Xylem Elements and Element Associations of Angiosperms’, *Am. J. Bot.* **1965**, *52*, 657.
- [277] T. S. Feild, M. A. Zweiniecki, T. Brodribb, T. Jaffre, M. J. Donohughe, N. M. Holbrook, ‘Structure and function of tracheary elements in *Amborella trichopoda*’, *Int. J. Plant Sci.* **2000**, *161*, 705–712.
- [278] H. Maherali, W. T. Pockman, R. B. Jackson, ‘Adaptive variation in the vulnerability of woody plants to xylem cavitation’, *Ecology* **2004**, *85*, 2184–2199.
- [279] F. Y. Shen, R. Guo, Q. Sun, R. F. Gao, Y. B. Shen, Z. Y. Zhang, ‘Possible causes for embolism repair in xylem’, *Environ. Exp. Bot.* **2008**, *62*, 139–144.
- [280] F. Secchi, M. A. Zwieniecki, ‘Analysis of xylem sap from functional (Nonembolized) and nonfunctional (Embolized) vessels of *Populus nigra*: Chemistry of refilling’, *Plant Physiol.* **2012**, *160*, 955–964.
- [281] M. M. Kohonen, Å. Helland, ‘On the Function of Wall Sculpturing in Xylem Conduits’, *J. Bionic Eng.* **2009**, *6*, 324–329.
- [282] B. Choat, A. R. Cobb, S. Jansen, ‘Structure and function of bordered pits: New discoveries and impacts on whole-plant hydraulic function’, *New Phytol.* **2008**, *177*, 608–626.
- [283] S. Li, F. Lens, S. Espino, Z. Karimi, M. Klepsch, H. J. Schenk, M. Schmitt, B. Schuldt, S. Jansen, ‘Intervessel pit membrane thickness as a key determinant of embolism resistance in Angiosperm xylem’, *IAWA J.* **2016**, *37*, 152–171.
- [284] M. McCully, M. Canny, A. Baker, C. Miller, ‘Some properties of the walls of metaxylem vessels of maize roots, including tests of the wettability of their luminal wall surfaces.’, *Ann. Bot.* **2014**, *113*, 977–89.
- [285] M. M. Wróblewska, ‘The progressive and ancestral traits of the secondary xylem within Magnolia clad - the early diverging lineage of flowering plants’, *Acta Soc. Bot. Pol.* **2015**, *84*, 87–96.
- [286] L. Pereira, D. N. A. Flores-Borges, P. R. L. Bittencourt, J. L. S. Mayer, E. Kiyota, P. Araújo, S. Jansen, R. O. Freitas, R. S. Oliveira, P. Mazzafera, ‘Infrared nanospectroscopy reveals the chemical nature of pit membranes in water-conducting cells of the plant xylem’, *Plant Physiol.* **2018**, *177*, 1629–1638.
- [287] S. Carlquist, ‘Pit Membrane Remnants in Perforation Plates of Primitive Dicotyledons and Their Significance’, *Am. J. Bot.* **1992**, *79*, 660.
- [288] T. J. Brodribb, N. M. Holbrook, R. S. Hill, ‘Seedling growth in conifers and angiosperms: impacts of contrasting xylem structure’, *Aust. J. Bot.* **2005**, *53*, 749–755.
- [289] T. S. Feild, J. P. Wilsony, ‘Evolutionary Voyage of angiosperm vessel structure-function and its significance for early angiosperm success’, *Int. J. Plant Sci.* **2012**, *173*, 596–609.
- [290] J. S. Sperry, U. G. Hacke, T. S. Feild, Y. Sano, E. H. Sikkema, ‘Hydraulic consequences of

- vessel evolution in angiosperms', *Int. J. Plant Sci.* **2007**, *168*, 1127–1139.
- [291] L. Augusto, T. J. Davies, S. Delzon, A. de Schrijver, 'The enigma of the rise of angiosperms: Can we untie the knot?', *Ecol. Lett.* **2014**, *17*, 1326–1338.
- [292] D. Mohnen, 'Pectin structure and biosynthesis', *Curr. Opin. Plant Biol.* **2008**, *11*, 266–277.
- [293] G. J. McDougall, 'Cell-Wall-Associated Peroxidases from the Lignifying Xylem of Angiosperms and Gymnosperms: Monolignol Oxidation', *Holzforschung* **2001**, *55*, 246–249.
- [294] L. Duroux, K. G. Welinder, 'The peroxidase gene family in plants: a phylogenetic overview.', *J. Mol. Evol.* **2003**, *57*, 397–407.
- [295] N. Bakalovic, F. Passardi, V. Ioannidis, C. Cosio, C. Penel, L. Falquet, C. Dunand, 'PeroxiBase: A class III plant peroxidase database', *Phytochemistry* **2006**, *67*, 534–539.
- [296] C. I. Lacayo, M. S. Hwang, S. Y. Ding, M. P. Thelen, 'Lignin Depletion Enhances the Digestibility of Cellulose in Cultured Xylem Cells', *PLoS One* **2013**, *8*, DOI 10.1371/journal.pone.0068266.
- [297] P. Sarkar, E. Bosneaga, M. Auer, 'Plant cell walls throughout evolution: towards a molecular understanding of their design principles.', *J. Exp. Bot.* **2009**, *60*, 3615–35.
- [298] J. H. Grabber, J. Ralph, R. D. Hatfield, 'Severe inhibition of maize wall degradation by synthetic lignins formed with coniferaldehyde', *J. Sci. Food Agric.* **1998**, *78*, 81–87.
- [299] O. Skyba, C. J. Douglas, S. D. Mansfield, 'Syringyl-Rich lignin renders poplars more resistant to degradation by wood decay fungi', *Appl. Environ. Microbiol.* **2013**, *79*, 2560–2571.
- [300] C. P. Macmillan, H. Birke, 'Lignin Deposition in Cotton Cells? Where is the lignin?', *J. Plant Biochem. Physiol.* **2014**, *1*, 1000e106.
- [301] J. A. Fawcett, Y. van de Peer, 'Angiosperm polyploids and their road to evolutionary success', *Trends Evol. Biol.* **2010**, *2*, 16–21.
- [302] Q. Zhao, H. Wang, Y. Yin, Y. Xu, F. Chen, R. A. Dixon, 'Syringyl lignin biosynthesis is directly regulated by a secondary cell wall master switch.', *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107*, 14496–501.
- [303] B. M. Lange, C. Lapierre, H. Sandermann, 'Elicitor-induced spruce stress lignin: Structural similarity to early developmental lignins', *Plant Physiol.* **1995**, *108*, 1277–1287.
- [304] N. Wuyts, G. Lognay, R. Swennen, D. De Waele, 'Nematode infection and reproduction in transgenic and mutant *Arabidopsis* and tobacco with an altered phenylpropanoid metabolism.', *J. Exp. Bot.* **2006**, *57*, 2825–35.
- [305] B. Menden, M. Kohlhoff, B. M. Moerschbacher, 'Wheat cells accumulate a syringyl-rich lignin during the hypersensitive resistance response.', *Phytochemistry* **2007**, *68*, 513–20.
- [306] V. A. Klap, M. A. Hemminga, J. J. Boon, 'Retention of lignin in seagrasses: Angiosperms that returned to the sea', *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **2000**, *194*, 1–11.

- [307] S. H. Brawley, N. A. Blouin, E. Ficko-Blean, G. L. Wheeler, M. Lohr, H. V. Goodson, J. W. Jenkins, C. E. Blaby-Haas, K. E. Helliwell, C. X. Chan, T. N. Marriage, D. Bhattacharya, A. S. Klein, Y. Badis, J. Brodie, Y. Cao, J. Collén, S. M. Dittami, C. M. M. Gachon, B. R. Green, S. J. Karpowicz, J. W. Kim, U. J. Kudahl, S. Lin, G. Michel, M. Mittag, B. J. S. C. Olson, J. L. Pangilinan, Y. Peng, H. Qiu, S. Shu, J. T. Singer, A. G. Smith, B. N. Sprecher, V. Wagner, W. Wang, Z. Y. Wang, J. Yan, C. Yarish, S. Zäuner-Riek, Y. Zhuang, Y. Zou, E. A. Lindquist, J. Grimwood, K. W. Barry, D. S. Rokhsar, J. Schmutz, J. W. Stiller, A. R. Grossman, S. E. Prochnik, ‘Insights into the red algae and eukaryotic evolution from the genome of *Porphyra umbilicalis* (Bangiophyceae, Rhodophyta)’, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2017**, *114*, E6361–E6370.
- [308] E. N. Uzal, L. V Gómez Ros, F. Pomar, M. A. Bernal, A. Paradela, J. P. Albar, A. Ros Barceló, ‘The presence of sinapyl lignin in *Ginkgo biloba* cell cultures changes our views of the evolution of lignin biosynthesis.’, *Physiol. Plant.* **2009**, *135*, 196–213.
- [309] W. E. Friedman, M. E. Cook, in *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.*, Royal Society, **2000**, pp. 857–868.
- [310] C. Boyce, C. Kevin, G. D. Cody, M. L. Fogel, R. M. Hazen, M. O. Alexander, A. H. Knoll, C. K. Boyce, C. M. O’, D. Alexander, ‘Chemical evidence for cell wall lignification and the evolution of tracheids in early Devonian plants’, *Int. J. Plant Sci.* **2003**, *164*, 691–702.
- [311] L. V Gómez Ros, G. J. Aznar-Asensio, J. A. Hernandez, M. A. Bernal, M. J. L. Núñez-Flores, J. Cuello, A. Ros Barceló, ‘Structural motifs of syringyl peroxidases are conserved during angiosperm evolution.’, *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 4131–8.
- [312] A. Leyva, X. Liang, J. A. Pintor-Toro, R. A. Dixon, C. J. Lamb, ‘cis-element combinations determine phenylalanine ammonia-lyase gene tissue-specific expression patterns.’, *Plant Cell* **1992**, *4*, 263–271.
- [313] J. Raes, A. Rohde, J. H. Christensen, Y. Van De Peer, W. Boerjan, ‘Genome-Wide Characterization of the Lignification Toolbox in *Arabidopsis*’, *Plant Physiol.* **2003**, *133*, 1051–1071.
- [314] G. Peter, D. Neale, ‘Molecular basis for the evolution of xylem lignification.’, *Curr. Opin. Plant Biol.* **2004**, *7*, 737–42.
- [315] S. J. Gould, E. S. Vrba, ‘Exaptation—a Missing Term in the Science of Form’, *Paleobiology* **1982**, *1*, 4–15.
- [316] M. J. Donoghue, ‘Key Innovations, Convergence, and Success: Macroevolutionary Lessons from Plant Phylogeny’, *Paleobiology* **2005**, *31*, 77–93.
- [317] W. S. Armbruster, J. Lee, B. G. Baldwin, ‘Macroevolutionary patterns of defense and pollination in *Dalechampia* vines: Adaptation, exaptation, and evolutionary novelty’, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, *106*, 18085–18090.

CAPÍTULO I. CHEMICAL COMPOSITION OF CACTI WOOD AND COMPARISON WITH THE WOOD OF OTHER TAXONOMIC GROUPS¹

1.1 RESUMEN

El objetivo de esta parte del estudio fue determinar la composición química de la madera de 25 especies de Cactaceae y relacionar la composición con su diversidad anatómica. La hipótesis fue que los componentes químicos de la madera difieren en relación con las características anatómicas de la madera. Los resultados mostraron diferencias significativas en los compuestos químicos de la madera entre especies y géneros ($p < 0.05$). *Pereskia* tuvo el porcentaje mayor de lignina, mientras que las especies de *Coryphantha* tuvieron el menor; los compuestos extractivos en agua fueron más altos para *Echinocereus*, *Mammillaria* y *Opuntia*. El análisis de componentes principales mostró que la proporción de lignina separaba los grupos fibrosos; además, las diferencias dentro de cada tipo de madera se produjeron debido a la lignificación del tejido vascular y el tipo de engrosamiento de la pared celular. En comparación con otros grupos de especies, las especies de Cactáceas con madera fibrosa y dimórfica tuvieron un mayor porcentaje de lignina que las gimnospermas y las especies de *Acer*. La lignina puede conferir rigidez especial a los elementos traqueales para soportar la desecación sin daños durante condiciones climáticas adversas.

Palabras clave: diversidad molecular, biología estructural, Cactaceae, lignina, holocelulosa.

1.2 ABSTRACT

The aims of this study were to determine the wood chemical composition of 25 species of Cactaceae and to relate the composition to their anatomical diversity. The hypothesis was that wood chemical components differ in relationship to their wood features. The results showed significant differences in wood chemical compounds across species and genera ($p < 0.05$). *Pereskia* had the highest percentage of lignin, whereas species of *Coryphantha* had the lowest; extractive compounds in water were highest for *Echinocereus*, *Mammillaria* and *Opuntia*. Principal component analysis showed that lignin proportion separated the fibrous, dimorphic and non-fibrous groups; additionally, the differences within each type of wood occurred because of the lignification of the vascular tissue and the type of wall thickening. Compared with other groups of

¹ A. Maceda, M. Soto-Hernández, C. B. Peña-Valdivia. T. Terrazas. *Chem. Biodiversity* **2018**, 15(4), e1700574. doi: 10.1002/cbdv.201700574

species, the Cactaceae species with fibrous and dimorphic wood had a higher lignin percentage than did gymnosperms and *Acer* species. Lignin may confer special rigidity to tracheary elements to withstand desiccation without damage during adverse climatic conditions.

Keywords: Molecular diversity, structural biology, Cactaceae, lignin, holocellulose

1.3 INTRODUCTION

The study of wood chemical composition is important for wood use in industry, primarily in energy [1-3], paper production [4,5] and food for livestock [6]. Additionally, wood chemical composition studies are important to identify extractive compounds with potential for industrial [7] or medicinal [8] purposes and to provide references for the structural chemical composition of wild species [9]. A variety of studies have focused primarily on tree species [10], herbaceous species [11] and even succulents [12,13] to complement the knowledge of the chemical diversity and structural composition of their tissues and their possible uses.

The Cactaceae family is distinctive because many species are adapted to diverse environmental conditions, primarily xeric ones, and the members have highly diverse morphological, physiological and anatomical characteristics [14]. Among the anatomical characteristics, the Cactaceae show great variations in wood [15-17], specifically in the type of cells that form the matrix [fiber (F), parenchyma (P) or wide-band tracheids (WBTs)] in which the vessels (Vs) are embedded. Based on these matrix features, Cactaceae woods are classified as fibrous, non-fibrous and dimorphic [14,18].

Studies of the wood chemical compositions of Cactaceae are scarce. Reyes-Rivera *et al.* [19] documented the differences among 13 species of Cactaceae that had fibrous, non-fibrous and dimorphic woods. They highlighted that the eight species with fibrous wood had a very homogeneous pattern similar to that of other Eudicotyledonous and gymnosperm species, but the heterogeneity was greater in the five species studied with non-fibrous or dimorphic wood. These authors suggest that the differences are associated with plant size and type of wood. Additionally, the wood of the non-fibrous species was distinguished by the absence of F and low lignin content, in contrast to the dimorphic woods that only possessed F in the adult stage and had a greater proportion of lignin than that in some fibrous woods. Reyes-Rivera *et al.* [19] noted the lack of studies of other species of the Cactaceae that are necessary to support their findings, particularly

in species with non-fibrous or dimorphic wood, because their chemical composition is highly diverse compared with that of fibrous woods.

WBTs are important to avoid V embolisms and cavitations [20-24]. Most species of the Cactaceae at some stage of their development have WBTs [16,25,26], particularly those in the subfamily Cactoideae [17,27]. Therefore, analyzing and comparing the chemical composition of the non-fibrous woods in which WBTs predominate are relevant. In Mexico, non-fibrous woods are well represented in the genera of the Cactaceae tribe [17,27] and in the genus *Echinocereus*, which is relevant because *Echinocereus* is a monophyletic genus and differs from the other genera of the Echinocereae tribe that have fibrous wood [28-30].

The aims of this study were to determine the wood chemical composition and wood type of the cellular matrix of 25 species of Cactaceae, evaluate whether significant differences existed across these species and compare these species with the data reported in the literature for Cactaceae and other species in different taxonomic groups. Our primary hypothesis in this study was that significant differences in the wood chemical composition were related to the different types of cell matrices in the Cactaceae.

1.4 RESULTS

Wood chemical composition. The Kruskal-Wallis analysis showed significant differences ($p < 0.046$) and highly significant differences ($p < 0.0001$) in cellulose, lignin and hemicellulose contents at the species and genus levels (Table 1.1). Tables 1.2 and 1.3 show the mean values for each variable analyzed of the different species. Duncan's multiple range tests showed differences among the seven genera, primarily between the non-fibrous and fibrous ones (Table 1.4).

Extractives in ethanol (96%): The lowest percentages of these compounds were in *Cylindropuntia* and *Pereskia* (7.45 and 7.17%, respectively), with the highest percentage corresponding to the *Coryphantha* species (8.20 to 9.08%; Table 1.2).

Extractives in water at 90 °C: The species of *Coryphantha*, *Echinocereus*, *Mammillaria*, *Neolloydia* and *Opuntia* had the highest percentages (15.35 to 18.67%) of extractive compounds soluble in hot water, in contrast to *Cylindropuntia* and *Pereskia*, with the lowest values (8.24 to 9.10%; Table 1.2).

Table 1.1. Kruskal-Wallis analysis for chemical composition variables to species and genera.

	Ethanol- benzene	Ethanol 96%	Water 90 °C	Total extractives	Extractive- free wood	Cellulose	Lignin	Hemicellulose
				Species				
Median	2.57	8.33	16.56	25.94	74.05	31.84	20.08	20.32
χ -square	38	43.33	40.66	46	46	51.33	72.66	54
Df	25	25	25	25	25	25	25	25
Significance	0.046	0.013	0.025	0.006	0.006	0.001	0.0001	0.001
				Genera				
Median	2.51	8.41	16.90	26.17	73.83	31.73	21.24	19.52
χ -square	18.17	17.31	21.20	19.52	19.52	21.82	24.76	22.00
Df	6	6	6	6	6	6	6	6
Significance	0.006	0.008	0.002	0.003	0.003	0.001	0.0001	0.001

Table 1.2. Partial chemical composition (% of dry biomass) of 25 fibrous, non-fibrous and dimorphic species of Cactaceae.

Species	Extractive compounds (%)			Total extractives	Extractive-free wood (%)
	Ethanol-benzene	Ethanol 96%	Water90°C		
<i>Coryphantha clavata</i>	2.93±0.84	8.68±1.09	18.02±1.67	27.53±1.0	72.47±1.61
<i>C. cornifera</i>	2.50±0.13	8.77±0.33	16.78±1.48	26.17±1.14	73.83±1.14
<i>C. delaetiana</i>	2.50±0.62	8.60±0.60	15.90±1.66	25.25±0.78	74.75±0.78
<i>C. delicate</i>	3.43±0.30	8.34±0.33	17.39±1.89	27.11±1.	72.89±1.68
<i>C. hintoriori</i>	2.40±0.46	8.46±0.18	15.87±0.76	25.01±0.84	74.99±0.84
<i>C. macromeris</i>	2.51±0.22	8.87±1.19	17.20±1.86	26.63±2.28	73.37±2.29
<i>C. pallida</i>	2.74±0.22	9.08±1.24	17.07±0.66	26.88±0.	73.12±0.69
<i>C. pseudoechinus</i>	2.83±0.18	8.25±2.02	17.18±1.13	26.35±2.41	73.65±2.41
<i>C. ramillosa</i>	3.02±0.48	8.89±0.18	16.98±1.45	26.88±0.81	73.12±0.81
<i>C. retusa</i>	3.16±0.45	8.20±0.07	17.55±1.22	26.92±1.12	73.08±1.12
<i>Mammillaria carnea</i>	2.90±0.28	8.73±0.32	17.92±1.65	27.47±1.07	72.53±1.08
<i>M. dixanthocentron</i>	2.70±0.22	8.53±0.26	17.38±0.07	26.66±0.28	73.34±0.29
<i>M. magnifica</i>	2.47±0.08	8.38±0.30	17.22±0.16	26.2±0.37	73.80±0.37
<i>M. myxtax</i>	2.68±0.13	8.64±0.27	18.67±0.54	27.88±0.78	72.12±0.78
<i>Neolloydia conoidea</i>	2.49±0.16	8.52±0.36	16.84±0.21	25.99±0.57	74.01±0.57
<i>Echinocereus cinerascens</i>	2.68±0.29	8.57±0.33	16.91±0.87	26.25±0.97	73.75±0.98
<i>E. dasyacanthus</i>	2.56±0.36	8.41±0.18	16.54±0.20	25.7±0.25	74.30±0.25
<i>E. pectinatus</i>	2.52±0.23	8.45±0.36	16.28±0.15	25.46±0.52	74.54±0.53
<i>E. pentalophus</i>	2.95±0.20	8.65±0.04	17.17±0.13	26.78±0.25	73.22±0.26
<i>Cylindropuntia imbricata</i>	2.11±0.25	7.60±0.22	8.94±1.17	17.78±0.80	82.22±0.80
<i>C. kleiniae</i>	2.12±0.10	7.45±0.15	8.32±0.48	17.1±0.57	82.90±0.58
<i>C. leptocaulis</i>	2.34±0.09	7.79±0.33	9.10±0.8	18.31±0.74	81.69±0.74
<i>Opuntia stenopetala</i>	2.31±0.17	8.06±0.23	15.61±0.83	24.36±0.77	75.64±0.78
<i>O. stricta</i>	2.45±0.26	8.22±0.14	15.35±0.65	24.37±0.36	75.63±0.37
<i>Pereskia lychnidiflora</i>	2.03±0.34	7.17±0.11	8.24±1.33	16.68±1.59	83.32±1.60

n=3, ±=Standard Deviation (SD)

Total extractive compounds and extractive-free wood: For most of the species studied, the percentages of total extractive compounds were between 24.36 and 27.88%, with percentages of extractive-free wood between 72.12 and 75.64%. The exceptions were *Cylindropuntia* and *Pereskia*, which had the lowest values of total extractive compounds and the highest values for extractive-free wood of the species studied (Table 1.2).

Cellulose: The cellulose content showed little variation across species. The maximum and minimum percentages corresponded to *Coryphantha pallida* (38.18%) and *Pereskia lychnidiflora* (27.17%; Table 1.3), respectively.

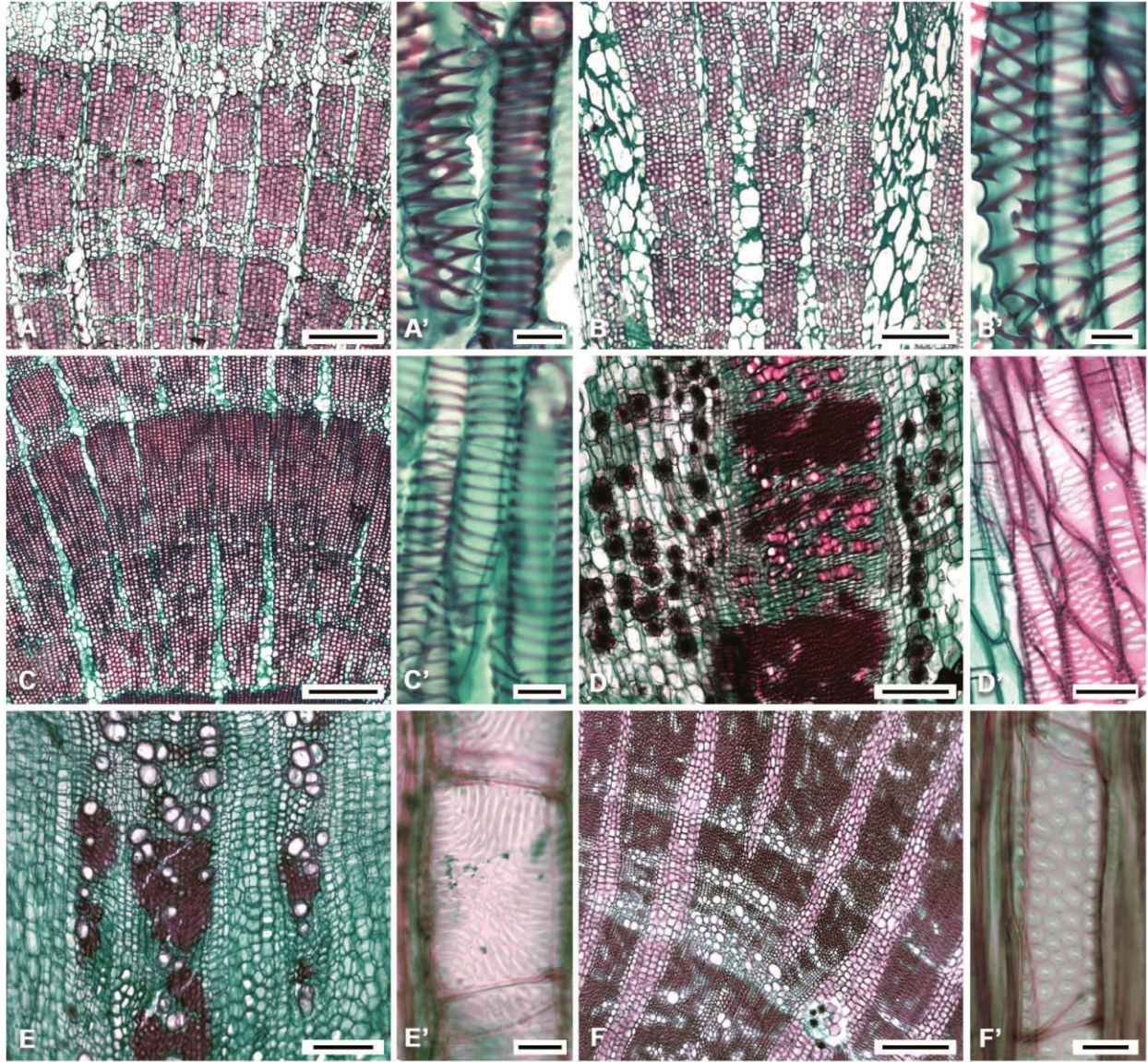


Figure 1.1. Wood of some Cactaceae. A–F, cross-sections, A'–F', tangential sections. A, A') *Coryphantha delaeitiana*. B, B') *Mammillaria dixathocentron*. C, C') *Echinocereus dasyacanthus*. D, D') *Opuntia stenopetala*. E, E') *O. stricta*. F, F') *Cylindropuntia leptocaulis*. Scale is A–F = 300 μ m. A', B', C', F' = 20 μ m; D' = 100 μ m; E' = 50 μ m.

Lignin: A gradient of lignin was observed, in which *Pereskia* had the highest percentage (42.52%), followed by *Cylindropuntia* (33.93 to 37.39%), and *Coryphantha* and *Mammillaria* had the lowest contents (15.76–21.24%; Table 1.3).

Hemicelluloses: The hemicellulose content showed wide variation. *Coryphantha delaeitiana* had the highest percentage (24.66%), and *Pereskia lychnidiflora* (13.63%) and *Neolloydia conoidea* (14.77%) had the lowest ones (Table 1.3).

Table 1.3. Content of cellulose, lignin and hemicellulose (% of dry biomass) of 25 fibrous, non-fibrous and dimorphic species of Cactaceae.

Species	Cellulose	Lignin	Hemicellulose
<i>Coryphantha clavata</i>	34.37±1.95	15.76±1.15	22.33±1.18
<i>C. cornifera</i>	32.22±0.98	19.66±1.16	21.95±2.14
<i>C. delaetiana</i>	31.73±1.56	18.36±0.72	24.66±0.42
<i>C. delicata</i>	32.23±2.14	16.29±0.88	24.37±0.32
<i>C. hintoriori</i>	31.06±1.82	21.24±0.61	22.68±1.69
<i>C. macromeris</i>	33.84±1.67	16.66±1.06	22.87±0.60
<i>C. pallida</i>	38.18±1.50	17.17±0.99	17.76±1.15
<i>C. pseudoechinus</i>	33.25±1.45	17.77±2.03	22.63±4.09
<i>C. ramillosa</i>	34.94±0.18	16.84±1.20	21.34±0.73
<i>C. retusa</i>	36.55±2.3	17.58±1.33	18.95±4.92
<i>Mammillaria carnea</i>	35.22±1.22	18.77±0.68	18.54±1.09
<i>M. dixanthocentron</i>	33.02±1.94	18.42±1.36	21.90±1.96
<i>M. magnifica</i>	33.98±0.83	18.40±0.9	21.42±0.29
<i>M. myxtax</i>	34.08±1.11	17.33±0.48	20.72±0.77
<i>Neolloydia conoidea</i>	32.31±0.85	26.93±2.13	14.77±2.42
<i>Echinocereus cinerascens</i>	30.62±0.95	22.46±1.86	20.67±1.46
<i>E. dasyacanthus</i>	29.03±1.47	23.88±0.18	21.40±1.43
<i>E. pectinatus</i>	30.03±1.53	24.99±0.37	19.52±1.81
<i>E. pentalophus</i>	31.26±1.72	20.32±1.11	21.64±2.83
<i>Cylindropuntia imbricata</i>	27.91±0.05	37.39±1.49	16.92±0.70
<i>C. kleiniae</i>	28.91±1.60	37.27±1.08	16.72±2.13
<i>C. leptocaulis</i>	30.78±0.90	33.93±0.69	16.98±2.25
<i>Opuntia stenopetala</i>	30.46±0.85	29.56±1.36	15.61±1.27
<i>O. stricta</i>	31.31±1.40	28.11±1.49	16.20±3.07
<i>Pereskia lychnidiflora</i>	27.17±1.05	42.52±2.60	13.63±3.42

n=3, ±=Standard Deviation (SD)

Wood anatomy. Four patterns were identified based on the cell-type matrix in which the conductive and supporting cells were embedded (Figure 1.1).

1) WBT matrix: Most Vs were embedded in a matrix of WBT with both tracheary elements with helical and annular secondary walls. These WBT-Vs in some species alternated with bands of Vs and unlignified axial P; the rays were also unlignified. The species of *Coryphantha*, *Mammillaria* and *Neolloydia* had this wood pattern (Figure 1.1A, B). (2) WBT-F matrix: WBT and Vs were in the same proportion, the WBT had a helical secondary wall, and the V elements were helical and reticulate. In some species, narrow bands of unlignified axial P with Vs and occasional small patches of F were observed; the rays were narrow and unlignified with abundant mucilage cells.

Table 1.4. Mean, standard deviation and Duncan's multiple range test of the seven genera of Cactaceae studied. Different letters in each line indicate significant differences ($p < 0.05$)

	<i>Coryphantha</i>	<i>Cylindropuntia</i>	<i>Echinocereus</i>	<i>Mammillaria</i>	<i>Nelloydia</i>	<i>Opuntia</i>	<i>Pereskia</i>
Ethanol-benzene	2.80±0.34 ^b	2.19±0.13 ^a	2.67±0.19 ^b	2.68±0.18 ^b	2.48±0.16 ^{ab}	2.38±0.10 ^{ab}	2.03±0.34 ^a
Ethanol 96%	8.61±0.30 ^d	7.61±0.17 ^b	8.52±0.11 ^c	8.57±0.15 ^d	8.52±0.36 ^{cd}	8.14±0.11 ^c	7.17±0.11 ^a
Water 90°C	16.99±0.68 ^c	8.78±0.41 ^a	16.72±0.39 ^c	17.79±0.65 ^c	16.84±0.21 ^c	15.48±0.18 ^b	8.23±1.33 ^a
Total extractives	26.47±0.80 ^c	17.73±0.61 ^a	26.04±0.59 ^c	27.05±0.76 ^c	25.99±0.57 ^c	24.36±0.01 ^b	16.68±1.60 ^a
Extractive-free wood	73.52±0.80 ^a	82.27±0.61 ^c	73.95±0.59 ^a	72.94±0.76 ^a	74.01±0.57 ^a	75.63±0.01 ^b	83.32±1.60 ^c
Cellulose	33.83±2.25 ^d	29.2±1.46 ^{ab}	30.63±0.62 ^{bc}	34.07±0.90 ^d	32.31±0.85 ^{cd}	30.88±0.60 ^{bc}	27.16±1.05 ^a
Lignin	17.73±1.66 ^a	36.19±1.96 ^d	22.91±2.01 ^b	18.23±0.62 ^a	26.93±2.13 ^c	28.83±1.03 ^c	42.51±2.60 ^e
Hemicellulose	21.95±2.16 ^b	16.87±0.14 ^a	20.80±0.95 ^b	20.64±1.48 ^b	14.76±2.42 ^a	15.90±0.42 ^a	13.63±3.42 ^a

Coryphantha n=10; *Cylindropuntia*, *Echinocereus*, *Mammillaria* n=4; *Neolloydia*, *Opuntia*, *Pereskia* n=3, ±=Standar Deviation (SD)

This wood was common among *Echinocereus* species (Figure 1.1C). (3) F-P matrix: The Vs were embedded in F or unlignified axial P. Vs had pseudoscalariform or alternate intervascular pits, and the rays were wide and unlignified. This wood pattern was found in some *Opuntia* species (Figure 1.1D, E). (4) F matrix: The Vs were embedded in F; the V elements had pseudoscalariform and alternate intervascular pits. Axial P was scarce, and the rays were wide and mostly lignified. The species of *Cylindropuntia* (Figure 1.1F) and *Pereskia* had this pattern.

The most conspicuous difference was in the correlation of the matrices in which Vs were embedded with the accumulation of secondary tissue in their walls, grading from annular to alternate intervascular pits with the more lignified walls in all types of wood.

Principal components: The first three components explained 93.8% of the total variation among species (Table 1.5). The first component was mostly determined by the percentage of lignin, followed by that of extractive compounds with ethanol (96%). The variables that determined the second component were the ethanol-benzene extract and extractive-free wood, and the third component was determined by the percentage of cellulose. The ordination of these three components separated the fibrous and dimorphic species, which had the highest accumulation of lignin and the highest percentages of extractive-free wood (Figure 1.2). The species of other genera were located on the positive axes and corresponded to non-fibrous species with less lignin; notably, *Ariocarpus retusus* and *Ferocactus hamatacanthus* were distinct from the other species with non-fibrous wood.

Table 1.5. Vectors, eigenvalues and cumulative proportion of the variation explained by each variable.

Variables	PC1	PC2	PC3
Ethanol-Benzene (1:2 v/v)	-0.155	-0.628	0.497
Ethanol 96 %	0.416	0.320	-0.227
Water 90 °C	0.379	-0.352	-0.461
Extractive-free wood	-0.375	0.480	0.214
Cellulose	0.381	0.157	0.568
Lignin	-0.451	0.209	-0.220
Hemicellulose	0.412	0.285	0.268
Eigen value	4.012	1.644	0.911
Variance (%)	57.3	23.5	13.0
Accumulative variance (%)	57.3	80.8	93.8

1.5 DISCUSSION

The results of this study confirmed that species with different types of wood show variations in their chemical composition (Tables 1.2-1.4). The variation within genera was high when more than three species represented a genus, e.g., *Coryphantha*, or when the samples came from different localities, e.g., *Cylindropuntia imbricata* and *Pereskia lychnidiflora* (compare the values of this work with those of Reyes-Rivera *et al.* ^[19]). Additionally, the contents of lignin, cellulose and

extractive compounds of Cactaceae were different from those of gymnosperms and other angiosperms reported in other studies (Appendix 2.1).

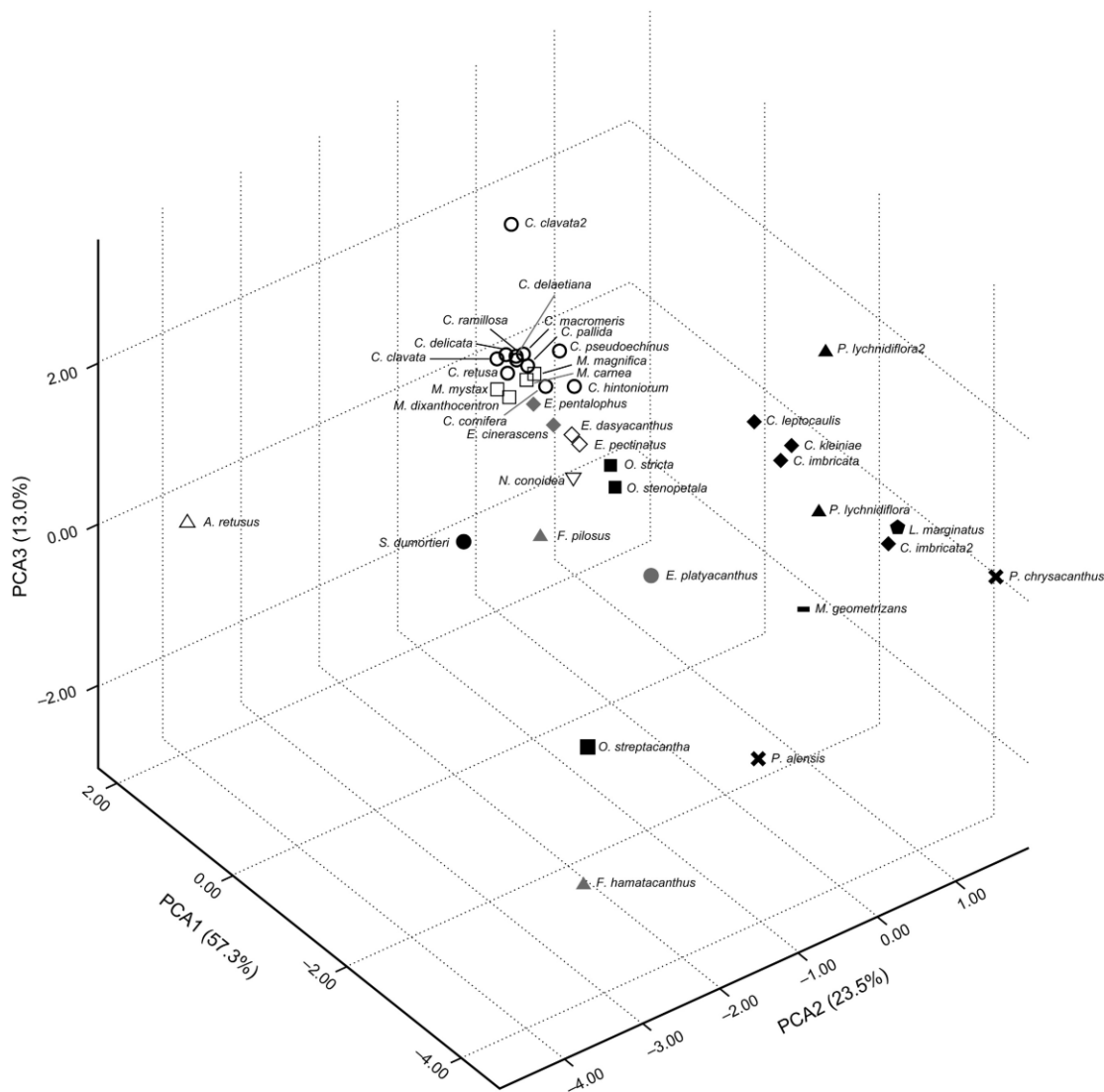


Figure 1.2. Three-plot resulting of the principal component analysis of 25 species of Cactaceae based on wood chemical compounds. Black figures are fibrous species, grey figures are dimorphic wood and empty figures are non-fibrous species.

Chemical composition. The chemical composition significantly differed between species with fibrous and non-fibrous wood. Among species with dimorphic wood, the differences compared with non-fibrous species, specifically in lignin content, were less notable. Additionally, the content of extractive compounds in water also showed differences between *Cylindropuntia* and *Opuntia* species because the genus *Opuntia* had unligified P cells and wide rays with abundant

mucilaginous cells and druses, whereas in *Cylindropuntia*, the P cells were lignified, and the rays were narrow.

The differences in wood composition were partially reflected in the contents of the extractive compounds, with different solvents with specific chemical characteristics extracting different compounds. The mixture of ethanol and benzene, because of lower polarity, solubilizes phenolic compounds [36], aldehydes, alcohols, paraffin, sulfones and some organic acids [37,38]. Ethanol at 96% has a higher polarity than that of the previous mixture but lower than that of water and extracts phenolic and polar compounds [39]. Water at 90 °C, with high polarity, solubilizes and extracts mineral salts, starch, gums and tannins [40,41]. Among the differences in composition among the studied genera were the presence and content of some compounds, such as mucilage and starch, which were the polysaccharides observed in the anatomical sections. None of the species showed phenolic compounds in their cell lumina.

Wood anatomy. Four patterns of wood were identified based on differences in the cell-type matrix. In the fibrous species of *Pereskia*, *Cylindropuntia* and *Opuntia*, differences corresponded to variations in the axial and radial P. In *Pereskia* and *Cylindropuntia*, the P was mostly lignified, and the rays were narrow, whereas in *Opuntia*, both Ps were unlignified and the rays were very wide, with large mucilaginous cells, very similar to those reported by Conde [42] and Gibson [43,44] for other species of both genera.

Among the non-fibrous species, the primary difference was the type of secondary wall pattern. In some species, such as *Coryphantha delicata* and *C. hinteriorum*, annular and helical wall thickenings were observed in WBT and V elements; in other species, such as *C. delaetiana* and *C. macromeris*, only helical wall thickenings were observed (Figure 1.1). In dimorphic species, the F and the change to reticulate or pseudoscalariform pits in the V elements and the absence of WBT were the primary differences.

The similarity of non-fibrous wood in *Coryphantha*, *Mammillaria* and *Neolloydia* species was reported in Vázquez-Sánchez *et al.* [17]. Those authors showed that the anatomy and morphology of these genera are very similar, and their phylogenetic relationship is close. The anatomy described in the present study is congruent with that documented for species of the same genera or phylogenetically related genera [27,42,45-47]. In this study, we emphasized the matrix

differences in which the Vs were embedded and the secondary wall features of the tracheary elements that varied in relation to matrix composition.

Chemical composition among cacti. The percentages of extractive-free wood differed from those reported by Seegmiller *et al.* [32], with their percentages lower than those obtained in this work. The differences might be because those authors analyzed the complete stem of *Ferocactus* sp., *Mammillaria microcarpa* and *Cylindropuntia acanthocarpa* (Appendix 2.2); therefore, the content of total extractive and hemicellulose compounds was higher because of the abundant cortical P and mucilage. The lignin and cellulose contents are lower when the complete stem is included in the analysis.

For *Opuntia ficus-indica*, Nefzaoui and Salem [46] reported cellulose, hemicellulose and lignin contents of 11, 18 and 3.9%, respectively. By contrast, Mannai *et al.* [48] found that for the cladodes of the same species, the cellulose, hemicellulose and lignin contents were 53.6, 10.9 and 4.8%, respectively (Appendix 2.2). The results of both studies differed significantly from our results; in this study, we specifically analyzed the wood of the *Opuntia* species, and the abundant cortical tissue was not included.

Our results are consistent with those of Reyes-Rivera *et al.* [19]. As revealed by the principal components analysis (PCA) (Table 1.5), the species grouping was based primarily on the lignin percentage because the species with fibrous wood and several dimorphic species had a greater accumulation of lignin than the non-fibrous wood species and the species of *Echinocereus* with dimorphic wood. Lignin is one of the most important variables of Cactaceae based on the cell type in the wood. For example, in the fibrous species, such as *Pereskia* [47] and *Cylindropuntia*, F predominated, and most cells were completely lignified, except for a few unlignified ray cells. For *Opuntia*, although the Vs were immersed in F, the P was unlignified, with very wide rays and abundant mucilage; therefore, two of the species studied in this genus were close to non-fibrous or dimorphic species in PC1 and were short shrubs.

For non-fibrous species, the accumulation of lignin depends on the types of the secondary walls of V elements and WBTs because reticular or helical secondary walls may be in Vs or helical and annular secondary walls in WBTs [16,27,49]. The abundance of any of these types of secondary wall thickening affects the lignin content of wood. Differences and similarities were observed in the anatomical sections (Figure 1.1), and some species of *Coryphantha*, *Echinocereus* and

Mammillaria were very similar in composition, whereas others differed significantly. In this regard, the similarity between *Echinocereus* and the other two non-fibrous genera was notable because the genus belongs to a different tribe. *Echinocereus* is part of the tribe of Echinocereeae in which most genera of North American columnar species with fibrous wood are classified. However, in *Echinocereus*, WBTs predominate, showing groups of F close to the vascular cambium only in a few species [30].

The difference was large between genera with dimorphic wood, such as *Echinocactus* and *Ferocactus*, and *Echinocereus* because of differences in anatomy and lignin accumulation. For *Echinocactus platyacanthus*, the transition from non-fibrous to fibrous wood was rapid; thus, in the cell matrix, the Vs were immersed in F, and the V pitting was pseudoscalariform. For *Ferocactus*, the transition from non-fibrous to fibrous wood was gradual; thus, the cell matrix had similar proportions of WBT and F when the fibrous phase began, and the transition from helical to pseudoscalariform pits was distinctive. In the case of *Echinocereus*, as mentioned above, F was scarce, and therefore, WBTs predominated, and Vs maintained their helical cell walls (Figure 1.1E, F)

The individuals of *Coryphantha clavata*, *Cylindropuntia imbricata* and *Pereskia lychnidiflora* that were analyzed in this study were not grouped with the individuals of the same species reported by Reyes-Rivera *et al.* [19]. This difference might be because in the two studies, different individuals from different localities were analyzed, and the results showed interspecific variation. Other species with fibrous wood or with abundant tracheids have similar behavior [34].

The total content of extractive compounds and extractive compounds in water at 90 °C also determined the variation within species, which may be related to the content of mucilage in the wood [50] because these polysaccharides are solubilized in hot water [51-53]. The amount of mucilage in vascular tissue affects the percentage of extractive compounds in hot water; therefore, species with large amounts of mucilage were in the genera *Coryphantha* and *Echinocereus* and were followed by the *Opuntia* species. The mucilage was observed primarily in the unlignified rays in which it was abundant.

The extractive-free wood contains cellulose, hemicellulose and lignin, which remain attached and form the primary structures of the cell walls of the secondary xylem. These three components are called lignocellulosic compounds [54]. Lignin was the variable that had the greatest

effect on wood variation among the Cactaceae species. The aforementioned structures were in contrast to cellulose and hemicellulose, which showed less variation among taxa, but in some genera, this variation was greater, such as *Coryphantha* and *Pilosocereus*, according to Reyes *et al.* ^[19]. Among the other contents of extractive compounds, only those obtained with concentrated ethanol affected the variation across the species, whereas those corresponding to concentrated ethanol-benzene had minor influence according to the PCA (Table 1.5).

Compared with other taxonomic groups, the percentages shown for the 25 species of Cactaceae are consistent with the values of extractives in ethanol-benzene but differed in water at 90 °C by more than twofold, possibly due to the abundant mucilage in some of the cacti studied. The cellulose contents were in the range of those reported for grass species (Poaceae) but were low compared with those of other Eudicotyledons and gymnosperms (Table A1.7). The percentage of lignin in the non-fibrous species was similar to that in some hardwoods, such as *Acer* and *Populus*. Of the fibrous species, *Opuntia* was within the range reported for *Gigantochloa* (bamboo); *Cylindropuntia* was in the range of some gymnosperm species, particularly *Tsuga* (Table A1.7); and *Pereskia lychnidiflora* had the highest lignin values, even higher than those of the hardwood and softwood species.

The high percentages of lignin obtained by Reyes-Rivera *et al.* ^[19] could be a unique characteristic of species with large stems, which have more lignin. Another possible explanation may be the overestimation of Klason lignin, as noted by Dence ^[55]. This author considered that factors such as the concentration, low or high, of sulfuric acid; the elevated temperature during hydrolysis; or a longer time in reflux might cause the structural modification of the celluloses, which prevents them from being solubilized with sulfuric acid. Therefore, these celluloses are added to lignin, leading to overestimation of the percentages of lignin. However, additional studies with other tree-like species of cacti are required to support the values reported by Reyes-Rivera *et al.* ^[19].

Based on the results of PCA, although marked differences were observed across the fibrous, non-fibrous and dimorphic species due to the Klason lignin percentage, variation also occurred among species of the same genus. This was the case for *Coryphantha*, *Mammillaria* and *Echinocereus* (Figure 1.1), which was primarily due to the differences in the type of wood and the different proportions and types of thickening of the secondary walls of WBTs, Vs and F. The

variation among species of the same genus is consistent with that described by Pettersen ^[33], Seegmiller *et al.* ^[32], Escamilla-Treviño ^[31] and Wahab *et al.* ^[34] in genera of other taxonomic groups (Table A1.7). Moreover, dimorphic woods grouped with fibrous ones in the case of *Echinocactus* and *Ferocactus*, whereas *Ariocarpus*, which is non-fibrous, was separated from the other non-fibrous species, which might be related to the very low content of lignin.

1.6 CONCLUSIONS

Among the chemical compounds that compose the secondary xylem structure, lignin is the primary component that differentiates among fibrous, non-fibrous and dimorphic wood types. The importance of lignin is due to the type of cells that form the primary matrix of wood (F, WBT) and the thickenings of the cell walls of WBT (helical or annular) and V elements (annular, helical, reticulate, pseudoscalariform or alternate pitting). The lignification of the vascular tissue plays an important role in the adaptation of a species to the climatic conditions of its habitat. The non-fibrous species are notable because, despite their low lignin content, the limited accumulation of cell wall thickenings, helical and annular, confers rigidity to the cellular structure, which allows them to withstand adverse climatic conditions.

1.7 EXPERIMENTAL SECTION

Complete adult, healthy and reproductive plants of twenty-five species were collected in their natural distribution areas during 2015, except for *Pereskia*, whose sample was an old branch (Table 1.6). Cacti were maintained at the Botanical Garden of the National Autonomous University of Mexico until the analyses were performed. For each species collected, a voucher was prepared and housed at the National Mexican Herbarium (MEXU). The selected species represented the three subfamilies (Pereskioideae, Opuntioideae and Cactoideae) of Cactaceae. Cactoideae is the subfamily with the most non-fibrous and dimorphic species.

Table 1.6. Species studied by subfamily and tribe with collection number, type of wood and growth form. Growth form follows Vázquez-Sánchez *et al.*'s (56) proposal. The vouchers were deposited at MEXU and the initial collectors were BV = Balbina Vázquez; SA = Salvador Arias; HSM = Hernando Sánchez-Mejorada; UG = Ulises Guzmán; DA = David Aquino; CPNL = Carmen P. Novoa. Species identification was verified by SA.

Subfamily (tribe) – Species	Collector number	Type of wood	Stem*	Size category
Cactoideae (Cactaceae)				
<i>Coryphantha clavata</i> (Scheidw.) Backeb.	BV2535	Non-fibrous	Cylindric	Small
<i>C. cornifera</i> (DC.) Lem.	BV2534	Dimorphic	Cylindric	Small
<i>C. delaetiana</i> (Quehl) A.Berger	BV2542	Non-fibrous	Globose	Small
<i>C. delicata</i> L.Bremer	SA1927	Non-fibrous	Cylindric	Small
<i>C. hintoniorum</i> Dicht & A.Lüthy	BV2539	Non-fibrous	Cylindric	Small
<i>C. macromeris</i> (Engelmann) Lemaire	BV2600	Non-fibrous	Globose	Small
<i>C. pallida</i> Britton & Rose	SA860	Non-fibrous	Globose	Small
<i>C. pseudoechinus</i> Boed.	BV2543	Non-fibrous	Cylindric	Small
<i>C. ramillosa</i> Cutak	HSM3775	Non-fibrous	Globose	Small
<i>C. retusa</i> Britton & Rose	SG 55	Non-fibrous	Globose	Small
<i>Mammillaria carnea</i>	DA 241	Non-fibrous	Cylindric	Small
<i>M. dixanthocentron</i> Backeb. ex Mottram	CPNL133	Non-fibrous	Cylindric	Small
<i>M. magnifica</i> Buchenau	UG1411	Non-fibrous	Columnar	Small
<i>M. mystax</i> Mart.	DA238	Non-fibrous	Cylindric	Small
<i>Neolloydia conoidea</i> (DC.) Britton & Rose	BV2595	Non-fibrous	Cylindric	Small
Cactoideae (Echinocereae)				
<i>Echinocereus cinerascens</i> (DC.) Lem. subsp. <i>tulensis</i>	SA1744	Dimorphic	Cylindric	Small
<i>E. dasyacanthus</i> Engelm.	SA2077	Dimorphic	Cylindric	Small
<i>E. pectinatus</i> (Scheidw.) Engelm.	SA1918	Dimorphic	Cylindric	Small
<i>E. pentalophus</i> (DC.) Lem.	SA1740	Non-fibrous	Cylindric	Small
Opuntioideae				
<i>Cylindropuntia imbricata</i> (Haw.) F.M.Knuth	TT990	Fibrous	Tree	Medium
<i>C. kleiniae</i> (DC.) F.M.Knuth	TT1000	Fibrous	Shrub	Medium
<i>C. leptocaulis</i> (DC.) F.M.Knuth	TT994	Fibrous	Shrub	Medium
<i>Opuntia stenopetala</i> Lem.	TT997	Fibrous	Shrub	Medium

<i>O. stricta</i> (Haw.) Haw.	TT998	Fibrous	Shrub	Medium
Pereskioideae				
<i>Pereskia lychnidiflora</i> DC.	TT967	Fibrous	Tree	Tall

Wood anatomy. Most of the wood samples were fixed and embedded in paraffin according to the procedure of Loza-Cornejo and Terrazas [57], except for *Cylindropuntia* and *Pereskia*, for which we used the sliding microtome and followed the standard protocols [58]. Both cross and tangential sections 12–20 μm thick were prepared and stained with safranin-fast green to confirm the cell types. Additionally, the species studied were grouped based on their anatomical features, which we related to their chemical composition.

Depending on the size of the plant, the portion used for chemical analysis varied. For small species (< 50 cm in height), we removed the epidermis and cortical tissue of the stems, and the complete vascular cylinder and the pith were maintained because small species develop little wood. For medium species (0.5–1.5 m in height) and large species (> 1.5 m in height), only the wood of the basal part of the plant was used as reported by Reyes-Rivera *et al.* [19]. From the isolated wood, a small portion was separated for the anatomical evaluation, and the rest was used for chemical analysis

Drying of the wood. The wood samples were dehydrated at 50 °C for 72 h; the dry wood was ground in a Wiley mill and passed through a mesh with a pore size of 400 to 600 μm to produce sawdust. This particle size resulted in the highest extraction of cellular contents [34,59]. Sawdust samples were stored in a desiccator until chemical analyses were performed.

Extractable compounds of wood. The extractive compounds were obtained with the method indicated in the standard T204 cm-97 [34,59,60]. Each sawdust sample was kept at 60 °C for 4 h; then, 2 g was placed in filter paper cartridges and dried for 12 h, and the weight of each sample was recorded. Each cartridge was subjected to sequential Soxhlet extraction with ethanol-benzene (v/v, 1:2) and ethanol (96%) for 6 h in each case. The cartridges were dried for 12 h, and their weight was recorded. The sample was removed from the cartridge and refluxed with distilled water at 95 °C for 1 h, filtered on a Büchner filter with a medium pore, dehydrated at 105 °C for 12 h and weighed. The process was conducted in triplicate for each sample. The extractive-free fraction was used for the chemical analyses based on the method proposed by Reyes-Rivera *et al.* [19].

The percentage of compounds soluble in ethanol-benzene (v/v, 1:2), soluble in 96% ethanol, and soluble in distilled water at 95 °C was quantified. The percentage of wood extractives was calculated according to the weight lost in each extraction with the following formula ^[59]:

$$\text{Extractable compounds (\%)} = [(A + B + C) / W_0] \times 100$$

where A is the lost weight (g) after extraction with the ethanol-benzene mixture (2:1), B is the lost weight (g) after extraction with ethanol (96%), C is the lost weight (g) after extraction with hot water, and W₀ is the initial weight of the sample (g).

Klason Lignin. The Klason lignin was determined according to the TAPPI Standard T-222 om-02 method ^[60], which has been used in other studies ^[34,55,61-63]. To 0.3 g of the extractive-free wood, a solution (3 mL) of 72% sulfuric acid in water was added, kept at 18 °C for 2 h and stirred every 30 min. With this procedure, the cellulose and hemicelluloses of the sample hydrolyze. Each sample was diluted with distilled water (84 mL) and kept boiling for 4 h at constant volume. The lignin was separated with a Büchner glass funnel of fine pore and dried at 105 °C for 12 h; the constant weight was recorded. The percentage of lignin was calculated with the following formula ^[59]:

$$\text{Lignin (\%)} = (W_L / W_w) \times 100$$

where W_L is the weight (g) of the lignin, and W_w is the weight (g) of the sample of extractive-free wood.

Cellulose and hemicelluloses. Cellulose was extracted with the Kûrshner-Höffer method, and hemicellulose was estimated by the difference between 100% and the sum of the cellulose and lignin percentages ^[61]. To 0.1 g of extractive-free wood, 2.5 mL of HNO₃:ethanol (v/v, 1:4) was added and kept under reflux in a boiling water bath for 1 h. The sample was decanted to discard the HNO₃-ethanol mixture. This extraction was performed three times; then, 2.5 mL of 1% KOH in water was added, the sample was kept in reflux for 30 min, and the cellulose was obtained by filtering with a Büchner filter. The cellulose was dried for 12 h at 50 °C, and the constant weight was recorded. The percentage of cellulose was calculated with the following formula ^[55]:

$$\text{Cellulose (\%)} = (W_C / W_w) \times 100$$

where WC is the weight (g) of the cellulose, and WW is the weight (g) of the extractive-free wood sample.

The hemicelluloses were calculated with the following formula:

$$\text{Hemicelluloses (\%)} = 100 - (\text{cellulose (\%)} + \text{lignin (\%)})$$

Statistical analyses. For each species used in the analysis, three repetitions were performed to provide the necessary data to perform the statistical tests. The Kolmogorov-Smirnov and Shapiro-Wilk analyses showed that the percentage data, transformed with the square root of the arch-sinus, did not show normality. Therefore, the nonparametric Kruskal-Wallis test was used to determine whether the differences among the species were significant. A second Kruskal-Wallis test was also used to determine differences among genera and was followed by Duncan's multiple range tests to determine which pairs were different. The results of this study contrasted with those of other taxonomic groups in the literature. Through PCA, we identified the variables that best explained the differences among species. In this PCA, in addition to the 25 species studied here, the 13 reported by Reyes-Rivera *et al.* ^[19] were incorporated.

1.8 ACKNOWLEDGEMENTS

Funding was provided by the Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, DGAPA, Universidad Nacional Autónoma de México Project IN210115 to TT and by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACYT, Ph.D. scholarship 103022 to AM. We are grateful to Salvador Arias who identified and donated us part of the plants to complement our study. We also thank our institutions for facilities and to Julio César Montero-Rojas for artwork.

1.9 AUTHOR CONTRIBUTION

TT and AM designed the work, AM, MSH, TT and CP performed the experiments and analyzed the data, AM and TT wrote the manuscript. All the authors read and approved the manuscript.

1.10 APPENDIX

Table A1.7. Percentage of wood chemical components in species of different taxonomic groups available in the literature.

Species	Extractive in ethanol- benzene	Extractive in water 90 °C	Total extractive compounds	Cellulose	Lignin	Hemi- cellulos e	Referen- ce
<i>Agave</i> spp.	-	-	4-12	65-84	7-16	3-10	[31]
<i>Acacia greggii</i>	-	-	57-67	20-27	6-9	1-6	[32]
<i>Acer</i> spp.	2-3	2-4	-	56-61	21-30	-	[33]
<i>Erigonum fasciculatum</i>	-	-	49-59	8-30	9-13	3-20	[32]
<i>Fraxinus</i> spp.	5	7	-	51-53	26	-	[33]
<i>Gigantochloa brang</i>	-	-	8-9.23	34-52	25-33	-	[34]
<i>Hilaria rigida</i>	-	-	23-30	31-38	8-9	22-29	[32]
<i>Populus</i> spp.	2-5	2-4	-	64-67	16-23	-	[33]
<i>Quercus</i> spp.	3-7	5-11	-	48-57	18-28	-	[33]
<i>Quercus turbinella</i>	-	-	40-47	25-36	10-12	11-22	[32]
<i>Saccharum officinarum</i>	-	-	2.14	35.28	25.2	33.28	[35]
<i>Abies</i> spp.	2-3	2-5	-	58-61	29	-	[33]
<i>Picea</i> spp.	2-4	2-4	-	60-62	27-29	-	[33]
<i>Pinus</i> spp.	1-6	2-4	-	45-61	26-30	-	[33]
<i>Tsuga</i> spp.	3-5	4-5	-	55-58	27-38	-	[33]

Table A1.8. Percentage of wood chemical components in cacti species available in the literature.

Species	Total extractives	Cellulose	Lignin	Hemicellulose	Reference
<i>Ariocarpus retusus</i>	39.4	31	13.7	15.9	[19]
<i>Coryphantha clavata</i>	22.7	41.7	14.2	21.4	[19]
<i>Echinocactus platyacanthus</i>	15.7	22	51.8	10.5	[19]
<i>Ferocactus hamatacanthus</i>	28.6	12.2	54.4	4.8	[19]
<i>Ferocactus pilosus</i>	24.2	17.4	49.8	8.6	[19]
<i>Ferocactus</i> sp.	44.4-56.8	16.6-29.6	3.4 -9.5	11.1-26.4	[32]
<i>Cylindropuntia acantocarpa</i>	53.4-65.4	17.5-24.1	2.28-3.77	10.8-24.6	[32]
<i>Cylindropuntia imbricata</i>	12.4	23.8	51.3	12.6	[19]
<i>Lophocereus marginatus</i>	11.1	25.5	49.9	13.5	[19]
<i>Mammillaria microcarpa</i>	35.2-45.8	17.4-22.0	4.8-7.8	25.2-32.9	[32]
<i>Myrtillocactus geometrizans</i>	11.6	21	56.3	11.1	[19]
<i>Opuntia ficus-indica</i>	-	11-53.6	3.9-4.8	10.9-18	[46, 48]
<i>Opuntia streptacantha</i>	28	17.6	45.1	9.3	[19]
<i>Pereskia lychnidiflora</i>	11.4	34.4	36	18.2	[19]
<i>Pilosocereus alensis</i>	20.6	17.2	53.1	9.1	[19]
<i>Pilosocereus chrysacanthus</i>	7.7	23.2	56.8	12.3	[19]

1.11 REFERENCES

- [1] S. Szczukowski, J. Tworkowski, A. Klasa, M. Stolarski, 'Productivity and chemical composition of wood tissues of short rotation willow coppice cultivated on arable land', *Rost. Vyroba*, **2002**, *48*, 413-417.
- [2] E. Serafimova, M. Mladenov, I. Mihailova, Y. Pelovski, 'Study on the characteristics of waste wood ash', *J. Chem. Technol. Metall.*, **2011**, *46*, 31-34.
- [3] M. Ioelovich, 'Methods for determination of chemical composition of biomass', *J. SITA*, **2015**, *17*, 208-214.
- [4] H. T. Sahin, M. B. Arslan, 'A study on physical and chemical properties of cellulose paper immersed in various solvent mixtures', *Int. J. Mol. Sci.*, **2008**, *9*, 78-88.
- [5] K. O. Reddy, C. U. Maheswari, M. Shukla, E. Muzenda, 'Preparation, chemical composition, characterization, and properties of Napier grass paper sheets', *Sep. Sci. Technol.*, **2014**, *49*, 1527-1534.
- [6] C. Peña-Valdivia, C. Trejo, V. B. Arroyo-Peña, A. B. Sánchez-Urdaneta, R. Balois-Morales, 'Diversity of unavailable polysaccharides and dietary fiber in domesticated nopalito and cactus pear fruit (*Opuntia* spp.)', *Chem. Biodivers.*, **2012**, *9*, 1599-1610.
- [7] E. Sepúlveda, C. Sáenz, E. Aliaga, C. Aceituno, 'Extraction and characterization of mucilage in *Opuntia* spp.', *J. Arid. Environ.*, **2007**, *68*, 534-545.
- [8] Y. Jyh-Ferng, Y. Cheng-Hong, L. Ming-Tsai, G. Zi-Jie, W. Yuh-Wern, C. Li-Yeh, 'Chemical composition, antioxidant, and antibacterial activity of wood vinegar from *Litchi chinensis*', *Molecules*, **2016**, *21*, 1 - 10.
- [9] A. Pawlicka, B. Waliszewska, 'Chemical composition of selected species of exotic wood derived from the region of Africa', *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.*, **2011**, *10*, 37-41.
- [10] J. A. Honorato-Salazar, F. Apolinar-Hidalgo, G. Colotl-Hernández, 'Composición lignocelulósica de *Pinus ayacahuite* Ehrenb. Ex Schltld., *P. leiophylla* Schlecht. & Cham. Y *P. herrerae* Martínez', *Rev. Mex. Cien. For.*, **2016**, *7*, 47-56.
- [11] M. Kiaei, S. Mahdavi, A. Kialashaki, M. Nemati, A. Samariha, A. Saghafi, 'Chemical composition and morphological properties of canola plant and its potential application in pulp and paper industry', *Cellul. Chem. Technol.*, **2014**, *48*, 105-110.
- [12] G. Ginestra, M. L. Parker, R. N. Bennett, J. Robertson, G. Mandalari, A. Narbad, R. B. Lo-Curto, G. Bisignano, C. B. Faulds, K. W. Waldron, 'Anatomical, chemical, and biomechanical characterization of cladodes from prickly Pear [*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill]', *J. Agric. Food Chemistry*, **2009**, *57*, 10323-10330.
- [13] G. Maki-Díaz, C. B. Peña-Valdivia, R. García-Nava, M. L. Arévalo-Galarza, G. Calderón-Zavala, S. Anaya-Rosales, 'Características físicas y químicas de nopal verdura (*Opuntia ficus-indica*) para exportación y consumo nacional', *Agrociencias*, **2015**, *49*, 31-51.

- [14] J. D. Mauseth, 'Structure-function relationships in highly modified shoots of Cactaceae', *Ann. Bot.*, **2006**, *98*, 901-926.
- [15] J. D. Mauseth, B. J. Plemons-Rodríguez, 'Evolution of extreme xeromorphic characters in wood: a study of nine evolutionary lines in Cactaceae', *Am. J. Bot.*, **1998**, *85*, 209-218.
- [16] J. D. Mauseth, 'Wide-band tracheids are present in almost all species of Cactaceae', *J. Plant. Res.*, **2004**, *117*, 69-76.
- [17] M. Vázquez-Sánchez, T. Terrazas, D. Grego-Valencia, S. Arias, 'Growth form and wood evolution in the tribe Cacteeae (Cactaceae)', *Willdenowia*, **2017**, *47*, 49-67.
- [18] J. D. Mauseth, B. J. Plemons, 'Developmentally variable, polymorphic woods in cacti. *Am. J. Bot.*, **1995**, *82*, 1199-1205.
- [19] J. Reyes-Rivera, G. Canché-Escamilla, M. Soto-Hernández, T. Terrazas, 'Wood chemical composition in species of Cactaceae: the relationship between lignification and stem morphology', *PLoS ONE*, **2015**, *10*, e0123919.
- [20] J. D. Mauseth, Y. Uozumi, B. J. Plemons, J. V. Landrum, 'Structural and systematic study of an unusual tracheid type in cacti', *J. Plant Res.*, **1995**, *108*, 517-526.
- [21] J. D. Mauseth, B. J. Plemons-Rodríguez, 'Presence of paratracheal water storage tissue does not alter vessel characters in cactus wood', *Am. J. Bot.*, **1997**, *84*, 815-822.
- [22] J. V. Landrum, 'Wide-band tracheids in genera of Portulacaceae: novel, non-xylary tracheids possibly evolved as an adaptation to water stress', *J. Plant. Res.*, **2006**, *119*, 497-504.
- [23] T. Y. Garret, C. V. Huynh, G. B. North, 'Root contraction helps protect the "living rock" cactus *Ariocarpus fissuratus* from lethal high temperatures when growing in rocky soil', *Am. J. Bot.*, **2010**, *97*, 1951-1960.
- [24] D. Grego-Valencia, T. Terrazas, R. Lara-Martínez, L. F. Jiménez-García, 'La membrana de la punteadura en dos especies de Cacteeae, Cactaceae', *Bot. Sci.*, **2015**, *93*, 1-11.
- [25] S. Loza-Cornejo, T. Terrazas, L. López-Mata, C. Trejo, 'Características morfo-anatómicas y metabolismo fotosintético de plántulas de *Stenocereus queretaroensis* (Cactaceae): su significado adaptativo', *Interciencia*, **2003**, *28*, 83-89.
- [26] V. J. Cenizo, M. B. Mazzola, B. M. Corró-Molas, A. G. Kin, 'Características morfológicas y anatómicas de las plántulas de *Trichocereus candicans* (Cactaceae)', *Bol. Soc. Argent. Bot.*, **2013**, *48*, 3-4.
- [27] T. Terrazas, R. Escamilla-Molina, M. Vázquez-Sánchez, 'Variation in the tracheary elements in species of *Coryphantha* (Cacteeae-Cactoideae) with contrasting morphology: the bottleneck model', *Braz. J. Bot.*, **2016**, *39*, 669-678.
- [28] D. Sánchez, S. Arias, T. Terrazas, 'Phylogenetic relationships in *Echinocereus* (Cactaceae, Cactoideae)', *Syst. Bot.*, **2014**, *39*, 1183-1196.
- [29] D. Sánchez, D. Grego-Valencia, T. Terrazas, S. Arias, 'How and why does the areole meristem move in *Echinocereus* (Cactaceae)?', *Ann. Bot.*, **2015**, *115*, 19-26.

- [30] D. Sánchez, T. Terrazas, D. Grego-Valencia, S. Arias, ‘Phylogeny in *Echinocereus* (Cactaceae) based on combined morphological and molecular evidence: taxonomic implications’, *Syst. Biodivers.*, **2017**, *16*, 28-44.
- [31] L. L. Escamilla-Treviño, ‘Potential of plants forms the genus *Agave* as Bioenergy crops. *Bioenergy Res.*, **2012**, *5*, 1-9.
- [32] R. F. Seegmiller, P. R. Krausman, W. H. Brown, F. M. Whiting, ‘Nutritional composition of desert Bighorn Sheep forage in the Harquahala Mountains, Arizona’, *Desert Plants*, **1990**, *10*, 87-90.
- [33] R. G. Pettersen, in ‘The chemistry of solid wood. Advances in chemistry series’, Ed. R. M. Rowell, Washintong, **1984**, pp. 57-126.
- [34] R. Wahab, M. T. Mustafa, M. Sudin, A. Mohamed, S. Rahman, H. W. Samsi, I. Khalid, Extractives, Hollocellulose, α -Cellulose, lignin and ash contents in cultivated tropical bamboo *Gigantochloa brang*, *G. levis*, *G. scortechinii* and *G. wrayi*’, *Curr. Res. J. Biol. Sci.*, **2013**, *5*, 266-272.
- [35] A. O. Ayeni, O. A. Adeeyo, O. M. Oresegun, T. E. Oladimeji, ‘Compositional analysis of lignocellulosic materials: evaluation of an economically viable method suitable for woody and non-woody biomass’, *Am. J. Eng. Res.*, **2015**, *4*, 14-19.
- [36] J. O. Vargas-Muñoz, in ‘Comportamiento de algunos extractos de la corteza de pino Caribe (*Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis* Barret & Golfari) sobre el crecimiento de hongos xilofagos y su acción antioxidante, Ed. J. O. Vargas-Muñoz, Bolivia, **2008**, p. 5-65.
- [37] W. Lansheng, P. Wanxi, L. Zhi, T. Yueping, S. Liwen, ‘Analysis on molecular characteristics of wood extractives from *Eucalyptus urophydis* biomass’, *Biotechnol. Indian J.*, **2013**, *7*, 559-564.
- [38] R. Hernández-Sánchez, L. Lami-Izquierdo, J. Pino-Olea, A. Cámara-Pérez, Y. Martínez-Pérez, ‘Identificación básica de extractives en alcohol benceno del bagazo de la caña de azúcar mediante CG/EM’, *ICIDCA*, **2014**, *48*, 16-20.
- [39] R. H. R. Carvalho, E. L. Galvão, A. C. Barros, M. M. Conceicao, E. M. B. D. Sousa, ‘Extraction, fatty acid profile and antioxidant activity of sesame extract (*Sesamum indicum* L.)’, *Braz. J. Chem. Eng.*, **2012**, *29*, 409-420.
- [40] A. N. Shebani, A. J. Reenen, M. Meincken, ‘The effect of wood extractives on the thermal stability of different wood-LLDPE composites’, *Thermochim. Acta*, **2009**, *481*, 52-56.
- [41] M. L. Campaña, A. Tijero, R. Aguado, M. M. López, A. Moral, ‘Biorrefinería de residuos de marea. Obtención de celulosa de alta pureza’, *Biosaia.*, **2014**, *3*, 1-3.
- [42] F. L. Conde, ‘Anatomical comparisons of five species of *Opuntia* (Cactaceae)’, *Ann. Miss. Bot. Garden*, **1975**, *62*, 425-473.
- [43] A. C. Gibson, ‘Wood anatomy of puntias with cylindrical to globular stems’, *Bot. Gaz.*, **1977**, *138*, 334-351.
- [44] A. C. Gibson, ‘Woody anatomy of platyopuntias’, *Aliso.*, **1978**, *9*, 279-307.

- [45] A. C. Gibson, 'Comparative anatomy of secondary xylem in Cactoideae (Cactaceae)', *Biotropica*, **1973**, 5, 29-65.
- [46] E. G. Bobich, S. N. Park, 'Biomechanics and anatomy of cladode junctions for two *Opuntia* (Cactaceae) species and their hybrid', *Am. J. Bot.*, **2001**, 88, 391-400.
- [45] S. Loza-Cornejo, X. Aparicio-Fernández, R. J. Patakafalvi, G. H. Rosas-Saito, 'Caracteres anatómicos y fitoquímicos del talo y raíz de *Mammillaria uncinata* (Cactaceae)', *Acta. Bot. Mex.*, **2017**, 120, 21-38.
- [46] A. Nefzaoui, H. B. Salem, in 'Cacti. Biology and uses', Ed. P. S. Nobel, California, **2002**, p. 199-210.
- [47] J. D. Mauseth, J. V. Landrum, 'Relictual vegetative anatomical characters in Cactaceae: the genus *Pereskia*', *J. Plant Res.*, **1997**, 110, 55-64.
- [48] F. Mannai, M. Ammar, J. Garrido-Yanez, E. Elaloui, Y. Moussaoui, 'Cellulose fiber from Tunisian Barbary Fig "*Opuntia ficus-indica*" for papermaking', *Cellulose*, **2016**, 23, 2061-2072.
- [49] T. Terrazas-Salgado, J. D. Mauseth, in 'Cacti. Biology and uses', Ed. P. S. Nobel, California, **2002**, p. 23-40.
- [50] P. S. Nobel, J. Cavelier, J. L. Andrade, 'Mucilage in cacti: its apoplastic capacitance, associated solutes, and influence on tissue water relations' *J. Exp. Bot.*, **1992**, 43, 641-648.
- [51] E. L. Hirst, J. K. N. Jones, in 'Modern methods of plant analysis', Ed K. Paech, M. V. Tracey, Berlin, **1955**, p. 275-294.
- [52] C. A. Alalor, J. A. Avbunudiogba, K. Augustine, 'Isolation and characterization of mucilage obtained from *Colocasia esculenta*', *Int. J. Pharm. Biol. Sci.*, **2014**, 4, 25-29.
- [53] M. A. S. A. G. Arasi, M. G. Rao, J. Bagyalakshmi, 'The comparison and Analysis of two extraction methods for polysaccharides in *Psidium guajava* L. Fruits', *Pharms. Res.*, **2016**, 50, 218-224.
- [54] H. Chen, in 'Biotechnology of lignocellulose: theory and practice', Ed. H. Chen, Beijing, **2014**, pp. 25-71.
- [55] C. W. Dence, in 'Methods in lignin chemistry', Ed. S. Y. Lin, C. W. Dence, Syracuse, **1992**, p. 33-61.
- [56] M. Vázquez-Sánchez, T. Terrazas, A. Salvador, 'El hábito y la forma de crecimiento en la tribu Cacteeae (cactaceae, Cactoideae)', *Bot. Sci.*, **2012**, 90, 97-108.
- [57] S. Loza-Cornejo, T. Terrazas, 'Anatomía del tallo y de la raíz de dos especies de *Wilcoxia* Britton & Rose (Cactaceae) del noreste de México', *Bol. Soc. Bot. México*, **1996**, 59, 13-23.
- [58] S. Arias, T. Terrazas, 'Variación en la anatomía de la madera de *Pachycereus pecten-aboriginum* (Cactaceae)', *Anales Inst. Biol. Univ. Nac. Autòn. Mèxico, Bot.*, **2001**, 72, 157-169.

- [59] J. Reyes-Rivera, T. Terrazas, in 'Xylem: Methods and Protocols, Methods in molecular Biology', Ed. M. De-Lucas, J. P. Etchells, Durham, **2017**, p. 193-211.
- [60] Technical Association of the Pulp and Paper Industry, 'T222 om-02. Acid insoluble lignin in wood and pulp', **2002**.
- [61] L. R. Carballo-Abreu, U. Orea-Igarza, E. Cordero-Manchado, 'Composición química de tres maderas en la provincia de Pinar del Río, Cuba a tres alturas del fuste comercial. Parte No. 1: *Corymbia citriodora*.' , *Rev. Chapingo, Ser. Cie.*, **2004**, *10*, 57-62.
- [62] J. V. F. Latorraca, O. Dünisch, G. Koch, 'Chemical composition and natural durability of juvenile and mature heartwood of *Robinia pseudoacacia* L', *An. Acad. Bras. Ciênc.*, **2011**, *83*, 1059-1068.
- [63] F. Fonseca-Prieto, G. Canché-Escamilla, J. C. Chavarria-Hernández, S. Duarte-Aranda. 'Characterization of lignocellulosic residues of henequen and their use as a bio-oil source', *Biomass. Conversion. Biorefin.*, **2014**, *4*, 95-104.

CAPÍTULO II. DIFFERENCES IN THE STRUCTURAL CHEMICAL COMPOSITION OF THE PRIMARY XYLEM OF CACTACEAE: A TOPOCHEMICAL PERSPECTIVE²

2.1 RESUMEN

El xilema de Cactaceae es un Sistema complejo con diferentes tipos de células cuya función principal es conducir y almacenar agua, principalmente durante el desarrollo del xilema primario, que tiene elementos de vasos y traqueidas de banda ancha. La anatomía del xilema primario de Cactaceae ha sido ampliamente estudiada, pero se sabe poco sobre su composición química. El objetivo de este estudio fue determinar la composición química estructural del xilema primario de Cactaceae y compararlo con la anatomía del grupo. Se utilizaron semillas de ocho especies de cactus, que representan las subfamilias Pereskioideae, Opuntioideae y Cactoideae. Las semillas germinaron y crecieron durante ocho meses. Posteriormente, solo el tallo de la plántula fue seleccionado, secado, molido y procesado con base en la norma TAPPI T-222 om-02; la lignina se cuantificó con el método de Klason y la celulosa con el método de Kurshner-Höffer. Mediante el uso de microscopía de infrarrojo por transformada de Fourier se calculó el porcentaje de siringilo y guayacilo de lignina. Las plántulas de cada especie fueron fijadas, seccionadas y teñidas para su descripción anatómica y análisis de microscopía de fluorescencia para la topoquímica del xilema primario. Los resultados mostraron que hubo diferencias significativas entre especies ($p < 0.05$), excepto en las hemicelulosas. A través de un análisis de componentes principales, se descubrió que la cantidad de extraíbles solubles en agua y el tejido libre de extraíbles eran las variables que separaban las especies, seguidas de celulosa y hemicelulosas, ya que las plántulas desarrollaron principalmente células de parénquima y el tejido conductor mostró elementos de vaso y traqueidas de banda ancha, ambos con engrosamientos anulares y helicoidales en paredes secundarias. El tipo de lignina con el porcentaje más alto fue el de tipo guayacilo que se acumuló principalmente en los vasos y proporcionó rigidez. Mientras que en las traqueidas de banda ancha del metaxilema, la lignina de tipo siringilo se acumuló en las paredes secundarias S2 y S3 lo que permitió un flujo eficiente de agua y darle a la planta la capacidad de soportar condiciones difíciles durante el desarrollo de las plántulas. Solo una especie puede ser considerada con pedomorfosis, ya que los elementos conductores tenían una química similar en xilema primario y secundario.

² A. Maceda, M. Soto-Hernández, C. B. Peña-Valdivia, C. Trejo, T. Terrazas. *Front. Plant Sci.* **2019**, Artículo en prensa. doi: 10.3389/fpls.2019.01497

Palabras clave: FTIR, lignina, topoquímica, xilema primario, elementos de vaso.

2.2 ABSTRACT

The xylem of Cactaceae is a complex system with different types of cells whose main function is to conduct and store water, mostly during the development of primary xylem, which has vessel elements and wide-band tracheids. The anatomy of primary xylem of Cactaceae has been widely studied but little is known about its chemical composition. The aim of this study was to determine the structural chemical composition of the primary xylem of Cactaceae and to compare it with the anatomy in the group. Seeds from eight cacti species were used, representing the Pereskioideae, Opuntioideae, and Cactoideae subfamilies. Seeds were germinated and growth for eight months. Subsequently, only the stem of the seedling was selected, dried, milled and processed following the TAPPI T-222 om-02 norm; lignin was quantified using the Klason method and cellulose with the Kurshner-Höffer method. Using the Fourier Transform Infrared Spectroscopy, the percentage of syringyl and guaiacyl in lignin was calculated. Seedlings of each species were fixed, sectioned, and stained for its anatomical description and fluorescence microscopy analysis for the topochemistry of the primary xylem. The results showed that there were significant differences between species ($p < 0.05$), except in the hemicelluloses. Through a principal component analysis it was found that the amount of extractive-free stem and hot water soluble extractives were the variables that separated the species, followed by cellulose and hemicelluloses, since the seedlings developed mainly parenchyma cells and the conductive tissue showed vessel elements and wide band tracheids, both with annular and helical thickenings in secondary walls. The type of lignin with the highest percentage was guaiacyl-type which is accumulated mainly in the vessels, providing rigidity. Whereas in the wide band tracheids from metaxylem, syringyl lignin accumulated in the secondary walls S2 and S3, which permits an efficient flow of water and gives the plant the ability to endure difficult conditions during seedling development. Only one species can be considered to have paedomorphosis, since the conductive elements had a similar chemistry in primary and secondary xylem.

Keywords: FTIR, lignin, guaiacyl, topochemistry, primary xylem, vessel elements.

2.3 INTRODUCTION

Xylem is a complex plant tissue formed by cells that carry out different functions ^[1,2] such as water conduction, support, and storage ^[3-5]. Secondary xylem is the most studied structure mainly in tree species ^[6,7], industrial pulping processes ^[8,9] or timber-yielding production ^[10].

Seedlings of flowering plants have primary xylem, which is divided in protoxylem (initial stage) and metaxylem (stage previous to secondary growth), where vessel elements (VE) are predominant ^[11,12]; nevertheless, in some angiosperm families there are also tracheids ^[13] and wide-band tracheids (WBT). The latter are imperforated elements with annular or helical thickenings of secondary wall ^[14,15]. The chemical composition of primary xylem has been described mainly in economically important herbaceous plants, that do not have any secondary growth ^[16,17], such as bamboo ^[18,19] and some forage species ^[20-23].

In Cactaceae family, the anatomical characteristics of the four subfamilies have been vastly studied ^[14,24,25], because their stem morphological diversity is wide (tree, shrub, columnar, or globose; ^[25]), their size is diverse (small depressed globose to large trees; ^[26]), and their types of cellular matrices in the wood differ (monomorphic, dimorphic, and polymorphic; ^[27,28]) and are related to growth form ^[29,30].

Chemical composition of secondary metabolites, analyzed by phytochemical profiling, has allowed the identification of the principal compounds in the stem ^[31], structural chemical composition of stem conductive tissue ^[32-34], and from other structures such as glochids and spines in several cacti species ^[35,36].

The structural chemical composition of the secondary xylem of Cactaceae has been studied in fibrous, nonfibrous, and dimorphic species. The lignin concentration is the main component to distinguish fibrous species from non-fibrous ones ^[33], also, the composition of lignin monomers is heterogeneous in nonfibrous and dimorphic species, but the occurrence of syringyl and guaiacyl is homogeneous in fibrous species ^[32,34]. In addition, cellulose and lignin percentages differ with other families and between Cactaceae genera ^[33].

In the case of primary xylem of Cactaceae, little is known about the chemical composition and proportion of the structural compounds of its cell elements. Several authors have suggested that Cactaceae wood is paedomorphic ^[14,37,38], related to the occurrence of WBT in adult age or

having WBT only in the juvenile stage [14,39,40] changing to fibers in the adult one [27,29]. Because of this, knowledge on the chemical composition of the primary xylem will allow us to establish similarity between primary and secondary xylem and to support the hypothesis of paedomorphism in the xylem tissue of this family. Therefore, in the present study we determine the chemical composition of the primary xylem in seedlings of eight Cactaceae species, we obtain infrared spectra of lignin to calculate the syringyl/guaiacyl proportion, describe the vascular tissue with fluorescence microscopy and compare the chemical composition of primary and secondary vascular tissue of the same species.

2.4 RESULTS

2.4.1 Structural chemical composition

The modifications made to the TAPPI norm allowed the repeatability of extractives, cellulose, lignin, and hemicellulose percentages (Tables 2.2 and 2.3). The CV of the percentages of extractives was less than 5%, except for one *O. streptacantha* variable (water at 90°C), that had a CV above 5% (Table 2.2). Hemicelluloses showed CV values less than 5%. With respect to lignin, four species showed a CV slightly above 5%, but only one species showed this value for cellulose (Table 2.3).

Table 2.1. Average of the extractives in seedlings of eight species of Cactaceae.

Species	Ethanol:benzene (%)	CV	Ethanol 96% (%)	CV	Water 90°C (%)	CV
<i>C. imbricata</i>	7.8±0.2	2.6	3.8±0.2	4.2	7.6±0.2	3.1
<i>E. platyacanthus</i>	8.5±0.3	3.4	4.4±0.1	3.2	10.4±0.1	1.1
<i>F. pilosus</i>	9.7±0.4	3.9	5.2±0.2	4.3	9.7±0.1	0.6
<i>L. lychnidiflora</i>	4.3±0.1	2.4	2.5±0.1	3.7	5±0.1	1.9
<i>L. marginatus</i>	4.8±0.2	4.4	4.4±0.2	4.3	7.5±0.4	4.8
<i>M. carnea</i>	8.2±0.4	4.7	5.7±0.2	3.5	9.8±0.1	0.9
<i>M. geometrizzans</i>	7±0.1	1.7	4.7±0.1	2.7	6.5±0.3	4.1
<i>O. streptacantha</i>	7.5±0.3	3.6	5.1±0.2	3.7	9.1±0.8	8.6

CV= Coefficient of variation

The differences in the content of structural components were significant ($p < 0.05$) among the species—the only exception being hemicellulose ($p = 0.09$, Table S2.2). Furthermore, the *post hoc* Dunn's test showed that the differences among extractives of *L. lychnidiflora* (B) and the rest of the species were significant (Figure 2.1). Cellulose proportion varied significantly

between *M. carnea* (A) and *L. lychnidiflora* (B), and the lignin proportion of *L. lychnidiflora* (A) with *E. platyacanthus* and *M. carnea* (B) (Figure 2.2).

Table 2.2. Average of the lignocellulose percentages in seedlings of eight Cactaceae species.

Species	Extractives free stem (%)	CV	Cellulose (%)	CV	Lignin (%)	CV	Hemicellulose (%)	CV
<i>C. imbricata</i>	80.7±0.6	0.7	53±2.2	4.1	10±0.5	4.8	19.5±0.2	1.3
<i>E. platyacanthus</i>	76.8±0.5	0.7	52.8±3.2	6.1	7.8±0.2	2.7	19.2±0.4	1.8
<i>F. pilosus</i>	75.4±0.7	0.9	52.9±0.7	1.4	7.7±0.3	3.4	18.3±0.4	2.4
<i>L. lychnidiflora</i>	88.2±0.3	0.3	55.8±0.9	1.6	11.5±0.8	6.7	17.7±0.5	2.6
<i>L. marginatus</i>	83.2±0.7	0.9	56.2±1.4	2.5	9.9±0.6	6.3	18.2±0.4	2.2
<i>M. carnea</i>	76.5±0.7	0.9	54.5±0.7	1.3	7.4±0.6	7.5	19.5±0.3	2
<i>M. geometrizans</i>	81.8±0.5	0.6	54.6±1.3	2.4	10.6±0.4	3.9	18±0.4	2.4
<i>O. streptacantha</i>	78.4±1.2	1.6	51.3±1.8	3.4	9.8±0.7	6.7	19.1±0.4	2.2

CV= Coefficient of variation

2.4.2 Principal component analysis

The PCA for seedlings showed that the first two principal components explain 85% of the total variation between species (Figure 2.3A). In the first component (PC1), the extractive-free stem and extractives in water at 90°C showed the highest contribution (Table 2.4); this was the case for cellulose and hemicellulose in the second component (PC2). In the graphic representation *L. lychnidiflora* was separated from the other species (Figure 2.3A).

In the PCA for seedlings and adults, lignin and cellulose had the strongest influence in total variation in the PC1 (Table 2.4), while extractives in water at 90°C (PC2) and ethanol-benzene extractives (PC3) also contributed with variability, but in a smaller proportion. The graphic representation of the three components showed the separation between seedlings and adult plants (Figure 2.3B).

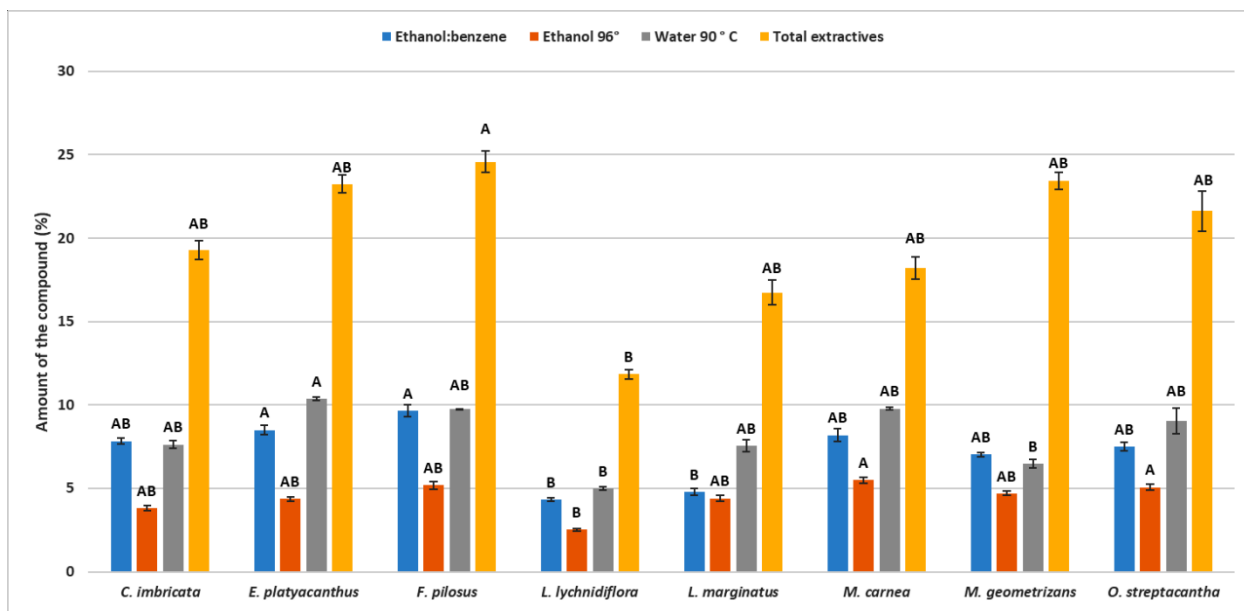


Figure 2.1. Mean of the percentages for each type of extractive in eight Cactaceae species. Different letters indicate significant differences between means based on the Pairwise Multiple Comparison Dunn's test ($p \leq 0.05$). Bars represent standard deviation.

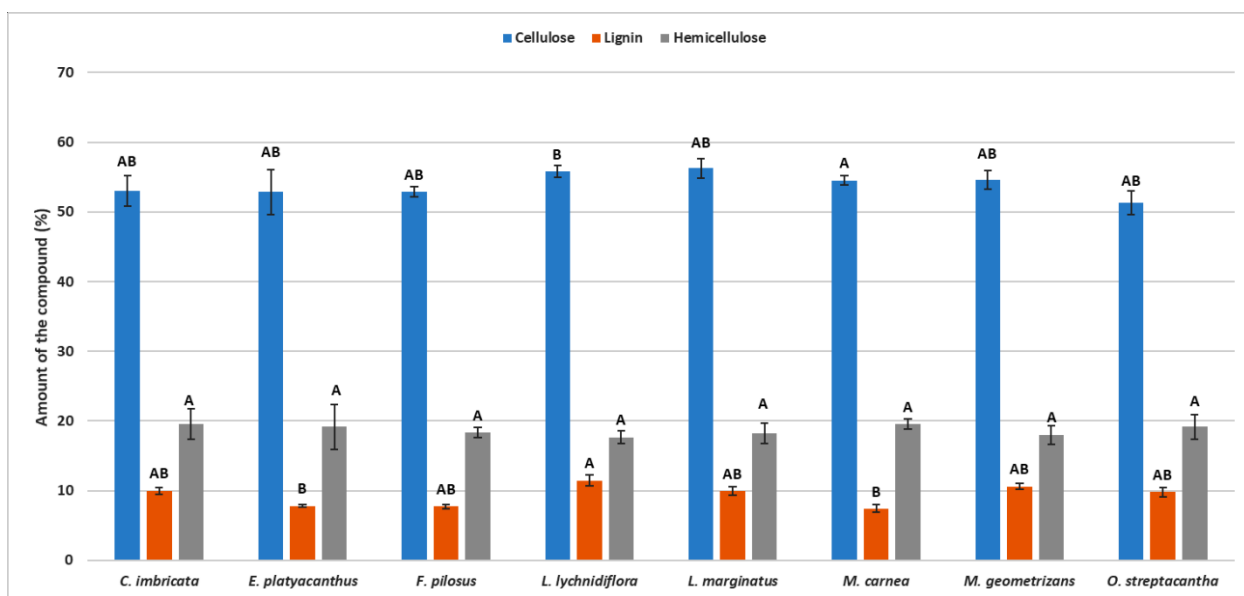


Figure 2.2. Mean of the percentages for each lignocellulosic compound in eight Cactaceae species. Different letters indicate significant differences between means based on the Pairwise Multiple Comparison Dunn's test ($p \leq 0.05$). Bars represent standard deviation.

Table 2.3. Eigenvectors, eigenvalues and accumulated proportion of the explained variation by each variable

Variables	Seedlings		Seedlings and adult plants		
	PC1	PC2	PC1	PC2	PC3
Ethanol:benzene	-0.41	-0.14	0.24	0.05	-0.75
Ethanol 96°	-0.36	-0.13	0.31	-0.35	0.53
Water 90° C	-0.42	0.04	0.19	-0.61	-0.06
Extractives-free wood	0.44	0.07	-0.31	0.53	0.21
Celullose	0.3	0.61	0.46	0.37	0.07
Lignin	0.4	-0.29	-0.53	-0.18	0.13
Hemicelullose	-0.27	0.71	0.46	0.23	0.29
Eigenvalues	5.08	0.89	3.01	2.26	1.38
Proportion variance (%)	72.5	12.8	43	32.3	19.7
Accumulated variance (%)	72.5	85.3	43	75.3	95

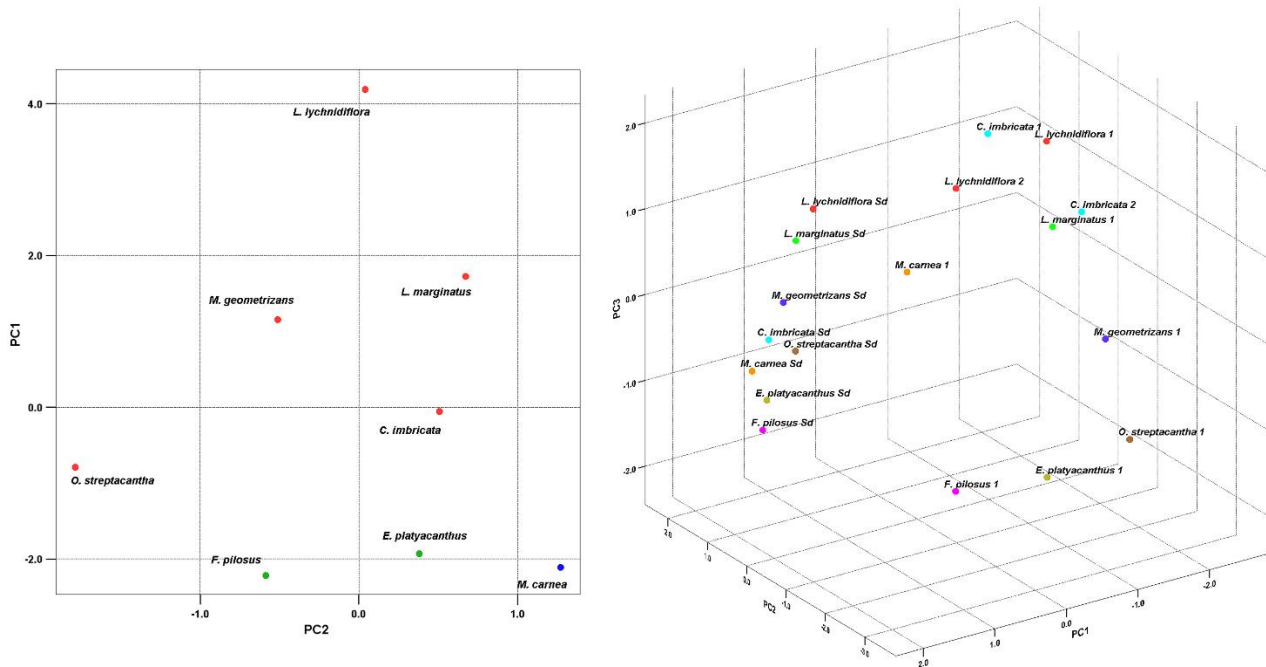


Figure 2.3. Principal components analysis. A. Graphic of the eight Cactaceae seedlings based on the first two principal components. The red dots represent the fibrous species, the green dots the dimorphic species, and the blue dot the nonfibrous species. B. Dispersion graphic in the eight species of seedlings and adults. Colors correspond to each distinct species. Sd=seedling. 1=Adult plant from Reyes-Rivera et al. [32]. 2=Adult plant from Maceda et al. [33]

2.4.3 Chemical composition of lignin of the primary xylem

The results of FTIR-ATR spectrum (Figure 2.4) showed the fingerprints peaks for lignin (800–1800 cm^{-1}). The peak associated to 1501 cm^{-1} was the C=C aromatic ring vibration of guaiacyl-syringyl. At 1325 cm^{-1} the syringyl ring breathing with C-O stretching was detected, whereas the peak at 1271 cm^{-1} detected the C-O and glucopyranosic cycle guaiacylic symmetric vibration. The peak at 1225 cm^{-1} detected C-O and glucopyranosic cycle syringylic symmetric vibration and the peak at 1030 cm^{-1} detected the C-H in-plane deformation in guaiacyl and C-O deformation in primary alcohol. The last peak at 913 cm^{-1} was the =CH out-of-plane deformation in aromatic ring (guaiacylic-syringylic).

With peaks at 1325 and 1271 cm^{-1} , the primary xylem ratio S/G from the stem were calculated (Table 2.5). The syringyl proportion was different among the species, *M. geometrizans* showed the lowest percentage (20.67 %) and *L. lychnidiflora* the highest one (41.87%) of the whole group. On the contrary, guaiacyl proportion had the lowest value in *L. lychnidiflora* (58.13%) and the highest one in *M. geometrizans* (79.33%).

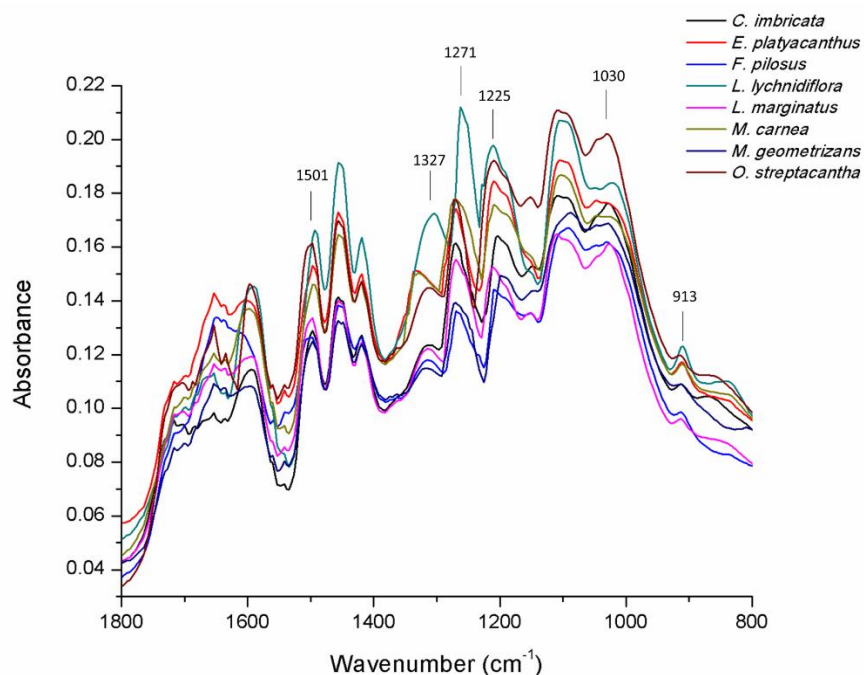


Figure 2.4. FTIR-ATR spectrum of lignin in the primary xylem of seedlings of eight Cactaceae species.

By comparing syringyl and guaiacyl percentages of primary xylem with those in the secondary xylem (Table 2.5), it was notice that S/G proportion was similar in *C. imbricata*, *E.*

platyacanthus, and *M. carnea*. The S/G proportion differs in other species where the percentages of syringyl increased and the percentages of guaiacyl decreased. For example, in *F. pilosus*, primary xylem S/G ratio was 0.55 and in secondary xylem was 3.5, due to the percentage of syringyl that went from 35% to 72%. In the other species studied syringyl percentages increased between 3 and 22% (Table 2.5).

Table 2.4. Syringyl and guaiacyl values for primary xylem compared to secondary xylem of eight Cactaceae species.

Species	S (%)	G (%)	S/G ratio	S (%)	G (%)	S/G ratio
	Seedlings (Primary xylem)			Adult plants (Secondary xylem)*		
<i>C. imbricata</i>	30	70	0.43	30	70	0.4
<i>E. platyacanthus</i>	41	59	0.68	40	60	0.7
<i>F. pilosus</i>	35	65	0.55	72	22	3.5
<i>L. lychnidiflora</i>	42	58	0.72	48/62**	52/38**	0.9/1.6
<i>L. marginatus</i>	32	68	0.47	51	49	1.1
<i>M. carnea</i>	39	61	0.63	42	58	0.72
<i>M. geometrizzans</i>	21	79	0.26	38	62	0.6
<i>O. streptacantha</i>	31	69	0.45	53/69**	47/31**	1.1/2.2

* = values taken from Reyes-Rivera et al. [32], except *M. carnea*, whose value was obtained from samples derived from Maceda et al. [33] and read by FTIR. ** = values taken from Reyes-Rivera et al. [34]

2.4.4 Topochemistry of primary xylem

Proto and metaxylem were found in the eight species, and in the 8-months-old seedlings the vascular cambium was visible. Vessel element of the protoxylem showed helical type secondary walls and their lignin chemical composition differed from metaxylem. The use of safranin O / fast green staining with microscopy fluorescence made it possible to identify differences in fluorescence emission intensity in the stem of the seedlings (Figure 2.5). With bright field microscope, VE and WBT had the characteristic red lignin staining while parenchyma had green cellulose staining (Figure 2.5A, C, E, G). With fluorescence excitation, xylem in the vascular bundles had green tonalities, parenchyma from pith and cortex had just red tonalities as well as the epidermis (Figure 2.5B, D, F, H).

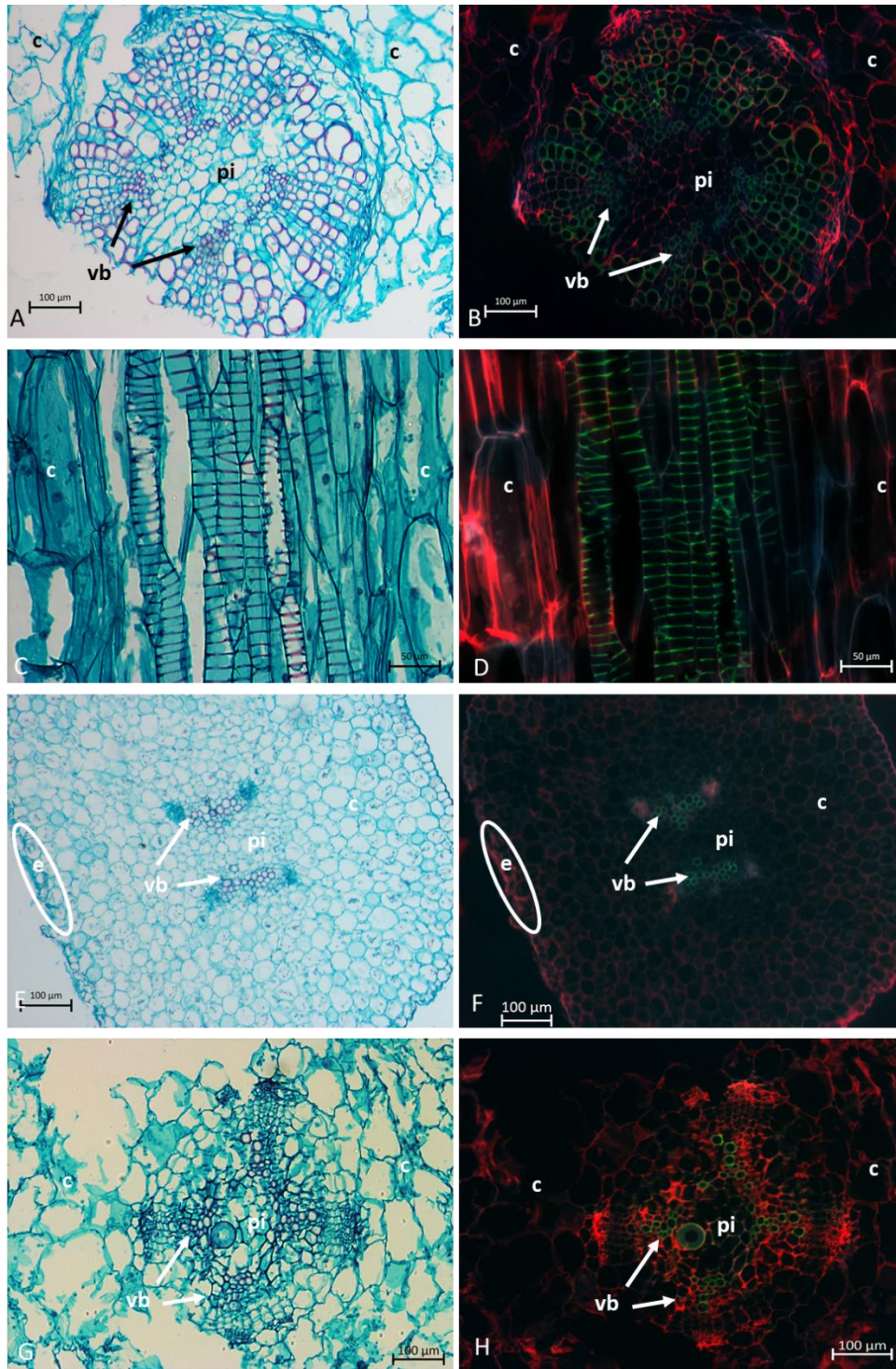


Figure 2.5. Comparison of brightfield illumination and fluorescence microscopy with triple band excitation of seedling stems. A, C, E, G: Brightfield illumination. B, D, F, H: Fluorescence emission. A, B: *Lophocereus marginatus*, transverse sections. C, D. *Lophocereus marginatus*, longitudinal sections. E, F: *Leuenbergeria lychnidiflora*, transverse sections. G, H: *O. streptacantha*, transverse sections. Scale: A, B, E, F, G, H; 100 μm . C, D: 50 μm . c=cortex, e=epidermis, p=pith, vb= vascular bundle

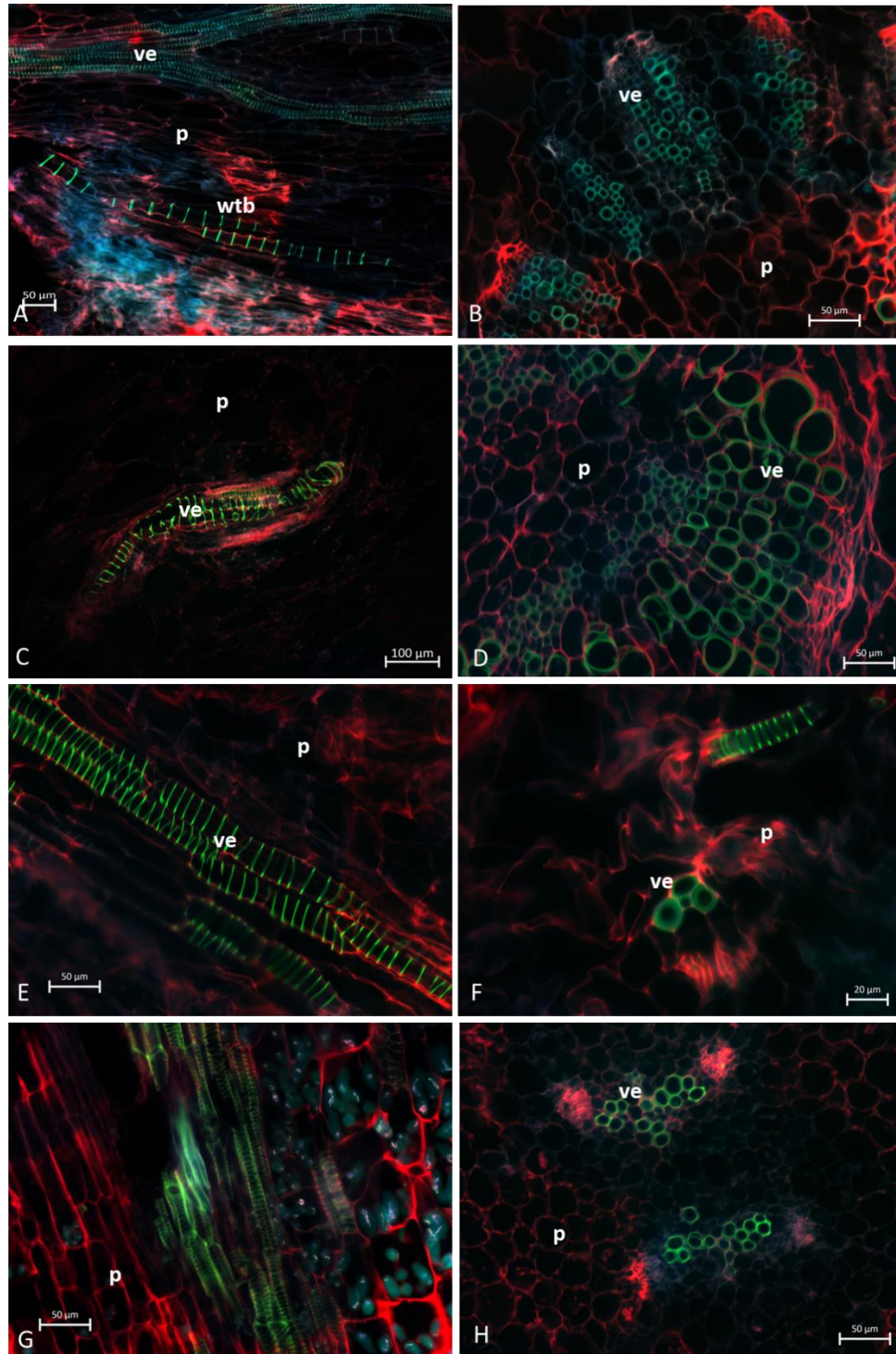


Figure 2.6. Image seedlings stems of fibrous species with triple band excitation fluorescence. A, C, E, G: Longitudinal sections. B, D, F, H: Transverse sections. A-B: *Cylindropuntia imbricata*. C-D: *Lophocereus marginatus*. E-F: *Myrtillocactus geometrizans*. G-H: *Leuenbergeria lychnidiflora*. Bar is 50 μm in A, B, D, E, G, H; 100 μm in C; 20 μm in F. p=parenchyma, ve=vessel element, wbt=wide band tracheid.

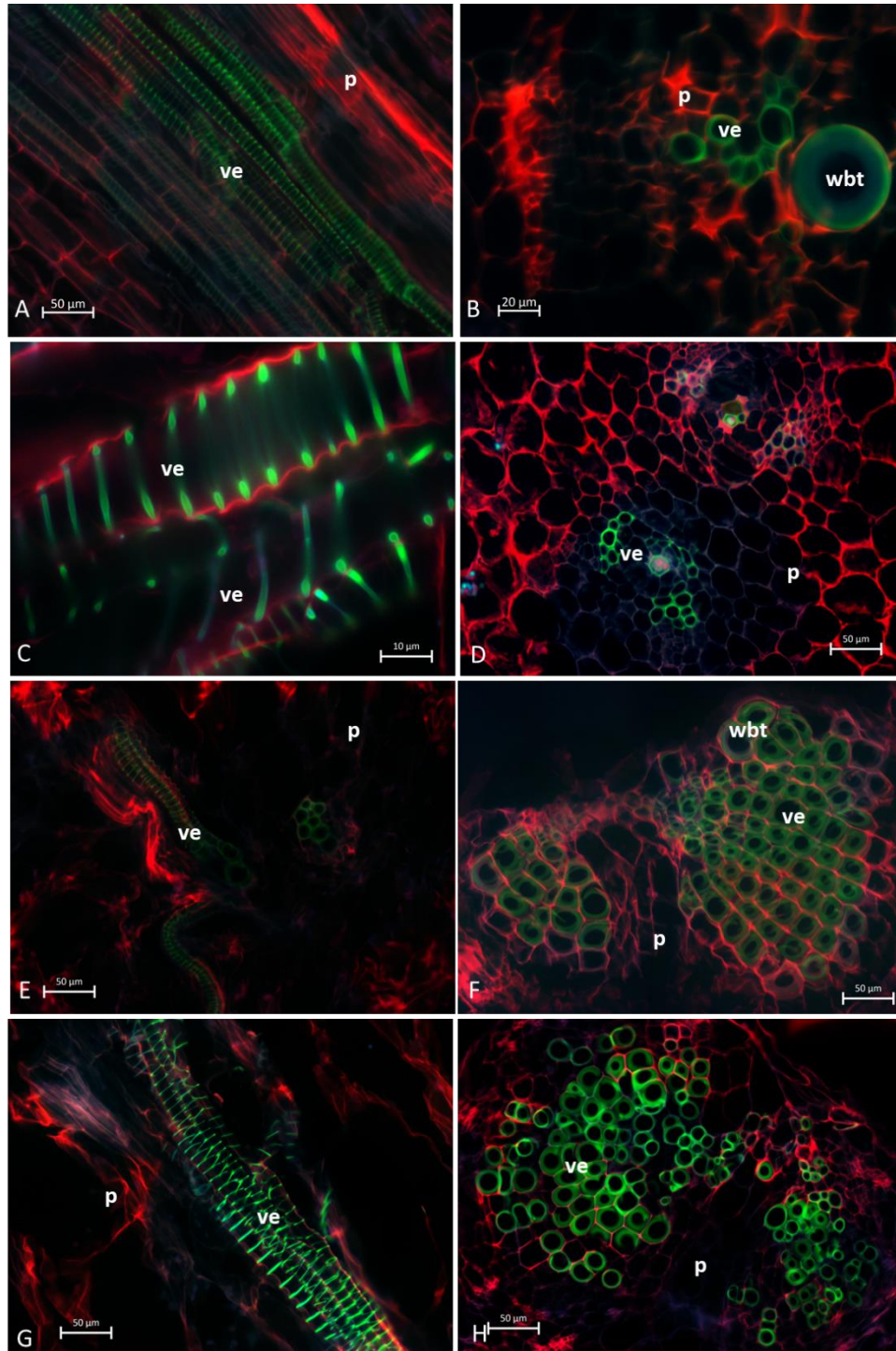


Figure 2.7. Image seedlings stems of fibrous, non-fibrous, and dimorphic species with triple band excitation fluorescence. A, C, E, G: Longitudinal sections. B, D, F, H: Transverse sections. A, B: *Opuntia streptacantha*. C, D: *Echinocactus platyacanthus*. E-F: *Ferocactus pilosus*. G-H: *Mammillaria carnea*. Bar is 50 μm in A, D-H; 100 μm in B; 20 μm in C. p=parenchyma, ve=vessel element, wbt=wide band tracheid.

The fluorescence intensity was lower in the protoxylem with green-blue tones, while in the metaxylem the colors were lime green (Figure 2.6). Most species had VE of metaxylem with helical type secondary walls (Figure 2.6A, C, E), but *L. lychnidiflora* had reticulate type secondary wall (Figure 2.6G). The fluorescence of lignin in all seedlings had an emission green to blue, the hollocelulose and proteins of the middle lamella and part of the primary cell wall were reddish in VE, WBT, and parenchyma. The primary xylem was limited by parenchyma cells of the pith. These parenchyma cells were isodiametric, with 10 to 50 μm in diameter. In the protoxylem of *L. lychnidiflora*, the primary wall of the parenchyma cells was not lignified with abundant starch grains (Figure 2.6G, H). The former can be deduced by fluorescence intensity (green-blue), which is similar to the one found in the VEs of the protoxylem. With the development of metaxylem, the parenchyma in contact to the VEs was narrower.

C. imbricata and *O. streptacantha* showed WBT in the interfascicular region. These WBTs had annular type secondary walls. The fluorescent emission intensity of lignin in each thickening of the secondary wall in the WBT was weaker than the one found in VEs (Figure 2A, B and Figure 2.7A, B). The presence of WBT was scarce in *F. pilosus* and *M. carnea*, but its location was within the vascular bundles. The fluorescent emission intensity of lignin also showed variation between VEs (a higher intensity and lime green coloring) and WBTs (green-blue coloring and a weaker intensity) (Figure 2.7E-H). The parenchyma in *E. platyacanthus* and *M. carnea* had the highest values of size, with a mean of 34.35 μm and 29.35 μm respectively (Figure 2.7C, D, G, H), and 23.5 μm in *F. pilosus* (Figure 2.7E, F).

2.5 DISCUSSION

2.5.1 Chemical composition

The species that were significantly different in the percentages of seedling extractives and structural components of the cell wall (cellulose and lignin) were the dimorphic ones and the nonfibrous ones compared with the fibrous *L. lychnidiflora* and *L. marginatus*. These results showed that differences exist between the fibrous species and the nonfibrous and dimorphic species since the seedling stage. However, *C. imbricata* and *O. streptacantha*, that are fibrous wood species, not show significant differences with the dimorphic and nonfibrous wood species during the seedling stage. The lack of differences was probably related to the abundance of

parenchyma and the annular and helical type secondary walls in VEs and WBTs of both Opuntioideae (Figures 2.6A and 2.7A).

When comparing the results of the percentages of seedling extractives with those reported by Maceda et al. [33] and Reyes-Rivera et al. [32], a similarity was found between the developmental stages of *C. imbricata*, *F. pilosus*, *L. lychnidiflora*, and *M. carnea*. Moreover, significant differences existed between the four mentioned species with *E. platyacanthus*, *L. marginatus*, *M. geometrizzans*, and *O. streptacantha*. The chemical characterization and quantification of the compounds in the extractives is little known, most of the studies have been focused on the analysis of extractives in alcohol [41,42]. In this study, the use of solvents with different polarity allowed the removal of different extractives. For example with ethanol:benzene the phenolic compounds, aldehydes, alcohols, waxes and some organic acids were solubilized and extracted [43–45]. With ethanol at 96% more phenolic and polar compounds were extracted [46], and with hot water (90° C), starch, gums and pectin were extracted [47,48].

Cellulose percentages in seedlings were higher than 50% and exceeded those of adult plants [32,33]. High cellulose percentages were related to the abundance of non-lignified parenchyma and to the helical type of secondary walls in most of the conductive elements, VE and WBT, thus non-lignified primary walls were more abundant (Figures 2.6 and 2.7). On the contrary, the presence of lignin showed percentages lower than 10% (Table 2.3), while fibrous and dimorphic adult plants had VEs and fibers with cell walls that had accumulated abundant lignin [32].

With the quantification method of Li et al., [49], the total amount of hemicellulose could be obtained, in contrast with other methods that only quantify one type of hemicellulose such as xylan, for example. In seedlings, hemicellulose percentages were also high; this was mainly due to abundance of parenchyma in seedlings, which is congruent with the results by Maceda et al. [33] in nonfibrous species of *Coryphantha*, *Echinocereus*, and *Mammillaria*.

Most of the studies on the chemical structure of primary xylem focused on the lignocellulose compounds, because of the importance of forage species in animal nutrition. In the species reported in the literature, lignocellulose compounds percentages were different even within the same family (Table S2.1). Therefore, the percentages of Cactaceae extractives were similar to some of the species in the Poaceae, possibly because of the accumulation of non-structural carbohydrates and other soluble compounds [50,51]. Regarding the lignocellulose compounds, only three species

showed similar cellulose values to those found in the seedlings of Cactaceae. This means that cacti accumulated a higher quantity of cellulose in their cell walls of the stem, while the other species with primary xylem accumulated lower percentages (<47%, Table S2.6).

The percentage of hemicellulose in the Cactaceae seedlings was similar to that reported in the Fabaceae family, which were mainly galactomannans, while in the Poaceae family the percentages of hemicellulose were usually higher (>23%) but of the beta-glucan type ^[52] (Table S2.6). Future research in Cactaceae will focus on the type of hemicellulose present. Regarding lignin, the percentages for *Cannabis sativa* (Cannabaceae) and *Pennisetum purpureum* (Poaceae) were similar to those found in Cactaceae seedlings. It is interesting that in the primary xylem of Cactaceae, the percentages of lignin were closer to those in herbaceous species, in contrast to the reports by Maceda et al. ^[33], where the values of the secondary xylem of nonfibrous and some fibrous Cactaceae species were similar to those of hardwood and softwood species (gymnosperms). Only the secondary xylem of *Opuntia* species had similarities with the bamboo *G. brang* (Table S2.6) ^[33].

Therefore, during the seedling stage of Cactaceae, a larger quantity of cellulose was accumulated, while in the development of the secondary xylem, the accumulation of lignin was higher in the secondary cell walls of VEs and fibers, especially in fibrous species, while in nonfibrous species lignin occurred in WBTs and VEs. The results for fibrous wood supported what happens in other groups of woody plants ^[53,54].

The principal component analysis on seedling composition showed that the variable with the highest impact for group separation was the percentage of extractive-free stem (Table 2.3). This was related to what has been reported in the literature, where it was mentioned that during the development of primary xylem, plant biomass increases mainly acropetally, due to procambium activity, originating protoxylem and metaxylem, which can be distinguished anatomically by diameter and lignification types of the secondary wall ^[2,55] The water percentages at 90°C, also had a high contribution in the first component which would entail that there was a large accumulation of water-soluble compounds, that could be related mainly to some compounds such as mucilage ^[56,57] and non-structural carbohydrates ^[58]. Because principal component analysis indicated the importance of the extractives in seedlings and adult plants, is important quantify and identify each compound present in the different types of extraction in future research.

In the second component, hemicelluloses and celluloses had the greatest importance to separate the species. Unlike what happens in the secondary xylem of cacti, where lignin accumulation was the most important one, cellulose in seedlings acquired a greater relevance because the lignification is a high-cost metabolic process ^[53,59,60]. During early development stages of plant growth there was a larger accumulation of holocellulose in cell walls of parenchyma, VEs and WBTs ^[61], allowing the elongation to a lower metabolic investment.

During the development of primary xylem, the predominance of helical type secondary wall in VEs and annular type in WBT in proto and metaxylem, as well as reticular type in secondary walls in the metaxylem of *Leuenbergeria*, agrees with the type of cell walls described for many other taxa ^[11,62,63]. The limited secondary wall and the high proportion of unligified primary wall in these tracheary elements (VEs, WBTs) were the major characteristics that allow us to understand why cellulose was the main chemical compound of primary xylem in Cactaceae (Table 2.3). Moreover, for secondary xylem, the lignin was the most important variable, which contributes to group separation (Figure 2.3B). Species with fibrous wood had VEs with a higher lignin accumulation and pseudoscalariform or alternate pits; in addition to the presence of fibers and lignified axial and radial parenchyma, except for *O. streptacantha* that had unligified parenchyma. In the case of *M. carnea* —a nonfibrous species— secondary xylem had VEs with mainly helical thickenings embedded in a matrix of WBTs with similar secondary wall thickenings ^[32,33].

During seedling stage, to withstand droughts, cacti bet on the presence of abundant parenchyma cells and mucilage, such as it occurs in nonfibrous species of adult Cactaceae ^[33]. In addition, the occurrence of helical type secondary walls and the inclination degrees of the helices allow the VE to have a higher wettability and efficiency in water ascent ^[64,65]. These helical and annular types of secondary wall, provide VEs with resistance to endure the tensions generated in the water column by changes in water potential in the seedling. Both types of thickenings of the secondary wall, function as supports or rings that "hold" the cell walls joined, preventing them from collapsing or breaking during changes in water potential ^[66], and represent an adaptive biomechanical advantage to endure drought conditions, by allowing VEs and WBTs to bend without lumen closure ^[67].

This trait of VE and WBT with helical thickenings happen in the primary xylem of Cactaceae seedlings and continue during the first years of life of most Cactoideae species, and in the adult stage of most Cactaceae species [25,40]. However, in the case of *L. lychnidiflora*, VEs change during metaxylem development from helical to reticular type secondary wall, a phenomenon that had not been observed in other species of Cactaceae. Several authors interpret the presence of annular or helical type secondary wall as a retention of juvenile traits [38,68,69]. The retention of this type of secondary walls in the water conductive cells in the adult plants is considered an adaptive trait and happens mainly in small-sized plants, which have to endure adverse conditions especially of hydric stress [25].

2.5.2 Topochemistry of lignin

The innovation of lignin in xylem cell walls allowed the development of tracheary elements and the establishment of plants in various terrestrial environments and diverse ecological niches [70-72]. The success in the distribution of Angiosperms is due to xylem diversity and lignin (different proportions of lignin S/G) [73-75]. The results in the lignin structure of primary xylem of Cactaceae were consistent among the different species, because the guaiacyl monomer predominates in proto and metaxylem. In secondary xylem of most of the adult plants (except for *C. imbricata*, *E. platyacanthus*, and *M. carnea*) the syringyl monomer predominates as for *F. pilosus* (Table 2.4).

The use of fluorescence microscopy with triple band excitation and the safranin O / fast green staining, allowed to identify the differences in the chemical composition of cell wall from VE and WBT mainly, similar to the results of Frank et al. [76] and Bond et al. [77] with the same staining and fluorescence microscopy. The band of wavelengths used were in the range of the reports from different authors: 488 y 514 nm [78], 450-490 nm [79], 488/568 nm [77], with sequential excitation (355, 488, and 633 nm) or two bands at the same time (488 and 561 nm) [80], and especially with the bands used by Angeles et al. [81] who used the same fluorescence emission band for lignin (505-530) that the band used in this work. Therefore, with the three bands of excitation (385-400, 475-490, 545-565), blue and green characteristic tonalities of lignin were observed [77,78,82-84], in addition, fluorescence intensity reflects the concentration of lignin, higher intensity represent a higher accumulation of lignin [85] (Figure 2.5).

The fluorescence observations of the primary xylem in the seedlings showed that VEs had a higher fluorescence intensity, while WBTs intensity was higher in the S1 layer of the secondary

wall, than in the S2 and S3 layers of the same wall (Figure 2.8). This would explain the values shown in Table 2.5, since syringyl levels were lower than those for guaiacyl, because of a predominance of VE, whose composition was mainly G-type lignin [86,87], while WBTs accumulated mainly S-type lignin, but the G-type in the S1 layer of the secondary wall was also observed (Figure 2.8). The predominance of guaiacyl in the primary xylem was in agreement with that reported by Li et al. [88] for Angiosperms. The middle lamella and part of the primary cell wall in VEs, WBTs, and parenchyma showed red intense color due to hollocelulose [89,90] and proteins or enzymes [91].

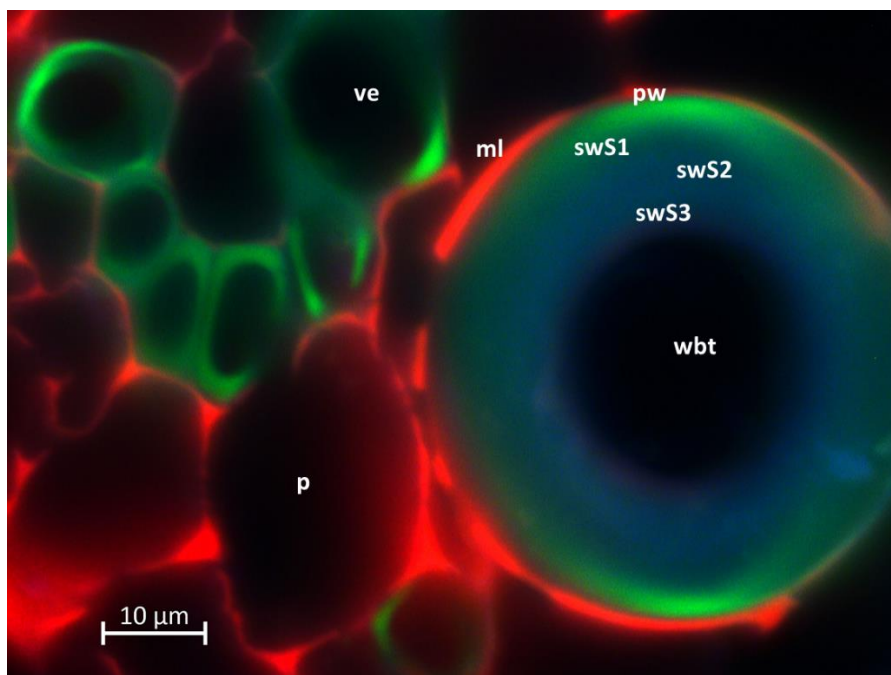


Figure 2.8. WBT and VEs of *Opuntia streptacantha*, where differences in fluorescence intensity were observed with the triple band excitation. The layers 2 and 3 of the secondary wall have a green-blue color, while part of layer 1 of secondary wall has a lime green color, similar to the one found in the secondary wall thickenings in VEs. Bar is 10 µm. p=parenchyma, pw=primary wall, sw1=secondary wall 1, sw2=secondary wall 2, sw3=secondary wall 3, ml=middle lamella, ve=vessel element, wbt=wide band tracheid.

Comparisons of syringyl and guaiacyl percentages in the primary xylem with those in secondary xylem reported by Reyes-Rivera et al. [32,34] indicated that syringyl percentages were much higher in adult plants than those present in seedlings. This is possibly due to the fact that some species in the adult stage have fibers and the cell wall of VEs are completely lignified with pseudoscalariform pits, which influence syringyl and guaiacyl percentages. Moreover, fibers have a higher syringyl percentage [92-94]. In the case of the nonfibrous species *M. carnea*, guaiacyl

proportion was very similar in seedlings and in adult plants, due to the presence of VEs and WBTs with annular and helical type secondary walls both in the primary (Figure 2.7) and secondary xylem ^[33]. The occurrence of these tracheary elements and their chemical composition could be related to the paedomorphosis process reported for Cactaceae ^[14,38,95].

The accumulation of syringyl-type lignin can vary within the same plant due to stressing environmental factors ^[96–98], mainly between early and latewood, where syringyl accumulation is higher in earlywood, while in latewood the syringyl percentage is lower and the guaiacyl percentage is higher. According to various authors, this change in lignin type allows drought conditions to be better tolerated ^[87,93,94]. Thus, the presence of high quantity of guaiacyl in the seedlings of Cactaceae would be similar to what occurs in latewood of secondary xylem, which would give VEs in primary xylem a higher resistance to drought conditions.

The layered accumulation of the secondary wall observed in the WBT in Figure 2.8 was similar to what has been reported for other species ^[99,100]. Guaiacyl accumulated in the primary wall and the first layer of secondary wall (swS1) and later in the second layer (swS2) ^[54,101–103], where syringyl monomers also accumulated in a gradual manner ^[84,104,105]. The presence of guaiacyl in primary wall and S1 layer of the secondary wall in WBTs and VEs provides high resistance to compression and also gives more rigidity and support to VEs ^[60,105–107].

The presence of syringyl lignin in the inner layers of the secondary wall of the WBTs could occur because lignin with syringyl/guaiacyl is less condensed and more hydrophilic, which allows water to flow in a more efficient way ^[61]. Thus, efficiency in water transport would allow the seedling to efficiently prevent the presence of embolisms and to avoid cavitation of VEs, by allowing the flow of water through the WBT lumen and later through the non-lignified primary wall into the adjacent VE, as it has been suggested by several authors ^[108,109]. Therefore, differences in lignin composition in Cactaceae seedlings, along with other factor such as succulence ^[110,111], WBTs presence ^[14,39,109], and helical type secondary wall in VEs ^[66] would allow to better endure drought conditions during their early stages, by accumulating more guaiacyl-type lignin. This situation is modified during the development of the secondary xylem in most species of Cactaceae, where syringyl-type lignin prevails in the tracheary elements, not only as a structural component ^[32,34], but also as a protection against oxidative agents of fungi ^[112,113] or other pathogenic organisms ^[114]. The use of other complementary methods such as the Time-

of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry (TOF-SIMS) [87], UV microspectrophotometry [115], along with precise measuring techniques like Nuclear Magnetic Resonance (NMR) and Py-GC/MS [34], will allow for a better understanding of the structural chemical composition of the primary xylem of Cactaceae species.

2.6 CONCLUSIONS

The principal components of the primary xylem of Cactaceae were extractive-free stem, water-soluble compounds and holocellulose, which foster a quick growth at a low energetic expense. The retention of annular and helical type secondary walls in secondary xylem, along with the similarity in the type of lignin present in the primary and secondary xylem of *M. carnea* supported the paedomorphism for this non-fibrous species of Cactaceae, but not for the other species.

The efficiency in the accumulation and ascent of water was due to the presence of abundant parenchyma cells and annular and helical type secondary wall in VEs and WBTs. The syringyl-type lignin in S2 and S3 layers of secondary walls of WBTs make the flow of water easier and prevent embolism and cavitation in VEs, whereas the guaiacyl lignin in primary and secondary walls (S1) contribute to the rigidity and support of WBTs. The resistance and flexibility of VEs occur because of the homogeneous accumulation of guaiacyl lignin in the cell wall and its helical thickenings.

The use of different techniques and methods in the study of the anatomy and the structural chemical composition of tracheary elements, both in the primary and secondary xylem, has allowed us to further understand the adaptations and strategies that Cactaceae species use to survive and adapt to the different conditions of the environments where they live and thrive.

2.7 EXPERIMENTAL SECTION

2.7.1 Plant material

Ripe fruits from eight Cactaceae species were collected in several regions of Mexico, which represent the different types of wood and growth forms (Table 2.5). The fruits were dissected to obtain seeds. *Echinocactus platyacanthus*, *Ferocactus pilosus*, *Leuenbergeria lychnidiflora*, *Lophocereus marginatus*, *Mammillaria carnea*, and *Myrtillocactus geometrizans* seeds were disinfected by immersion in 10% sodium hypochlorite for 5 min, placed on filter-paper saturated

with distilled water in sterile Petri dishes ^[116,117] and kept at 25°C under a light/darkness photoperiod of 12 h in a germination chamber ^[118–120]. *Cylindropuntia imbricata* and *Opuntia streptacantha* seeds were scarified with 98% sulfuric acid for 90 min, washed 5 times with distilled water, disinfected by immersion in 10% sodium hypochlorite for 5 min, and placed on filter-paper saturated with distilled water in sterile Petri dishes ^[121,122]. Seeds of both Opuntioideae and *L. lychnidiflora* were also kept in a germination chamber at 30°C and under a light/darkness photoperiod of 12 h ^[123].

Table 2.5. Morphology and stem characteristics of eight Cactaceae species.

Species	Wood type (adult stage)	Stem	Plant size
<i>Echinocactus platyacanthus</i> Link & Otto	Dimorphic	Columnar	Medium
<i>Ferocactus pilosus</i> Britton & Rose	Dimorphic	Columnar	Medium
<i>Cylindropuntia imbricata</i> (Haw.) F.M. Knuth	Fibrous	Tree	Tall
<i>Leuenbergeria lychnidiflora</i> (DC.) Lodé	Fibrous	Tree	Tall
<i>Lophocereus marginatus</i> (DC.) S. Arias & Terrazas	Fibrous	Tree	Tall
<i>Mammillaria carnea</i> Zucc. ex Pfeiff.	Nonfibrous	Globose	Small
<i>Myrtillocactus geometrizans</i> (Mart. ex Pfeiff.) Console	Fibrous	Tree	Tall
<i>Opuntia streptacantha</i> Lem.	Fibrous	Tree	Tall

After 30 days of germination, the seedlings were transplanted to trays with a 1:1:1 mixture of perlite-tezontle-potting soil and kept in the conditions previously described for germination, under a two-times-per-week water regime ^[40,124]. From 2 to 8 months of age, we selected the seedlings (classified as such because they maintained cotyledons (Figure S2.9) and showed abundant primary vascular tissue) ^[40] for evaluations.

2.7.2 Standardization of the method

For each collected seedling, the spines were eliminated to avoid their lignin interfering with the vascular tissue analysis, then, seedlings were desiccated at 50°C for 48 h and milled using a mortar until their particle size allowed them to go through a 0.4 to 0.6 mm mesh. The extractive-free ligno-cellulose was obtained from these samples ^[125,126].

The amount of sample required to extract and quantify extractives, Klason-lignin, cellulose, and hemicellulose was adapted from the methodology of the TAPPI T-222 om-02 norm. This method has been used in studies of wood ^[125,127], fibers ^[128] including adult plants of Cactaceae ^[32,33]. Each analysis was carried out in triplicate, mean and standard deviation were obtained ^[32].

For each one of the eight species, 75 seedlings were dried, milled and the material was homogenized. We used 25 seedlings per replication and three replications per species to perform the extraction and quantification procedure.

Stem extractives: 0.2 g of each milled stem sample was placed in a filter-paper cartridge, kept for 12 h at 60°C and its weight was registered. The extractives-free stem samples were obtained by successive extractions in Soxhlet ^[126], with ethanol:benzene (v/v 1:2) and 96% ethanol; each of the extractions took 24 cycles, which were five hours approximately. The cartridges were left to dry for 12 h to obtain constant weight ^[33]. The samples were removed from the cartridges and they were extracted in distilled water for an hour at 95°C, filtered through a medium-pore Büchner filter, and kept at 105°C for 12 h and their constant weight was recorded ^[33]. With the weights of the residues after each extraction, the percentage of stem extractives was calculated according to the following formula:

$$\% = [(A + B + C)/W_0] * 100$$

where A: weight (g) after the ethanol/benzene extraction, B: lost weight (g) after the ethanol extraction, C: lost weight (g) after the warm water extraction and W₀: weight of the initial sample (g).

Klason lignin: It was quantified by the method of the TAPPI T-222 om-02 norm ^[129-131] with some modifications. 0.5 mL of 72% sulfuric acid (in water v/v) were added to 0.05 g of the extractive-free sample, and kept at 18°C for 2 h and shake every 30 min. This allowed the sample to completely soak in the solution. After this, 14 mL of distilled water were added and it was kept at boiling point and at a constant volume for 4 h. The residue, which includes lignin, was filtered through a Büchner crystal funnel with fine pore, dried at 105°C for 12 h, and the constant weight of the sample was recorded ^[33]. Lignin percentage was determined according to the following formula:

$$\% \text{ lignin} = (W_L/W_W) * 100$$

where W_L: weight (g) of the resultant lignin, and W_W: weight (g) of the extractive-free stem sample.

Cellulose and hemicellulose: Kûrshner-Höffer's method ^[129] was modified to quantify cellulose. From extractive-free stem, 0.05 g were weighted and 1.25 mL of HNO₃-ethanol (v/v 1:4) were added, a boiling-reflux system was mounted in a water bath for 1 h. The HNO₃-ethanol reactive solution was eliminated by decantation and 1.25 mL of HNO₃-ethanol was added again. The extraction was made three times and in the last decantation, 1.25 mL of aqueous 1% KOH solution was added, the reflux was kept for 30 min and it was finally filtered out through a Büchner filter. The residue was left to dry for 12 h at 50°C and the cellulose constant weight was recorded ^[33,129]. Cellulose percentage was obtained according to the following formula:

$$\% \text{ cellulose} = \left(\frac{W_C}{W_W} \right) * 100$$

where W_C: cellulose weight (g); W_W: extractive-free stem sample weight (g).

Hemicellulose percentage was determined with the gravimetric method proposed by Li et al. ^[49] with few modifications. From extractive-free stem, 0.5 g were weighted and extracted with a reflux system with 10 mL of hot water for 3 h (solid to liquid ratio 1:20 mL). The reaction system was cooled to room temperature and filtrated. The filtrated was concentrated to 1.25 mL and was poured into 3.75 mL of 95% ethanol with stirring. The mixture was placed for 1 h, hemicellulose precipitate and was obtained by centrifugation (4500 g for 4 min) and freeze drying. The constant weight was recorded (H₀). The water insoluble solid residue was dried at 60°C for 16 h in an oven, after that, the solid residue was stepwise extracted with different concentrations of KOH (0.6, 1.0, 1.5, 2.0 and 2.5%) at 75°C for 3 h under a ratio of 1:20 (g/mL). In final step (2.5% of KOH), the solution of 2.5% of KOH was mixed with ethanol (99.7%) in a ratio 2:3. The five mixtures were filtered and then the filtrates were acidified to pH 5.5 with glacial acetic acid and concentrated to 1.25 mL. The mixtures were poured in 3.75 mL of 95% ethanol with vigorously stirring, then, the mixture was placed for 1 h to precipitate the hemicellulose and was finally obtained by centrifugation (4500 g for 4 min) and freeze drying. The constant weight was recorded in each step (H_{0.6}, H_{1.0}, H_{1.5}, H_{2.0}, H_{2.5}). Total hemicellulose was obtained by the following formula:

$$\% \text{ hemicellulose} = \left(\frac{W_H}{W_W} \right) * 100$$

2.7.3 Syringyl/Guaiacyl ratio lignin

The estimation of lignin composition has been made through different methods, Pyrolysis–Gas Chromatography–Mass Spectrometry (Py-GC/MS) ^[132], Nuclear Magnetic Resonance (NMR) ^[34,133–135], Fourier Transform Infrared (FTIR) ^[32,34,136], and High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) ^[32,137,138]. For this reason, in this paper Klason lignin is used directly to perform infrared (FTIR) spectrum readings, due Reyes-Rivera et al. ^[34] find consistent values when comparing these with other methods such as Py-GC/MS and NMR. Therefore, after the Klason lignin was obtained from the seedlings, the samples were kept in a desiccator and FTIR-ATR spectra were obtained using an Agilent, Cary 630 FTIR-ATR equipment. Ten spectra were obtained for each sample, their average was calculated and then the baseline and ATR corrections were performed to diminish spectrum noise ^[34,139,140]. After that, the 1269 to 1272 cm⁻¹ peak were used to measure guaiacyl values and the 1328 to 1330 cm⁻¹ peak to measure syringyl values ^[141,142]. The measurement was made following Pandey's method ^[143], in which, after baseline correction, the values of the peaks are measured by creating a line that connects the lower and the higher values of the peak, a vertical line is drawn from the base of the x axis to the top of the peak. The portion of the line between the top of the peak and the baseline is the correct value for each peak. Once the values of every syringyl and guaiacyl peaks were obtained, the percentages of each monomer were divided to obtain the ratio S/G.

2.7.4 Statistical analysis

Coefficient of variation (CV) was used as a measure to quantify the method's repeatability ^[22] because values smaller than the TAPPI norm were used. The CV was obtained with the following formula:

$$CV(\%) = \left(\frac{SD}{\mu} \right) * 100$$

where: SD = sample standard deviation, and μ = repetition average of each sample

Once the mean, standard deviation, and CV were obtained, normality was determined by the Kolmogorov-Smirnov test and the Shapiro-Wilk analysis, which showed that there was no normality in the data, even after using the arcsine square root. Therefore, the non-parametric Kruskal-Wallis test was applied, as well as the Dunn test as post hoc which compares multiple

pairs between each species and determines if the differences in the variables among the eight species were significant ^[144]. The results were compared with those reported by Reyes-Rivera et al. ^[32], Maceda et al. ^[33], and with studies that include primary xylem data (Table S2.6).

Then, two principal component analysis (PCA) were performed—the first one to define the variables that determined the differences between seedlings, and the second one with the variables of the seedlings and the adult plants of each species using the values of Reyes-Rivera et al. ^[32] and Maceda et al. ^[33].

2.7.5 Anatomical and topochemical description of lignin

Two to four seedlings per species were used for the anatomical description to obtain transverse and longitudinal sections. The tissues were fixed in formaldehyde, acetic acid, and alcohol and kept in a vacuum chamber for 24 h. This procedure facilitates the infiltration of the fixer and avoids vascular tissue collapse ^[145]. The tissues were embedded in paraffin, sections cut 10-12 μm thick using a rotary microtome, dewaxed and stained with safranin O / fast green ^[146].

Microscopy fluorescence combined with safranin O/fast green can be useful to identify differences in vascular tissue composition ^[76,147,148], because safranin O contributes to highlighting the fluorophores present in the lignin molecule ^[77,81,84,100]. This combination has a greater sensitivity to identify variations in the composition of vascular tissue compared with Maüle and Wiesner techniques ^[149–151]. Lignin fluorescence has been characterized by a wide range of excitation and emission wavelengths ^[84,100,152]. It has been proposed to use different wavelengths to identify variations in the intensity and tonalities of fluorescence lignin ^[80,81,85,153]. Therefore, the observations were made on a fluorescence microscope with the DAPI-FITC-TRITC band excitation, which has three types of waves: violet (385 to 400 nm), blue (475 to 490 nm), and green (545 to 565 nm) with an emission filter of 430, 510 and 570 nm respectively. For this, each sample was kept for one minute under exposure to observe the autofluorescence of lignin ^[80] highlighted by safranin O ^[77,81,154].

2.8 CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

2.9 AUTHOR CONTRIBUTIONS

AM, TT designed the work; AM performed the experiments and prepared the figures. AM, TT, MS, CPV and CTL analyzed the data. AM and TT wrote the manuscript; all the authors have read and approved the manuscript.

2.10 ACKNOWLEDGMENTS

Funding was provided by the DGAPA-PAPIIT, UNAM [grants IN209012 and IN210115 to TT] and by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) [PhD grant: 103022 to AM]. We also thank Julio Cesar Montero-Rojas for artwork and to LANABIO, UNAM for allowing us to use the fluorescence microscope. The comments of two anonymous reviewers allow us to improve the manuscript.

2.11 APPENDIX



Figure S2.9. Seedlings of Cactaceae. A. *Leuenbergeria lychnidiflora*, eight months. B. *Echinocactus platyacanthus*, 1-8 months. C. *Cylindropuntia imbricata*, eight months. D. *Ferocactus pilosus*, eight months. E. *Opuntia streptacantha*, eight months. F. *Mammillaria carnea*, 2-8 months. Bar is 1 cm in A-E; 5 mm in F.

Table S2.6. Percentages of the extractives and lignocellulosic compounds of species with primary xylem.

Species	Extractives %	Cellulose %	Hemicellulose %	Lignin %	References
<i>Bambusa vulgaris</i>	6.79	47.51	24.44	21.26	[16]
<i>Bromus inermis</i>	-	30	28.2	34.7	[155]
<i>Cannabis sativa</i>	-	53.86	10.6	8.76	[23]
<i>Dactylis glomerata</i>	39.2-56.9	23.6-52.3	23.5	21.3	[155]
<i>Dendrocalamus giganteus</i>	7.1	44.4	25-35	22	[18]
<i>D. oldhami</i>	3.3-3.9	34.1-47.1	25.1-34.5	20.9-25.2	[17]
<i>Eleusine indica</i>	-	26.1	32.51	4.14	[156]
<i>Festuca arundinacea</i>	33.7-36.2	26.7-28.4	30.3-31.9	43-49	[21]
<i>Gigantochloa brang</i>	8-9.23	34-52	-	25-33	[125]
<i>Helianthus annuus</i>	-	34.06	5.18	7.72	[23]
<i>H. tuberosus</i>	-	20.95	5.48	5.05	[23]
<i>Lotus corniculatus</i>	49.7-54.5	22.7-28.7	13.4-25.5	9.2-30	[21,155]
<i>Medicago sativa</i>	48.9-55.2	14.7-23.9	13-15.1	8.2-17.4	[21,155]
<i>Miscanthus saccharifloris</i>	-	42	30.15	9.65	[23]
<i>Neosinocalamus affinis</i>	4.5	-	62.4	24.3	[157]
<i>Panicum maximum</i>	-	32.71	42.57	3.09	[156]
<i>P. virgatum</i>	24.9-27.1	32.2-43	33.6-36.4	46.1-68	[21,155]
<i>Pennisetum purpureum</i>	-	34.04-46.58	34.14-39.31	5.62-22.25	[156,158]
<i>Phalaris arundinacea</i>	33.3-38.1	25.5-27	30.3-33.1	45-48	[21]
<i>Phyllostachys edulis</i>	-	44.63	23.65	20.35	[136]
<i>Secale cereale</i>	26.4-28.6	34.4-34.8	28.2-30.2	6.4-6.9	[21]
<i>Sorghum bicolor</i>	38.2-43.4	25.6-28.5	26.4-27.7	4.6-5.3	[21]
<i>Trifolium pratense</i>	-	25	20.6	34	[155]
<i>Zea mays</i>	6.6	39.27	25.96-64.2	9.02-19.9	[23,159]

Table S2.7. Kruskal-Wallis values for each variable.

Variables	Chi-cuadrado	Degrees of freedom	Probability>Chi-square
Ethanol-benzene	25.69	7	0.001***
Ethanol	24.36	7	0.001***
Water 90 °C	25.29	7	0.001***
Total extractives	25.84	7	0.001***
Extractives-free wood	25.84	7	0.001***
Celullose	15.95	7	0.026*
Lignin	22.36	7	0.002***
Hemicelullose	12.04	7	0.099

***= highly significant differences; *=significant differences.

2.12 REFERENCES

- [1] M. Baucher, M. El Jaziri, O. Vandeputte, 'From primary to secondary growth: origin and development of the vascular system', *J. Exp. Bot.* **2007**, 58, 3485–3501.
- [2] K. Růžička, R. Ursache, J. Hejátko, Y. Helariutta, 'Xylem development - from the cradle to the grave', *New Phytol.* **2015**, 207, 519–535.
- [3] R. B. Pratt, A. L. Jacobsen, F. W. Ewers, S. D. Davis, 'Relationships among xylem transport, biomechanics and storage in stems and roots of nine Rhamnaceae species of the California chaparral', *New Phytol.* **2007**, 174, 787–798.
- [4] C. R. Brodersen, A. J. McElrone, 'Maintenance of xylem Network Transport Capacity: A Review of Embolism Repair in Vascular Plants', *Front. Plant Sci.* **2013**, 4, 108.
- [5] W. J. Lucas, A. Groover, R. Lichtenberger, K. Furuta, S.-R. Yadav, Y. Helariutta, X.-Q. He, H. Fukuda, J. Kang, S. M. Brady, J. W. Patrick, J. Sperry, A. Yoshida, A.-F. López-Millán, M. A. Grusak, P. Kachroo, 'The plant vascular system: evolution, development and functions', *J. Integr. Plant Biol.* **2013**, 55, 294–388.
- [6] C. R. ; Danzer, S. R. Leavitt, S. W. Panyushkina, I. P. Mergner, A. Garcia, E. Best-Svob, 'Xylem tracheid development in *Pinus resinosa* seedlings in controlled environments', *Tree-Ring Res.* **2001**, 57, 45–53.
- [7] C. Lupi, H. Morin, A. Deslauriers, S. Rossi, 'Xylem phenology and wood production: resolving the chicken-or-egg dilemma', *Plant. Cell Environ.* **2010**, 33, 1721–1730.
- [8] H. T. Sahin, M. B. Arslan, 'A study on physical and chemical properties of cellulose paper immersed in various solvent mixtures', *Int. J. Mol. Sci.* **2008**, 9, 78–88.
- [9] K. Obi Reddy, C. Uma Maheswari, M. Shukla, E. Muzenda, 'Preparation, Chemical Composition, Characterization, and Properties of *Napier grass* Paper Sheets', *Sep. Sci. Technol.* **2014**, 49, 1527–1534.
- [10] A. Pawlicka, B. Waliszewska, 'Chemical composition of selected species of exotic wood derived from the region of Africa', *Acta Sci. Pol. - Silvarum Colendarum Ratio Ind. Lignaria* **2011**, 10, 37–41.
- [11] D. W. Bierhorst, P. M. Zamora, 'Primary Xylem Elements and Element Associations of Angiosperms', *Am. J. Bot.* **1965**, 52, 657.
- [12] S. Carlquist, E. L. Schneider, 'Origins and nature of vessels in monocotyledons. 11. Primary xylem microstructure, with examples from zingiberales', *Int. J. Plant Sci.* **2010**, 171, 258–266.
- [13] T. S. Feild, M. A. Zweiniecki, T. Brodribb, T. Jaffre, M. J. Donohughe, N. M. Holbrook, 'Structure and function of tracheary elements in *Amborella trichopoda*', *Int. J. Plant Sci.* **2000**, 161, 705–712.
- [14] J. D. Mauseth, 'Wide-band tracheids are present in almost all species of Cactaceae', *J. Plant Res.* **2004**, 117, 69–76.

- [15] E. Arruda, G. F. Melo-de-Pinna, 'Wide-band tracheids (WBTs) of photosynthetic and non-photosynthetic stems in species of Cactaceae 1', *J. Torrey Bot. Soc.* **2010**, *137*, 16–29.
- [16] L. O. Ekebafé, M. O. Ekebafé, F. A. O. Akpa, G. Erhuanga, B. W. Etiobhio, 'Graft copolymerization of acrylonitrile onto delignified native bamboo (*Bambusa vulgaris*) cellulosic and its utilization potential for heavy metal uptake from aqueous medium', *Chem. Ind. Chem. Eng. Q.* **2011**, *17*, 133–140.
- [17] S. Cao, X. Ma, L. Lin, F. Huang, L. Huang, L. Chen, 'Morphological and Chemical Characterization of Green Bamboo (*Dendrocalamopsis oldhami* (Munro) Keng f.) for Dissolving Pulp Production', *BioResources.* **2014**, *9*, 4528–4539.
- [18] P. F. Vena, J. F. Görgens, T. Rypstra, 'Hemicelluloses extraction from giant bamboo prior to Kraft and soda AQ pulping to produce paper pulps, value-added biopolymers and bioethanol', *Cellul. Chem. Technol.* **2010**, *44*, 153–163.
- [19] W. J. Chang, M. J. Chang, S. T. Chang, T. F. Yeh, 'Chemical composition and immunohistological variations of a growing bamboo shoot', *J. Wood Chem. Technol.* **2013**, *33*, 144–155.
- [20] H. G. Jung, K. P. Vogel, 'Influence of lignin on digestibility of forage cell wall material', *J. Anim. Sci.* **1986**, *62*, 1703–12.
- [21] J. H. Cherney, K. D. Johnson, J. J. Volenec, K. S. Anliker, 'Chemical composition of herbaceous grass and legume species grown for maximum biomass production', *Biomass* **1988**, *17*, 215–238.
- [22] A. V. Chaves, G. C. Waghorn, M. H. Tavendale, 'A simplified method for lignin measurement in a range of forage species', *J. Wood Chem. Technol.* **2002**, *33*, 144–155.
- [23] M. Tutt, J. Olt, 'Suitability of various plant species for bioethanol production', *Agron. Res. Biosyst. Eng. Spec. Issue* **2011**, *1*, 261–267.
- [24] J. D. Mauseth, B. J. Plemons, 'Developmentally variable, polymorphic woods in cacti', *Am. J. Bot.* **1995**, *82*, 1199–1205.
- [25] M. Vázquez-Sánchez, T. Terrazas, D. Grego-Valencia, S. Arias, 'Growth form and wood evolution in the tribe Cactaeae (Cactaceae)', *Willdenowia* **2017**, *47*, 49–67.
- [26] M. Vázquez-Sánchez, T. Terrazas, 'Stem and wood allometric relationships in Cactaeae (Cactaceae)', *Trees* **2011**, *25*, 755–767.
- [27] J. D. Mauseth, B. J. Plemons-Rodriguez, 'Evolution of extreme xeromorphic characters in wood: A study of nine evolutionary lines in Cactaceae', *Am. J. Bot.* **1998**, *85*, 209–218.
- [28] D. H. Arnold, J. D. Mauseth, 'Effects of environmental factors on development of wood', *Am. J. Bot.* **1999**, *86*, 367–371.
- [29] A. Gibson, 'Woody Anatomy of platyopuntias', *Aliso* **1978**, *9*, 279–307.
- [30] J. D. Mauseth, 'Structure-function relationships in highly modified shoots of cactaceae', *Ann. Bot.* **2006**, *98*, 901–926.

- [31] S. Loza-Cornejo, X. Aparicio-Fernández, R. J. Patakfalvi, G. H. Rosas-Saito, ‘Anatomic and phytochemical characters of the stem and root of *Mammillaria uncinata* (Cactaceae)’, *Acta Bot. Mex.* **2017**, *120*, 21–38.
- [32] J. Reyes-Rivera, G. Canché-Escamilla, M. Soto-Hernández, T. Terrazas, ‘Wood chemical composition in species of Cactaceae the relationship between lignification and stem morphology’, *PLoS One* **2015**, *10*, e0123919.
- [33] A. Maceda, M. Soto-Hernández, C. B. Peña-Valdivia, T. Terrazas, ‘Chemical Composition of Cacti Wood and Comparison with the Wood of Other Taxonomic Groups’, *Chem. Biodivers.* **2018**, *15*, e1700574.
- [34] J. Reyes-Rivera, M. Soto-Hernández, G. Canché-Escamilla, T. Terrazas, ‘Structural characterization of lignin in four cacti wood: Implications of lignification in the growth form and succulence’, *Front. Plant Sci.* **2018**, *871*, 1518.
- [35] H. N. Pritchard, J. A. Hall, ‘The chemical composition of glochids from *Opuntia*’, *Can. J. Bot.* **1976**, *54*, 173–176.
- [36] K. D. Kohl, A. W. Miller, M. D. Dearing, ‘Evolutionary irony: Evidence that “defensive” plant spines act as a proximate cue to attract a mammalian herbivore’, *Oikos* **2015**, *124*, 835–841.
- [37] A. Altesor, E. Ezcurra, ‘Functional morphology and evolution of stem succulence in cacti’, *J. Arid Environ.* **2003**, *53*, 557–567.
- [38] M. W. Dulin, B. K. Kirchoff, ‘Paedomorphosis, Secondary Woodiness, and Insular Woodiness in Plants’, *Bot. Rev.* **2010**, *76*, 405–490.
- [39] S. Loza-Cornejo, T. Terrazas, L. López-Mata, C. Trejo, ‘Características morfo-anatómicas y metabolismo fotosintético en plántulas de *Stenocereus queretaroensis* (Cactaceae): Su significado adaptativo’, *Interciencia* **2003**, *28*, 83–89.
- [40] S. Loza-Cornejo, T. Terrazas, ‘Morfo-anatomía de plántulas en especies de Pachycereae: ¿hasta cuándo son plántulas?’, *Bol. la Soc. Bot. Mex.* **2011**, *88*, 1–13.
- [41] S. Loza-Cornejo, L. López-Mata, T. Terrazas, ‘Morphological Seed Traits and Germination of Six Species of Pachycereae (Cactaceae)’, *J. Prof. Assoc. Cactus Dev.* **2008**, *10*, 71–84.
- [42] S. Guillén, T. Terrazas, E. de la Barrera, A. Casas, ‘Germination differentiation patterns of wild and domesticated columnar cacti in a gradient of artificial selection intensity’, *Genet. Resour. Crop Evol.* **2011**, *58*, 409–423.
- [43] R.-A. Mariana, M. C. María, ‘Aspectos sobre la germinación de *Myrtillocactus geometrizans*, *Stenocereus dumortieri* y *Echinocereus cinerascens*’, *Cactáceas y Suculentas Mex.* **2013**, *58*, 118–126.
- [44] L. R. Salas-Cruz, R. F. Pournavab, L. Díaz-Jiménez, J. L. Hernández-Piñero, A. Carrillo-Parra, M. L. Cárdenas-Avila, ‘Seed germination and seedling survival of six cacti species using natural zeolite as substrate’, *Int. J. Curr. Res. Acad. Rev.* **2014**, *2*, 81–91.
- [45] M. R. R. Bevilaqua, A. P. S. Filho, C. A. Mangolin, A. J. B. Oliveira, M. D. F. P. S.

- Machado, ‘Genetic and chemical diversity in seeds of cactus mandacaru (*Cereus* sp.) from two edaphoclimatic regions contrasting’, *An. Acad. Bras. Cienc.* **2015**, *87*, 765–776.
- [46] B. Sánchez-Soto, Á. Reyes-Olivas, E. García-Moya, T. Terrazas, ‘Germinación de tres cactáceas que habitan la región costera del noroeste de México’ **2010**, 299–305.
- [47] M. E. Monroy Vázquez, C. B. Peña-Valdivia, J. R. García, E. Solano, H. Campos, E. García, ‘Chemical Scarification and Ozone in Seed Dormancy Alleviation of Wild and Domesticated *Opuntia*, Cactaceae’, *Ozone Sci. Eng.* **2017**, *39*, 104–114.
- [48] L. F. Souza, B. F. Gasparetto, R. R. Lopes, I. B. I. Barros, ‘Temperature requirements for seed germination of *Pereskia aculeata* and *Pereskia grandifolia*’, *J. Therm. Biol.* **2016**, *57*, 6–10.
- [49] M. L. Bárcenas-Argüello, L. López-Mata, T. Terrazas, E. García-Moya, ‘Germinación de tres especies de *Cephalocereus* (Cactaceae) endémicas del Istmo de Tehuantepec, México’, *Polibotánica* **2013**, *36*, 105–116.
- [50] R. Wahab, M. T. Mustafa, M. Sudin, A. Mohamed, S. Rahman, H. W. Samsi, I. Khalid, ‘Extractives, Holocellulose, α -Cellulose, Lignin and Ash Contents in Cultivated Tropical Bamboo *Gigantochloa brang*, *G. levis*, *G. scortechinii* and *G. wrayi*’ **2013**, 266–272.
- [51] J. Reyes-Rivera, T. Terrazas, ‘Lignin Analysis by HPLC and FTIR.’, *Methods Mol. Biol.* **2017**, *1544*, 193–211.
- [52] C. W. Dence, in *Methods Lignin Chem.* (Eds.: S.Y. Lin, C.W. Dence), Springer, Berlin, **1992**, pp. 33–61.
- [53] J. S. Han, J. S. Rowell, in *Pap. Compos. FROM AGRO-BASED Resour.* (Eds.: R.M. Rowell, Y.A. Raymond, J.K. Rowell), Lewis Publisher, USA, **1997**, pp. 83–134.
- [54] C. L. R. Abreu, U. Orea-Igarza, E. Cordero-Manchado, ‘Composición química de tres maderas en la provincia de Pinar del Río, Cuba a tres alturas del fuste comercial. Parte N° 1: *Corymbia citriodora*’, *Rev. Chapingo. Ser. Ciencias For. y del Ambient.* **2004**, *10*, 57–62.
- [55] J. V. F. Latorraca, O. Dünisch, G. Koch, ‘Chemical composition and natural durability of juvenile and mature heartwood of *Robinia pseudoacacia* L.’, *An. Acad. Bras. Cienc.* **2011**, *83*, 1059–1068.
- [56] F. V. Fonseca-Prieto, G. Canché-Escamilla, J. C. Chavarria-Hernandez, S. Duarte-Aranda, ‘Characterization of lignocellulosic residues of henequen and their use as a bio-oil source’, *Biomass Convers. Biorefinery* **2014**, *4*, 95–104.
- [57] R. Li, G. Yang, J. Chen, M. He, ‘The characterization of hemicellulose extract from corn stalk with stepwise alkali extraction’, *Palpu Chongi Gisul/Journal Korea Tech. Assoc. Pulp Pap. Ind.* **2017**, *49*, 29–40.
- [58] V. A. Klap, M. A. Hemminga, J. J. Boon, ‘Retention of lignin in seagrasses: Angiosperms that returned to the sea’, *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **2000**, *194*, 1–11.
- [59] Z. Jin, S. Shao, K. S. Katsumata, K. Iiyama, ‘Lignin characteristics of peculiar vascular

- plants', *J. Wood Sci.* **2007**, *53*, 520–523.
- [60] J.-K. Weng, T. Akiyama, N. D. Bonawitz, X. Li, J. Ralph, C. Chapple, 'Convergent evolution of syringyl lignin biosynthesis via distinct pathways in the lycophyte *Selaginella* and flowering plants', *Plant Cell* **2010**, *22*, 1033–1045.
- [61] A. V. Marques, J. Rencoret, A. Gutiérrez, J. C. Del Río, H. Pereira, 'Ferulates and lignin structural composition in cork', *Holzforschung* **2016**, *70*, 275–289.
- [62] X. Li, C. Sun, B. Zhou, Y. He, 'Determination of Hemicellulose, Cellulose and Lignin in Moso Bamboo by Near Infrared Spectroscopy', *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 17210.
- [63] S. Jaramillo-Carmona, J. M. Fuentes-Alventosa, G. Rodríguez-Gutiérrez, K. W. Waldron, A. C. Smith, R. Guillén-Bejarano, J. Fernández-Bolaños, A. Jiménez-Araujo, R. Rodríguez-Arcos, 'Characterization of asparagus lignin by HPLC', *J. Food Sci.* **2008**, *73*, C526-532.
- [64] L. M. Kline, D. G. Hayes, A. R. Womac, N. Labbé, 'Simplified determination of lignin content in hard and soft woods via UV-spectrophotometric analysis of biomass dissolved in ionic liquids', *BioResources* **2010**, *5*, 1366–1383.
- [65] A.-S. Jääskeläinen, M. Nuopponen, P. Axelsson, M. Tenhunen, M. Löijä, T. Vuorinen, 'Determination of Lignin Distribution in Pulps by FTIR ATR Spectroscopy', *J. Pulp Pap. Sci.* **2003**, *29*, 328-331.
- [66] G. Zhou, G. Taylor, A. Polle, 'FTIR-ATR-based prediction and modelling of lignin and energy contents reveals independent intra-specific variation of these traits in bioenergy poplars', *Plant Methods* **2011**, *7*, DOI 10.1186/1746-4811-7-9.
- [67] M. L. Luna, J. P. R. Giacosa, G. E. Giudice, P. V. Fernández, M. Ciancia, M. C. N. Saparrat, 'Structure and chemistry of the xylem of arborescent species of *Blechnum* from South America', *IAWA J.* **2015**, *36*, 3–21.
- [68] R. Safou-Tchiama, T. A. Barhé, P. Soulounganga, A. G. Akagah, B. De Jeso, 'A comparative study of the syringyl, guaiacyl and hydroxyl groups units distribution in some African tropical hardwoods lignin by Py-GC/MS and spectroscopic techniques', *J. Mater. Environ. Sci.* **2017**, *8*, 2530–2540.
- [69] K. K. Pandey, 'Study of the effect of photo-irradiation on the surface chemistry of wood', *Polym. Degrad. Stab.* **2005**, *90*, 9–20.
- [70] A. Dinno, 'Nonparametric pairwise multiple comparisons in independent groups using Dunn's test', *Stata J.* **2015**, *15*, 292–300.
- [71] B. Q. Huang, E. C. Yeung, in *Plant Microtech. Protoc.* (Eds.: E.C.T. Yeung, C. Stasolla, M.J. Sumner, B.Q. Huang), Springer International Publishing, Switzerland, **2015**, pp. 23–43.
- [72] S. Loza-Cornejo, T. Terrazas, 'Anatomía del tallo y de la raíz de dos especies de *Wilcoxia* Britton & Rose (Cactaceae) del noreste de México', *Bot. Sci.* **1996**, 13–23.
- [73] J. Haseloff, 'Old botanical techniques for new microscopes', *Biotechniques* **2003**, *34*, 1174–1182.

- [74] V. De Micco, G. Aronne, ‘Combined histochemistry and autofluorescence for identifying lignin distribution in cell walls’, *Biotech. Histochem.* **2007**, 82, 209–216.
- [75] J. H. Frank, A. D. Elder, J. Swartling, A. R. Venkitaraman, A. D. Jeyasekharan, C. F. Kaminski, ‘A white light confocal microscope for spectrally resolved multidimensional imaging’, *J. Microsc.* **2007**, 227, 203–215.
- [76] G. Angeles, S. A. Owens, F. W. Ewers, ‘Fluorescence shell: a novel view of sclereid morphology with the Confocal Laser Scanning Microscope’, *Microsc. Res. Tech.* **2004**, 63, 282–288.
- [77] J. Bond, L. Donaldson, S. Hill, K. Hitchcock, ‘Safranin fluorescent staining of wood cell walls.’, *Biotech. Histochem.* **2008**, 83, 161–171.
- [78] L. Donaldson, ‘Softwood and hardwood lignin fluorescence spectra of wood cell walls in different mounting media’, *IAWA J.* **2013**, 34, 3–19.
- [79] Y. Zeng, S. Zhao, H. Wei, M. P. Tucker, M. E. Himmel, N. S. Mosier, R. Meilan, S. Y. Ding, ‘In situ micro-spectroscopic investigation of lignin in poplar cell walls pretreated by maleic acid’, *Biotechnol. Biofuels* **2015**, 8, 126.
- [80] N. P. Kutscha, R. R. Mcormond, ‘The Suitability of Using Fluorescence Microscopy for Studying Lignification in Balsam’, *Tech. Bull. Life Sci. Agric. Exp. Station. Univ. Maine* **1972**, 62, 15.
- [81] R. Decou, H. Serk, D. Ménard, E. Pesquet, ‘Analysis of Lignin Composition and Distribution Using Fluorescence Laser Confocal Microspectroscopy’, *Methods Mol. Biol.* **2017**, 1544, 233–247.
- [82] S. Kiyoto, A. Yoshinaga, E. Fernandez-Tendero, A. Day, B. Chabbert, K. Takabe, ‘Distribution of Lignin, Hemicellulose, and Arabinogalactan Protein in Hemp Phloem Fibers’, *Microsc. Microanal.* **2018**, 24, 442–452.
- [83] L. Donaldson, K. Radotić, A. Kalauzi, D. Djikanović, M. Jeremić, ‘Quantification of compression wood severity in tracheids of *Pinus radiata* D. Don using confocal fluorescence imaging and spectral deconvolution’, *J. Struct. Biol.* **2010**, 169, 106–115.
- [84] Z. Ji, J. F. Ma, Z. H. Zhang, F. Xu, R. C. Sun, ‘Distribution of lignin and cellulose in compression wood tracheids of *Pinus yunnanensis* determined by fluorescence microscopy and confocal Raman microscopy’, *Ind. Crops Prod.* **2013**, 47, 212–217.
- [85] Y. Zeng, M. E. Himmel, S.-Y. Ding, ‘Visualizing chemical functionality in plant cell walls’, *Biotechnol. Biofuels* **2017**, 10, 263.
- [86] L. Donaldson, N. Williams, ‘Imaging and Spectroscopy of Natural Fluorophores in Pine Needles.’, *Plants (Basel, Switzerland)* **2018**, 7, 1–16.
- [87] M. B. Dürrenberger, S. Handschin, B. Conde-Petit, F. Escher, ‘Visualization of Food Structure by Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM)’, *LWT - Food Sci. Technol.* **2001**, 34, 11–17.
- [88] L. Reti, J. A. Castrillón, ‘Cactus Alkaloids. I. *Trichocereus terscheckii* (Parmentier) Britton

- and Rose', *J. Am. Chem. Soc.* **1951**, 73, 1767–1769.
- [89] E. H. Park, J. H. Kahng, S. H. Lee, K. H. Shin, 'An anti-inflammatory principle from cactus', *Fitoterapia* **2001**, 72, 288–290.
- [90] J. O. Vargas Muñoz, Comportamiento de Algunos Extractos de La Corteza de Pino Caribe (*Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis* Barret & Golfari) Sobre El Crecimiento de Hongos Xilofagos y Su Acción Antioxidante, Cochabamba, **2008**.
- [91] L. Wang, W. Peng, Z. Lin, Y. Tan, L. Shi, 'Analysis on molecular characteristics of wood extractives from *Eucalyptus urophydis* biomass', *Biotechnol. an Indian J.* **2013**, 7, 559–564.
- [92] C. Hernández-Sánchez, 'Caracterización de extractivos en alcohol-benceno solubles en acetona del bagazo de la caña de azúcar mediante Cromatografía Gaseosa-Espectrometría de Masas', *Rev. Cent. Azúcar* **2015**, 42, 42–50.
- [93] R. H. R. Carvalho, E. L. Galvão, J. A. C. Barros, M. M. Conceição, E. M. B. D. Sousa, 'Extraction, fatty acid profile and antioxidant activity of sesame extract: (*Sesamum indicum* L.)', *Brazilian J. Chem. Eng.* **2012**, 29, 409–420.
- [94] A. N. Shebani, A. J. van Reenen, M. Meincken, 'The effect of wood extractives on the thermal stability of different wood-LLDPE composites', *Thermochim. Acta* **2009**, 481, 52–56.
- [95] M. L. Campaña, A. Tijero, R. Aguado, M. M. López, A. Moral, 'Biorrefinería de residuos de marea: obtención de celulosa de alta pureza', *Biosaia* **2014**, 3, 1–3.
- [96] A. Mohammadkhani, F. L. Stoddard, D. R. Marshall, 'Survey of amylose content in Secale cereale, *Triticum monococcum*, *T. turgidum* and *T. tauschii*', *J. Cereal Sci.* **1998**, 28, 273–280.
- [97] B. Butkutė, N. Lemežienė, J. Cesevičienė, Ž. Liatukas, G. Dabkevičienė, 'Carbohydrate and lignin partitioning in switchgrass (*Panicum virgatum* L.) biomass as a bioenergy feedstock', *Zemdirbyste-Agriculture* **2013**, 100, 251–260.
- [98] H. V. Scheller, P. Ulvskov, 'Hemicelluloses', *Annu. Rev. Plant Biol.* **2010**, 61, 263–289.
- [99] E. Novaes, M. Kirst, V. Chiang, H. Winter-Sederoff, R. Sederoff, 'Lignin and biomass: A negative correlation for wood formation and lignin content in trees', *Plant Physiol.* **2010**, 154, 555–561.
- [100] J. Barros, H. Serk, I. Granlund, E. Pesquet, 'The cell biology of lignification in higher plants', *Ann. Bot.* **2015**, 115, 1053–1074.
- [101] M. Kubo, M. Udagawa, N. Nishikubo, G. Horiguchi, M. Yamaguchi, J. Ito, T. Mimura, H. Fukuda, T. Demura, 'Transcription switches for protoxylem and metaxylem vessel formation', *Genes Dev.* **2005**, 19, 1855–1860.
- [102] C. A. Alalor, J. A. Avbunudiogba, K. Augustine, 'Isolation and characterization of mucilage obtained from *Colocasia esculenta*', *Int. J. Pharm. Biol. Sci.* **2014**, 4, 25–29.
- [103] M. A. S. Amutha Gnana Arasi, M. G. Rao, J. Bagyalakshmi, 'The comparison and analysis

- of two extraction methods for polysaccharides in *Psidium guajava* L. Fruits’, *Indian J. Pharm. Educ. Res.* **2016**, *50*, S218–S224.
- [104] L. Plavcová, S. Jansen, in *Funct. Ecol. Xylem Anat.* (Ed.: U. Hacke), Springer International Publishing, Switzerland, **2015**, pp. 209–234.
- [105] J. S. Amthor, ‘Efficiency of lignin biosynthesis: a quantitative analysis’, *Ann. Bot.* **2003**, *91*, 673–695.
- [106] A. Ros Barceló, L. V. Gómez Ros, C. Gabaldón, M. López-Serrano, F. Pomar, J. S. Carrión, M. A. Pedreño, ‘Basic peroxidases: The gateway for lignin evolution?’, *Phytochem. Rev.* **2004**, *3*, 61–78.
- [107] L. Pereira, D. N. A. Flores-Borges, P. R. L. Bittencourt, J. L. S. Mayer, E. Kiyota, P. Araújo, S. Jansen, R. O. Freitas, R. S. Oliveira, P. Mazzafera, ‘Infrared nanospectroscopy reveals the chemical nature of pit membranes in water-conducting cells of the plant xylem’, *Plant Physiol.* **2018**, *177*, 1629–1638.
- [108] I. W. Bailey, ‘The Development of Vessels in Angiosperms and its Significance in Morphological Research’, *Am. J. Bot.* **1944**, *31*, 421–428.
- [109] S. Carlquist, ‘Xylem heterochrony: An unappreciated key to angiosperm origin and diversifications’, *Bot. J. Linn. Soc.* **2009**, *161*, 26–65.
- [110] M. M. Kohonen, Å. Helland, ‘On the Function of Wall Sculpturing in Xylem Conduits’, *J. Bionic Eng.* **2009**, *6*, 324–329.
- [111] M. McCully, M. Canny, A. Baker, C. Miller, ‘Some properties of the walls of metaxylem vessels of maize roots, including tests of the wettability of their luminal wall surfaces’, *Ann. Bot.* **2014**, *113*, 977–989.
- [112] G. N. Karam, ‘Biomechanical model of the xylem vessels in vascular plants’, *Ann. Bot.* **2005**, *95*, 1179–1186.
- [113] T. Y. Garrett, C.-V. Huynh, G. B. North, ‘Root contraction helps protect the “living rock” cactus *Ariocarpus fissuratus* from lethal high temperatures when growing in rocky soil’, *Am. J. Bot.* **2010**, *97*, 1951–1960.
- [114] M. S. Box, B. J. Glover, ‘A plant developmentalist’s guide to pedomorphosis: reintroducing a classic concept to a new generation’, *Trends Plant Sci.* **2010**, *15*, 241–246.
- [115] S. Carlquist, ‘How wood evolves: A new synthesis’, *Botany* **2012**, *90*, 901–940.
- [116] Z. A. Popper, G. Michel, C. Hervé, D. S. Domozych, W. G. T. Willats, M. G. Tuohy, B. Kloareg, D. B. Stengel, ‘Evolution and Diversity of Plant Cell Walls: From Algae to Flowering Plants’, *Annu. Rev. Plant Biol.* **2011**, *62*, 567–590.
- [117] D. J. Cosgrove, M. C. Jarvis, ‘Comparative structure and biomechanics of plant primary and secondary cell walls’, *Front. Plant Sci.* **2012**, *3*, 204.
- [118] H. Renault, D. Werck-Reichhart, J. K. Weng, ‘Harnessing lignin evolution for biotechnological applications’, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2019**, *56*, 105–111.

- [119] J. S. Sperry, U. G. Hacke, T. S. Feild, Y. Sano, E. H. Sikkema, ‘Hydraulic consequences of vessel evolution in angiosperms’, *Int. J. Plant Sci.* **2007**, *168*, 1127–1139.
- [120] J. K. Weng, C. Chapple, ‘The origin and evolution of lignin biosynthesis’, *New Phytol.* **2010**, *187*, 273–285.
- [121] T. S. Feild, J. P. Wilsony, ‘Evolutionary Voyage of angiosperm vessel structure-function and its significance for early angiosperm success’, *Int. J. Plant Sci.* **2012**, *173*, 596–609.
- [122] M. Speranza, A. Gutiérrez, J. C. Del Río, L. Bettucci, Á. T. Martínez, M. J. Martínez, ‘Sterols and lignin in *Eucalyptus globulus* Labill. wood: Spatial distribution and fungal removal as revealed by microscopy and chemical analyses’, *Holzforschung* **2009**, *63*, 362–370.
- [123] N. Bergau, A. N. Santos, A. Henning, G. U. Balcke, A. Tissier, ‘Autofluorescence as a signal to sort developing glandular trichomes by flow cytometry’, *Front. Plant Sci.* **2016**, *7*, 949.
- [124] B. Albinsson, S. Li, K. Lundquist, R. Stomberg, ‘The origin of lignin fluorescence’, *J. Mol. Struct.* **1999**, *508*, 19–27.
- [125] K. Radotić, A. Kalauzi, D. Djikanović, M. Jeremić, R. M. Leblanc, Z. G. Cerović, ‘Component analysis of the fluorescence spectra of a lignin model compound’, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2006**, *83*, 1–10.
- [126] C. Zhou, Q. Li, V. L. Chiang, L. A. Lucia, D. P. Griffis, ‘Chemical and spatial differentiation of syringyl and guaiacyl lignins in poplar wood via time-of-flight secondary ion mass spectrometry’, *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 7020–7025.
- [127] K. Saito, Y. Watanabe, M. Shirakawa, Y. Matsushita, T. Imai, T. Koike, Y. Sano, R. Funada, K. Fukazawa, K. Fukushima, ‘Direct mapping of morphological distribution of syringyl and guaiacyl lignin in the xylem of maple by time-of-flight secondary ion mass spectrometry’, *Plant J.* **2012**, *69*, 542–552.
- [128] L. Li, Xiao Fei Cheng, J. Leshkevich, T. Umezawa, S. A. Harding, V. L. Chiang, ‘The last step of syringyl monolignol biosynthesis in angiosperms is regulated by a novel gene encoding sinapyl alcohol dehydrogenase’, *Plant Cell* **2001**, *13*, 1567–1585.
- [129] L. A. Donaldson, A. P. Singh, A. Yoshinaga, K. Takabe, ‘Lignin distribution in mild compression wood of *Pinus radiata*’, *Can. J. Bot.* **1999**, *77*, 41–50.
- [130] L. A. Donaldson, J. Paul Knox, ‘Localization of cell wall polysaccharides in normal and compression wood of radiata pine: Relationships with lignification and microfibril orientation’, *Plant Physiol.* **2012**, *158*, 642–653.
- [131] L. Donaldson, A. Vaidya, ‘Visualising recalcitrance by colocalisation of cellulase, lignin and cellulose in pretreated pine biomass using fluorescence microscopy’, *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 44386.
- [132] J. R. Obst, J. Ralph, ‘Characterization of hardwood lignin: Investigation of syringyl/guaiacyl composition by ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy’, *Holzforschung* **1983**, *37*, 297–302.

- [133] K. Takabe, S. Miyauchi, R. Tsunoda, K. Fukazawa, 'Distribution of Guaiacyl and Syringyl Lignins in Japanese Beech (*Fagus crenata*): Variation Within an Annual Ring', *IAWA J.* **1992**, *13*, 105–112.
- [134] Y. Watanabe, Y. Kojima, T. Ona, T. Asada, Y. Sano, K. Fukazawa, 'Histochemical study on heterogeneity of lignin in *Eucalyptus* species II. The distribution of lignins and polyphenols in the walls of various cell types', *IAWA J.* **2004**, *25*, 283–295.
- [135] A. Altesor, 'Allometric neoteny and the evolution of succulence in cacti', *Bot. J. Linn. Soc.* **1994**, *114*, 283–292.
- [136] L. A. Donaldson, 'Abnormal lignin distribution in wood from severely drought stressed *Pinus radiata* trees', *IAWA J.* **2002**, *23*, 161–178.
- [137] A. Lourenço, J. Rencoret, C. Chemetova, J. Gominho, A. Gutiérrez, J. C. Del Río, H. Pereira, 'Lignin Composition and Structure Differs between Xylem, Phloem and Pith in *Quercus suber* L.', *Front. Plant Sci.* **2016**, *7*, 1612.
- [138] U. C. Malavasi, A. S. Davis, M. de M. Malavasi, 'Lignin in woody plants under water stress: A review', *Floresta e Ambient.* **2016**, *23*, 589–597.
- [139] P. Prislán, G. Koch, K. Cufar, J. Gričar, U. Schmitt, 'Topochemical investigations of cell walls in developing xylem of beech (*Fagus sylvatica* L.)', *Holzforschung* **2009**, *63*, 482–490.
- [140] C. Grünwald, K. Ruel, U. Schmitt, 'Differentiation of xylem cells in rolC transgenic aspen trees - A study of secondary cell wall development', *Ann. For. Sci.* **2002**, *59*, 679–685.
- [141] C. K. Boyce, M. A. Zwieniecki, G. D. Cody, C. Jacobsen, S. Wirick, A. H. Knoll, N. M. Holbrook, 'Evolution of xylem lignification and hydrogel transport regulation', *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 17555–17558.
- [142] J. H. Grabber, 'How Do Lignin Composition, Structure, and Cross-Linking Affect Degradability? A Review of Cell Wall Model Studies', *Crop Sci.* **2005**, *45*, 820–831.
- [143] N. Yoshizawa, H. Ohba, J. Uchiyama, S. Yokota, 'Deposition of lignin in differentiating xylem cell walls of normal and compression wood of *Buxus microphylla* var. *insularis* Nakai', *Holzforschung* **1999**, *53*, 156–160.
- [144] L. A. Donaldson, 'Lignification and lignin topochemistry - An ultrastructural view', *Phytochemistry* **2001**, *57*, 859–873.
- [145] N. Yoshizawa, M. Satoh, S. Yokota, T. Idei, 'Formation and structure of reaction wood in *Buxus microphylla* var. *insularis* Nakai', *Wood Sci. Technol.* **1992**, *27*, 1–10.
- [146] N. Yoshizawa, N. Watanabe, S. Yokota, T. Idei, 'Distribution of Guaiacyl and Syringyl Lignins in Normal and Compression Wood of *Buxus microphylla* var. *insularis* Nakai', *IAWA J.* **1993**, *14*, 139–151.
- [147] J. D. Mauseth, Y. Uozumi, B. J. Plemons, J. V. Landrum, 'Structural and systematic study of an unusual tracheid type in cacti', *J. Plant Res.* **1995**, *108*, 517–526.
- [148] J. V. Landrum, 'Wide-band tracheids in genera of Portulacaceae: novel, non-xylary tracheids

- possibly evolved as an adaptation to water stress', *J. Plant Res.* **2006**, *119*, 497–504.
- [149] M. J. Linton, P. S. Nobel, 'Hydraulic conductivity, xylem cavitation, and water potential for succulent leaves of *Agave deserti* and *Agave tequilana*', *Int. J. Plant Sci.* **2001**, *162*, 747–754.
- [150] A. Nerd, P. M. Neumann, 'Phloem water transport maintains stem growth in a drought-stressed crop cactus (*Hylocereus undatus*)', *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* **2004**, *129*, 486–490.
- [151] S. Kiyoto, A. Yoshinaga, E. Fernandez-Tendero, A. Day, B. Chabbert, K. Takabe, 'Distribution of Lignin, Hemicellulose, and Arabinogalactan Protein in Hemp Phloem Fibers', *Microsc. Microanal.* **2018**, *24*, 442–452.
- [152] L. Donaldson, K. Radotić, A. Kalauzi, D. Djikanović, M. Jeremić, 'Quantification of compression wood severity in tracheids of *Pinus radiata* D. Don using confocal fluorescence imaging and spectral deconvolution', *J. Struct. Biol.* **2010**, *169*, 106–115.
- [153] Y. Zeng, M. E. Himmel, S.-Y. Ding, 'Visualizing chemical functionality in plant cell walls', *Biotechnol. Biofuels* **2017**, *10*, 263.
- [154] M. B. Dürrenberger, S. Handschin, B. Conde-Petit, F. Escher, 'Visualization of Food Structure by Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM)', *LWT - Food Sci. Technol.* **2001**, *34*, 11–17.
- [155] J. E. Bidlack, D. R. Buxton, 'Content and deposition rates of cellulose, hemicellulose, and lignin during regrowth of forage grasses and legumes', *Can. J. Plant Sci.* **1992**, *72*, 809–818.
- [156] I. Ekpo, R. Ogali, S. Ofodile, O. Achugasim, 'Comparison of Biomass Content for the Evaluation of Cellulosic Ethanol Fuel Production from Predominant Perennial Grasses in South-South, Nigeria', *Int. J. Appl. Sci. Technol.* **2016**, *6*, 38–46.
- [157] H. Ren, X. Dai, H. Zhai, Z. Liu, S. Omori, 'Comparison of bamboo native lignin and alkaline lignin modified by phase-method', *Cellul. Chem. Technol.* **2015**, *49*, 429–438.
- [158] S. H. Kamarullah, M. M. Mydin, W. S. Atikah, W. Omar, S. S. Harith, B. Hisham, M. Noor, N. Zaimatul, A. Alias, S. Manap, R. Mohamad, 'Surface morphology and chemical composition of napier grass fibers', *Malaysian J. Anal. Sci.* **2015**, *19*, 889–895.
- [159] J. Zhang, Y. S. Choi, C. G. Yoo, T. H. Kim, R. C. Brown, B. H. Shanks, 'Cellulose-hemicellulose and cellulose-lignin interactions during fast pyrolysis', *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2015**, *3*, 293–301.

CAPÍTULO III. CARACTERIZACIÓN QUÍMICA, CUANTIFICACIÓN DE LIGNOCELULÓSICOS E ÍNDICES DE CRISTALINIDAD EN TRES ESPECIES DE *Opuntia* CON POTENCIAL INDUSTRIAL Y BIOCOMBUSTIBLES

3.1 RESUMEN

El género *Opuntia* se cultiva en México por sus frutos y cladodios jóvenes y maduros. En la industria del papel y la energética se ha investigado poco sobre su uso. Los objetivos de este estudio fueron cuantificar extraíbles en diferentes disolventes orgánicos y agua, cuantificar compuestos lignocelulósicos, comparar la proporción de sirinigilo/guayacilo de la lignina y calcular los índices de cristalinidad de la celulosa. La hipótesis fue que hubo diferencias entre las especies. Cladodios maduros de tres especies de *Opuntia* se deshidrataron y trituraron; con la harina se hicieron extracciones en secuencia con disolventes con base en la norma TAPPI T-222 om-02. La lignina Klason, celulosa y hemicelulosas se cuantificaron. De muestras de celulosa y lignina se obtuvieron los espectros de infrarrojo por Transformada de Fourier para calcular la relación de sirinigilo/guayacilo de lignina y los índices de celulosa cristalina. Los porcentajes de agua variaron de 89 a 92 %; con el análisis de Kruskal-Wallis se obtuvo diferencias significativas ($p > 0.05$) en extraíbles con etanol: benceno, celulosa y hemicelulosas. *Opuntia ficus-indica* tuvo la mayor cantidad de celulosa (32.6 %) y hemicelulosas (13.5 %) y *O. streptacantha* presentó menor porcentaje de celulosas (28.1 %) y hemicelulosas (9.8 %). La relación de sirinigilo/guayacilo fue de 1.59 a 2.12, por la presencia de más de 60 % de sirinigilo. Los índices de cristalinidad revelaron porcentajes mayores a 60 % de celulosa cristalina. Los porcentajes de lignocelulósicos y composición química de lignina y celulosa posibilita el uso de las especies de *Opuntia* en la producción de nanofibras de celulosa y biocombustibles.

Palabras clave: *Opuntia*, proporción S/G, celulosa cristalina, FTIR, biocombustibles

3.2 ABSTRACT

The *Opuntia* genus is grown in Mexico for its young and mature fruits and cladodes. In the paper and energy industry little research has been done on its use. The objectives of this study were to quantify extractives in different organic solvents and water, to quantify lignocellulosic compounds, to compare the ratio of syringyl/guaiacyl of lignin and to

calculate the crystallinity index of cellulose. The hypothesis was that there were differences between species. Mature cladodes of three *Opuntia* species were dehydrated and milled; with the flour, extractions were made in sequence with solvents based on the TAPPI standard T-222 om-02. Lignin Klason, cellulose and hemicellulose were quantified. From cellulose and lignin samples Fourier transform infrared spectra were obtained to calculate the syringyl/guaiacyl ratio and the crystalline cellulose index. Water percentages varied from 89 to 92 %; Kruskal-Wallis analysis showed significant differences ($p > 0.05$) in extractives with ethanol:benzene, cellulose and hemicelluloses. *Opuntia ficus-indica* had the highest amount of cellulose (32.6 %) and hemicelluloses (9.8 %). The syringyl/guaiacyl ratio was from 1.59 to 2.12, due to the presence of 60 % of syringyl. Crystallinity index revealed percentages greater than 60 % of crystalline cellulose. The percentages of lignocellulosics and chemical composition of lignin and cellulose make it possible to use *Opuntia* species in the production of cellulose nanofibers and biofuels.

Keywords: *Opuntia*, ratio S/G, crystalline cellulose, FTIR, biofuels.

3.3 INTRODUCCIÓN

La producción de biocombustibles permite reducir la utilización de combustibles fósiles ^[1]. La posibilidad de desertificación debido al cambio climático ha propiciado el uso de plantas que habitan en zonas desérticas para la producción de biocombustibles ^[2,3]; además de la reducción en el uso de especies prioritarias para consumo humano como maíz y caña de azúcar ^[4]. Las especies con metabolismo ácido de las crasuláceas (MAC) son potenciales productoras de biocombustibles ^[5,6], especialmente *Agave tequilana* ^[7-9] y *Opuntia ficus-indica* ^[10-12].

Opuntia ficus-indica es la especie más estudiada por su cultivo y por ser considerada especie invasora en algunos países ^[13] y es la de mayor importancia global ^[14,15]. Se han propuesto alternativas de aprovechamiento y se ha investigado la composición química de la celulosa de diferentes partes de la planta: glóquidas y espinas ^[16-19], cáscara de frutos ^[20], cladodios ^[21-23], epidermis de cladodios ^[24], tronco principal ^[25] y semillas ^[26]; para utilizarse en biocombustibles ^[27] e industria del papel ^[25].

El género *Opuntia* es importante en México histórica y culturalmente por el aprovechado de sus cladodios como verdura (nopalitos) [28], frutos (tunas) [29] y forraje [30]. En México existen 65000 ha de cultivo de nopal [31] y anualmente se obtiene un aproximado de 10.5 a 11.8 toneladas por ha [32,33], en Zacatecas, Aguascalientes, San Luis Potosí, Guanajuato, Jalisco y Estado de México principalmente [28].

Ochenta y tres especies de *Opuntia* son reconocidas en México con potencial de aprovechamiento [32]; la mayoría de estudios de *O. robusta* y *O. streptacantha* se han enfocado en la calidad nutricional de frutos [34,35]. La composición de celulosa cristalina, porcentajes de hemicelulosas y la relación de sirinigilo/guayacilo de cladodios maduros de *O. robusta* y *O. streptacantha* no ha sido estudiada.

Por lo que los objetivos de este estudio fueron cuantificar la composición química de cladodios, evaluar la proporción de sirinigilo/guayacilo, calcular el porcentaje de celulosa cristalina y comparar los resultados de *Opuntia ficus-indica*, *O. robusta* y *O. streptacantha* con la literatura. La hipótesis fue que hubo diferencias en la composición de celulosa entre las especies de *Opuntia*.

3.4 RESULTADOS

3.4.1 Composición química de cladodios

El promedio del tamaño de los cladodios difirió entre las especies con excepción de su longitud ($p = 0.064$). Los cladodios de *O. robusta* fueron los más anchos (24.32 cm), gruesos (2.1 cm) y pesados (2.78 kg) en comparación con las otras especies (14.28-15.32 cm, 0.88-1.46 cm, 0.70-0.98 kg respectivamente). *O. ficus-indica* (92.1 %) y *O. robusta* (92 %) tuvieron diferencias significativas ($p < 0.05$) en el contenido de agua con respecto a *O. streptacantha* (89.7 %) (Cuadro 3.1).

O. robusta tuvo diferencias significativas ($p < 0.05$) en el porcentaje de extraíbles con etanol:benceno (4.22%) (Figura 3.1), con respecto a *O. ficus-indica* (3.1 %) y *O. streptacantha* (2.9 %). Los porcentajes de extraíbles en etanol (96 %), agua a 90 °C, extraíbles totales y madera libre de extraíbles, no tuvieron significativas ($p > 0.05$). Sin embargo, *O. streptacantha* tuvo el mayor porcentaje en extraíbles en etanol (1.76 %), agua (44.52 %) y

extraíbles totales (49.20 %); mientras que *O. ficus-indica* presentó la mayor cantidad de madera libre de extraíbles (56.7 %) (Figura 3.1).

Cuadro 3.1. Media, desviación estándar y comparación de medias de los tamaños de cladodio de las tres especies de *Opuntia*. Las letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas en cada línea (Tukey, $p < 0.05$)

Especie	<i>O. ficus-indica</i>	<i>O. robusta</i>	<i>O. streptacantha</i>
Largo (cm)	42.72±6.95 ^A	42.5±3.34 ^A	34.84±5.24 ^A
Ancho (cm)	14.28±1.74 ^A	24.32±3.64 ^B	15.32±2.22 ^A
Grosor (cm)	1.46±0.6 ^{AB}	2.1±0.46 ^B	0.88±0.04 ^A
Peso fresco (kg)	0.98±0.09 ^B	2.78±0.22 ^C	0.70±0.09 ^A
Peso seco (kg)	0.08±0.01 ^A	0.22±0.03 ^B	0.07±0.01 ^A
Contenido de agua (%)	92.1±0.4 ^B	92.0±0.58 ^B	89.7±0.87 ^A

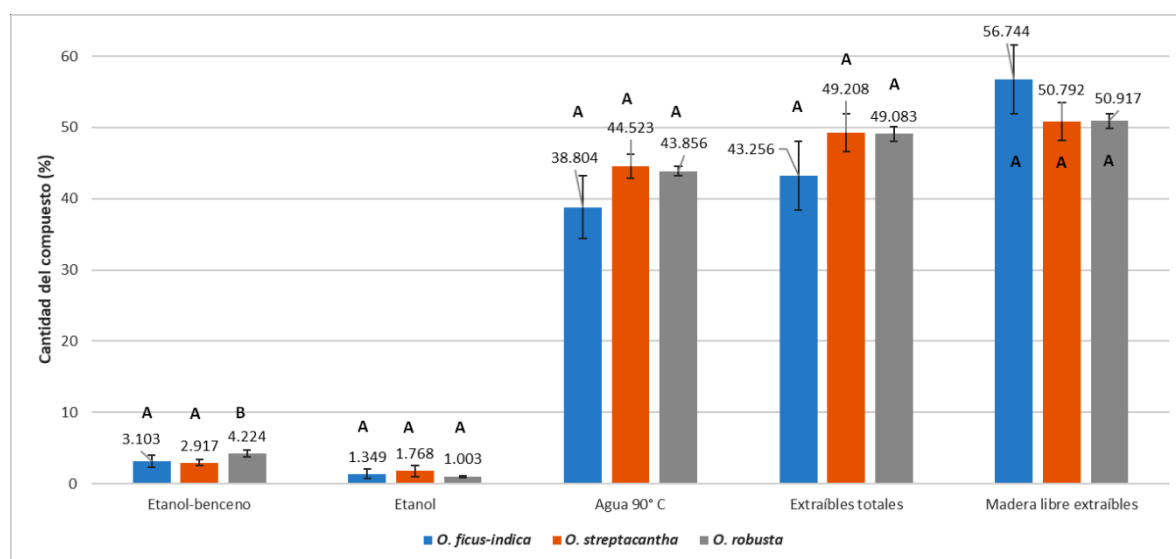


Figura 3.1. Media de los porcentajes de cada tipo de extraíble y madera libre de extraíble para las tres especies de *Opuntia*. Las barras indican la desviación estándar. Las letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas (Tukey, $p \leq 0.05$).

Las diferencias en celulosa fueron significativas ($p < 0.05$) entre *O. ficus-indica* (32.629 %) y *O. streptacantha* (28.122 %). En hemicelulosas, las diferencias significativas ($p < 0.05$) fueron entre *O. ficus-indica* (13.55 %) y *O. streptacantha* (11.49 %) con respecto a *O. robusta* (9.86 %). Lignina no tuvo diferencias significativas ($p > 0.05$) (Figura 3.2).

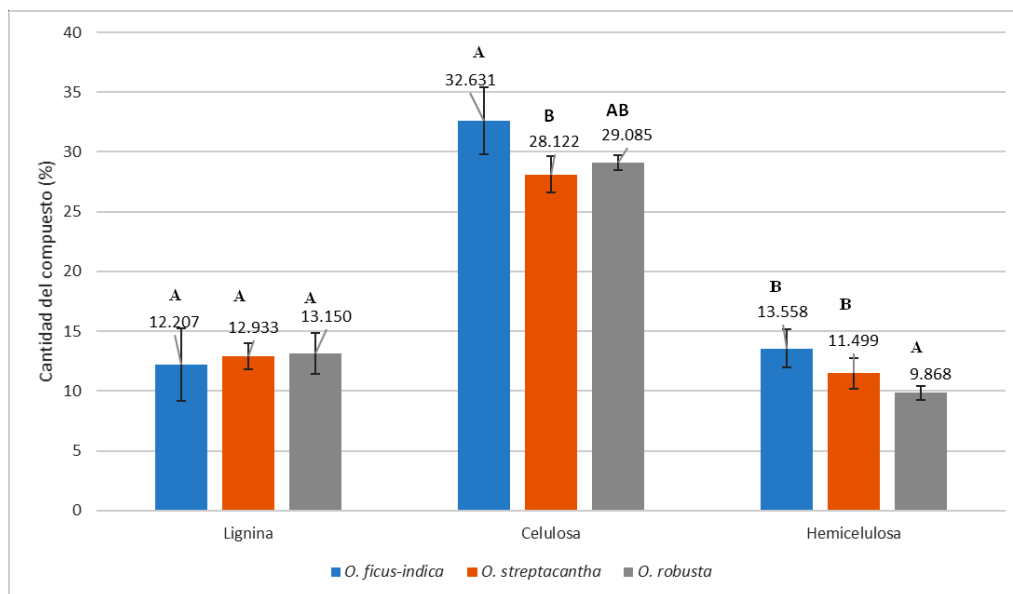


Figura 3.2. Media de los porcentajes de cada tipo de compuesto lignocelulósico para las tres especies de *Opuntia*. Letras distintas indican diferencias significativas entre medias (Dunn y Tukey, $p \leq 0.05$)

3.4.2 Relación S/G

Los espectros FTIR de *Opuntia* reflejaron las bandas asociadas a lignina. La banda 1501 cm^{-1} mostró la vibración del anillo aromático C=C de guayacilo-siringilo; 1325 cm^{-1} correspondió con la expansión-contracción del anillo de siringilo y estiramiento de C-O; 1271 cm^{-1} reflejó la vibración simétrica de C-O y del ciclo glucopiranosico de guayacilo; la 1225 cm^{-1} mostró la vibración simétrica de C-O y del ciclo glucopiranosico de siringilo; 1030 cm^{-1} reflejó la deformación del plano C-H de guayacilo y deformación del alcohol primario C-O y la 913 cm^{-1} mostró la deformación =CH fuera del plano del anillo aromático de guayacilo y siringilo (Figura 3.3).

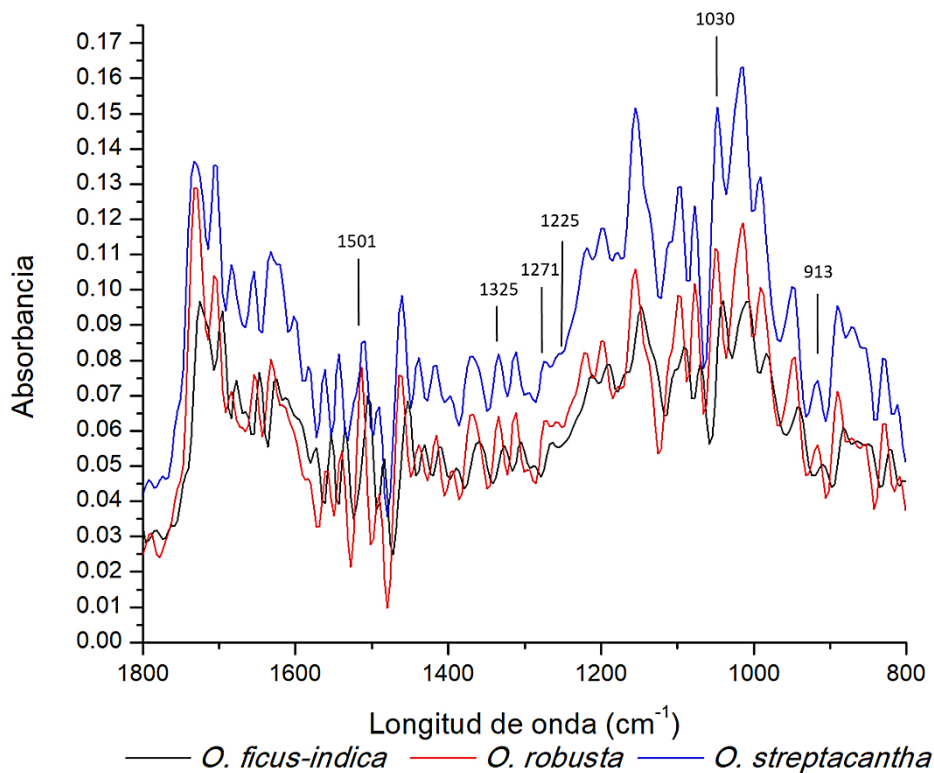


Figura 3.3. Espectro FTIR de la huella dactilar de tres especies de *Opuntia*

Cuadro 3.2. Porcentajes de siringilo, guayacilo y proporción de S/G

Especie	Siringilo	Guayacilo	S/G
<i>O. ficus-indica</i>	61.4	38.6	1.59
<i>O. robusta</i>	64.7	35.3	1.83
<i>O. streptacantha</i>	67.9	32.1	2.12

La proporción de siringilo y guayacilo (S/G) se obtuvo con las bandas 1325 y 1271 cm^{-1} . El porcentaje de siringilo fue mayor que el de guayacilo (Cuadro 3.2); *O. streptacantha* tuvo una proporción mayor de S/G (2.12) mientras que *O. ficus-indica* presentó la menor proporción (1.59).

3.4.3 Cristalinidad de la celulosa

Los espectros de FTIR reflejaron las bandas de la celulosa purificada (Figura 3.4). La banda de 3000 a 3600 cm^{-1} correspondió con el estiramiento de OH (enlaces de hidrógeno); 2900 cm^{-1} reflejó el estiramiento de CH; 1430 cm^{-1} el doblamiento de CH_2 (celulosa cristalina y amorfa); 1372 cm^{-1} representó el doblamiento de CH; 1336 cm^{-1} el doblamiento en plano de OH (celulosa amorfa). La banda 1317 cm^{-1} reflejó la agitación de CH_2 (celulosa cristalina I);

1163 cm^{-1} la unión asimétrica del estiramiento del oxígeno de C-O-C; 893 cm^{-1} correspondió con la asimetría del estiramiento y deformación de C-O-C, C-C-O y C-C-H; 670 cm^{-1} mostró el estiramiento C-O-H fuera del plano. La pureza de celulosa se determinó con la ausencia de respuesta de las bandas 1735 cm^{-1} que corresponde a la presencia de xilanos y hemicelulosas. La ausencia de las bandas 1595 cm^{-1} , 1512 cm^{-1} y 1463 cm^{-1} indica ausencia de lignina. La ausencia de respuesta de la banda 1269 cm^{-1} reflejó la ausencia de lignina y hemicelulosa (Figura 3.4).

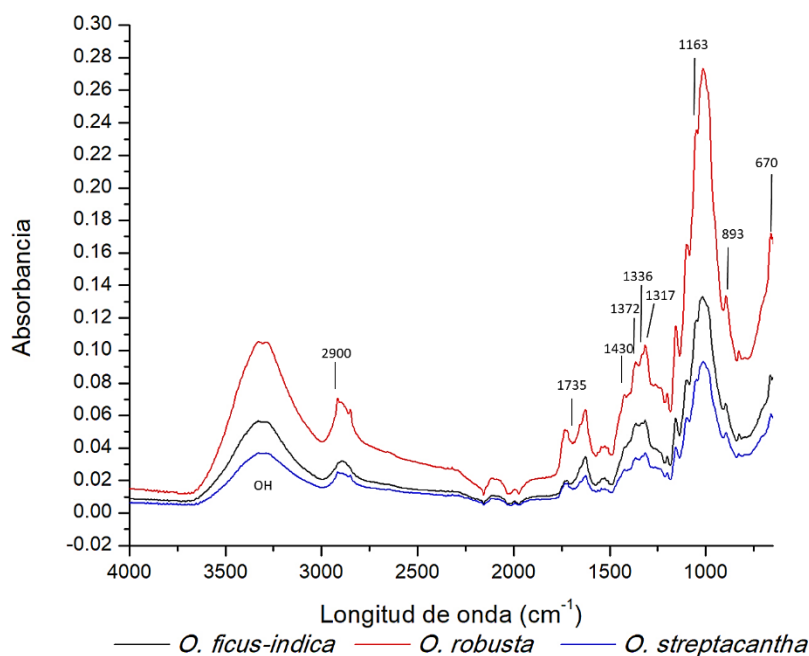


Figura 3.4. Espectro FTIR para la obtención de los índices de cristalinidad de celulosa para las tres especies de *Opuntia*.

Los índices de cristalinidad TCI, LOI e IA se presentan en el Cuadro 3.3. El índice TCI presentó porcentajes elevados de celulosa cristalina en *O. ficus-indica* (79 %), *O. robusta* (74 %) y *O. streptacantha* (76 %). El índice LOI reflejó la cristalinidad empírica de la celulosa, los porcentajes de celulosa cristalina variaron de 61 a 68 % en las tres especies de *Opuntia*. *O. ficus-indica* presentó el mayor porcentaje de celulosa cristalina (77 %) con el índice IA, *O. robusta* y *O. streptacantha* tuvieron un porcentaje del 70 % (Cuadro 3.3). Los tres índices mostraron que las tres especies de *Opuntia* tuvieron porcentajes de celulosa cristalina por encima del 60 %, para celulosa amorfa el porcentaje fue menor al 40 %.

Cuadro 3.3. Índices de cristalinidad para determinar la celulosa cristalina de las tres especies de *Opuntia*

	TCI (%)	LOI (%)	IA (%)
<i>O. ficus-indica</i>	79	68	77
<i>O. robusta</i>	74	61	70
<i>O. streptacantha</i>	76	68	70

3.5 DISCUSIÓN

3.5.1 Composición química de cladodios

El tamaño de los cladodios de *O. ficus-indica* y *O. streptacantha* estuvieron dentro de los valores reportados por Reyes-Agüero et al. [32]; la longitud, anchura y grosor de los cladodios corresponde a los valores registrados por Pérez-Sánchez et al. [36]. Estas características morfológicas son resultado de las condiciones de cultivo y domesticación y no a la expresión genética de las plantas [37,38]. Los porcentajes de agua en los cladodios corresponden con los porcentajes de 85 % [11], 88 % [10,39] y 95 % [40,41] reportados en la literatura. Comparado con los frutos, estos presentan porcentajes de agua entre 59 % a 90 % [42,43]. La acumulación de 90 % de agua en tejido parenquimático de los cladodios en las tres *Opuntias* estudiadas y las reportadas en literatura, es importante debido a que se pueden descomponer rápidamente [27] y se pueden utilizar en la producción de etanol [10,30,44] y biocombustibles [45], con rendimientos mayores que los que se obtienen en *Agave tequilana* [46].

Opuntia ficus-indica es la especie que más se ha reportado la composición química de diferentes partes de la planta (Cuadro 3.4). Los porcentajes de extraíbles en etanol:benceno, fueron similares a los reportados para el tallo *O. stenopetala* y *O. stricta* [47] y diferente al tallo de *O. ficus-indica* [25]. Las diferencias fueron debido a la utilización de tolueno por dichos autores. Sin embargo, la mezcla de disolventes de baja polaridad permite la extracción de fenólicos, aldehídos, ceras y ácidos orgánicos [48,49]. Para su aprovechamiento en otras áreas y estudios de metabolitos secundarios, la mezcla de etanol:tolueno obtuvo mayores rendimientos [25].

La extracción con etanol 96 %, permite la separación de compuestos de mayor polaridad como fenoles y compuestos polares [50]. Los porcentajes que se obtuvieron para las tres especies de *Opuntia* (1.0-1.8 %) fueron menores respecto a los de la epidermis de cladodios de *O. ficus-indica* (27.6 %) [26] y para tallos de *O. stenopetala* (8.1 %) y *O. stricta*

(8.2 %) ^[47]. En semillas de *O. ficus-indica*, los porcentajes de extraíbles en etanol 96 % son similares (1.6 %) (Cuadro 3.4).

Los porcentajes de extraíbles en agua caliente de las tres especies de *Opuntia* (38.8-44.5 %) son cercanos al porcentaje del tallo de *O. ficus-indica* (36.3 %) ^[25] y difieren con el porcentaje que presentan cladodios (63.1 %) ^[41] y tallos de *O. stenopetala* (15.6 %) y *O. stricta* (15.35 %) ^[47]. La variación de dichos porcentajes se debe a las células parenquimáticas y mucilaginosas en xilema ^[47] y región cortical ^[51] que acumulan almidones, gomas y otros compuestos solubles en agua caliente ^[52,53].

Los cladodios de *O. basilaris* (40.33 %) tuvieron concentración de extraíbles totales cercanos a los que se obtuvieron en *O. ficus-indica* (43.3 %), *O. robusta* (49.1 %) y *O. streptacantha* (49.2 %). El Kossori et al. ^[26] reportaron valores de 62.3 % para *O. ficus-indica* comparado con otros estudios donde los valores de extraíbles totales son de 17.7 a 28 % (Cuadro 3.4). La variación en los porcentajes es debido a factores ambientales ^[53] y a la parte de la planta que se analiza ^[54,55].

Los porcentajes de celulosa de *O. robusta* (29.1 %) y *O. streptacantha* (28.1 %) son similares a lo reportado en el Cuadro 3.4 para cladodios de *O. ficus-indica* (8.4-29.1 %). En *O. ficus-indica* (32.62 %) los valores fueron parecidos a *O. basilaris* (33.7 %). La acumulación de celulosa en *O. ficus-indica* varía en los diferentes órganos de la planta. Las semillas tienen valores entre 35 % ^[20] y 45.1 % ^[26]; los frutos van de 10 a 27 % ^[42,56]; el tallo presenta 53 % ^[25,57] y las espinas tienen 50 % ^[19]. La variación en la acumulación de celulosa en el mismo órgano de la planta se debe a condiciones ambientales y al cultivo de la planta ^[58,59].

El porcentaje de lignina de las tres especies estudiadas corresponde a lo reportado por Yang et al. ^[11] y Santos et al. ^[60] (Cuadro 3.4). La acumulación de lignina varía en *O. ficus-indica* debido a que se reportan valores que van de 2.7-7.95 % a 16 % (Cuadro 3.4). El tallo de *O. ficus-indica* presenta valores bajos (4.8 %; ^[25,57]) que difiere con lo reportado para otras plantas que, al madurar acumulan un mayor porcentaje de lignina ^[63,64], como se observa para *O. stenopetala*, *O. streptacantha* y *O. stricta* ^[47,62].

Cuadro 3.4. Porcentajes de extraíbles y compuestos lignocelulósicos de *O. ficus-indica* y otras especies de *Opuntia* reportados en la literatura.

Especie	Órgano de la planta	Lignina (%)	Celulosa (%)	Hemicelulosa (%)	Extraíbles (%)	Extraíbles totales (%)	Cita
<i>Opuntia basilaris</i>	Ec	7.5	33.72	21.48	-	± 40.33	1
<i>O. cochenillifera</i>	C	6.8	-	51.5	-	-	2
<i>O. compressa</i>	G	-	95	-	-	-	3
<i>O. ficus-indica</i>	C	7.95	-	42	-	24.3	4
<i>O. ficus-indica</i>	C	16	-	26.7	-	17.7	5
<i>O. ficus-indica</i>	C	3.6	21.6	48	-	-	6
<i>O. ficus-indica</i>	C	13.7-13.8	-	39.9-40.1	-	-	2
<i>O. ficus-indica</i>	C	12.3	13.1	18.5	-	25	7
<i>O. ficus-indica</i>	C	-	8.4	-	-	-	8
<i>O. ficus-indica</i>	C	2.7	18.9*	-	63.1 ^c	-	9
<i>O. ficus-indica</i>	E	0.02	29.1	8.47	27.6 ^a	± 62.23	10
<i>O. ficus-indica</i>	Ef	2.4	27	35	-	-	11
<i>O. ficus-indica</i>	Es	1.2	47.9	48.4	-	-	6
<i>O. ficus-indica</i>	F	-	10-15.4	3.2	-	-	12
<i>O. ficus-indica</i>	Ps	20	35	27	-	-	11
<i>O. ficus-indica</i>	S	0.1	45.1	5.39	1.59 ^a	± 49.41	13
<i>O. ficus-indica</i>	T	4.8	53.6	-	24 ^b , 36.3 ^c , 29.6 ^d , 9.8 ^e	-	14
<i>O. ficus-indica</i>	T	4.8	53	11	25 ^c	-	15
<i>O. stenopetala</i>	T	29.56	30.46	15.61	8.06 ^a , 15.6 ^c , 2.31 ^e	24.36	16
<i>O. streptacantha</i>	T	45.1	17.6	9.3	-	28	17
<i>O. stricta</i>	T	28.11	31.31	16.2	8.22 ^a , 15.35 ^c , 2.45 ^e	24.37	16

^a Extraíbles en etanol. ^b Extraíbles en agua fría. ^c Extraíbles en agua caliente. ^d Extraíbles en solución de hidróxido de sodio. ^e Extraíbles en etanol-tolueno o etanol benceno. *Porcentaje de holocelulosa. Ec = epidermis cladodio, C = cladodio, G = glóquidas, Ef = epidermis fruto, Es = espina, F = fruto, Ps = pericarpo semilla; S = semilla, T = tallo. 1 = [24], 2 = [75], 3 = [16], 4 = [10], 5 = [76], 6 = [21], 7 = [11], 8 = [23], 9 = [57], 10 = [26], 11 = [71], 12 = [58], 13 = [26], 14 = [25], 15 = [72], 16 = [39], 17 = [77]

La acumulación de hemicelulosas en las especies analizadas fue bajo (9.10-11.05 %; Figura 3.2) comparado con la literatura para cladodios (Cuadro 3.4); debido a que los porcentajes van de 18.5 % ^[11] a 48 % ^[21]. Los porcentajes fueron similares al de tallos (9.3-16.2 %) ^[47,57,62]. En *O. cochenillifera* se registra una mayor acumulación de hemicelulosas (51.5 %) ^[60] comparado con *O. ficus-indica* y *O. basilaris* (Cuadro 3.4). Las variaciones en porcentajes de lignina y hemicelulosas se deben principalmente a factores ambientales que influyen en su acumulación ^[59,65].

3.5.2 Proporción S/G de lignina e índices de celulosa cristalina

La proporción de siringilo y guayacilo mediante el uso de ATR-FTIR, permite la identificación cuantitativa de los monómeros siringilo y guayacilo de la lignina ^[66,67]. Los resultados difieren a lo reportado por Reyes-Rivera et al. ^[62] que obtuvieron una proporción S/G (1.1) con oxidación por nitrobenzeno y HPLC para *O. streptacantha*. Al utilizar lignina-dioxano (DL), Reyes-Rivera et al. ^[68] obtienen mediante Py-GC/MS, 2D-NMR y ATR-FTIR las proporciones 2.1, 2.2 y 1.8 respectivamente para *O. streptacantha*. Los dos primeros valores son similares a la proporción que se obtuvo con lignina Klason en este estudio (2.1), debido a que posiblemente, presenta valores similares a la lignina obtenida con el método DL. Para las especies de *O. robusta* y *O. ficus-indica*, no se ha reportado en la literatura las proporciones de S/G.

La presencia de mayor porcentaje de siringilo en el polímero de lignina, indica si una especie se deslignifica eficientemente en procesos de producción de papel (proceso de Kraft) ^[69,70]. Además es un indicador de que la lignina se puede desnaturalizar para utilizarse como materia prima en la producción de biocombustibles. Las especies con proporciones S/G elevadas son candidatas adecuadas para su uso en la producción de papel ^[71,72]. *Eucalyptus* spp. son ejemplo de especies con proporciones de 1.4 a 3.8 y que han sido utilizadas en la producción de papel ^[73,74]. Las especies con mayor porcentaje de guayacilo, el proceso de deslignificación es complicado de realizar como ocurre con *Panicum virgatum* (0.75) ^[75].

Las especies analizadas tuvieron mayor porcentaje de siringilo (61.4-67.9 %) y de proporción S/G (1.59-2.12). Estos valores revelan que la lignina es menos condensada ^[76] y presentan un mayor número de enlaces β -O-4 ^[77] que pueden hidrolizarse con el proceso de Kraft ^[78,79], sin utilizar procesos que utilizan un mayor consumo de insumos como

temperatura, mayor alcalinidad y tiempo de retención ^[70]. Las especies con mayor proporción de guayacilo deben someterse a procesos enzimáticos para aumentar la cantidad de siringilo ^[80]. Con base en lo anterior, las tres especies de *Opuntia* pueden ser utilizadas como materia prima para la producción de papel y en la producción de biocombustibles derivado de la desnaturalización de la lignina.

Los índices de cristalinidad con FTIR permitieron cuantificar los porcentajes de celulosa cristalina y amorfa ^[81-83], sin necesidad de realizar procesos destructivos de la muestra ^[84,85]. Debido a la ausencia de respuesta de bandas de hemicelulosa ^[86] y lignina ^[87-89], los índices de cristalinidad se pudieron calcular. Por lo tanto, el método de extracción utilizado para celulosa fue eficiente en la obtención de una muestra pura.

El índice LOI muestra el orden de la celulosa ^[90-92], este índice se ha considerado como método empírico y menos sensible ^[93,94]. Sin embargo, tuvo valores acordes al índice TCI. Este índice refleja con mayor sensibilidad el porcentaje de celulosa cristalina ^[87,90,92]. Ambos índices han sido ampliamente utilizados como indicadores para cuantificar la proporción de celulosa cristalina y amorfa ^[94-97]. Para las especies estudiadas, los dos índices mostraron que tuvieron mayor cristalinidad y orden en la celulosa.

El índice IA permitió confirmar los valores del índice TCI debido a que reflejan la proporción de celulosa cristalina con respecto a la celulosa amorfa ^[87]. En *O. ficus-indica*, el porcentaje de celulosa cristalina (77 %) fue mayor que *O. robusta* y *O. streptacantha* (70 %). Estos resultados difieren con lo reportado por Yang et al. (2015), que obtuvieron valores de 55.9 % de celulosa amorfa y 27.2 % de celulosa cristalina para *O. ficus-indica*. Greco y Maffezzoli ^[98] reportan valores bajos de celulosa cristalina (22-28%) pero solo analizan el tejido vascular de los cladodios. También se ha reportado el porcentaje de celulosa cristalina en semillas de *O. ficus-indica* (60 %) ^[20] y en la epidermis de los frutos (38 %) ^[56]. En el caso de las espinas, éstas presentan entre 33.8 % ^[18] y 70 % de celulosa cristalina ^[17].

La presencia de una mayor cristalinidad en la celulosa de la pared primaria confiere resistencia al ataque de patógenos ^[99]. La presencia de mayor empaquetamiento de microfibrillas de celulosa cristalina, provoca que la pared primaria sea menos susceptible a la acción enzimática ^[100]. La presencia de celulosa cristalina aumenta la resistencia física y mecánica, la fuerza de tensión, químicamente es menos reactiva y tiene menor humectación

[101,102]. Debido a esta propiedad se ha utilizado en la elaboración de componentes de nanofibras de celulosa o celulosa microfibrilada [103,104], en cosméticos y equipo médico [105,106]; además de que puede ser mezclada con fibra de celulosa reciclada para la estructuración de nuevo papel [101,107].

La celulosa amorfa puede utilizarse en la producción de etanol, debido a que es fácilmente hidrolizada y fermentada [11,108] mediante el uso de enzimas celulasas [109]. Los índices de cristalinidad en conjunto con la proporción S/G demostraron que *O. ficus-indica*, *O. robusta* y *O. streptacantha* tienen potencial de uso en la producción de papel [25] y biocombustibles [10,27,33].

3.6 CONCLUSIONES

Las tres especies de *Opuntia* presentaron contenidos de agua cercanos a 90 % y pueden ser utilizadas en la producción de biocombustibles. Las variables que presentaron variación significativa fueron el porcentaje de extraíbles en etanol:benceno, celulosa y hemicelulosas. Las tres especies presentaron mayores porcentajes de siringilo y valor de S/G elevado por lo que son aptas para deslignificar con el proceso de Kraft en la producción de papel. Los índices de cristalinidad mostraron que las tres especies tuvieron porcentajes de celulosa cristalina arriba del 60%, por lo que pueden ser aprovechadas en la obtención de materiales celulósicos y en biocombustibles.

3.7 SECCIÓN EXPERIMENTAL

Cladodios maduros, saludables, de plantas adultas elegidas al azar se colectaron en terrenos de cultivo en la localidad de Montecillo, municipio de Texcoco, Estado de México, México. Las especies recolectadas fueron *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill., *O. robusta* H. L. Wendl. ex. Pfeiff y *O. streptacantha* Lem. Espinas y glóquidas se eliminaron de los cladodios para evitar interferencia con los resultados de lignina y celulosa. Largo, ancho y grosor de cada cladodio se midió, el peso fresco y seco se obtuvieron para calcular el contenido de agua. Los cladodios se cortaron en fragmentos y secaron a 50° C para registrar peso constante.

El análisis de la composición química se apejó a la norma TAPPI T-222 om-02. Cada muestra se molió hasta un tamaño de partícula de 0.4 mm para extraer y purificar la lignina y celulosa [110] con base en el método reportado por Reyes-Rivera y Terrazas [111]. De cada

especie se pesaron 2 mg de muestra y se colocaron en cartuchos de papel filtro para realizar extracciones sucesivas por 6 h en Soxhlet con etanol-benceno (1:2 v/v) y posteriormente etanol al 96%. Las muestras de cada extracción se secaron a 60° C por 24 h para registrar peso constante.

Los cartuchos se desecharon, las muestras se mantuvieron en un sistema de reflujo con agua a 90 °C durante 1 h. Cada muestra se filtró con un filtro Büchner de poro medio y se secó a 105° C por 24 h hasta obtener peso constante. Para cuantificar porcentaje de extraíbles totales se utilizó la fórmula siguiente:

$$\text{Extraíbles totales: (\%)} = [(A + B + C) / W_0] \times 100$$

Donde A es el peso perdido (g) después de extraer con etanol:benceno, B es el peso perdido (g) después de extraer con etanol a 96 % y C es el peso perdido (g) después de extraer en agua a 90° C; W_0 es el peso inicial de la muestra. Para obtener el porcentaje de madera libre de extraíbles se restó del 100 % del peso inicial, el porcentaje de extraíbles totales.

Lignina Klason: A 1 g de madera libre de extraíbles de cada especie se adicionaron 15 mL de ácido sulfúrico al 72% a 2° C. La preparación se mantuvo en agitación y a temperatura ambiente (18° C) por 2 h. 560 mL de agua destilada se agregaron para realizar la hidrólisis de la holocelulosa, durante 4 h se mantuvo en un sistema de reflujo y la muestra se filtró a través de un filtro Büchner de poro fino. La muestra se lavó con 100 mL de agua destilada y se dejó secar a 105° C durante 24 h hasta obtener peso constante. La lignina Klason se cuantificó con la siguiente fórmula:

$$\text{Lignina (\%)} = (W_L / W_w) \times 100$$

Donde W_L es el peso (g) de la lignina, y W_w es el peso (g) de la madera libre de extraíbles.

El porcentaje de celulosa se cuantificó con el método de Kûshner-Höffer^[47,112]. A 1 g de madera libre de extraíbles se agregaron 25 mL de HNO₃:etanol (1:4 v/v) se agregaron a 1 g de madera libre de extraíbles de cada muestra. En un sistema de reflujo se mantuvo la mezcla en ebullición por una hora. La muestra se decantó para descartar la solución de HNO₃:etanol y agregar nuevamente 25 mL de HNO₃:etanol (1:4 v/v) para repetir el ciclo tres veces más. En la última decantación se adicionaron 25 mL de solución acuosa de KOH al 1%, en reflujo se mantuvo por 30 min y se filtró en un filtro Büchner de poro fino. El residuo

(celulosa) se secó a 50° C por 12 h para obtener peso constante. La fórmula utilizada fue la siguiente:

$$\text{Celulosa (\%)} = (W_C / W_W) \times 100$$

Donde W_C es el peso (g) de la celulosa, y W_W es el peso (g) de la madera libre de extraíbles.

Las hemicelulosas se cuantificaron con base al método propuesto por Li et al. ^[113]. De la madera libre de extraíbles se tomaron 0.5 g y colocaron en un sistema de reflujo con 10 mL de agua caliente por 3 h (proporción sólido a líquido 1:20 mL). El sistema se enfrió a temperatura ambiente y se filtró. El filtrado se concentró a 1.25 mL y se vertió dentro de 3.75 mL de etanol al 95% con agitación. La mezcla se mantuvo por 1 h sin agitación para que la hemicelulosa se precipitara. Para obtener el peso seco (H_0) la muestra se centrifugó (4500 g por 4 min) y liofilizó. El residuo insoluble en agua se secó a 60° C por 16 h, extracciones sucesivas se realizaron con diferentes concentraciones de KOH (0.6, 1.0, 1.5, 2.0 y 2.5%) en una proporción 1:20 (g/mL) a 75° C por 3 h. En la etapa final, la solución de 2.5% de KOH se mezcló con etanol (99.7%) en una proporción 2:3. Las cinco mezclas se filtraron; los filtrados fueron acidificados a un pH de 5.5 con ácido acético glacial y concentrados a 1.25 mL. Las mezclas se vertieron en 3.75 mL de etanol al 95 % con agitación vigorosa, la mezcla se mantuvo 1 h para que la hemicelulosa precipitara, finalmente se centrifugó (4500 g por 4 min) y liofilizó. El peso constate se registró en cada etapa de extracción ($H_{0.6}$, $H_{1.0}$, $H_{1.5}$, $H_{2.0}$, $H_{2.5}$). Las hemicelulosas totales se obtuvieron con la siguiente fórmula:

$$\text{Hemicelulosa (\%)} = (W_H/W_W) \times 100$$

La cuantificación de la proporción de siringilo/guayacilo (S/G) se obtuvo mediante espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR). De lignina-Klason se tomaron 0.5 g de muestra y se mantuvieron durante 12 h a 90° C para eliminar la humedad e interferencia en los espectros. 10 lecturas en FTIR (Agilent Cary 630 FTIR) se realizaron; la corrección de línea base y el procedimiento de deconvolución para la separación de las bandas ocultas se aplicaron a cada espectro ^[114].

Los espectros se promediaron y se obtuvo la huella dactilar de 800-1800 cm^{-1} de longitud de onda. Las bandas 1269 a 1272 cm^{-1} y 1328 a 1330⁻¹ se utilizaron para cuantificar la proporción de guayacilo (G) y siringilo (S) respectivamente, mediante el método de

Pandey ^[115]. El valor de cada banda se obtuvo al trazar una línea que conectó los valores más bajos y otra similar para los valores más altos de cada banda, una línea vertical es trazada de la base del eje X a la punta de la banda, la porción de la línea entre la punta y la base, es el valor de cada banda. Con estos valores se obtuvo la proporción S/G; mientras más baja es la proporción, la lignina está compuesta por un mayor número de guayacilos; si la proporción es elevada, la presencia de siringilos es mayor y el proceso de deslignificación es eficiente durante el proceso de producción de papel ^[69].

El porcentaje de celulosa cristalina de cada muestra se obtuvo con 10 espectros de FTIR. La corrección de la línea base se realizó y los espectros de 650-4000 cm^{-1} de longitud de onda se promediaron ^[116]. Los índices de cristalinidad permitieron identificar la presencia de celulosa cristalina y celulosa amorfa ^[83,85,117]. Los índices de cristalinidad utilizados fueron:

-Proporción de cristalinidad (Cr.R.₁) de Ciolacu et al. ^[87] o cristalinidad total (TCI) ^[90]. El área bajo la curva de las absorbancias 1372 cm^{-1} (A_{1372}) y 2900 cm^{-1} (A_{2900}) se midió y la proporción de estas bandas: $\text{TCI} = A_{1372} / A_{2900}$ se obtuvo. El resultado se multiplicó por 100 para obtener el porcentaje de celulosa cristalina. Mientras mayor cantidad de celulosa cristalina, el valor fue más cercano a 100%.

-Índice de orden lateral (LOI) de Poletto et al. ^[90] o segunda proporción de cristalinidad (Cr.R.₂) de Ciolacu et al. ^[87]. El área bajo la curva de las absorbancias 1430 cm^{-1} (A_{1430}) y 893 cm^{-1} (A_{893}) se obtuvo para obtener la proporción de las bandas A_{1430} / A_{893} . Este índice calcula el orden y la relación entre celulosa cristalina y celulosa amorfa, mientras más cercano esté a 100%, mayor orden y porcentaje de celulosa cristalina hay en la muestra ^[87,118].

-Índice asimétrico a/b (IA). Es la proporción entre el ancho de los segmentos a la mitad de la altura máxima de la banda de absorción de OH. Reflejó la relación entre celulosa cristalina y amorfa. Si es cercano a 100%, hay mayor cantidad de celulosa cristalina en la muestra ^[87].

El tamaño de cladodios, porcentaje de cada extracción y porcentaje de lignocelulósicos se promedió. Los análisis estadísticos utilizados fueron desviación estándar, análisis de varianza y prueba *post hoc* de Tukey aplicado a las medidas del tamaño, peso de cladodio y

contenido de agua. Los valores de este último se transformaron con la raíz cuadrada del arco seno. A los porcentajes de extraíbles en agua y celulosa se les aplicó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y la prueba *post-hoc* test de Dunn ^[119], debido a que no hubo normalidad en los datos con base en los resultados de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk, incluso después de la transformación de los valores con la raíz cuadrada del arco seno. Las demás variables tuvieron normalidad con la transformación con la raíz cuadrada del arco seno por lo que se hicieron análisis de varianza y prueba *post hoc* de Tukey.

3.8 REFERENCIAS

- [1] G. M. Souza, M. V. R. Ballester, C. H. de Brito Cruz, H. Chum, B. Dale, V. H. Dale, E. C. M. Fernandes, T. Foust, A. Karp, L. Lynd, R. Maciel Filho, A. Milanez, F. Nigro, P. Osseweijer, L. M. Verdade, R. L. Victoria, L. Van der Wielen, ‘The role of bioenergy in a climate-changing world’, *Environ. Dev.* **2017**, 23, 57–64.
- [2] G. Khamis, J. Papenbrock, ‘Newly established drought-tolerant plants as renewable primary products as source of bioenergy’, *Emirates J. Food Agric.* **2014**, 26, 1067–1080.
- [3] M. T. Reza, X. Yang, C. J. Coronella, H. Lin, U. Hathwaik, D. Shintani, B. P. Neupane, G. C. Miller, ‘Hydrothermal Carbonization (HTC) and Pelletization of Two Arid Land Plants Bagasse for Energy Densification’, *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2016**, 4, 1106–1114.
- [4] Y. Anker, F. Nakonechny, B. Niazov, S. Lugovskoy, M. Nisnevitch, ‘Biofuel Production by Fermentation of Water Plants and Agricultural Lignocellulosic by-Products’, *MATEC Web Conf.* **2016**, 70, 12005.
- [5] S. C. Davis, F. G. Dohleman, S. P. Long, ‘The global potential for *Agave* as a biofuel feedstock’, *GCB Bioenergy* **2011**, 3, 68–78.
- [6] J. A. Pérez-Pimienta, R. M. Mojica-Álvarez, L. M. Sánchez-Herrera, A. Mittal, R. W. Sykes, ‘Recalcitrance Assessment of the Agro-industrial Residues from Five *Agave* Species: Ionic Liquid Pretreatment, Saccharification and Structural Characterization’, *BioEnergy Res.* **2018**, 11, 551–561.
- [7] J. A. M. Holtum, D. Chambers, T. Morgan, D. K. Y. Tan, ‘*Agave* as a biofuel feedstock in Australia’, *GCB Bioenergy* **2011**, 3, 58–67.
- [8] H. M. Núñez, L. F. Rodríguez, M. Khanna, ‘*Agave* for tequila and biofuels: An economic assessment and potential opportunities’, *GCB Bioenergy* **2011**, 3, 43–57.
- [9] L. L. Escamilla-Treviño, ‘Potential of Plants from the Genus *Agave* as Bioenergy Crops’, *Bioenergy Res.* **2012**, 5, 1–9.
- [10] O. O. Kuloyo, J. C. du Preez, M. del P. García-Aparicio, S. G. Kilian, L. Steyn, J. Görgens, ‘*Opuntia ficus-indica* cladodes as feedstock for ethanol production by

Kluyveromyces marxianus and *Saccharomyces cerevisiae*', *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, *30*, 3173–3183.

- [11] L. Yang, M. Lu, S. Carl, J. A. Mayer, J. C. Cushman, E. Tian, H. Lin, 'Biomass characterization of *Agave* and *Opuntia* as potential biofuel feedstocks', *Biomass and Bioenergy* **2015**, *76*, 43–53.
- [12] H. A. Ruiz, A. Martínez, W. Vermerris, 'Bioenergy Potential, Energy Crops, and Biofuel Production in Mexico', *Bioenergy Res.* **2016**, *9*, 981–984.
- [13] A. A. Isaac, 'Overview of cactus (*Opuntia ficus-indica* (L): A myriad of alternatives', *Stud. Ethno-Medicine* **2016**, *10*, 195–205.
- [14] I. O. Castillo, A. Flores Hernández, M. Rivera González, J. Guillermo Martínez, J. De Jesús, E. Arellano, 'Productividad del agua en el cultivo de nopal con riego por goteo en la comarca lagunera', *Terra Latinoam.* **2003**, *21*, 195–201.
- [15] R. Ciriminna, V. Morreale, M. Pecoraino, M. Pagliaro, 'Solar air drying for innovative *Opuntia ficus-indica* cladode dehydration', *4open* **2019**, *2*, 1.
- [16] H. N. Pritchard, J. A. Hall, 'The chemical composition of glochids from *Opuntia*', *Can. J. Bot.* **1976**, *54*, 173–176.
- [17] M. R. Vignon, L. Heux, M.-E. Malainine, M. Mahrouz, 'Arabinan-cellulose composite in *Opuntia ficus-indica* prickly pear spines', *Carbohydr. Res.* **2004**, *339*, 123–131.
- [18] M. Q. Marin-Bustamante, J. J. Chanona-Pérez, N. Güemes-Vera, R. Cásarez-Santiago, M. J. Perea-flores, I. Arzate-Vázquez, G. Calderón-Domínguez, 'Production and characterization of cellulose nanoparticles from nopal waste by means of high impact milling', *Procedia Eng.* **2017**, *200*, 428–433.
- [19] M. Q. Marin-Bustamante, J. J. Chanona-Pérez, N. Guemes-Vera, I. Arzate-Vázquez, M. J. Perea-Flores, J. A. Mendoza-Pérez, G. Calderón-Domínguez, R. G. Casarez-Santiago, 'Evaluation of physical, chemical, microstructural and micromechanical properties of nopal spines (*Opuntia ficus-indica*)', *Ind. Crops Prod.* **2018**, *123*, 707–718.
- [20] Y. Habibi, L. Heux, M. Mahrouz, M. R. Vignon, 'Morphological and structural study of seed pericarp of *Opuntia ficus-indica* prickly pear fruits', *Carbohydr. Polym.* **2008**, *72*, 102–112.
- [21] M. E. Malainine, A. Dufresne, D. Dupeyre, M. Mahrouz, R. Vuong, M. R. Vignon, 'Structure and morphology of cladodes and spines of *Opuntia ficus-indica*. Cellulose extraction and characterisation', *Carbohydr. Polym.* **2003**, *51*, 77–83.
- [22] H. Vieyra, U. Figueroa-López, A. Guevara-Morales, B. Vergara-Porras, E. San Martín-Martínez, M. Á. Aguilar-Mendez, 'Optimized Monitoring of Production of Cellulose Nanowhiskers from *Opuntia ficus-indica* (Nopal Cactus)', *Int. J. Polym. Sci.* **2015**, *2015*, 871345.
- [23] A. C. L. de Assis, L. P. Alves, J. P. T. Malheiro, A. R. A. Barros, E. E. Pinheiro-Santos, E. P. de Azevedo, H. da Silva Alves, J. A. Oshiro-Junior, B. P. G. de L.

- Damasceno, ‘*Opuntia ficus-Indica* L. Miller (Palma Forrageira) as an Alternative Source of Cellulose for Production of Pharmaceutical Dosage Forms and Biomaterials: Extraction and Characterization’, *Polymers (Basel)*. **2019**, *11*, E1124.
- [24] A. Ramezani Kakroodi, S. Panthapulakkal, M. Sain, A. Asiri, ‘Cellulose nanofibers from the skin of beavertail cactus, *Opuntia basilaris*, as reinforcements for polyvinyl alcohol’, *J. Appl. Polym. Sci.* **2015**, *132*, DOI 10.1002/app.42499.
- [25] F. Mannai, M. Ammar, J. G. Yanez, E. Elaloui, Y. Moussaoui, ‘Cellulose fiber from Tunisian Barbary Fig “*Opuntia ficus-indica*” for papermaking’, *Cellulose* **2016**, *23*, 2061–2072.
- [26] R. L. El Kossori, C. Villaume, E. El Boustani, Y. Sauvaire, L. Méjean, ‘Composition of pulp, skin and seeds of prickly pears fruit (*Opuntia ficus-indica* sp.)’, *Plant Foods Hum. Nutr.* **1998**, *52*, 263–270.
- [27] A. Comparetti, P. Febo, C. Greco, M. M. Mammano, S. Orlando, ‘Potential Production of Biogas from Prinkly Pear (*Opuntia ficus-indica* L.) in Sicilian Uncultivated Areas’, *Chem. Eng. Trans.* **2017**, *58*, 559–564.
- [28] R. L. Torres-Ponce, D. Morales-Corral, M. L. Ballinas-Casarrubias, G. V. Nevárez-Moorillón, ‘El nopal: planta del semidesierto con aplicaciones en farmacia, alimentos y nutrición animal’, *Rev. Mex. Ciencias Agrícolas* **2015**, *6*, 1129–1142.
- [29] G. Zenteno-Ramírez, B. I. Juárez-Flores, R. Aguirre-Rivera, M. D. Ortiz-Pérez, C. Zamora-Pedraza, J. A. Rendón-Huerta, ‘Evaluación de azúcares y fibra soluble en el jugo de variantes de tunas (*Opuntia* spp.)’, *Agrociencia* **2015**, *49*, 141–152.
- [30] A. A. Jaradat, ‘Genetic Resources of Energy Crops: Biological Systems to Combat Climate Change’, *Aust. J. Crop Sci.* **2010**, *4*, 309–323.
- [31] I. Antonia Domínguez-García, M. Del, R. Granados-Sánchez¹, L. M. Sagarnaga-Villegas¹, M. Salas-González¹, J. Aguilar-Ávila¹, ‘Viabilidad económica y financiera de nopal tuna (*Opuntia ficus-indica*) en Nopaltepec, Estado de México’, *Rev. Mex. Ciencias Agrícolas* **2017**, *8*, 1371–1382.
- [32] J. Reyes-Agüero, J. Aguirre-Rivera, H. M. Hernández, ‘Systematic notes and a detailed description of *Opuntia ficus-indica* (L) Mill. (CACTACEAE)’ **2005**, 395–408.
- [33] P. Cross, C. Mukarakate, M. Nimlos, D. Carpenter, B. S. Donohoe, J. A. Mayer, J. C. Cushman, B. Neupane, G. C. Miller, S. Adhikari, ‘Fast Pyrolysis of *Opuntia ficus-indica* (Prickly Pear) and *Grindelia squarrosa* (Gumweed)’, *Energy and Fuels* **2018**, *32*, 3510–3518.
- [34] X. Aparicio-Fernández, S. Loza-Cornejo, M. G. Torres-Bernal, N. J. Velázquez-Placencia, H. J. Arreola-Nava, ‘Características físico-químicas de frutos de variedades silvestres de *Opuntia* de dos regiones semiáridas de Jalisco, México’, *Polibotánica* **2017**, *43*, 1–26.

- [35] Ş. Kivrak, İ. Kivrak, E. Karababa, ‘Analytical evaluation of phenolic compounds and minerals of *Opuntia robusta* J.C. Wendl. and *Opuntia ficus-barbarica* A. Berger’, *Int. J. Food Prop.* **2018**, *21*, 244–256.
- [36] R. E. Pérez-Sánchez, L. A. Delgado-Sánchez, P. A. García-Saucedo, J. Pulido, R. Ortiz-Rodríguez, ‘Caracterización, modelación morfológica y análisis proximales de *Opuntia ficus-indica* y *O. atropes* durante las épocas de estiaje y lluvias’, *Nov. Sci.* **2015**, *15*, 133–152.
- [37] A. Muñoz-Urias, G. Palomino-Hasbach, T. Terrazas, A. García-Velázquez, E. Pimienta-Barrios, ‘Variación anatómica y morfológica en especies y entre poblaciones de *Opuntia* en la porción sur del desierto Chihuahuense’, *Boletín la Soc. Botánica México* **2008**, *83*, 1–11.
- [38] D. M. López-Gutiérrez, J. A. Reyes-Agüero, A. Muñoz, J. Robles, E. Cuevas, ‘Comparación morfológica entre poblaciones silvestres y manejadas de *Opuntia atropes* (Cactaceae) en Michoacán, México’, *Rev. Mex. Biodivers.* **2015**, *86*, 1072–1077.
- [39] Y. Mizrahi, A. Nerd, P. S. Nobel, in *Hortic. Rev. (Am. Soc. Hortic. Sci.)*. (Ed.: J. Janick), John Wiley & Sons, Inc., USA, **1996**, pp. 291–319.
- [40] G. Maki-Díaz, C. B. Peña-Valdivia, R. García-Nava, M. L. Arévalo-Galarza, G. Calderón-Zavala, S. Anaya-Rosales, ‘Características físicas y químicas de nopal verdura (*Opuntia ficus-indica*) para exportación y consumo nacional’, *Agrociencia* **2015**, *49*, 31–51.
- [41] A. Texco-López, A. Cadena-Ramírez, J. Álvarez-Cervantes, X. Tovar-Jiménez, C. A. Gómez-Aldapa, J. Castro-Rosas, A. Téllez-Jurado, ‘Optimization of the acid hydrolysis of cladodes of *Opuntia ficus-indica* by response surface methodology’, *Rev. Mex. Ing. Quim.* **2018**, *17*, 1095–1104.
- [42] R. Álvarez-Armenta, C. B. Peña-Valdivia, ‘Structural polysaccharides in xoconostle (*Opuntia matudae*) fruits with 26 different ripening stages’, *J. Prof. Assoc. Cactus Dev.* **2009**, *11*, 26–44.
- [43] J. C. Cushman, S. C. Davis, X. Yang, A. M. Borland, ‘Development and use of bioenergy feedstocks for semi-arid and arid lands’, *J. Exp. Bot.* **2015**, *66*, 4177–4193.
- [44] N. Retamal, J. M. Durán, J. Fernández, ‘Ethanol production by fermentation of fruits and cladodes of prickly pear cactus [*Opuntia ficus-indica* (L.) Miller]’, *J. Sci. Food Agric.* **1987**, *40*, 213–218.
- [45] M. Volpe, J. L. Goldfarb, L. Fiori, ‘Hydrothermal carbonization of *Opuntia ficus-indica* cladodes: Role of process parameters on hydrochar properties’, *Bioresour. Technol.* **2018**, *247*, 310–318.
- [46] N. A. Owen, K. F. Fahy, H. Griffiths, ‘Crassulacean acid metabolism (CAM) offers sustainable bioenergy production and resilience to climate change’, *GCB Bioenergy* **2016**, *8*, 737–749.

- [47] A. Maceda, M. Soto-Hernández, C. B. Peña-Valdivia, T. Terrazas, ‘Chemical Composition of Cacti Wood and Comparison with the Wood of Other Taxonomic Groups’, *Chem. Biodivers.* **2018**, *15*, e1700574.
- [48] L. Wang, W. Peng, Z. Lin, Y. Tan, L. Shi, ‘Analysis on molecular characteristics of wood extractives from *Eucalyptus urophydis* biomass’, *Biotechnol. an Indian J.* **2013**, *7*, 559–564.
- [49] C. Hernández-Sánchez, ‘Caracterización de extractivos en alcohol-benceno solubles en acetona del bagazo de la caña de azúcar mediante Cromatografía Gaseosa-Espectrometría de Masas’, *Rev. Cent. Azúcar* **2015**, *42*, 42–50.
- [50] R. H. R. Carvalho, E. L. Galvão, J. A. C. Barros, M. M. Conceição, E. M. B. D. Sousa, ‘Extraction, fatty acid profile and antioxidant activity of sesame extract: (*Sesamum indicum* L.)’, *Brazilian J. Chem. Eng.* **2012**, *29*, 409–420.
- [51] R. I. Ventura-Aguilar, E. Bosquez-Molina, S. Bautista-Baños, F. Rivera-Cabrera, ‘Cactus stem (*Opuntia ficus-indica* Mill): anatomy, physiology and chemical composition with emphasis on its biofunctional properties.’, *J. Sci. Food Agric.* **2017**, *97*, 5065–5073.
- [52] A. N. Shebani, A. J. van Reenen, M. Meincken, ‘The effect of wood extractives on the thermal stability of different wood-LLDPE composites’, *Thermochim. Acta* **2009**, *481*, 52–56.
- [53] M. C. Morais, H. Pereira, ‘Variation of extractives content in heartwood and sapwood of *Eucalyptus globulus* trees’, *Wood Sci. Technol.* **2012**, *46*, 709–719.
- [54] J. Gominho, J. Figueira, J. C. Rodrigues, H. Pereira, ‘Within-tree variation of heartwood, extractives and wood density in the eucalypt hybrid urograndis (*Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*)’, *Wood Fiber Sci.* **2001**, *33*, 3–8.
- [55] I. Miranda, V. Sousa, J. Ferreira, H. Pereira, ‘Chemical characterization and extractives composition of heartwood and sapwood from *Quercus faginea*’, *PLoS One* **2017**, *12*, e0179268.
- [56] Y. Habibi, M. Mahrouz, M. R. Vignon, ‘Microfibrillated cellulose from the peel of prickly pear fruits’, *Food Chem.* **2009**, *115*, 423–429.
- [57] F. Mannai, M. Ammar, J. G. Yanez, E. Elaloui, Y. Moussaoui, ‘Alkaline Delignification of Cactus Fibres for Pulp and Papermaking Applications’, *J. Polym. Environ.* **2018**, *26*, 798–806.
- [58] S. Katić, D. Milić, Đ. Karagić, S. Vasiljević, D. Glamočić, I. Jajić, ‘Variation of protein, cellulose and mineral contents of lucerne as influenced by cultivar and cut’, *Biotechnol. Anim. Husb.* **2009**, *25*, 1189–1195.
- [59] H. Le Gall, F. Philippe, J.-M. Domon, F. Gillet, J. Pelloux, C. Rayon, ‘Cell Wall Metabolism in Response to Abiotic Stress’, *Plants (Basel, Switzerland)* **2015**, *4*, 112–166.

- [60] T. do N. Santos, E. D. Dutra, A. Gomes do Prado, F. C. B. Leite, R. de F. R. de Souza, D. C. dos Santos, C. A. Moraes de Abreu, D. A. Simões, M. A. de Moraes, R. S. C. Menezes, ‘Potential for biofuels from the biomass of prickly pear cladodes: Challenges for bioethanol and biogas production in dry areas’, *Biomass and Bioenergy* **2016**, *85*, 215–222.
- [61] G. Ginestra, M. L. Parker, R. N. Bennett, J. Robertson, G. Mandalari, A. Narbad, R. B. Lo Curto, G. Bisignano, C. B. Faulds, K. W. Waldron, ‘Anatomical, chemical, and biochemical characterization of cladodes from prickly pear [*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.]’, *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 10323–10330.
- [62] J. Reyes-Rivera, G. Canché-Escamilla, M. Soto-Hernández, T. Terrazas, ‘Wood chemical composition in species of Cactaceae the relationship between lignification and stem morphology’, *PLoS One* **2015**, *10*, e0123919.
- [63] E. Novaes, M. Kirst, V. Chiang, H. Winter-Sederoff, R. Sederoff, ‘Lignin and biomass: A negative correlation for wood formation and lignin content in trees’, *Plant Physiol.* **2010**, *154*, 555–561.
- [64] Y. Tang, F. Liu, H. Xing, K. Mao, G. Chen, Q. Guo, J. Chen, ‘Correlation Analysis of Lignin Accumulation and Expression of Key Genes Involved in Lignin Biosynthesis of Ramie (*Boehmeria nivea*)’, *Genes (Basel)*. **2019**, *10*, 389.
- [65] C. Schädel, A. Richter, A. Blöchl, G. Hoch, ‘Hemicellulose concentration and composition in plant cell walls under extreme carbon source-sink imbalances’, *Physiol. Plant.* **2010**, *139*, 241–255.
- [66] S. Lau, R. Ibrahim, ‘Ff-IR Spectroscopic Studies on Lignin from Some Tropical Woods and Rattan’, *Pertanika* **1992**, *14*, 75–81.
- [67] S. H. Ghaffar, M. Fan, ‘Structural analysis for lignin characteristics in biomass straw’, *Biomass and Bioenergy* **2013**, *57*, 264–279.
- [68] J. Reyes-Rivera, M. Soto-Hernández, G. Canché-Escamilla, T. Terrazas, ‘Structural characterization of lignin in four cacti wood: Implications of lignification in the growth form and succulence’, *Front. Plant Sci.* **2018**, *871*, 1518.
- [69] A. Alves, R. Simoes, D. J. Stackpole, R. E. Vaillancourt, B. M. Potts, M. Schwanninger, J. Rodrigues, ‘Determination of the syringyl/guaiacyl ratio of Eucalyptus globulus wood lignin by near infrared-based partial least squares regression models using analytical pyrolysis as the reference method’, *J. Near Infrared Spectrosc.* **2011**, *19*, 343–348.
- [70] R. B. Santos, E. A. Capanema, M. Y. Balakshin, H. M. Chang, H. Jameel, ‘Effect of hardwoods characteristics on kraft pulping process: Emphasis on lignin structure’, *BioResources* **2011**, *6*, 3623–3637.
- [71] P. Prinsen, J. Rencoret, A. Gutiérrez, T. Liitiä, T. Tamminen, J. L. Colodette, M. Á. Berbis, J. Jiménez-Barbero, Á. T. Martínez, J. C. Del Río, ‘Modification of the lignin structure during alkaline delignification of eucalyptus wood by kraft, soda-AQ, and soda-O2 cooking’, *Ind. Eng. Chem. Res.* **2013**, *52*, 15702–15712.

- [72] G. Ventrone, E. F. Alves, L. S. Penna, R. C. Francis, 'Effect of S/G ratio on kraft pulping and ECF bleaching of some poplars and eucalyptus', *Cellul. Chem. Technol.* **2014**, *48*, 365–373.
- [73] J. Rencoret, G. Marques, A. Gutiérrez, D. Ibarra, J. Li, G. Gellerstedt, J. I. Santos, J. Jiménez-Barbero, Á. T. Martínez, J. C. Del Río, 'Structural characterization of milled wood lignins from different eucalypt species', *Holzforschung* **2008**, *62*, 514–526.
- [74] J. Rencoret, A. Gutiérrez, L. Nieto, J. Jiménez-Barbero, C. B. Faulds, H. Kim, J. Ralph, Á. T. Martínez, J. C. del Río, 'Lignin composition and structure in young versus adult eucalyptus globulus plants', *Plant Physiol.* **2011**, *155*, 667–682.
- [75] W. Jung, D. Savithri, R. Sharma-Shivappa, P. Kolar, 'Changes in lignin chemistry of switchgrass due to delignification by sodium hydroxide pretreatment', *Energies* **2018**, *11*, 376.
- [76] C. Wang, H. Li, M. Li, J. Bian, R. Sun, 'Revealing the structure and distribution changes of *Eucalyptus* lignin during the hydrothermal and alkaline pretreatments', *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 593.
- [77] R. B. Santos, E. A. Capanema, M. Y. Balakshin, H. M. Chang, H. Jameel, 'Lignin structural variation in hardwood species', *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 4923–4930.
- [78] Y. Tsutsumi, R. Kondo, K. Sakai, H. Imamura, 'The Difference of Reactivity between Syringyl Lignin and Guaiacyl Lignin in Alkaline Systems', *Holzforschung* **1995**, *49*, 423–428.
- [79] J. Ralph, 'Hydroxycinnamates in lignification', *Phytochem. Rev.* **2010**, *9*, 65–83.
- [80] S. Camarero, D. Ibarra, Á. T. Martínez, J. Romero, A. Gutiérrez, J. C. del Río, 'Paper pulp delignification using laccase and natural mediators', *Enzyme Microb. Technol.* **2007**, *40*, 1264–1271.
- [81] T. P. Schultz, G. D. McGinnis, M. S. Bertran, 'Estimation of cellulose crystallinity using fourier transform-infrared spectroscopy and dynamic thermogravimetry', *J. Wood Chem. Technol.* **1985**, *5*, 543–557.
- [82] S. Park, J. O. Baker, M. E. Himmel, P. A. Parilla, D. K. Johnson, 'Cellulose crystallinity index: Measurement techniques and their impact on interpreting cellulase performance', *Biotechnol. Biofuels* **2010**, *3*, 10.
- [83] J. Gawron, M. Szcześna, T. Zielenkiewicz, T. Gołofit, 'Cellulose crystallinity index examination in oak wood originated from antique woodwork', *Nauk. Donies. Komunik* **2012**, *55*, 188.
- [84] H. Kasprzyk, K. Wicháacz, 'Some aspects of estimation of the crystallinity of gamma radiation wood cellulose by FTIR Spectroscopy and X-ray diffraction techniques', *Acta Sci. Pol. Silv. Colendar. Rat. Ind. Lignar* **2004**, *3*, 73–84.
- [85] N. Kruer-Zerhusen, B. Cantero-Tubilla, D. B. Wilson, 'Characterization of cellulose crystallinity after enzymatic treatment using Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR)', *Cellulose* **2018**, *25*, 37–48.

- [86] C. J. Chen, J. J. Luo, X. P. Huang, S. K. Zhao, ‘Analysis on cellulose crystalline and FTIR spectra of artocarpus heterophyllus Lam wood and its main chemical compositions’, *Adv. Mater. Res.* **2011**, 236–238, 369–375.
- [87] D. Ciolacu, F. Ciolacu, V. I. Popa, ‘Amorphous cellulose-structure and characterization’, *Cellul. Chem. Technol.* **2011**, 45, 13–21.
- [88] F. Lionetto, R. Del Sole, D. Cannoletta, G. Vasapollo, A. Maffezzoli, ‘Monitoring wood degradation during weathering by cellulose crystallinity’, *Mater. (Basel, Switzerland)* **2012**, 5, 1910–1922.
- [89] Y. Fors, V. Richards, ‘The Effects of the Ammonia Neutralizing Treatment on Marine Archaeological Vasa Wood’, *Stud. Conserv.* **2010**, 55, 41–54.
- [90] M. Poletto, H. L. Ornaghi, A. J. Zattera, ‘Native Cellulose: Structure, Characterization and Thermal Properties’, *Mater. (Basel, Switzerland)* **2014**, 7, 6105–6119.
- [91] W. Fatriasari, W. Syafii, N. Wistara, K. Syamsu, B. Prasetya, S. H. Anita, L. Risanto, ‘Fiber disruption of betung bamboo (*Dendrocalamus asper*) by combined fungal and microwave pretreatment’, *Biotropia (Bogor)*. **2015**, 22, 81–94.
- [92] B. Poyraz, A. Tozluoğlu, Z. Candan, A. Demir, M. Yavuz, Ü. Büyüksarı, H. İ. Ünal, H. Fidan, R. C. Saka, ‘TEMPO-treated CNF Composites: Pulp and Matrix Effect’, *Fibers Polym.* **2018**, 19, 195–204.
- [93] X. Colom, F. Carrillo, ‘Crystallinity changes in lyocell and viscose-type fibres by caustic treatment’, *Eur. Polym. J.* **2002**, 38, 2225–2230.
- [94] S. Y. Oh, I. Y. Dong, Y. Shin, C. K. Hwan, Y. K. Hak, S. C. Yong, H. P. Won, H. Y. Ji, ‘Crystalline structure analysis of cellulose treated with sodium hydroxide and carbon dioxide by means of X-ray diffraction and FTIR spectroscopy’, *Carbohydr. Res.* **2005**, 340, 2376–2391.
- [95] A. Kljun, T. A. S. Benians, F. Goubet, F. Meulewaeter, J. P. Knox, R. S. Blackburn, ‘Comparative analysis of crystallinity changes in cellulose I polymers using ATR-FTIR, X-ray diffraction, and carbohydrate-binding module probes’, *Biomacromolecules* **2011**, 12, 4121–4126.
- [96] K. Karimi, M. J. Taherzadeh, ‘A critical review of analytical methods in pretreatment of lignocelluloses: Composition, imaging, and crystallinity’, *Bioresour. Technol.* **2016**, 200, 1008–1018.
- [97] D. M. Khai, P. D. Nhan, T. D. Hoanh, ‘An investigation of the structural characteristics of modified cellulose from *Acacia* pulp’, *Vietnam J. Sci. Technol.* **2017**, 55, 452–460.
- [98] A. Greco, A. Maffezzoli, ‘Rotational molding of biodegradable composites obtained with PLA reinforced by the wooden backbone of *Opuntia ficus-indica* cladodes’, *J. Appl. Polym. Sci.* **2015**, 132, 42447.
- [99] F. G. Malinovsky, J. U. Fangel, W. G. T. Willats, ‘The role of the cell wall in plant immunity’, *Front. Plant Sci.* **2014**, 5, 178.

- [100] M. Chauve, L. Barre, S. Tapin-Lingua, D. da Silva Perez, D. Decottignies, S. Perez, N. L. Ferreira, ‘Evolution and impact of cellulose architecture during enzymatic hydrolysis by fungal cellulases’, *Adv. Biosci. Biotechnol.* **2013**, *04*, 1095–1109.
- [101] J. Turrado, A. R. Saucedo, J. Ramos, M. L. Reynoso, ‘Comportamiento de la Fibra de Celulosa Reciclada en el Proceso de Hidratación’, *Inf. tecnológica* **2008**, *19*, 129–136.
- [102] N. Terinte, R. Ibbett, K. C. Schuster, ‘Overview on native cellulose and microcrystalline cellulose I structure studied by X-ray diffraction (WAXD): comparison between measurement techniques’, *Lenzinger Berichte* **2011**, *89*, 118–131.
- [103] M. Henriksson, G. Henriksson, L. A. Berglund, T. Lindström, ‘An environmentally friendly method for enzyme-assisted preparation of microfibrillated cellulose (MFC) nanofibers’, *Eur. Polym. J.* **2007**, *43*, 3434–3441.
- [104] J. Dlouhá, L. Suryanegara, H. Yano, ‘The role of cellulose nanofibres in supercritical foaming of polylactic acid and their effect on the foam morphology’, *Soft Matter* **2012**, *8*, 8704–8713.
- [105] W. Hamad, ‘On the Development and Applications of Cellulosic Nanofibrillar and Nanocrystalline Materials’, *Can. J. Chem. Eng.* **2006**, *84*, 513–519.
- [106] T. H. Wegner, P. E. Jones, ‘Advancing cellulose-based nanotechnology’, *Cellulose* **2006**, *13*, 115–118.
- [107] N. F. Robles, A. R. Saucedo, E. Delgado, R. Sanjuán, J. Turrado, ‘Effect of cellulose microfibers on paper with high contents of recycled fiber’, *Rev. Mex. Ciencias For.* **2014**, *5*, 70–78.
- [108] Y. Zheng, Z. Pan, R. Zhang, ‘Overview of biomass pretreatment for cellulosic ethanol production’, *Int. J. Agric. Biol. Eng.* **2009**, *2*, 51–68.
- [109] S. P. S. Chundawat, G. Bellesia, N. Uppugundla, L. Da Costa Sousa, D. Gao, A. M. Cheh, U. P. Agarwal, C. M. Bianchetti, G. N. Phillips, P. Langan, V. Balan, S. Gnanakaran, B. E. Dale, ‘Restructuring the crystalline cellulose hydrogen bond network enhances its depolymerization rate’, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 11163–11174.
- [110] F. Lu, J. Ralph, in *Cereal Straw as a Resour. Sustain. Biomater. Biofuels* (Ed.: Run-Cang), Elsevier, USA, **2010**, pp. 169–207.
- [111] J. Reyes-Rivera, T. Terrazas, ‘Lignin Analysis by HPLC and FTIR.’, *Methods Mol. Biol.* **2017**, *1544*, 193–211.
- [112] C. L. R. Abreu, U. Orea-Igarza, E. Cordero-Manchado, ‘Composición química de tres maderas en la provincia de Pinar del Río, Cuba a tres alturas del fuste comercial. Parte N° 1: *Corymbia citriodora*’, *Rev. Chapingo. Ser. Ciencias For. y del Ambient.* **2004**, *10*, 57–62.

- [113] R. Li, G. Yang, J. Chen, M. He, 'The characterization of hemicellulose extract from corn stalk with stepwise alkali extraction', *Palpu Chongi Gisul/Journal Korea Tech. Assoc. Pulp Pap. Ind.* **2017**, *49*, 29–40.
- [114] C.-M. Popescu, V. I. Popa, 'Analytical methods for lignin characterization. II. Spectroscopic studies', *Cellul. Chem. Technol.* **2006**, *40*, 597–621.
- [115] K. K. Pandey, 'Study of the effect of photo-irradiation on the surface chemistry of wood', *Polym. Degrad. Stab.* **2005**, *90*, 9–20.
- [116] U. P. Agarwal, R. R. Reiner, S. A. Ralph, 'Estimation of cellulose crystallinity of lignocelluloses using near-IR FT-Raman spectroscopy and comparison of the Raman and Segal-WAXS methods', *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 103–113.
- [117] H.-C. Chen, Q. Li, C. M. Shuford, J. Liu, D. C. Muddiman, R. R. Sederoff, V. L. Chiang, 'Membrane protein complexes catalyze both 4- and 3-hydroxylation of cinnamic acid derivatives in monolignol biosynthesis', *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2011**, *108*, 21253–21258.
- [118] M. L. Nelson, R. T. O'Connor, 'Relation of certain infrared bands to cellulose crystallinity and crystal latticed type. Part I. Spectra of lattice types I, II, III and of amorphous cellulose', *J. Appl. Polym. Sci.* **1964**, *8*, 1311–1324.
- [119] A. Dinno, 'Nonparametric pairwise multiple comparisons in independent groups using Dunn's test', *Stata J.* **2015**, *15*, 292–300.

CAPÍTULO IV. DISTRIBUCIÓN Y COMPOSICIÓN DE LA LIGNINA Y CELULOSA EN EL XILEMA SECUNDARIO DE CACTACEAE

4.1 RESUMEN

La familia Cactaceae es diversa en formas, tamaños y anatomía, presenta heterogeneidad en la acumulación de lignocelulosa en pared celular, lo que se relaciona con su anatomía. La variación en la composición de la lignina se ha estudiado principalmente en especies fibrosas y algunas dimorfas, pero la de especies no fibrosas se conoce poco junto con la composición de su celulosa. El objetivo de este estudio fue analizar la composición y distribución de celulosa y lignina en el tejido vascular del xilema secundario en especies no fibrosas. De 25 especies de Cactaceae se extrajo y purificó la celulosa. Los espectros de infrarrojo por Transformada de Fourier de la celulosa se obtuvieron para calcular los índices de cristalinidad. Con nitrobenzeno se realizó una oxidación, en la madera extraída con etanol:benzeno (1:2), etanol (96 %) y agua, para cuantificar la vainillina y siringaldehído mediante HPLC y obtener la relación siringilo/guayacilo. Mediante microscopía de fluorescencia con tres bandas de excitación se determinó la distribución de la celulosa y lignina en los tejidos vegetales teñidos con safranina O/verde rápido. Los índices de cristalinidad variaron entre 63 y 93 % en la mayoría de las especies, las excepciones fueron las especies fibrosas de *Cylindropuntia* y *Opuntia*. La relación S/G fue heterogénea en las cactáceas y mostró mayor acumulación de siringilo en la mayoría de especies no fibrosas y de guayacilo en las especies fibrosas. La emisión de fluorescencia correspondió con las proporciones S/G y la tonalidad de las fibras varió notablemente. La presencia de más celulosa cristalina y de siringilo en el xilema secundario de especies no fibrosas se relaciona con la succulencia de las plantas y podría ser parte del sistema de protección celular contra patógenos.

Palabras clave: xilema secundario, Cactaceae, fluorescencia, HPLC, proporción S/G

4.2 ABSTRACT

The Cactaceae family is diverse in shapes, sizes and anatomy and it has heterogeneity in the accumulation of lignocellulose in the cell wall, which is related to its anatomy. The variation in the composition of lignin has been studied mainly in fibrous species and some dimorphs,

but that non-fibrous species is little known along with the composition of its cellulose. The objective of this study was to analyze the composition and distribution of cellulose and lignin in the vascular tissue of the secondary xylem in non-fibrous species. Plants of 25 species of Cactaceae, cellulose was extracted and purified. The Fourier transform infrared spectra of the cellulose were obtained to calculate the crystallinity index. With nitrobenzene, oxidation was performed on the wood extracted with ethanol:benzene (1:2), ethanol (96 %) and water, to quantify vanillin and syringaldehyde by HPLC and obtain the syringyl/guaiacyl ratio. Fluorescence microscopy with three excitation bands determined the distribution of cellulose and lignin in plant tissues stained with safranin O/fast green. Crystallinity index varied between 63 and 93 % in most species, the exceptions were the fibrous species of *Cylindropuntia* and *Opuntia*. The S/G ratio was heterogeneous in cacti and showed greater accumulation of syringyl in the majority of non-fibrous species and guaiacyl in fibrous species. The fluorescence emission corresponded to the S/G ratios and the fiber tonality varied markedly. The presence of more crystalline and syringyl cellulose in the secondary xylem of non-fibrous species is related to the succulence of plants and could be part of the cellular protection system against pathogens.

Keywords: secondary xylem, Cactaceae, fluorescence, HPLC; S/G ratio

4.3 INTRODUCCIÓN

Las cactáceas son plantas adaptadas a condiciones ambientales diversas, entre las que prevalecen la sequía y las temperaturas extremas ^[1-4]. La familia Cactaceae se compone por las subfamilias Pereskioideae, Mhuinoideae, Opuntioideae y Cactoideae ^[5-7], ésta última con 1222 especies documentadas ^[8-10].

Cactaceae presenta especies con forma de crecimiento globosa, columnar, arbustiforme y arbórea que se relacionan con la anatomía que presentan ^[11-13]; se han clasificado anatómicamente con base en el tipo de matriz celular predominante en el xilema secundario. Esos tipos de matriz son parenquimatosas, no fibrosas y fibrosas ^[14-16]. La presencia de uno o varios tipos de matriz celular ha permitido que también se clasifiquen en especies monomorfas, dimorfas y polimorfas ^[17,18]. Así, de manera general se clasifican en: no fibrosas, especies con traqueidas de banda ancha (TBA) y elementos de vaso (EV) ^[12,13], fibrosas (F), presentan fibras (F) asociadas a EV ^[19-21], y dimorfas, la planta presenta TBA

asociadas a EV durante las primeras etapas del desarrollo, y la planta adulta sustituye las TBA por fibras en conjunto con EV [22–24].

La composición química de *Opuntia ficus-indica*, integrante de Cactaceae, es una de las más conocidas debido a su importancia en el consumo de cladodios y frutos por humanos [25–27], como forraje [28,29] y por el potencial que tiene en la industria papelera [30–33] y de biocombustibles [34–37]. Otras especies, pertenecientes a las principales subfamilias (Pereskioideae, Opuntioideae y Cactoideae) también se han estudiado y reportado la concentración de compuestos extraíbles (etanol:benceno 1:2, etanol 96%, agua a 90 °C), y lignocelulósicos [13,38,39]. Al respecto, la lignina es uno de los principales componentes estructurales relacionado con las diferencias entre especies fibrosas y no fibrosas y que, a la vez, derivan de la presencia del xilema secundario y del tipo de engrosamiento de la pared secundaria (anular, helicoidal, reticular y punteado [13]).

Reyes-Rivera et al. [21,39] registraron heterogeneidad en la relación siringilo/guayacilo de 13 especies de Cactaceae, documentaron un porcentaje mayor de monómeros de siringilo que de guayacilo en *Coryphantha clavata*, *Ferocactus hamatacanthus* y *F. pilosus*, y propusieron que una de sus funciones es de soporte estructural al interaccionar los monómeros de siringilo de las TBA con los ferulatos unidos a la celulosa de las fibras, además de que siringilo es un posible oxidante e inhibidor de patógenos [39]. De las 13 especies que analizaron dichos autores, solo dos fueron no fibrosas, las demás especies fueron fibrosas y dimorfas; por lo que, la proporción de siringilo y guayacilo relacionada con la anatomía de especies no fibrosas se ha analizado escasamente. Tampoco se ha reportado la proporción de su celulosa cristalina y amorfa y su posible relación estructural y fisiológica en las paredes celulares del xilema secundario.

Los objetivos de este estudio fueron determinar los índices de cristalinidad de la celulosa, la proporción siringilo/guayacilo en la lignina e identificar la distribución de la celulosa y la lignina en el xilema secundario de 25 especies de Cactaceae. La hipótesis fue que hubo diferencias en la composición de celulosa y lignina entre las especies de Cactaceae.

4.4 RESULTADOS

4.4.1 Celulosa cristalina

El espectro FTIR mostró las principales bandas relacionadas con la pureza de celulosa (Figura 4.1). La banda de 3000 a 3600 cm^{-1} muestra el estiramiento de OH (enlaces de hidrógeno), la de 2900 cm^{-1} muestra el de CH, la de 1430 cm^{-1} es el doblamiento de CH_2 que revelan la presencia de celulosa cristalina y amorfa. La banda 1372 cm^{-1} muestra el doblamiento de CH, 1336 cm^{-1} representa la celulosa amorfa mediante el doblamiento en plano de OH, la de 1317 cm^{-1} refleja la celulosa cristalina I con la agitación de CH_2 , la de 1163 cm^{-1} refleja la unión asimétrica del estiramiento del oxígeno de C-O-C, la de 893 cm^{-1} muestra la asimetría del estiramiento y deformación de C-O-C, C-C-O y C-C-H de celulosa y la de 670 cm^{-1} representa el estiramiento C-O-H fuera del plano.

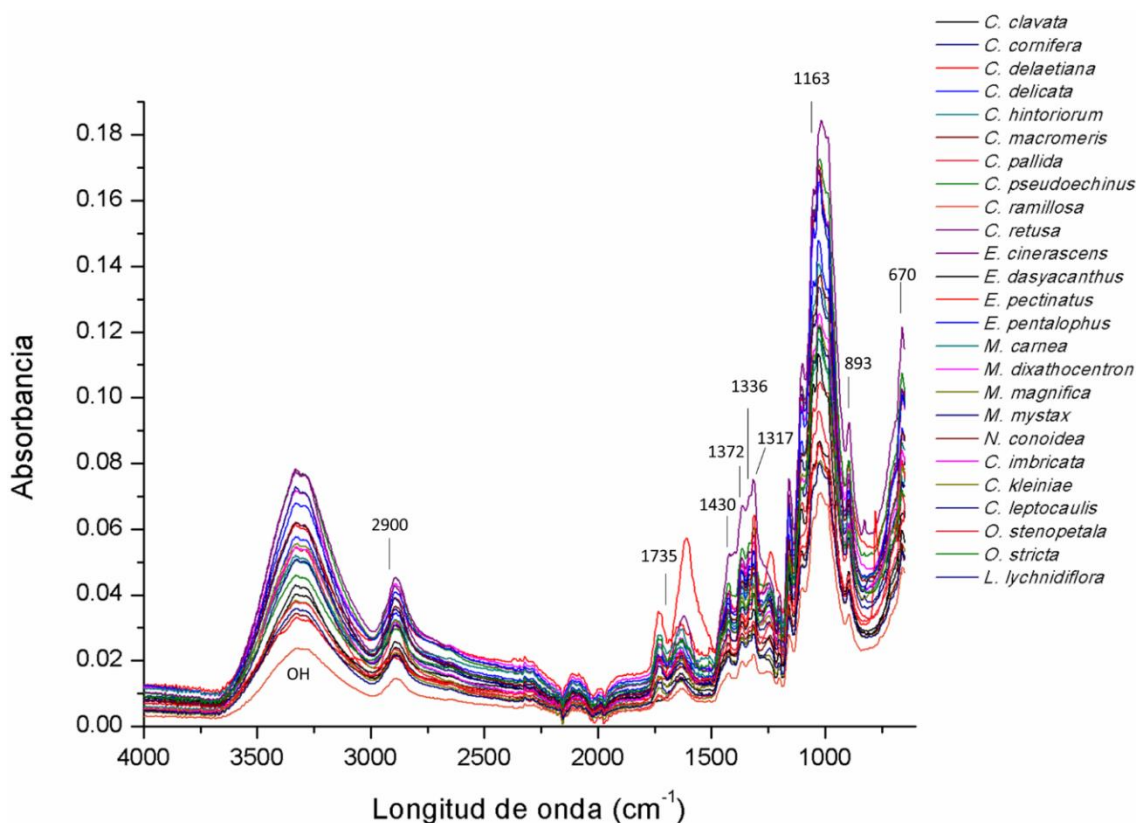


Figura 4.1. Espectro FTIR utilizados para calcular los índices de cristalinidad de celulosa de 25 especies de Cactaceae

Cuadro 4.1. Índices de cristalinidad para determinar la celulosa cristalina de las 25 especies de Cactaceae

Especie	TCI (%)	LOI (%)
<i>C. clavata</i>	70	69
<i>C. cornifera</i>	86	52
<i>C. delaetiana</i>	50	56
<i>C. delicata</i>	76	62
<i>C. hinteriorum</i>	66	64
<i>C. macromeris</i>	71	66
<i>C. pallida</i>	62	59
<i>C. pseudoechinus</i>	83	65
<i>C. ramillosa</i>	80	53
<i>C. retusa</i>	79	45
<i>E. cinerascens</i>	77	44
<i>E. dasyacanthus</i>	51	52
<i>E. pectinatus</i>	71	77
<i>E. pentalophus</i>	63	70
<i>M. carnea</i>	58	74
<i>M. dixathocentron</i>	75	81
<i>M. magnifica</i>	75	75
<i>M. mystax</i>	93	93
<i>N. conoidea</i>	69	72
<i>C. imbricata</i>	69	50
<i>C. kleiniae</i>	53	48
<i>C. leptocaulis</i>	58	43
<i>O. stenopetala</i>	57	58
<i>O. stricta</i>	47	73
<i>L. lychnidiflora</i>	80	83

El índice TCI de 18 especies fue cercano a 1. Esto indicó que la cantidad de celulosa cristalina es mayor que la amorfa. Sin embargo, casi todas las especies de *Cylindropuntia* (con excepción de *C. imbricata*), *Opuntia*, y las especies no fibrosas *C. delaetiana*, *E. dasyacanthus* y *M. carnea* presentaron valores casi similares entre celulosa cristalina y amorfa.

El índice LOI reflejó el orden de la estructura de la celulosa, los valores variaron entre 43 y 93 % para las 25 especies. Las especies con desorden mayor en la estructura fueron *C. retusa*, *E. cinerascens*, *C. kleiniae* y *C. leptocaulis*; en las demás especies predominó el orden en la estructura de celulosa (52-93 %).

Los dos índices de cristalinidad que se obtuvieron mediante los espectros de FTIR, mostraron que fueron elevados en la mayoría de las especies de Cactaceae, excepto en algunas especies fibrosas (*C. kleiniae*, *C. leptocaulis*, *O. stenopetala* y *O. stricta*) y no fibrosas cuyo índice TCI fue menor (*C. delaetiana*, *E. dasyacanthus* y *M. carnea*). La proporción de celulosa cristalina se relacionó con el ordenamiento de la celulosa (LOI), por lo que las especies antes mencionadas, presentaron índices bajos de cristalinidad y una celulosa más desordenada, excepto *O. stricta*, que presentó un mayor orden en la celulosa (Cuadro 5.1).

Las especies con índice mayor de cristalinidad variaron en el índice de ordenamiento de la celulosa (LOI), debido a que algunas especies presentaron un ordenamiento bajo, como el caso de *C. cornifera*, *C. ramillosa*, *C. retusa*, *E. cinerascens* y *C. imbricata*. Estas especies tuvieron índices de cristalinidad altos, pero un desorden mayor de la celulosa (Cuadro 5.1).

4.4.2 Proporción S/G

La proporción S/G de las 25 especies de cactáceas indicó que en la subfamilia Cactoideae, hubo heterogeneidad en la composición de la lignina en las especies consideradas como no fibrosas (Cuadro 5.2). Para *Coryphantha*, la proporción S/G tuvo un rango que va de 0.3 a 6.6, debido a que *C. clavata* presentó un mayor porcentaje de siringilo (86.9 %) que de guayacilo (13.1 %), contrario de lo que se obtuvo para *C. macromeris* y *C. pallida*, cuyos porcentajes de siringilo son 22.5 y 21.2 % mientras que los de guayacilo son 77.5 y 78.8 % respectivamente (Cuadro 5.2). Comparado con las especies no fibrosas de la subfamilia Cactoideae reportadas por Reyes-Rivera et al. ^[21] (Cuadro 5.3) se pudo observar que *C. clavata* presentó una proporción de 3.9, lo que confirma que esta especie presentó una gran acumulación de siringilo en el polímero de la lignina (80-86.9 %). *A. retusus*, otra especie no fibrosa, tuvo una proporción de 1.1, ya que acumuló 52 % de siringilo y 48 % de guayacilo, similar a *C. cornifera* (Cuadro 5.2).

Para *Echinocereus*, la proporción varió entre 2.2 y 2.8, excepto para *E. pentalophus* (5.9) debido a la acumulación de siringilo (85.5 %) con respecto a guayacilo (14.5 %). En el género *Mammillaria*, las proporciones presentaron un intervalo de 0.8 a 4.1, el porcentaje de siringilo en la mayoría de las especies fue mayor con respecto a guayacilo, como *M. carnea* que tuvo una cantidad mayor de siringilo (80.3 %) que de guayacilo (19.7 %), mientras que

M. dixathocentron la cantidad de guayacilo (54.6 %) fue mayor que la de siringilo (45.4 %). *Neolloydia conoidea* tuvo valores similares a los que se observaron en *Echinocereus*, con una proporción de S/G de 2 (Cuadro 5.2). De manera general, las especies no fibrosas presentaron una mayor acumulación de siringilo que de guayacilo (Cuadros 5.2 y 5.3).

Cuadro 4.2. Porcentajes de siringilo, guayacilo y la proporción S/G para las 25 especies de Cactaceae

Especie	S	G	S/G
<i>Coryphantha</i>			
<i>C. clavata</i>	86.9	13.1	6.6
<i>C. cornifera</i>	51.7	48.3	1.1
<i>C. delaetiana</i>	40.4	59.6	0.7
<i>C. delicata</i>	28.3	71.7	0.4
<i>C. hinteriorum</i>	58.7	41.3	1.4
<i>C. macromeris</i>	22.5	77.5	0.3
<i>C. pallida</i>	21.1	78.8	0.3
<i>C. pseudoechinus</i>	44.4	55.6	0.8
<i>C. ramillosa</i>	61	39	1.6
<i>C. retusa</i>	41.1	58.9	0.7
<i>Echinocereus</i>			
<i>E. cinerascens</i>	69	31	2.2
<i>E. dasyacanthus</i>	73.3	26.7	2.8
<i>E. pectinatus</i>	68.8	31.2	2.2
<i>E. pentalophus</i>	85.5	14.5	5.9
<i>Mammillaria</i>			
<i>M. carnea</i>	80.3	19.7	4.1
<i>M. dixatochentron</i>	45.4	54.6	0.8
<i>M. magnifica</i>	78.8	21.2	3.7
<i>M. mystax</i>	68.2	31.8	2.1
<i>Neolloydia</i>			
<i>N. conoidea</i>	67.1	32.9	2
<i>Cylindropuntia</i>			
<i>C. imbricata</i>	24.8	75.2	0.3
<i>C. kleiniae</i>	22.9	77.1	0.3
<i>C. leptocaulis</i>	31.4	68.3	0.5
<i>Opuntia</i>			
<i>O. stenopetala</i>	51.3	48.7	1.1
<i>O. stricta</i>	52.4	47.6	1.1
<i>Leuenbergeria</i>			
<i>L. lychnidiflora</i>	63.5	36.5	1.7

En el caso de las especies fibrosas, el género *Cylindropuntia* presentó valores similares en la proporción S/G (0.3-0.5) debido a que las especies acumularon porcentaje mayor de guayacilo (68.3-77.1 %) que de siringilo (22.9-31.4 %); en *Opuntia* se observó lo contrario, ya que presentaron acumulaciones mayores de siringilo (51.3-52.4 %) que guayacilo (47.6-48.7 %). *Leuenergeria lychnidiflora* mostró una cantidad mayor de siringilo (63.5 %) que de guayacilo (36.5 %) (Cuadro 5.2).

Cuadro 4.3. Porcentajes de siringilo, guayacilo y proporción S/G de 13 especies reportadas por Reyes-Rivera et al. ^[21,39]

Especies	Guayacilo	Siringilo	S/G
<i>Ariocarpus retusus</i>	48	52	1.1
<i>Coryphantha clavata</i>	20	80	3.9
<i>Echinocactus platyacanthus</i>	60	40	0.7
<i>Ferocactus hamatacanthus</i>	8; 6-11*	92; 89-94*	11.7; 8.5-16.4*
<i>Ferocactus pilosus</i>	22	78	3.5
<i>Cylindropuntia imbricata</i>	70	30	0.4
<i>Lophocereus marginatus</i>	49	51	1.1
<i>Myrtillocactus geometrizans</i>	62	38	0.6
<i>Opuntia streptacantha</i>	47; 31-33*	53, 67-69*	1.1; 2.1-2.2*
<i>Leuenergeria lychnidiflora</i>	52; 37-38*	48; 62-63*	0.9; 1.6-1.7*
<i>Pilosocereus alensis</i>	43	57	1.3
<i>Pilosocereus chrysacanthus</i>	70; 54-61*	30; 39-46*	0.4; 0.7-0.9*
<i>Stenocereus dumortieri</i>	75	25	0.3

*Valores de Reyes-Rivera et al. ^[39]

Los valores que se obtuvieron para *Cylindropuntia* (0.3-0.5) corresponden con los que obtuvieron Reyes-Rivera et al. ^[21] para *C. imbricata* (0.4 Cuadro 5.3). En *Opuntia* los valores (1.1) fueron similares a lo que menciona Reyes-Rivera et al. ^[21] mediante el proceso de oxidación por nitrobenzeno (1.1); sin embargo, la proporción es diferente a la que reporta Reyes-Rivera et al. ^[39] con la cuantificación de lignina-dioxano (DL) (2.1-2.2). *L. lychnidiflora* (1.7) tuvo valores similares a lo que reportó Reyes-Rivera et al. ^[39] con el procedimiento de DL (1.6-1.7) y diferente a lo que obtuvieron con el procedimiento de oxidación con nitrobenzeno (0.9) ^[21] (Cuadro 5.3).

En especies columnares y consideradas como especies fibrosas reportadas por Reyes-Rivera et al. ^[21,39], *M. geometrizans*, *P. chrysacanthus* y *S. dumortieri* presentaron una proporción menor a 1, debido a que acumularon principalmente guayacilo (Cuadro 5.3); *L.*

marginatus y *P. arenis* tuvieron ligeramente mayor acumulación de siringilo (51 y 57 % respectivamente) que de guayacilo (49 y 43 % respectivamente, Cuadro 5.3).

4.4.3 Microscopía de fluorescencia

La microscopía de fluorescencia con tres bandas de excitación mostró la emisión de fluorescencia de lignina y otros compuestos como holocelulosa y proteínas (Figuras 4.2, 4.3). Para estandarizar la intensidad de la fluorescencia y las diferencias en la coloración de la misma se hicieron observaciones a dos especies de gimnospermas: *Pinus* y *Cupressus* (Figura 4.2). La emisión de fluorescencia de la lignina reveló que las traqueidas de ambas especies presentaron tonalidades verdes como se observó en los cortes longitudinales, mientras que, en los transversales, la tonalidad fue verdosa-amarilla y de mayor intensidad. Además, la presencia de holocelulosa y proteínas se detectó por la emisión de fluorescencia roja principalmente en la lámina media y en las punteaduras de las traqueidas. Los espacios en negro o casi negro, son regiones sin fluorescencia como el lumen celular (Figura 4.2). En comparación con las imágenes de microscopía en campo claro, la tonalidad roja resultado de la tinción por safranina O, con microscopía de fluorescencia resaltó en tonalidades verdosas derivado de la presencia de lignina (Figura 4.2).

Entre angiospermas, la fluorescencia de la lignina presentó tonalidad e intensidad diferentes (Figura 4.3). En *F. hamatacanthus*, la presencia de fibras mostró fluorescencia azul. Esta correspondió a la presencia de mayor acumulación de lignina de tipo siringilo. Los elementos de vaso aledaños mostraron coloración verdosa, típica de la presencia de acumulación de guayacilo como se observó en las traqueidas de ambas gimnospermas (Figura 4.2). Con la imagen en campo claro y la tinción de safranina O/verde rápido se nota poco la coloración de las fibras (Figura 4.3A), mientras que el elemento de vaso muestra claramente las paredes teñidas y las punteaduras bordeadas escalariformes (Figura 4.3C).

Pilosocereus chrysacanthus mostró tonalidades verdes para los elementos de vaso de manera transversal y tangencial, en las fibras las tonalidades fueron verde claro a amarillosas especialmente en los cortes transversales (Figura 4.3F, H). La holocelulosa y las proteínas en la lámina media y en las paredes del parénquima no lignificado mostraron tonalidades rojas. En el parénquima radial, algunas células acumularon gránulos de almidón de diferentes tamaños, los cuales tuvieron una fluorescencia intensa de color turquesa (Figura 4.3F, H).

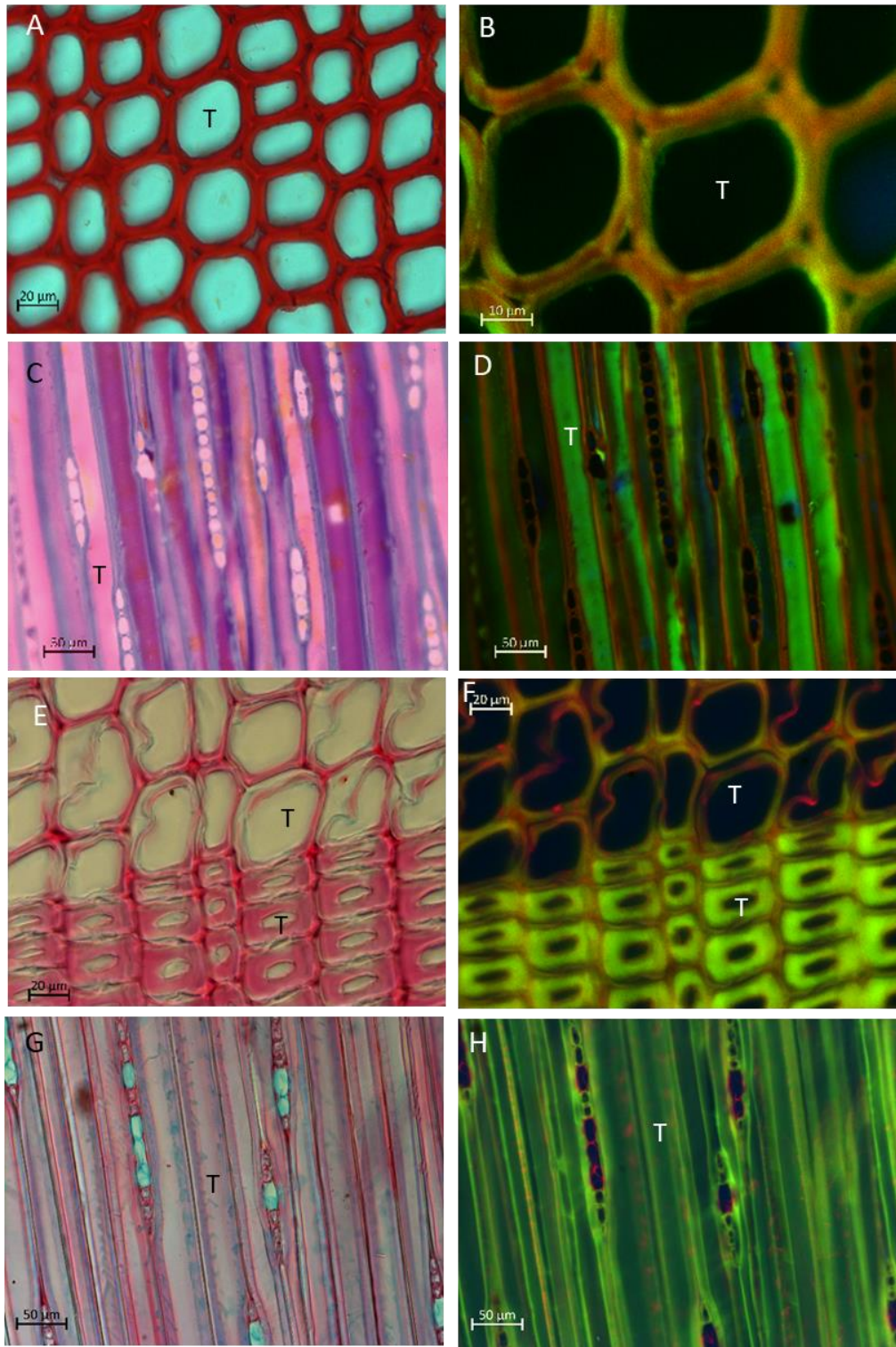


Figura 4.2. Comparación de imágenes en campo claro con imágenes de fluorescencia con triple banda excitación. A, C, E, G: Campo claro. B, D, F, H: emisión de fluorescencia. A, B, E, F: vistas transversales. C, D, G, H: vistas longitudinales. A, B, C, D: *Cupressus lindleyi*.

E, F, G, H: *Pinus douglasiana*. T: Traqueidas. Escala A, E, F: 20 μm . B: 10 μm . C, D, G, H: 50 μm .

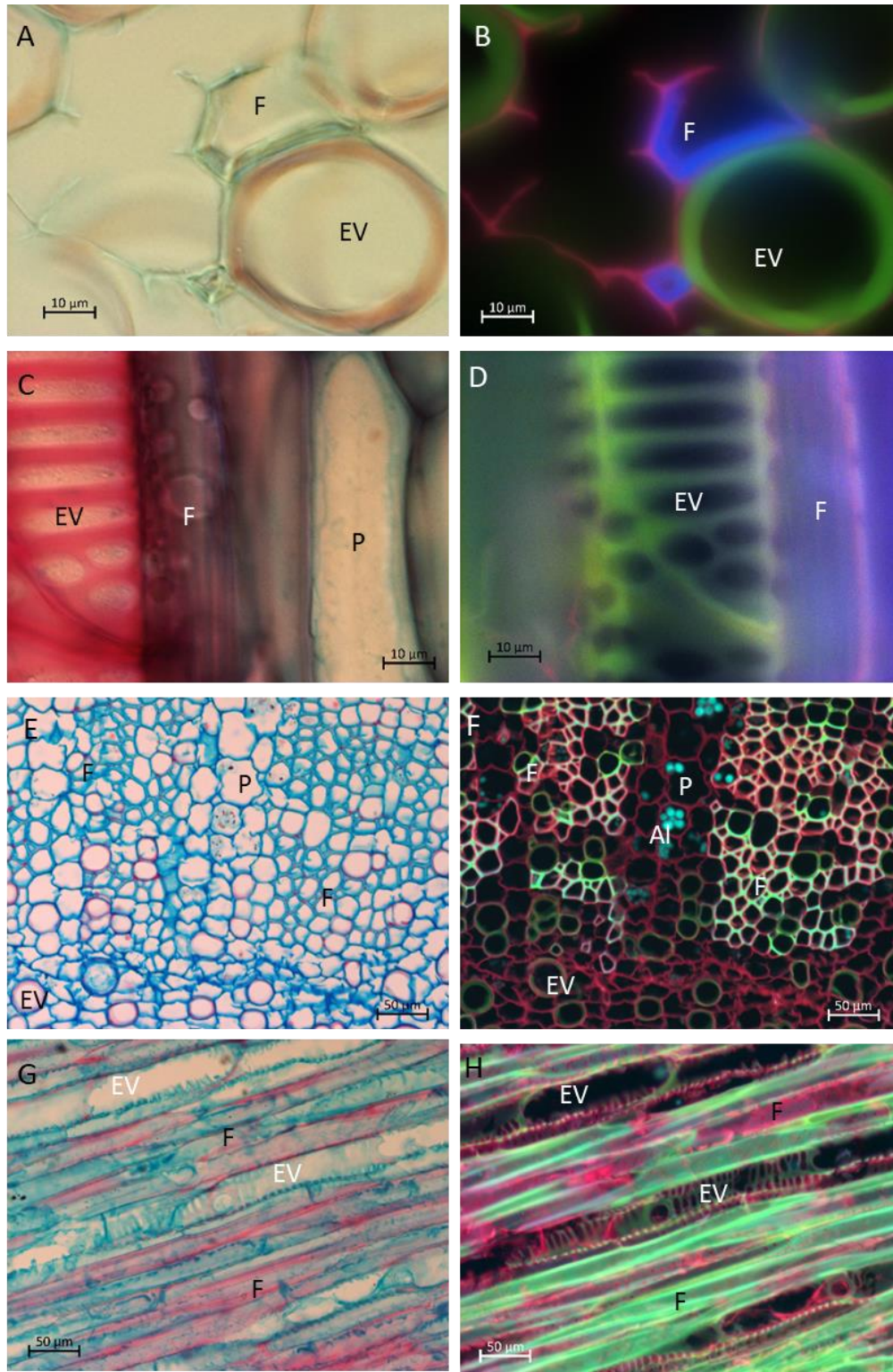


Figura 4.3. Comparación de imágenes en campo claro con imágenes de fluorescencia con triple banda excitación. A, C, E, G: Campo claro. B, D, F, H: emisión de fluorescencia. A, B, E, F: vistas transversales. C, D, G, H: vistas longitudinales. A, B, C, D: *Ferocactus*

hamatacanthus. E, F, G, H: *Pilosocereus crysacanthus*. EV: Elementos de vaso. F: Fibras. P: Parénquima. Al: Almidón. Escala A, B, C, D: 10 μm . E, F, G, H: 50 μm .

Las partes negras mostraron la ausencia de fluorescencia y fueron representativos de los lúmenes y partes de parénquima sin contenidos. La comparación de estas imágenes con las de campo claro mostró que los elementos de vaso y algunas fibras se tiñeron de color rojo por la presencia de lignina, mientras que las paredes no lignificadas, presentaron tonalidades azules; además, los gránulos de almidón se detectaron en tonalidades azul claro (Figura 4.3E, G).

Después de estandarizar las tonalidades, se obtuvieron las emisiones de fluorescencia del xilema secundario. Las especies fibrosas mostraron variación en las tonalidades principalmente en las fibras (Figura 4.4). En contraste, los EV emitieron tonalidad verde claro similar entre las especies. En el género *Cylindropuntia*, las fibras presentaron fluorescencia verde claro intensa, los EV fueron de color verde oscuro (*C. imbricata*) a verde claro (*C. kleiniae*), similar al parénquima lignificado que se detectó en las tres especies analizadas, mientras que el parénquima no lignificado tuvo tonalidades rojizas (Figura 4.4A-C). Para *Opuntia*, los EV presentaron colores similares, en cambio las fibras, tuvieron mayor variación en la fluorescencia, ya que se observaron tonalidades de verde claro y verde aguamarina (*O. stenopetala* y *O. streptacantha*) a tonalidades amarillas y azules (*O. stricta*) (Figura 4.4D-F).

Las especies de tipo columnar pertenecientes a Cactaceae emitieron fluorescencia de tonalidades amarillas en las fibras, mientras que en los EV la intensidad es menor y abarcaron tonalidades verdosas amarillas (Figura 4.4G-I), con excepción de *P. crysacanthus* cuyas fibras fueron de color verde claro y presentó acumulación de almidón de tonalidad turquesa (Figura 4.4J). En *L. lychnidiflora*, los EV y el parénquima reflejaron fluorescencia verde oscura, mientras que en las fibras se detectó fluorescencia verde claro y amarilla en algunas partes (Figura 4.4K, L). En todas las especies, se detectó la presencia de holocelulosa y proteínas con una emisión de fluorescencia roja.

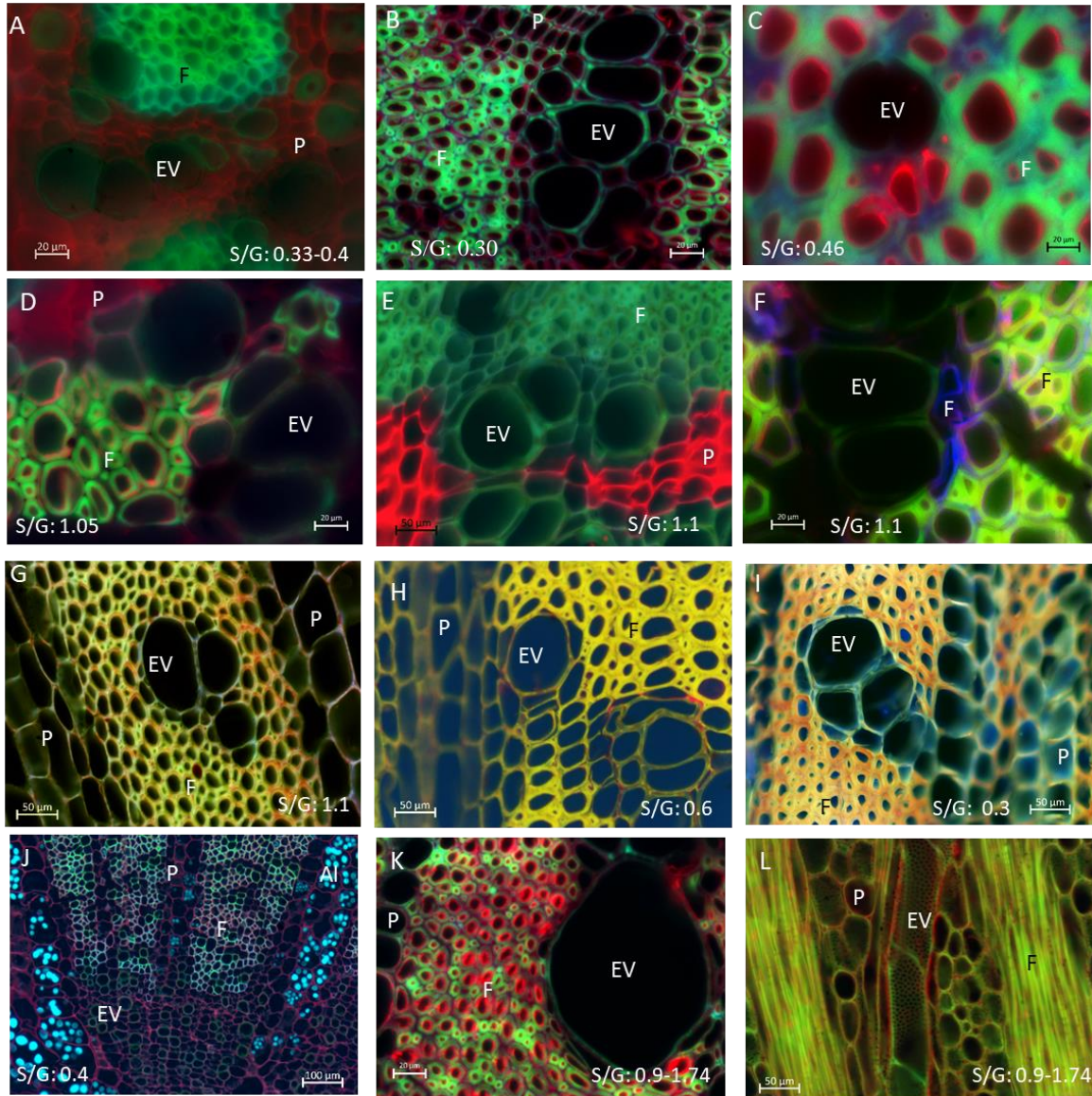


Figura 4.4. Emisión de fluorescencia del xilema secundario de especies fibrosas de Cactaceae. A: *Cylindropuntia imbricata*. B: *Cylindropuntia kleiniae*. C: *Cylindropuntia leptocaulis*. D: *Opuntia stenopetala*. E: *Opuntia streptacantha*. F: *Opuntia stricta*. G: *Lophocereus marginatus*. H: *Myrtillocactus geometrizans*. I: *Stenocereus dumortieri*. J: *Pilosocereus crysacanthus*. K y L: *Leuenbergeria lychnidiflora*. En cada imagen se muestran las proporciones de S/G. F: Fibras. EV: Elemento de vaso. P: Parénquima. Al: Almidón. Barra es 20 μm en A-D, F, K; 50 μm en E, G-I, L; 100 μm en J.

Entre las especies dimorfas, *E. platyacanthus* mostró predominio de EV en su xilema y su emisión de fluorescencia fue de color verde claro (Figura 4.5A, B); mientras que para *F. hamatacanthus* predominaron las traqueidas de banda ancha (TBA) con tonalidades verdes en pared primaria y las regiones S1 y S2 de la pared secundaria, mientras que en la región S3

de la pared secundaria la tonalidad fue verde azulada. Además, en la parte cercana al cambium vascular, se observó la presencia de fibras con paredes que fluorescieron de color azul violáceo (Figura 4.5C, D). En *F. pilosus*, los EV presentaron fluorescencia verde oscuro a verde claro, con algunas acumulaciones de holocelulosa en la pared secundaria; también se observaron fibras de color azul y amarillo cercanas al cambium vascular (Figura 4.5E, F).

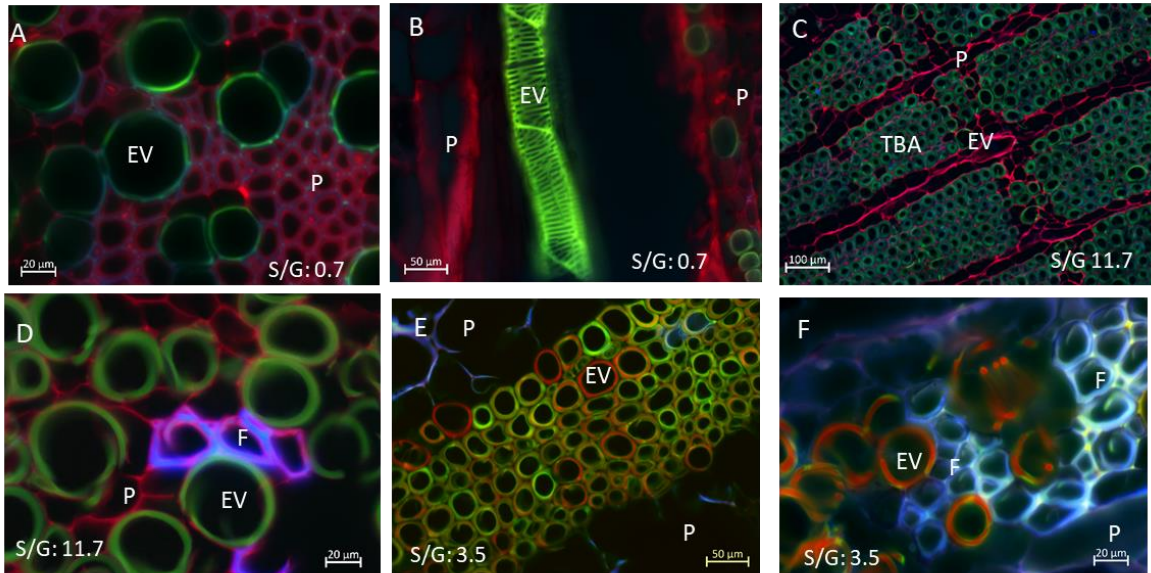


Figura 4.5. Emisión de fluorescencia del xilema secundario de especies dimorfas de Cactaceae. A y B: *Echinocactus platyacanthus* en vista transversal y longitudinal respectivamente. C y D: *Ferocactus hamatacanthus*. E y F: *Ferocactus pilosus*. En cada imagen se muestran las proporciones de S/G. F: Fibras. EV: Elemento de vaso. P: Parénquima. TBA: Traqueida de banda ancha. Barra es 20 μm en A, D, F; 50 μm en B, E y 100 μm en C.

La ausencia de fibras se confirmó en todas las especies no fibrosas y se presentaron TBA, EV y parénquima no lignificado. En *A. retusus* abundaron las TBA que presentaron tonalidad verde claro a verde oscuro, similar a las tonalidades observadas en los EV (Figura 4.6A). Para las especies del género *Coryphantha*, las tonalidades fueron muy similares entre las especies, tanto los EV como las TBA presentaron fluorescencia de color verde oscuro a verde claro, además de que se observó en algunas TBA mayor intensidad de la fluorescencia de lignina en la región S3 de la pared secundaria (*C. clavata* y *C. macromeris*) (Figura 4.6B, E). Para *C. delaetiana*, *C. macromeris* y *C. pallida* abundó la presencia de EV en el xilema

secundario (Figura 4.6C, E-G), mientras que en *C. clavata*, *C. hinteriorum* y *C. ramillosa*, las TBA predominaron.

En *Echinocereus* se observó la presencia mayoritaria de TBA en el xilema secundario (Figura 4.6I-K), con tonalidades fluorescentes de color verde oscuro a verde aguamarina; además se observaron pocos EV rodeados de TBA y su fluorescencia fue verde oscuro, verde claro y verde aguamarina, este último especialmente en *E. pentalophus* (Figura 4.6K).

El género *Mammillaria* se caracterizó por que las TBA y EV presentaron emisiones de fluorescencia similares, en *M. dixathocentron* abundaron los EV con tonalidades verde claro (Figura 4.6L). En *M. magnifica* hubo más TBA de tonalidad verde oscuro (Figura 4.6M), similar a los escasos EV que se observaron. En *N. conoidea*, fueron pocos los EV presentes en el tejido vascular y mayor abundancia de TBA, la fluorescencia de los EV y TBA fue de tipo verde oscuro a claro (Figura 4.6N, O). Con base en la tonalidad de la emisión de fluorescencia de las células del xilema y las proporciones S/G en las especies de Cactaceae (Cuadros 5.2 y 5.3) se sugiere la hipótesis sobre la relación de emisión fluorescente de los elementos traqueales con la composición de lignina (Cuadro 5.4).

Con base en lo anterior, la baja acumulación de siringilo en las especies de *Cylindropuntia* fue debido a la presencia de EV, parénquima lignificado y fibras cuya composición es similar al presentar emisiones de fluorescencia verde claro (Figura 4.4; Cuadro 5.4). En *M. geometrizzans* y *S. dumortieri*, las fibras con fluorescencia amarilla tuvieron proporciones mayores de guayacilo que de siringilo (Cuadro 5.4) y por lo tanto las proporciones fueron menores (Cuadro 5.3). *Opuntia* presentó una mayor proporción de S/G (1.05-1.1) con respecto a *Cylindropuntia* por la presencia de fibras con tonalidades verde aguamarina y algunas de verde claro, además de que su parénquima no estuvo lignificado. La proporción S/G en *L. lychnidiflora* reflejó que la acumulación de guayacilo en su tejido vascular es variable (0.9-1.74), además de que se observó que las fibras presentaron tonalidades verde claras, mientras que el parénquima y EV tuvieron tonalidades verde oscuro principalmente (Figura 4.4 K; Cuadro 4.4).

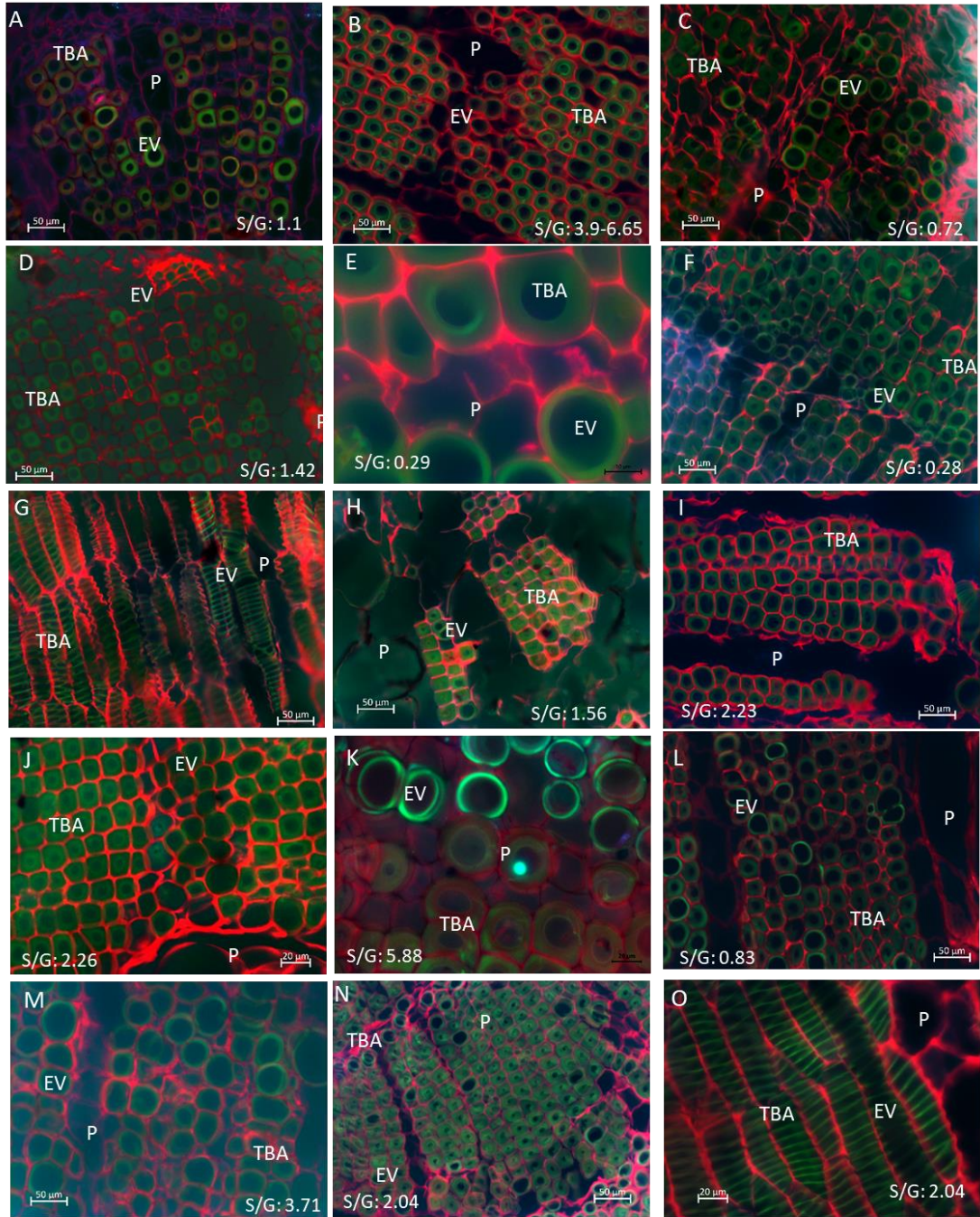


Figura 4.6. Emisión de fluorescencia del xilema secundario de especies no fibrosas de Cactaceae. A: *Ariocarpus retusus*. B-H: *Coyphantha*, C. *clavata*. C: *C. delaetiana*. D: *C. hinteriorum*. E: *C. macromeris*. F y G: *C. pallida*. H: *C. ramillosa*. I: *Echinocereus cinerascens*. J: *Echinocereus dasyacanthus*. K: *Echinocereus pentalophus*. L: *Mammillaria dixathocentron*. M: *Mammillaria magnifica*. N y O: *Nelloydia conoidea*. En cada imagen se muestran las proporciones de S/G. EV: Elemento de vaso. P: Parénquima. TBA: Traqueida de banda ancha. Barra es 50 µm A-D, F-I, L-N; 10 µm en E; 20 µm en I y O.

Cuadro 4.4. Emisión de fluorescencia de las paredes de los elementos traqueales y su posible proporción de S/G

	Azul- violáceo	Verde aguamarina	Verde oscuro	Verde claro	Verde amarillo	Amarillo
EV	-	- G / + S	- G / + S	+ G / -S	+ G / - S	-
TBA	-G/+ S	- G / + S	- G / + S	+ G / -S	-	-
F	-G/+ S	- G / + S	-	+ G / -S	-	+ G / - S
P	-	-	- G / + S	+ G / -S	+ G / - S	-

EV= Elemento de vaso. TBA= Traqueida de banda ancha. F= fibra. P= Parénquima. S= siringilo. G= Guayacilo. Valores negativos indican menor acumulación del monómero, valores positivos, indican mayor acumulación.

Lophocereus marginatus presentó fluorescencia similar a la de otras especies columnares, sin embargo, el parénquima tuvo tonalidades de verde oscuro, por lo que acumuló una mayor cantidad de siringilo (51%) (Cuadro 5.3). *Pilosocereus chrysacanthus* mostró abundantes fibras de tonalidad verde claro y amarillo (Figuras 4.3F, 4.4J), los EV tuvieron tonalidades verdes oscuro, por lo que su proporción S/G fue baja (0.4) debido a las fibras.

En especies dimorfas, *E. platyacanthus* tuvo menor porcentaje de siringilo (Cuadro 5.3), debido a que presentó un mayor número de EV con tonalidad verde claro (Figura 4.5A, B; Cuadro 4.4). *Ferocactus hamatacanthus* acumuló más siringilo en el xilema (Cuadro 4.3), por lo que en la emisión de fluorescencia se observó mayor presencia de TBA de color verde oscuro, con las paredes S3 con ligeras tonalidades azules en algunas células, los EV fueron de color verde claro, además de que las fibras tuvieron una coloración violácea azulada, por la presencia de una mayor cantidad de siringilos. En *F. pilosus* la situación fue similar, las fibras presentaron fluorescencia amarilla y azulada, con EV de tonalidad verde oscuro y claro (Figura 4.5E, F), por lo que acumula mayor porcentaje de siringilos en el xilema (Cuadro 4.3).

En las especies no fibrosas, *C. delaetiana*, *C. macromeris*, *C. pallida* y *M. dixathocentron* presentaron abundancia de EV de tonalidad verde claro y tuvieron proporciones S/G menores (Figura 4.6C, E-G, L). En las especies *C. clavata*, *M. magnifica*, *N. conoidea* y varias especies de *Echinocereus*, hubo mayor presencia de TBA en el xilema y se observaron pocos EV intercalados con fluorescencia similar entre ambos elementos traqueales (verde oscuro) (Figura 4.6 B, I-K, M-O).

4.5 DISCUSIÓN

4.5.1 Celulosa cristalina

Los índices de cristalinidad entre 47 y 58 % en algunas de las especies fueron similares a los de la mayoría de gimnospermas y de algunas angiospermas como *Pinus banksiana*, *P. resinosa*, *Picea sitchensis*, *Populus* spp. y *Ulmus americana* ^[40]. Las especies con índices de cristalinidad mayor a 60% (como *C. pallida* y *E. pentalophus*) son similares a angiospermas como *Acer rubrum*, *Arbutus menziesii*, *Eucalyptus* spp. y *Boehmeria nivea* reportadas por Agarwal et al. ^[40]. De las especies incluidas en este estudio, únicamente en *O ficus-indica* se ha documentado el porcentaje de celulosa cristalina. El contenido en semillas 60 % ^[41], epidermis de frutos 38 % ^[42] y espinas 33.81-70 % ^[32,43] es mayor que en cladodios 27.2 % ^[35] y tejido vascular 22-28 % ^[44].

Los porcentajes de celulosa cristalina entre 60 y 93 % en la mayoría de las cactáceas estudiadas, principalmente especies no fibrosas, puede relacionarse con el abundante parénquima no lignificado y la acumulación menor de lignina en el xilema, debido a que la celulosa funcionaría como método de sostén principalmente de la pared primaria sin perder flexibilidad de la misma ^[45-47]. Permite al xilema soportar y mantener la estructura celular durante los períodos de estrés hídrico y de lluvia ^[48,49].

En estos taxones la mayor cantidad de celulosa cristalina no solo tiene implicaciones estructurales, sino que también protege contra patógenos ^[50]. Una cantidad mayor de celulosa cristalina y ordenada significa un empaquetamiento mayor de celulosa en la pared primaria, por lo que funciona como una barrera primaria de defensa de la pared celular ^[51]. La celulosa cristalina está formada por cadenas de β -(1→4)-D-Glcp, que a su vez forman microfibrillas unidas inter e intra molecularmente por enlaces de hidrógeno y fuerzas de Van de Waals ^[52,53]. Esta estructuración proporciona resistencia a la degradación por enzimas glucosidasas ^[50] y enzimas producidas por hongos patógenos ^[54]; por lo que, las especies de cactáceas no fibrosas acumularían una cantidad mayor de celulosa cristalina como defensa primaria en el xilema ante posibles ataques de patógenos.

En las especies fibrosas de *Cylindropuntia* y *Opuntia*, los porcentajes de celulosa cristalina son similares a los de celulosa amorfa debido a que el xilema presenta una

acumulación mayor de lignina en las paredes celulares de los EV, fibras y parénquima ^[13], que funciona como barrera física contra patógenos ^[55]; en las especies no fibrosas al tener menor acumulación de lignina en el xilema, la celulosa cristalina se acumularía en las paredes primarias para dar mayor soporte ^[56,57].

La acumulación de celulosa cristalina (80 %) y ordenamiento de celulosa (83 %) en *L. lychnidiflora* fue similar al de especies no fibrosas y contrario al de especies fibrosas. Su distribución es en zonas de mayor humedad ^[58] comparado con *Cylindropuntia* y *Opuntia* cuya distribución se da en climas áridos y semiáridos ^[59-61]. Sin embargo, sería necesario realizar más análisis para determinar si prevalece este porcentaje de celulosa cristalina en otras especies.

4.5.2 Proporción S/G

La mayor concentración de siringilo en la mayoría de especies no fibrosas y dimorfas (excepto para *E. platyacanthus* Cuadro 5.3) de porte pequeño, globulares y columnares de mediano tamaño, contrasta con aquellas especies consideradas como fibrosas, de estructura arbustiva o columnar (excepto *L. lychnidiflora*, *Opuntia* y *P. alensis*). Con base en lo que se reporta en la literatura, las fibras presentan una mayor acumulación de siringilo que de guayacilo ^[62,63], por lo que se esperaría que la proporción fuera diferente; como propuso Li et al. ^[64], la acumulación de siringilo en las fibras confiere mayor resistencia y soporte a la pared celular.

Los resultados del presente estudio y los de Reyes-Rivera et al. ^[21,39] revelan que la función de la acumulación de siringilo en el xilema secundario de las cactáceas no fibrosas, no sería para soporte estructural de las plantas, sino que podrían formar parte del sistema de defensa contra patógenos como se ha reportado en la literatura para *Isoetes*, *Selaginella*, *Lycophyta* y gnetofitas ^[65-69], en gimnospermas ^[70] y en angiospermas ^[71-74]. Incluso en cactáceas como Reyes-Rivera et al., ^[39] proponen para *Ferocactus hamatacanthus*, en esta especie la acumulación de siringilo funciona como agente antioxidante o contra patógenos.

Por lo tanto, la presencia de siringilo en el xilema secundario en la mayoría de especies no fibrosas y dimorfas se debe a la succulencia presente en las especies con abundante parénquima no lignificado y con engrosamientos de la pared secundaria de tipo helicoidal y

anular en los elementos traqueales. La principal función sería como método de defensa contra patógenos y no como soporte estructural del tejido vascular como propusieron Li et al. [64] y Reyes-Rivera et al., [21]. La presencia de abundante siriginilo en el xilema de las especies de los géneros *Coryphantha*, *Echinocereus*, *Mammillaria* y *Neolloydia* muestran que su acumulación no depende de la presencia de fibras ni de la interacción entre fibras y TBA como propusieron Reyes-Rivera et al., [21], debido a que, en las especies no fibrosas, las TBA estuvieron asociadas a EV y no se detectó presencia de fibras, por lo tanto, la acumulación de los monómeros de siriginilo se daría principalmente en las paredes secundarias de las TBA.

4.5.3 Distribución de la lignina

Las imágenes de fluorescencia con las de campo claro (Figura 4.2 y 4.3) mostraron que las primeras permitieron identificar claramente las diferencias en la composición de las células del xilema; lo que concuerda con lo reportado por otros autores [75-77] y contrasta con otras técnicas de tinción (Maüle y Wiesner) [78-80]. Las tonalidades que se observaron en las muestras son derivadas del uso de las tres bandas de excitación. Su uso, en conjunto, permitió observar los colores verdaderos de la fluorescencia del xilema [75,81,82], aunque otros autores solo utilizan dos bandas [83-86] e incluso una para obtener imágenes monocromáticas e identificar las variaciones por las diferencias en la intensidad y tonalidad de grises [87-89].

La presencia de fluoróforos en la molécula de lignina permiten la autofluorescencia y detección sin tinción, en longitudes de onda entre 240 y 320 nm [90]. En contraste, la lignina teñida con safranina O/verde rápido, a los 488 nm se excita (Bond et al., 2008) y su emisión se detecta entre 505 y 530 nm [75], similar a la banda FITC empleada en este estudio. Además, la tinción con safranina evita el fotoblanqueo [91], permite que los fluoróforos tengan mayor tiempo de vida y se obtengan imágenes de mejor calidad [92-94], como las que se presentan en las Figuras 4.2-4.6. Las tonalidades que comúnmente se han detectado en la emisión de fluorescencia de lignina van de azul [81,83,95] a verde [84,96-98]. Sin embargo, se debe tener cuidado con los tiempos de exposición, el pH del medio y los procedimientos de preparación del tejido que pueden afectar la intensidad y tiempo de fluorescencia [99,100].

Los polisacáridos son moléculas que no fluorescen [101]; sin embargo, mediante el uso de diferentes tinciones para la detección de celulosa, las regiones de emisión se localizan entre 570-620 nm [95], para holocelulosa también se ha detectado que la longitud de excitación

abarca la región roja (600 nm de excitación) ^[87]. En este estudio, con la tinción de safranina O/verde rápido, las tonalidades rojas se localizaron en las células parenquimáticas no lignificadas y en la lámina media de los elementos traqueales, con una longitud de emisión de 570-620 nm, que corresponde a la banda TRITC y a la detección de compuestos holocelulósicos, proteínas y enzimas ^[95].

Las traqueidas en las dos gimnospermas analizadas tuvieron tonalidades verdes claro intensas (Figura 4.2), correspondientes a la presencia de lignina de tipo guayacilo ^[63,102]. Esta tonalidad fue similar a lo que se observó en los EV debido a que acumula monómeros de guayacilo y pequeñas cantidades de siringilo ^[62,63]. En cambio, las fibras presentes en las angiospermas (Figura 4.3B, D, F) revelaron que la emisión de fluorescencia varió de tonalidades azules, verde aguamarina, verde oscuro, verde claro y amarillo, que refleja la variación en la acumulación de siringilo en las paredes secundarias de las fibras. Esta variación se ha estudiado en *Betula pendula*. La acumulación de siringaldehído, acetosiringona y ácido sirínico en esta especie es muy variable y depende de la posición en la que se localizan las fibras, mientras que los componentes de guayacilo como vainillina y acetovanillona son similares en los EV independiente de su acumulación, y solo el ácido vainílico puede variar ^[103]. Por lo que como se propuso en el Cuadro 5.5, la emisión de fluorescencia de la lignina se relaciona con la proporción de monómeros de guayacilo y siringilo; sin embargo, ésta sería una propuesta cualitativa y es necesario corroborar con técnicas precisas como microscopía de UV ^[104] o espectrometría de masas de iones secundarios de tiempo de vuelo (TOF-SIMS) ^[105].

La abundancia de TBA en las especies no fibrosas corresponde con lo reportado por Maceda et al. ^[13]. Sin embargo, mediante el uso de microscopía de fluorescencia, se determinó que en *Echinocereus* no se detecta la presencia de fibras, como anteriormente habían propuesto dichos autores. Por lo que el uso de microscopía de fluorescencia permite una descripción fidedigna del xilema. En las especies fibrosas, los resultados de presencia de fibras en ambos grupos, fueron similares a lo que menciona Reyes-Rivera et al. ^[21,39]. Las diferencias se detectaron en las especies dimorfas de *Ferocactus*, debido a que solo se observaron unas cuantas fibras cercanas al cambium vascular, mientras que dichos autores

mostraron una mayor abundancia de fibras, lo que posiblemente se relacione con la proporción de S/G de 11.7.

Por lo que, la diversidad en la composición química es reflejo de la adaptabilidad que tiene el xilema no solo en Cactaceae, si no en diferentes familias de plantas, para variar de forma interespecífica ^[106,107] e intraespecífica ^[107,108]. La acumulación de siringilo en las TBA y EV de las especies no fibrosas, sería parte del mecanismo de defensa contra patógenos ^[73,109]. Además, una mayor acumulación de siringilo en las paredes internas de los elementos traqueales, permite una mayor eficiencia en el transporte de agua debido a la afinidad que tiene con los monómeros de siringilo (Pereira et al., 2018). La acumulación de guayacilo permite el soporte de las paredes primarias y secundarias en EV y posiblemente en fibras ^[107,110-112].

La diversidad en la composición de la celulosa, lignina y su distribución en el xilema de Cactaceae permitió entender que las diferencias en su acumulación pueden tener implicaciones en el sistema de defensa contra patógenos. Además, las características como succulencia ^[113-115], abundante mucílago ^[116,117], reducción de hojas ^[58,118] y metabolismo ácido de las crasuláceas (MAC) ^[119,120], favorecen su supervivencia en condiciones estresantes.

4.6 CONCLUSIONES

Las especies no fibrosas de Cactaceae presentaron heterogeneidad en la composición de celulosa y lignina. La acumulación de más del 60 % de celulosa cristalina tiene implicaciones en la estructura y rigidez de la pared primaria en las especies no fibrosas. El porcentaje mayor al 70 % de siringilo en especies no fibrosas confiere a la pared secundaria de las TBA resistencia al ataque de patógenos además de mayor eficiencia en el flujo de agua. La microscopía de fluorescencia junto con el análisis cuantitativo de la lignina, permitió la identificación de diferencias en la distribución de la lignina y es un método que permite calcular la proporción de siringilo/guayacilo directamente en el xilema.

4.7 SECCIÓN EXPERIMENTAL

4.7.1 Celulosa cristalina

Durante 2015 se recolectaron plantas adultas, saludables, de 25 especies de Cactaceae (Cuadro 5.5). Los tallos se utilizaron para cuantificar la proporción de siringilo/guayacilo, la cristalinidad de la celulosa y la distribución de la lignina en el xilema secundario.

Celulosa cristalina: Para analizar cada especie se pesaron 2 g de material secado y molido, el procedimiento para la obtención de madera libre de extraíbles (madera que se sometió a un proceso de eliminación de compuestos solubles en disolventes de diferente polaridad), se realizó mediante la extracción con disolventes: etanol:benceno (1:2), etanol 96 % y agua caliente a 90 °C, mediante la técnica propuesta por Reyes-Rivera y Terrazas ^[121].

La celulosa se purificó del material libre de extraíbles mediante el procedimiento documentado por Maceda et al. ^[13] y basado en el método de Kûshner-Höffer ^[122]. A 0.5 g de la madera libre de extraíbles, se agregaron 12.5 mL de HNO₃/etanol (1:4, v/v), se mantuvo en un sistema con reflujo, durante 1 h, la muestra a temperatura ambiente se decantó, se agregaron 12.5 mL de la mezcla HNO₃:etanol y se mantuvo en reflujo; el ciclo completo se repitió dos veces. En la última decantación se agregaron 12.5 mL de solución acuosa de KOH al 1 % y se mantuvo en reflujo por 30 min más, se filtró a través de un filtro Büchner de poro fino. El residuo (celulosa) se secó a 50 °C por 12 h.

Para confirmar la presencia de celulosa cristalina y amorfa se utilizó la espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR). Para esto, algunos miligramos de muestra seca se utilizaron y se realizaron 10 lecturas en FTIR, después de la corrección de la línea base se promediaron los espectros ^[40]. Mediante los índices de cristalinidad calculados de los espectros de FTIR se obtuvieron los porcentajes de celulosa cristalina y celulosa amorfa ^[123,124]. Los índices que se utilizaron fueron los siguientes:

-Proporción de cristalinidad (Cr.R.₁) ^[125], también denominada cristalinidad total (TCI) ^[126]: el área bajo la curva correspondiente a las absorbancias 1372 cm⁻¹ (A₁₃₇₂) y 2900 cm⁻¹ (A₂₉₀₀) se midió. La proporción de las bandas $TCI = A_{1372} / A_{2900}$ se obtuvo. El resultado se multiplicó por 100 para obtener el porcentaje de celulosa cristalina, mientras más cercano a 100%, mayor cantidad de celulosa cristalina hay en la muestra.

Cuadro 4.5. Especies de las 25 especies de Cactaceae y sus características anatómicas y del tallo incluidas en el presente estudio.

Especie	Número de colecta	Tipo de madera	Tallo
<i>Coryphantha clavata</i> (Scheidw.) Backeb.	BV2535	No fibrosa	Cilíndrico
<i>C. cornifera</i> (DC.) Lem.	BV2534	No fibrosa	Cilíndrico
<i>C. delaetiana</i> (Quehl) A. Berger	BV2542	No fibrosa	Globoso
<i>C. delicata</i> L. Bremer	SA1927	No fibrosa	Cilíndrico
<i>C. hinteriorum</i> Dicht & A. Lüthy	BV2539	No fibrosa	Cilíndrico
<i>C. macromeris</i> (Engelmann) Lemaire	BV2600	No fibrosa	Globoso
<i>C. pallida</i> Britton & Rose	SA860	No fibrosa	Globoso
<i>C. pseudoechinus</i> Boed.	BV2543	No fibrosa	Cilíndrico
<i>C. ramillosa</i> Cutak	HSM3775	No fibrosa	Globoso
<i>C. retusa</i> Britton & Rose	SG55	No fibrosa	Globoso
<i>Echinocereus cinerascens</i> (DC.) Lem. subsp. <i>tulensis</i>	SA1744	No fibrosa	Cilíndrico
<i>E. dasyacanthus</i> Engelm.	SA2077	No fibrosa	Cilíndrico
<i>E. pectinatus</i> (Scheidw.) Engelm.	SA1918	No fibrosa	Cilíndrico
<i>E. pentalophus</i> (DC.) Lem.	SA1740	No fibrosa	Cilíndrico
<i>Mammillaria carnea</i> Zucc. Ex Pfeiff.	DA241	No fibrosa	Cilíndrico
<i>M. dixathocentron</i> Backeb. Ex Mottram	CPNL133	No fibrosa	Cilíndrico
<i>M. magnifica</i> Buchenau	UG1411	No fibrosa	Columnar
<i>M. mystax</i> Mart.	DA238	No fibrosa	Cilíndrico
<i>Neolloydia conoidea</i> (DC.) Britton & Rose	BV2595	No fibrosa	Cilíndrico
<i>Cylindropuntia imbricata</i> (Haw.) F. M. Knuth	TT990	Fibrosa	Arbóreo
<i>C. kleiniae</i> (DC.) F. M. Knuth	TT1000	Fibrosa	Arbustivo
<i>C. leptocaulis</i> (DC.) F. M. Knuth	TT994	Fibrosa	Arbustivo
<i>Opuntia stenopetala</i> Lem.	TT997	Fibrosa	Arbustivo
<i>O. stricta</i> (Haw.) Haw.	TT998	Fibrosa	Arbustivo
<i>Leuenbergeria lychnidiflora</i> (DC.) Lodé	TT967	Fibrosa	Arbóreo

-Índice de orden lateral (LOI) ^[126] o segunda proporción de cristalinidad (Cr.R.₂) ^[125], con el área bajo la curva de las absorbancias 1430 cm⁻¹ (A₁₄₃₀) y 893 cm⁻¹ (A₈₉₃) se calculó para obtener la proporción LOI = A₁₄₃₀/ A₈₉₃, el resultado se multiplicó por 100 para obtener el porcentaje que permitió identificar la relación entre celulosa cristalina y celulosa amorfa, si el valor es cercano a 100, hay mayor celulosa cristalina ordenada ^[125,127].

4.7.2 Proporción S/G

Para calcular la proporción de Sirinigilo/guayacilo (S/G) se utilizó el método propuesto por Reyes-Rivera et al. ^[21] con ligeros cambios en el proceso de oxidación por nitrobenzeno. De la madera libre de extraíbles se pesaron 0.2 g que se colocaron en un vial con 7 mL de olución

acuosa 2 M de NaOH y 0.5 mL de nitrobenzeno en agitación. Posteriormente se colocó la mezcla en un sistema de digestión por microondas de alto desempeño (ETHOS UP, Milestone), donde se sometió a un tratamiento de digestión presurizada por 20 min a 170 °C. Después, la mezcla resultante se filtró a través de un filtro Büchner de poro fino, el filtrado se transfirió a un embudo de separación de 50 mL y se realizaron tres extracciones sucesivas con 30 mL de cloroformo, posteriormente se acidificó el filtrado a pH 1 con una solución 4 M de HCl, y se realizaron tres extracciones más cada una con 30 mL de cloroformo.

Las seis fases orgánicas se mezclaron y se concentró en un evaporador rotatorio a 40 °C a presión reducida, la muestra concentrada se aforo a 50 mL con acetonitrilo:agua (1:1 v/v) grado HPLC, se acidificó la muestra a pH 2.6 con ácido trifluoroacético, a través de una membrana de celulosa regenerada con un tamaño de poro de 0.45 µm se filtró, finalmente se tomó un mililitro para colocarlo en un vial de capacidad de 1.5 mL para su análisis por HPLC.

El sistema de HPLC estuvo equipado con un detector de longitud de onda variable UV-VIS, una columna analítica de fase reversa tipo RP-18 (250x4.6 mm, 5 µm), y una celda de flujo estándar, a una longitud de onda de 280 nm con una elución isocrática. Como fase móvil se empleó una mezcla de acetonitrilo/agua (1:6, v/v) con pH ajustado a 2.6 con ácido trifluoroacético. Para cuantificar los valores se realizó una curva de calibración mediante el uso de estándares de vainilla y siringaldehído (Merck, Schuchardt OHG, Hohenbrunn, Alemania), con las mismas condiciones empleadas para el análisis de cada muestra. Las curvas de calibración se obtuvieron con las concentraciones de 0.623, 1.9, 3.8 y 7.6 mmol L⁻¹ para vainillina y 0.746, 2.27, 4.55 y 9.1 mmol L⁻¹ para siringaldehído. La proporción S/G se calculó mediante el ajuste del rendimiento propuesto por Ohra-ahoa et al. (2013), donde se asume que aproximadamente el 30% de unidades condensadas de guayacilo se convierten a vainillina mientras que el 90% de unidades de siringilo se convierten a siringaldehído.

4.7.3 Microscopía de fluorescencia

La distribución de la lignina en el xilema secundario de Cactaceae se reconoció en muestras representativas de los géneros de Cactaceae, después de fijarlas, deshidatarlas y teñirlas con Safranina O y verde rápido mediante el método propuesto por Loza-Cornejo y Terrazas ^[128]. Las especies de madera no fibrosa se embebieron en parafina y se cortaron con micrótopo rotatorio, mientras que especies fibrosas como *Cylindropuntia* y *Leuenbergeria*, se empleó

el micrótopo de deslizamiento y el procedimiento de fijación-tinción fue directo ^[13]. Se obtuvieron cortes de 12-20 µm de grosor longitudinal y transversal principalmente.

La tinción conjunta de safranina O/verde rápido es común en microscopía de fluorescencia ^[75,76,84,93], por lo que se ha propuesto como un método para la detección de diferencias en la composición del tejido vascular, más eficiente que otras técnicas como tinción de Mañle y Wiesner ^[76,79,80]. El colorante safranina O resalta y aumenta la intensidad de fluorescencia en comparación con la autofluorescencia propia de la lignina, además de que prolonga la excitación de los fluoróforos, evita el fotoblanqueo del tejido y se obtienen imágenes de gran calidad ^[88,91-93].

Debido a que la lignina tiene amplia variabilidad de excitación y emisión, se ha propuesto utilizar diferentes longitudes de onda para identificar las variaciones en la intensidad y tonalidades de la fluorescencia de la lignina ^[75,81,82,99]. Para identificar las diferencias en la distribución de lignina en el xilema secundario de Cactaceae, se empleó un microscopio de fluorescencia con una banda de excitación DAPI-FITC-TRITC que presenta tres tipos de longitud de onda: violeta (385-400 nm), azul (475-490 nm) y verde (545 a 565 nm), con un filtro de emisión de 430, 510 y 570 nm respectivamente. Cada muestra se excitó por máximo un minuto para detectar la emisión de fluorescencia de la lignina ^[82,84]. Además, se obtuvieron preparaciones permanentes analizadas por Reyes-Rivera et al. ^[21] para observar con microscopía de fluorescencia, similar a lo descrito arriba y comparar con las de este estudio.

Con la finalidad de estandarizar cualitativamente la fluorescencia de lignina y determinar las diferencias en la composición de los elementos traqueales, se utilizaron dos especies representativas de las gimnospermas que acumulan guayacilo en su pared celular (*Pinus douglasiana* Martínez; *Cupressus lindleyi* Klotzsch ex. Endl.) ^[129-131] y dos especies de cactáceas que se han estudiado por la mayor cantidad de siringilo en el tejido vascular (*Ferocactus hamatacanthus* (Muehlenpf.) Britton & Rose) o de guayacilo (*Pilosocereus chrysacanthus* (F. A. C. Weber ex K. Schum.) Byles & G. D. Rowley) ^[21,39]. Los análisis fueron cualitativos y se compararon con los resultados obtenidos por la cuantificación de la proporción S/G mediante HPLC.

4.8 REFERENCIAS

- [1] P. S. Nobel, G. N. Geller, S. C. Kee, A. D. Zimmerman, ‘Temperatures and thermal tolerances for cacti exposed to high temperatures near the soil surface’, *Plant. Cell Environ.* **1986**, *9*, 279–287.
- [2] R. David Valdez-Cepeda, F. Blanco-Macías, C. Gallegos-Vázquez, G. E. Salinas-García, R. E. Vázquez-Alvarado, ‘Freezing Tolerance of *Opuntia* spp.’, *J. Prof. Assoc. Cactus Dev.* **2001**, *4*, 581.
- [3] H. Schwager, T. Masselter, T. Speck, C. Neinhuis, ‘Functional morphology and biomechanics of branch-stem junctions in columnar cacti’, *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **2013**, *280*, 20132244.
- [4] H. Kim, K. Kim, S. J. Lee, ‘Hydraulic strategy of cactus root–stem junction for effective water transport’, *Front. Plant Sci.* **2018**, *9*, 799.
- [5] R. Nyffeler, ‘Phylogenetic relationships in the cactus family (Cactaceae) based on evidence from trnK/ matK and trnL-trnF sequences.’, *Am. J. Bot.* **2002**, *89*, 312–326.
- [6] M. P. Griffith, J. M. Porter, ‘Phylogeny of Opuntioideae (Cactaceae)’, *Int. J. Plant Sci.* **2009**, *170*, 107–116.
- [7] R. T. Bárcenas, C. Yesson, J. A. Hawkins, ‘Molecular systematics of the Cactaceae’, *Cladistics* **2011**, *27*, 470–489.
- [8] R. S. Wallace, J. H. Cota, ‘An intron loss in the chloroplast gene rpoC1 supports a monophyletic origin for the subfamily Cactoideae of the Cactaceae’, *Curr. Genet.* **1996**, *29*, 275–281.
- [9] P. Ortega-Baes, S. Sühring, J. Sajama, E. Sotola, M. Alonso-Pedano, S. Bravo, H. Godínez-Alvarez, in *Desert Plants Biol. Biotechnol.* (Ed.: K.G. Ramawat), Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Berlin, **2010**, pp. 157–173.
- [10] T. Hernández-Hernández, H. M. Hernández, J. A. De-Nova, R. Puente, L. E. Eguiarte, S. Magallón, ‘Phylogenetic relationships and evolution of growth form in Cactaceae (Caryophyllales, Eudicotyledoneae).’, *Am. J. Bot.* **2011**, *98*, 44–61.
- [11] M. Vázquez-Sánchez, T. Terrazas, Y. S. Arias, ‘El hábito y la forma de crecimiento en la tribu Cacteae (Cactaceae, Cactoideae)’, *Bot. Sci.* **2012**, *90*, 97–108.
- [12] M. Vázquez-Sánchez, T. Terrazas, D. Grego-Valencia, S. Arias, ‘Growth form and wood evolution in the tribe Cacteae (Cactaceae)’, *Willdenowia* **2017**, *47*, 49–67.
- [13] A. Maceda, M. Soto-Hernández, C. B. Peña-Valdivia, T. Terrazas, ‘Chemical Composition of Cacti Wood and Comparison with the Wood of Other Taxonomic Groups’, *Chem. Biodivers.* **2018**, *15*, e1700574.
- [14] D. H. Arnold, J. D. Mauseth, ‘Effects of environmental factors on development of wood’, *Am. J. Bot.* **1999**, *86*, 367–371.

- [15] T. Terrazas, S. Arias, ‘Comparative stem anatomy in the subfamily cactoideae’, *Bot. Rev.* **2002**, 68, 444–473.
- [16] M. Vázquez-Sánchez, T. Terrazas, ‘Stem and wood allometric relationships in Cactaceae (Cactaceae)’, *Trees* **2011**, 25, 755–767.
- [17] J. D. Mauseth, B. J. Plemons, ‘Developmentally variable, polymorphic woods in cacti’, *Am. J. Bot.* **1995**, 82, 1199–1205.
- [18] J. D. Mauseth, B. J. Plemons-Rodriguez, ‘Evolution of extreme xeromorphic characters in wood: A study of nine evolutionary lines in Cactaceae’, *Am. J. Bot.* **1998**, 85, 209–218.
- [19] S. Arias, T. Terrazas, ‘Variación en la anatomía de la madera de *Pachycereus pecten-aboriginum* (Cactaceae)’, *An. del Inst. Biol. Univ. Nac. Autónoma México* **2001**, 72, 157–169.
- [20] T. Terrazas, S. Loza-Cornejo, H. J. Arreola-Nava, ‘Anatomía caulinar de las especies del género *Stenocereus* (Cactaceae)’, *Acta Botánica Venez.* **2005**, 28, 321–336.
- [21] J. Reyes-Rivera, G. Canché-Escamilla, M. Soto-Hernández, T. Terrazas, ‘Wood chemical composition in species of Cactaceae the relationship between lignification and stem morphology’, *PLoS One* **2015**, 10, e0123919.
- [22] A. C. Gibson, ‘Dimorphism of Secondary Xylem in two Species of Cacti’, *Flora* **1978**, 167, 403–408.
- [23] J. D. Mauseth, ‘Comparative structure-function studies within a strongly dimorphic plant, *Melocactus intortus* (Cactaceae)’, *Bradleya* **1989**, 7, 1–12.
- [24] J. D. S. Garcia, E. Scremin-Dias, P. Soffiatti, ‘Stem and root anatomy of two species of *Echinopsis* (Trichocereae: Cactaceae)’, *Rev. Mex. Biodivers.* **2012**, 83, 1036–1044.
- [25] G. Maki-Díaz, C. B. Peña-Valdivia, R. García-Nava, M. L. Arévalo-Galarza, G. Calderón-Zavala, S. Anaya-Rosales, ‘Características físicas y químicas de nopal verdura (*Opuntia ficus-indica*) para exportación y consumo nacional’, *Agrociencia* **2015**, 49, 31–51.
- [26] R. L. Torres-Ponce, D. Morales-Corral, M. L. Ballinas-Casarrubias, G. V. Nevárez-Moorillón, ‘El nopal: planta del semidesierto con aplicaciones en farmacia, alimentos y nutrición animal’, *Rev. Mex. Ciencias Agrícolas* **2015**, 6, 1129–1142.
- [27] G. Zenteno-Ramírez, B. I. Juárez-Flores, R. Aguirre-Rivera, M. D. Ortiz-Pérez, C. Zamora-Pedraza, J. A. Rendón-Huerta, ‘Evaluación de azúcares y fibra soluble en el jugo de variantes de tunas (*Opuntia* spp.)’, *Agrociencia* **2015**, 49, 141–152.
- [28] J. M. Pinos-Rodríguez, J. C. Velásquez-Blanco, S. S. González-Muñoz, J. C. García-López, J. R. Aguirre-Rivera, & R. Bárcena, ‘Evaluation of cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) as forage in a high concentrate total mixed ration on finishing lambs’, *J. Appl. Anim. Res.* **2007**, 32, 161–164.

- [29] A. A. Jaradat, 'Genetic Resources of Energy Crops: Biological Systems to Combat Climate Change', *Aust. J. Crop Sci.* **2010**, *4*, 309–323.
- [30] F. Mannai, M. Ammar, J. G. Yanez, E. Elaloui, Y. Moussaoui, 'Cellulose fiber from Tunisian Barbary Fig "*Opuntia ficus-indica*" for papermaking', *Cellulose* **2016**, *23*, 2061–2072.
- [31] F. Mannai, M. Ammar, J. G. Yanez, E. Elaloui, Y. Moussaoui, 'Alkaline Delignification of Cactus Fibres for Pulp and Papermaking Applications', *J. Polym. Environ.* **2018**, *26*, 798–806.
- [32] M. Q. Marin-Bustamante, J. J. Chanona-Pérez, N. Güemes-Vera, R. Cásarez-Santiago, M. J. Pereaflores, I. Arzate-Vázquez, G. Calderón-Domínguez, 'Production and characterization of cellulose nanoparticles from nopal waste by means of high impact milling', *Procedia Eng.* **2017**, *200*, 428–433.
- [33] A. C. L. de Assis, L. P. Alves, J. P. T. Malheiro, A. R. A. Barros, E. E. Pinheiro-Santos, E. P. de Azevedo, H. da Silva Alves, J. A. Oshiro-Junior, B. P. G. de L. Damasceno, '*Opuntia ficus-Indica* L. Miller (Palma Forrageira) as an Alternative Source of Cellulose for Production of Pharmaceutical Dosage Forms and Biomaterials: Extraction and Characterization', *Polymers (Basel)*. **2019**, *11*, E1124.
- [34] O. O. Kuloyo, J. C. du Preez, M. del P. García-Aparicio, S. G. Kilian, L. Steyn, J. Görgens, '*Opuntia ficus-indica* cladodes as feedstock for ethanol production by *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae*', *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, *30*, 3173–3183.
- [35] L. Yang, M. Lu, S. Carl, J. A. Mayer, J. C. Cushman, E. Tian, H. Lin, 'Biomass characterization of *Agave* and *Opuntia* as potential biofuel feedstocks', *Biomass and Bioenergy* **2015**, *76*, 43–53.
- [36] N. A. Owen, K. F. Fahy, H. Griffiths, 'Crassulacean acid metabolism (CAM) offers sustainable bioenergy production and resilience to climate change', *GCB Bioenergy* **2016**, *8*, 737–749.
- [37] T. do N. Santos, E. D. Dutra, A. Gomes do Prado, F. C. B. Leite, R. de F. R. de Souza, D. C. dos Santos, C. A. Moraes de Abreu, D. A. Simões, M. A. de Moraes, R. S. C. Menezes, 'Potential for biofuels from the biomass of prickly pear cladodes: Challenges for bioethanol and biogas production in dry areas', *Biomass and Bioenergy* **2016**, *85*, 215–222.
- [38] D. M. López-Gutiérrez, J. A. Reyes-Agüero, A. Muñoz, J. Robles, E. Cuevas, 'Comparación morfológica entre poblaciones silvestres y manejadas de *Opuntia atropes* (Cactaceae) en Michoacán, México', *Rev. Mex. Biodivers.* **2015**, *86*, 1072–1077.
- [39] J. Reyes-Rivera, M. Soto-Hernández, G. Canché-Escamilla, T. Terrazas, 'Structural characterization of lignin in four cacti wood: Implications of lignification in the growth form and succulence', *Front. Plant Sci.* **2018**, *871*, 1518.

- [40] U. P. Agarwal, R. R. Reiner, S. A. Ralph, ‘Estimation of cellulose crystallinity of lignocelluloses using near-IR FT-Raman spectroscopy and comparison of the Raman and Segal-WAXS methods’, *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 103–113.
- [41] Y. Habibi, L. Heux, M. Mahrouz, M. R. Vignon, ‘Morphological and structural study of seed pericarp of *Opuntia ficus-indica* prickly pear fruits’, *Carbohydr. Polym.* **2008**, *72*, 102–112.
- [42] Y. Habibi, M. Mahrouz, M. R. Vignon, ‘Microfibrillated cellulose from the peel of prickly pear fruits’, *Food Chem.* **2009**, *115*, 423–429.
- [43] M. R. Vignon, L. Heux, M.-E. Malainine, M. Mahrouz, ‘Arabinan-cellulose composite in *Opuntia ficus-indica* prickly pear spines’, *Carbohydr. Res.* **2004**, *339*, 123–131.
- [44] A. Greco, A. Maffezzoli, ‘Rotational molding of biodegradable composites obtained with PLA reinforced by the wooden backbone of *Opuntia ficus indica* cladodes’, *J. Appl. Polym. Sci.* **2015**, *132*, 42447.
- [45] R. M. Brown, ‘Cellulose Structure and Biosynthesis: What is in Store for the 21st Century?’, *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.*, **2004**, *42*, 487–495.
- [46] C. Somerville, ‘Cellulose Synthesis in Higher Plants’, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2006**, *22*, 53–78.
- [47] K. R. Silva, V. C. Kuster, A. F. De Melo Silva, D. C. De Oliveira, ‘Remodelling of cell wall composition during leaf development in *Lavoisiera mucorifera* (Melastomataceae)’, *Aust. J. Bot.* **2019**, *67*, 140–148.
- [48] J. D. Mauseth, ‘Structure-function relationships in highly modified shoots of cactaceae’, *Ann. Bot.* **2006**, *98*, 901–926.
- [49] T. Y. Garrett, C.-V. Huynh, G. B. North, ‘Root contraction helps protect the “living rock” cactus *Ariocarpus fissuratus* from lethal high temperatures when growing in rocky soil’, *Am. J. Bot.* **2010**, *97*, 1951–1960.
- [50] F. G. Malinovsky, J. U. Fangel, W. G. T. Willats, ‘The role of the cell wall in plant immunity’, *Front. Plant Sci.* **2014**, *5*, 178.
- [51] T. S. Nühse, ‘Cell wall integrity signaling and innate immunity in plants.’, *Front. Plant Sci.* **2012**, *3*, 280.
- [52] A. Endler, S. Persson, ‘Cellulose synthases and synthesis in Arabidopsis.’, *Mol. Plantlant* **2011**, *4*, 199–211.
- [53] S. Rongpipi, D. Ye, E. D. Gomez, E. W. Gomez, ‘Progress and opportunities in the characterization of cellulose – an important regulator of cell wall growth and mechanics’, *Front. Plant Sci.* **2019**, *9*, 1894.
- [54] M. Chauve, L. Barre, S. Tapin-Lingua, D. da Silva Perez, D. Decottignies, S. Perez, N. L. Ferreira, ‘Evolution and impact of cellulose architecture during enzymatic hydrolysis by fungal cellulases’, *Adv. Biosci. Biotechnol.* **2013**, *04*, 1095–1109.

- [55] Q. Liu, L. Luo, L. Zheng, ‘Lignins: Biosynthesis and biological functions in plants’, *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 335.
- [56] A. Caño-Delgado, S. Penfield, C. Smith, M. Catley, M. Bevan, ‘Reduced cellulose synthesis invokes lignification and defense responses in *Arabidopsis thaliana*’, *Plant J.* **2003**, *34*, 351–362.
- [57] T. Hamann, ‘Plant cell wall integrity maintenance as an essential component of biotic stress response mechanisms.’, *Front. Plant Sci.* **2012**, *3*, 77.
- [58] E. J. Edwards, M. J. Donoghue, ‘*Pereskia* and the Origin of the Cactus Life-Form’, *Am. Nat.* **2006**, *167*, 777–793.
- [59] C. Gómez-Hinostrosa, H. M. Hernández, ‘Diversity, geographical distribution, and conservation of Cactaceae in the Mier y Noriega region, Mexico’, *Biodivers. Conserv.* **2000**, *9*, 403–418.
- [60] J. Soberon, J. Golubov, J. Sarukhán, ‘The Importance of *Opuntia* in Mexico and Routes of Invasion and Impact of *Cactoblastis cactorum* (Lepidoptera: Pyralidae)’, *Florida Entomol.* **2001**, *84*, 486–492.
- [61] S. Rojas, C. Castillejos-Cruz, E. Solano, ‘Florística y relaciones fitogeográficas del matorral xerófilo en el Valle de Tecozautla, Hidalgo, México’, *Bot. Sci.* **2013**, *91*, 273–294.
- [62] Y. Lee, E. O. Voit, ‘Mathematical modeling of monolignol biosynthesis in *Populus* xylem’, *Math. Biosci.* **2010**, *228*, 78–89.
- [63] J. Barros, H. Serk, I. Granlund, E. Pesquet, ‘The cell biology of lignification in higher plants’, *Ann. Bot.* **2015**, *115*, 1053–1074.
- [64] L. Li, Xiao Fei Cheng, J. Leshkevich, T. Umezawa, S. A. Harding, V. L. Chiang, ‘The last step of syringyl monolignol biosynthesis in angiosperms is regulated by a novel gene encoding sinapyl alcohol dehydrogenase’, *Plant Cell* **2001**, *13*, 1567–1585.
- [65] J.-K. Weng, X. Li, J. Stout, C. Chapple, ‘Independent origins of syringyl lignin in vascular plants.’, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, *105*, 7887–7892.
- [66] J.-K. Weng, J. A. Banks, C. Chapple, ‘Parallels in lignin biosynthesis: A study in *Selaginella moellendorffii* reveals convergence across 400 million years of evolution.’, *Commun. Integr. Biol.* **2008**, *1*, 20–22.
- [67] J. M. Espiñeira, E. Novo Uzal, L. V Gómez Ros, J. S. Carrión, F. Merino, A. Ros Barceló, F. Pomar, ‘Distribution of lignin monomers and the evolution of lignification among lower plants’, *Plant Biol. (Stuttg.)* **2011**, *13*, 59–68.
- [68] D. S. Nawawi, W. Syafii, T. Akiyama, Y. Matsumoto, ‘Characteristics of guaiacyl-syringyl lignin in reaction wood in the gymnosperm *Gnetum gnemon* L.’, *Holzforschung* **2016**, *70*, 593–602.

- [69] S. H. Brawley, N. A. Blouin, E. Ficko-Blean, G. L. Wheeler, M. Lohr, H. V. Goodson, J. W. Jenkins, C. E. Blaby-Haas, K. E. Helliwell, C. X. Chan, T. N. Marriage, D. Bhattacharya, A. S. Klein, Y. Badis, J. Brodie, Y. Cao, J. Collén, S. M. Dittami, C. M. M. Gachon, B. R. Green, S. J. Karpowicz, J. W. Kim, U. J. Kudahl, S. Lin, G. Michel, M. Mittag, B. J. S. C. Olson, J. L. Pangilinan, Y. Peng, H. Qiu, S. Shu, J. T. Singer, A. G. Smith, B. N. Sprecher, V. Wagner, W. Wang, Z. Y. Wang, J. Yan, C. Yarish, S. Zäuner-Riek, Y. Zhuang, Y. Zou, E. A. Lindquist, J. Grimwood, K. W. Barry, D. S. Rokhsar, J. Schmutz, J. W. Stiller, A. R. Grossman, S. E. Prochnik, ‘Insights into the red algae and eukaryotic evolution from the genome of *Porphyra umbilicalis* (Bangiophyceae, Rhodophyta)’, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2017**, *114*, E6361–E6370.
- [70] B. M. Lange, C. Lapierre, H. Sandermann, ‘Elicitor-induced spruce stress lignin: Structural similarity to early developmental lignins’, *Plant Physiol.* **1995**, *108*, 1277–1287.
- [71] J. H. Grabber, J. Ralph, R. D. Hatfield, ‘Severe inhibition of maize wall degradation by synthetic lignins formed with coniferaldehyde’, *J. Sci. Food Agric.* **1998**, *78*, 81–87.
- [72] N. Wuyts, G. Lognay, R. Swennen, D. De Waele, ‘Nematode infection and reproduction in transgenic and mutant *Arabidopsis* and tobacco with an altered phenylpropanoid metabolism’, *J. Exp. Bot.* **2006**, *57*, 2825–2835.
- [73] B. Menden, M. Kohlhoff, B. M. Moerschbacher, ‘Wheat cells accumulate a syringyl-rich lignin during the hypersensitive resistance response’, *Phytochemistry* **2007**, *68*, 513–520.
- [74] O. Skyba, C. J. Douglas, S. D. Mansfield, ‘Syringyl-Rich lignin renders poplars more resistant to degradation by wood decay fungi’, *Appl. Environ. Microbiol.* **2013**, *79*, 2560–2571.
- [75] G. Angeles, S. A. Owens, F. W. Ewers, ‘Fluorescence shell: a novel view of sclereid morphology with the Confocal Laser Scanning Microscope’, *Microsc. Res. Tech.* **2004**, *63*, 282–288.
- [76] V. De Micco, G. Aronne, ‘Combined histochemistry and autofluorescence for identifying lignin distribution in cell walls’, *Biotech. Histochem.* **2007**, *82*, 209–216.
- [77] J. Bond, L. Donaldson, S. Hill, K. Hitchcock, ‘Safranin fluorescent staining of wood cell walls.’, *Biotech. Histochem.* **2008**, *83*, 161–71.
- [78] N. P. Kutscha, R. R. Mcormond, ‘The Suitability of Using Fluorescence Microscopy for Studying Lignification in Balsam’, *Tech. Bull. Life Sci. Agric. Exp. Station. Univ. Maine* **1972**, *62*, 15.
- [79] R. Decou, H. Serk, D. Ménard, E. Pesquet, ‘Analysis of Lignin Composition and Distribution Using Fluorescence Laser Confocal Microspectroscopy’, *Methods Mol. Biol.* **2017**, *1544*, 233–247.

- [80] S. Kiyoto, A. Yoshinaga, E. Fernandez-Tendero, A. Day, B. Chabbert, K. Takabe, ‘Distribution of Lignin, Hemicellulose, and Arabinogalactan Protein in Hemp Phloem Fibers’, *Microsc. Microanal.* **2018**, *24*, 442–452.
- [81] L. Donaldson, K. Radotić, A. Kalauzi, D. Djikanović, M. Jeremić, ‘Quantification of compression wood severity in tracheids of *Pinus radiata* D. Don using confocal fluorescence imaging and spectral deconvolution’, *J. Struct. Biol.* **2010**, *169*, 106–115.
- [82] L. Donaldson, N. Williams, ‘Imaging and Spectroscopy of Natural Fluorophores in Pine Needles’, *Plants (Basel, Switzerland)* **2018**, *7*, E10.
- [83] K. Radotić, A. Kalauzi, D. Djikanović, M. Jeremić, R. M. Leblanc, Z. G. Cerović, ‘Component analysis of the fluorescence spectra of a lignin model compound’, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2006**, *83*, 1–10.
- [84] J. Bond, L. Donaldson, S. Hill, K. Hitchcock, ‘Safranin fluorescent staining of wood cell walls.’, *Biotech. Histochem.* **2008**, *83*, 161–171.
- [85] M. Speranza, A. Gutiérrez, J. C. Del Río, L. Bettucci, Á. T. Martínez, M. J. Martínez, ‘Sterols and lignin in *Eucalyptus globulus* Labill. wood: Spatial distribution and fungal removal as revealed by microscopy and chemical analyses’, *Holzforschung* **2009**, *63*, 362–370.
- [86] L. A. Donaldson, H. W. Kroese, S. J. Hill, R. A. Franich, ‘Detection of wood cell wall porosity using small carbohydrate molecules and confocal fluorescence microscopy.’, *J. Microsc.* **2015**, *259*, 228–36.
- [87] L. A. Donaldson, A. P. Singh, A. Yoshinaga, K. Takabe, ‘Lignin distribution in mild compression wood of *Pinus radiata*’, *Can. J. Bot.* **1999**, *77*, 41–50.
- [88] M. B. Dürrenberger, S. Handschin, B. Conde-Petit, F. Escher, ‘Visualization of Food Structure by Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM)’, *LWT - Food Sci. Technol.* **2001**, *34*, 11–17.
- [89] Y. Xue, X. Qiu, Y. Wu, Y. Qian, M. Zhou, Y. Deng, Y. Li, ‘Aggregation-induced emission: The origin of lignin fluorescence’, *Polym. Chem.* **2016**, *7*, 3502–3508.
- [90] B. Albinsson, S. Li, K. Lundquist, R. Stomberg, ‘The origin of lignin fluorescence’, *J. Mol. Struct.* **1999**, *508*, 19–27.
- [91] J. D. Gray, P. Kolesik, P. B. Høj, B. G. Coombe, ‘Confocal measurement of the three-dimensional size and shape of plant parenchyma cells in a developing fruit tissue’, *Plant J.* **1999**, *19*, 229–236.
- [92] G. D. Lemon, U. Posluszny, ‘A new approach to the study of apical meristem development using laser scanning confocal microscopy’, *Can. J. Bot.* **1998**, *76*, 899–904.
- [93] J. Haseloff, ‘Old botanical techniques for new microscopes’, *Biotechniques* **2003**, *34*, 1174–1182.

- [94] J. H. Frank, A. D. Elder, J. Swartling, A. R. Venkitaraman, A. D. Jeyasekharan, C. F. Kaminski, 'A white light confocal microscope for spectrally resolved multidimensional imaging', *J. Microsc.* **2007**, *227*, 203–215.
- [95] L. Donaldson, A. Vaidya, 'Visualising recalcitrance by colocalisation of cellulase, lignin and cellulose in pretreated pine biomass using fluorescence microscopy', *Sci. Rep.* **2017**, *7*, DOI 10.1038/srep44386.
- [96] M. Simard, D. Rioux, G. Laflamme, 'Formation of Ligno-Suberized Tissues in Jack Pine Resistant to the European Race of *Gremmeniella abietina*', *Phytopathology* **2001**, *91*, 1128–1140.
- [97] X. Wu, J. Lin, Q. Lin, J. Wang, L. Schreiber, 'Casparian strips in needles are more solute permeable than endodermal transport barriers in roots of *Pinus bungeana*', *Plant Cell Physiol.* **2005**, *46*, 1799–1808.
- [98] P. Kitin, S. L. Voelker, F. C. Meinzer, H. Beeckman, S. H. Strauss, B. Lachenbruch, 'Tyloses and phenolic deposits in xylem vessels impede water transport in low-lignin transgenic poplars: a study by cryo-fluorescence microscopy', *Plant Physiol.* **2010**, *154*, 887–898.
- [99] L. Donaldson, 'Softwood and hardwood lignin fluorescence spectra of wood cell walls in different mounting media', *IAWA J.* **2013**, *34*, 3–19.
- [100] Y. Zeng, S. Zhao, H. Wei, M. P. Tucker, M. E. Himmel, N. S. Mosier, R. Meilan, S. Y. Ding, 'In situ micro-spectroscopic investigation of lignin in poplar cell walls pretreated by maleic acid', *Biotechnol. Biofuels* **2015**, *8*, 126.
- [101] L. A. Donaldson, K. Radotic, 'Fluorescence lifetime imaging of lignin autofluorescence in normal and compression wood.', *J. Microsc.* **2013**, *251*, 178–87.
- [102] J.-K. Weng, T. Akiyama, N. D. Bonawitz, X. Li, J. Ralph, C. Chapple, 'Convergent evolution of syringyl lignin biosynthesis via distinct pathways in the *Lycophyte*, *Selaginella* and flowering plants', *Plant Cell* **2010**, *22*, 1033–1045.
- [103] K. V Fagerstedt, P. Saranpää, T. Tapanila, J. Immanen, J. A. A. Serra, K. Nieminen, 'Determining the Composition of Lignins in Different Tissues of Silver Birch.', *Plants (Basel, Switzerland)* **2015**, *4*, 183–195.
- [104] G. Koch, G. Kleist, 'Application of scanning UV microspectrophotometry to localise lignins and phenolic extractives in plant cell walls', *Holzforschung* **2001**, *55*, 563–567.
- [105] K. Saito, Y. Watanabe, M. Shirakawa, Y. Matsushita, T. Imai, T. Koike, Y. Sano, R. Funada, K. Fukazawa, K. Fukushima, 'Direct mapping of morphological distribution of syringyl and guaiacyl lignin in the xylem of maple by time-of-flight secondary ion mass spectrometry', *Plant J.* **2012**, *69*, 542–552.
- [106] C. Lapiere, B. Pollet, C. Rolando, 'New insights into the molecular architecture of hardwood lignins by chemical degradative methods', *Res. Chem. Intermed.* **1995**, *21*, 397–412.

- [107] A. Ros Barceló, L. V. Gómez Ros, C. Gabaldón, M. López-Serrano, F. Pomar, J. S. Carrión, M. A. Pedreño, 'Basic peroxidases: The gateway for lignin evolution?', *Phytochem. Rev.* **2004**, *3*, 61–78.
- [108] F. Pomar, F. Merino, A. R. Barceló, 'O-4-Linked coniferyl and sinapyl aldehydes in lignifying cell walls are the main targets of the Wiesner (phloroglucinol-HCl) reaction.', *Protoplasma* **2002**, *220*, 17–28.
- [109] P. T. Martone, J. M. Estevez, F. Lu, K. Ruel, M. W. Denny, C. Somerville, J. Ralph, 'Discovery of lignin in seaweed reveals convergent evolution of cell-wall architecture.', *Curr. Biol.* **2009**, *19*, 169–75.
- [110] N. Yoshizawa, M. Satoh, S. Yokota, T. Idei, 'Formation and structure of reaction wood in *Buxus microphylla* var. *insularis* Nakai', *Wood Sci. Technol.* **1992**, *27*, 1–10.
- [111] N. Yoshizawa, N. Watanabe, S. Yokota, T. Idei, 'Distribution of Guaiacyl and Syringyl Lignins in Normal and Compression Wood of *Buxus microphylla* var. *insularis* Nakai', *IWA J.* **1993**, *14*, 139–151.
- [112] L. A. Donaldson, 'Lignification and lignin topochemistry - An ultrastructural view', *Phytochemistry* **2001**, *57*, 859–873.
- [113] M. E. Stone-Palmquist, J. D. Mauseth, 'The structure of enlarged storage roots in cacti', *Int. J. Plant Sci.* **2002**, *163*, 89–98.
- [114] J. F. Stevenson, J. D. Mauseth, 'Effects of environment on vessel characters in cactus wood', *Int. J. Plant Sci.* **2004**, *165*, 347–357.
- [115] P. S. Nobel, 'Parenchyma-chlorenchyma water movement during drought for the hemiepiphytic cactus *Hylocereus undatus*', *Ann. Bot.* **2006**, *97*, 469–474.
- [116] G. Goldstein, J. Andrade, P. Nobel, 'Differences in Water Relations Parameters for the Chlorenchyma and the Parenchyma of *Opuntia ficus-indica* Under Wet Versus Dry Conditions', *Funct. Plant Biol.* **1991**, *18*, 95–107.
- [117] P. S. Nobel, J. Cavelier, J. L. Andrade, 'Mucilage in cacti: Its apoplastic capacitance, associated solutes, and influence on tissue ψ ', *J. Exp. Bot.* **1992**, *43*, 641–648.
- [118] M. Sajeva, J. D. Mauseth, 'Leaf-like Structure in the Photosynthetic, Succulent Stems of Cacti', *Ann. Bot.* **1991**, *68*, 405–411.
- [119] P. S. Nobel, 'Water relations and photosynthesis of a barrel cactus, *Ferocactus acanthodes*, in the Colorado desert', *Oecologia* **1977**, *27*, 117–133.
- [120] U. Lüttge, 'Ecophysiology of Crassulacean Acid Metabolism (CAM)', *Ann. Bot.* **2004**, *93*, 629–52.
- [121] J. Reyes-Rivera, T. Terrazas, 'Lignin Analysis by HPLC and FTIR.', *Methods Mol. Biol.* **2017**, *1544*, 193–211.
- [122] C. L. R. Abreu, U. Orea-Igarza, E. Cordero-Manchado, 'Composición química de tres maderas en la provincia de Pinar del Río, Cuba a tres alturas del fuste comercial. Parte

- Nº 1: *Corymbia citriodora*', *Rev. Chapingo. Ser. Ciencias For. y del Ambient.* **2004**, *10*, 57–62.
- [123] J. Gawron, M. Szcześna, T. Zielenkiewicz, T. Gołofit, 'Cellulose crystallinity index examination in oak wood originated from antique woodwork', *Nauk. Donies. Komunik* **2012**, *55*, 188.
- [124] N. Kruer-Zerhusen, B. Cantero-Tubilla, D. B. Wilson, 'Characterization of cellulose crystallinity after enzymatic treatment using Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR)', *Cellulose* **2018**, *25*, 37–48.
- [125] D. Ciolacu, F. Ciolacu, V. I. Popa, 'Amorphous cellulose-structure and characterization', *Cellul. Chem. Technol.* **2011**, *45*, 13–21.
- [126] M. Poletto, H. L. Ornaghi, A. J. Zattera, 'Native Cellulose: Structure, Characterization and Thermal Properties', *Mater. (Basel, Switzerland)* **2014**, *7*, 6105–6119.
- [127] M. L. Nelson, R. T. O'Connor, 'Relation of certain infrared bands to cellulose crystallinity and crystal latticed type. Part I. Spectra of lattice types I, II, III and of amorphous cellulose', *J. Appl. Polym. Sci.* **1964**, *8*, 1311–1324.
- [128] S. Loza-Cornejo, T. Terrazas, 'Anatomía del tallo y de la raíz de dos especies de *Wilcoxia* Britton & Rose (Cactaceae) del noreste de México', *Bot. Sci.* **1996**, 13–23.
- [129] L. V Gómez Ros, G. J. Aznar-Asensio, J. A. Hernandez, M. A. Bernal, M. J. L. Núñez-Flores, J. Cuello, A. Ros Barceló, 'Structural motifs of syringyl peroxidases are conserved during angiosperm evolution.', *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 4131–4138.
- [130] J. K. Weng, C. Chapple, 'The origin and evolution of lignin biosynthesis', *New Phytol.* **2010**, *187*, 273–285.
- [131] A. Wagner, Y. Tobimatsu, L. Phillips, H. Flint, B. Geddes, F. Lu, J. Ralph, 'Syringyl lignin production in conifers: Proof of concept in a Pine tracheary element system', *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2015**, *112*, 6218–6223.

CAPÍTULO V. VISUALIZACIÓN Y COMPARACIÓN DEL FLUJO DE AGUA ENTRE *Mammillaria bocasana* Y *Echinocereus reinchenbachii* var. *fitchii*

5.1 RESUMEN

Las cactáceas presentan adaptaciones a condiciones estresantes de sequía. Las características anatómicas, estructurales y fisiológicas derivadas del estrés hídrico se han estudiado en estas plantas. El flujo de agua a través del xilema es hipotético y no demostrado experimentalmente. El objetivo del estudio fue analizar el flujo de agua en el xilema de dos especies no fibrosas de Cactaceae en un sistema de raíz dividida utilizando dos técnicas diferentes. La hipótesis fue que hubo diferencias en el flujo de agua. Plantas de *Mammillaria bocasana* y *Echinocereus reichenbachii* var. *fitchii* de un año de edad se mantuvieron en condiciones controladas de cámara de crecimiento con su raíz dividida en contenedores separados y se aplicó fucsina ácida al 0.2 % con dos técnicas diferentes. Con microscopía de campo claro, se hicieron observaciones en cortes transversales y longitudinales 24 h después de aplicar el colorante. El diseño experimental fue completamente al azar, 6 tratamientos con 5 plantas como unidades experimentales. La técnica de absorción fue adecuada para la marcación del flujo de agua. Los elementos conductores cercanos a cambium vascular se tiñeron de color violeta en ambas especies. En *Mammillaria* la mitad del xilema se tiñó por el flujo de agua con colorante; en contraste, en *Echinocereus* se tiñó el cilindro completo. Las diferencias se deben a la conductividad hidráulica teórica relativa y las medidas de los elementos conductores mayores en la primera especie, además de que se relaciona con el tamaño de la planta. El estudio demostró que las traqueidas de banda ancha teñidas participan en el transporte de agua.

Palabras clave: fucsina ácida, flujo de agua, raíz dividida, Cactaceae, conductividad hidráulica teórica relativa

5.2 ABSTRACT

The cacti show adaptations to stressful drought conditions. The anatomical, structural and physiological characteristics derived from water stress have been studied in these plants. Water flow through the xylem is hypothetical and not experimentally demonstrated. The objective of the study was to analyze the flow of water in the xylem of two non-fibrous

species of Cactaceae in a split root system using two different techniques. The hypothesis was that there were differences in water flow. *Mammillaria bocasana* and *Echinocereus reichenbachii* var. *fitchii* one-year-old plants were remained in controlled growth chamber conditions with their root divided into separate containers and 0.2 % acid fuchsin was applied with two different techniques. With light field microscopy, observations were made on transverse and longitudinal sections 24 h later. The experimental design was completely randomized, 6 treatments with 5 plants as experimental units. The absorption technique was suitable for water flow marking. The conductive elements near vascular cambium stained violet in both species. In *Mammillaria* half of the xylem was stained by the flow of water with dye, in contrast, in *Echinocereus* the entire cylinder was stained. The differences are due to the relative theoretical hydraulic conductivity and the measurements of the major conductive elements in the first species, in addition to being related to the size of the plant. The study showed that stained wide band tracheids participate in water transport.

Keywords: acid fuchsin, water flow, split root, Cactaceae, relative theoretical hydraulic conductivity

5.3 INTRODUCCIÓN

La familia Cactaceae presenta diversidad de formas de crecimiento ^[1] y adaptaciones a ambientes diversos ^[2-4]. La mayoría de las especies se ha adaptado a regiones áridas y semiáridas ^[5] donde los factores limitantes para el desarrollo de las plantas son la falta de agua y las temperaturas superiores a 30 °C ^[6-8]. Las cactáceas se adaptaron a dichas condiciones mediante modificaciones en sus estructuras ^[9,10], fisiología ^[11,12] y anatomía del xilema ^[13,14].

Las cactáceas presentan diversidad de matrices celulares que corresponde con su forma de vida ^[15]. Especies columnares, arbóreas y arbustiformes, presentan elementos de vaso (EV) y fibras (F) en xilema secundario ^[16,17]. Especies dimorfas tienen transición de traqueidas de banda ancha (TBA) y EV, a EV y F ^[18-20]. Las especies no fibrosas presentan EV-TBA ^[21,22] y solo algunas exclusivamente parénquima (P) ^[23,24].

Estudios de fisiología de cactáceas se han enfocado en la conductividad hidráulica teórica en *Opuntia* ^[25] y *Ferocactus acanthodes* ^[26]; en analizar el estrés hídrico en

Hylocereus [27], *Opuntia* [28,29], *Carnegia gigantea*, *Ferocactus acanthodes* y *Opuntia basilaris* [30] además de las diferencias en la conducción de agua en *O. microdasys* [4].

Además, las cactáceas han modificado su fisiología en respuesta al estrés hídrico y mediante el desarrollo del metabolismo ácido de las crasuláceas aprovechan eficientemente el agua [12,31]. Además, pueden mantener los estomas abiertos por 40 días sin disponibilidad de agua [26]. Entre las características estructurales adaptativas están la presencia de raíces largas [10], asociación con micorrizas que aceleran la captación de agua [32] y el desarrollo de raíces nuevas inmediatamente después de la presencia de agua [33,34]. Además de la absorción del agua a través de tricomas [35], la condensación de la neblina con las espinas [36] y redirección de la misma hacia las raíces por las costillas de las plantas [37], permiten captar y dirigir el agua a las raíces.

Entre los cambios anatómicos desarrollados por las cactáceas como adaptación al estrés hídrico están la reducción de diámetro de lumen de EV [38,39], la acumulación de mucopolisacáridos en células de parénquima [40] y la aparición de TBA en el tejido vascular en especies no fibrosas y en etapas juveniles de especies fibrosas [15,41,42]. Mauseth et al. [43] propusieron que las TBA almacenan y transfieren agua a los EV con lo que evitan la cavitación y embolismo, sin embargo, no se ha demostrado experimentalmente el flujo de agua a través de las TBA.

El flujo del agua en el xilema con colorantes como safranina, fucsina ácida y básica se ha realizado en coníferas [44,45], algunas monocotiledóneas [46,47] y dicotiledóneas [48-51]. Los objetivos de este estudio fueron evaluar las técnicas de tinción del xilema *in vivo*, caracterizar el flujo de agua a través del xilema secundario e identificar las diferencias en el flujo del agua y relacionarlas con las medidas de EV y TBA y conductividad hidráulica teórica de dos especies no fibrosas de Cactaceae. La hipótesis fue que hubo diferencias en el flujo de agua de las dos especies no fibrosas de Cactaceae.

5.4 RESULTADOS

5.4.1 Técnica de tinción

La prueba preliminar mostró que fucsina ácida al 0.2 % inyectada fue ineficiente para marcar el flujo de agua en las plantas de cactáceas. La presión de la inyección provocó que el

colorante se dispersara a través del parénquima cortical y abarcara todo el cilindro vascular (Figura 5.1A). El colorante ascendió de esta forma a lo largo del cilindro hasta el ápice de la planta independiente de la división de raíz. Esta técnica no mostró diferencias en el flujo del agua en ninguno de los tratamientos. La absorción de fucsina a través de las raíces (Figura 5.1B) mostró que la tinción fue únicamente en las raíces donde se aplicó. El pigmento no se detectó en el parénquima, a lo largo del tallo, similar a como sucedió con la inyección del colorante. En contraste con la inyección, esta técnica permitió detectar el flujo del agua en todos los tratamientos.

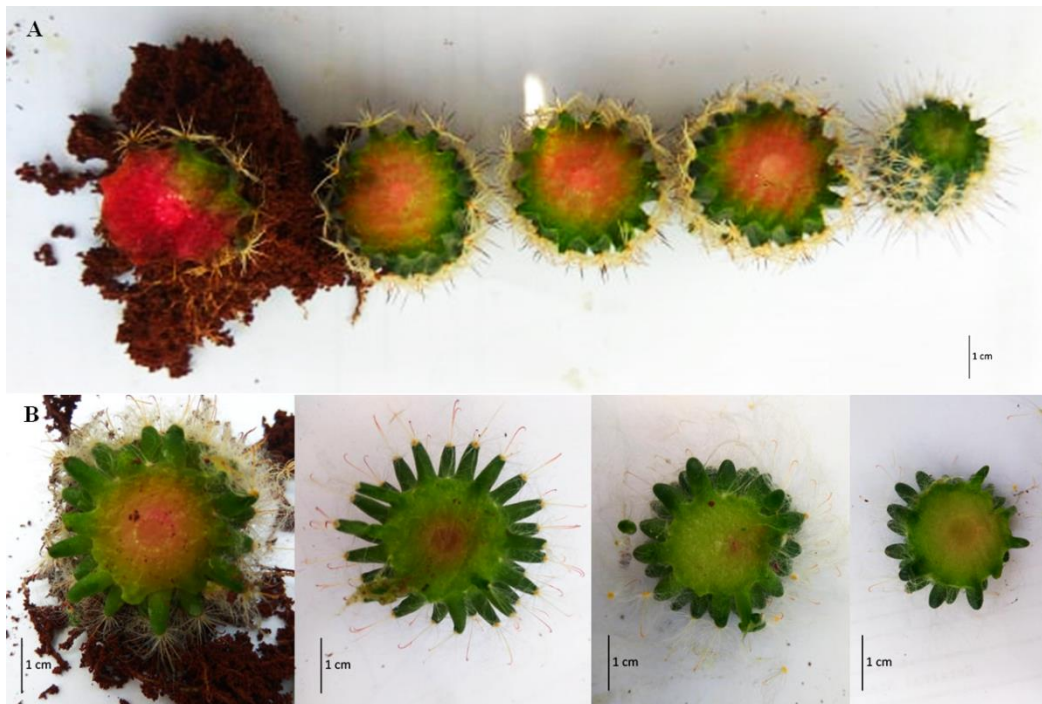


Figura 5.1. Comparación de las técnicas para marcar el flujo de agua. A. *Echinocereus*. B. *Mammillaria*. A. Técnica de inyección. B. Técnica de absorción por raíz.

5.4.2 Análisis del flujo de agua

Ambas especies absorbieron la fucsina por las raíces que marcó de diferente forma el flujo del agua a través del cilindro vascular. En *Echinocereus* se observó que en los tres tratamientos (Er, Es1 y Es2), el agua ascendió a través de las dos o tres primeras hileras cercanas al cambium vascular (Figura 5.2). Por lo que, las paredes de los engrosamientos secundarios se tiñeron de morado cuando la fucsina ácida ascendió a través del lumen de los elementos conductores. Los EV y TBA subsecuentes y cercanos a la médula no tiñeron las paredes con excepción de uno o dos vasos (Figura 5.2B). El tratamiento Er mostró algunos

fascículos sin tinción debido a que en ambos lados de la raíz hubo absorción de agua constantemente y no hubo estrés hídrico (Figura 5.2A, D, G, J). En los tratamientos Es1 y Es2, las primeras hileras de los fascículos del cilindro vascular se tiñeron con el colorante (Figura 5.2B, C, E, F, H, I, K, L).

En los tres tratamientos de *Mammillaria*, los fascículos del lado donde se aplicó el colorante se tiñeron los engrosamientos de las paredes secundarias de los EV y TBA. Los fascículos sobre la región de las raíces donde solo se aplicó agua, en Mr y Ms1, y las regiones sin agua de Ms2, no se tiñeron (Figura 5.3).

En ambas especies los engrosamientos de la pared secundaria fueron de tipo helicoidal para EV, y de tipo anular y helicoidal para TBA. Al comparar las medias entre EV de ambas especies se obtuvo que hubo diferencias significativas ($p < 0.05$) en todas las variables (Cuadro 5.1). Los EV de *Mammillaria* tuvieron valores de diámetro de lumen ($27.3 \mu\text{m}$) y conductividad hidráulica teórica relativa ($1.5\text{E-}17 \text{ m}^4 \text{ MPa}^{-1} \text{ s}^{-1}$) mayor que *Echinocereus*. En las TBA las diferencias fueron significativas entre ambas especies y *Mammillaria* tuvo los valores de diámetro total, diámetro de lumen y conductividad hidráulica teórica relativa con valor mayor (Cuadro 5.1).

Al comparar para cada especie entre EV y TBA, ambas especies tuvieron diferencias significativas ($p < 0.05$). Las TBA de *Echinocereus* tuvieron valores de diámetro totales de $22.5 \mu\text{m}$ mayor que los EV ($17.4 \mu\text{m}$); el diámetro de lumen también tuvo valores mayores. La conductividad hidráulica teórica relativa de las TBA fue de $1.2\text{E-}18 \text{ m}^4 \text{ MPa}^{-1} \text{ s}^{-1}$ mayor que la obtenida en los EV ($9.6\text{E-}19 \text{ m}^4 \text{ MPa}^{-1} \text{ s}^{-1}$). En *Mammillaria* los EV tuvieron conductividad hidráulica teórica relativa mayor que las TBA (Cuadro 5.1).

Las diferencias en la conductividad hidráulica de elementos conductores teñidos y no teñidos de *Echinocereus* fueron significativas (ANDEVA $p < 0.05$) en los EV del tratamiento Es1, el valor mayor correspondió a los EV teñidos ($1.4\text{E-}18 \text{ m}^4 \text{ MPa}^{-1} \text{ s}^{-1}$) con respecto de las no teñidas ($6.9\text{E-}19 \text{ m}^4 \text{ MPa}^{-1} \text{ s}^{-1}$). En los demás tratamientos no hubo diferencias significativas. En *Mammillaria* hubo diferencias significativas en los EV del tratamiento Mr y en las TBA del tratamiento Ms1 no tuvieron diferencias significativas (Cuadro 5.2).

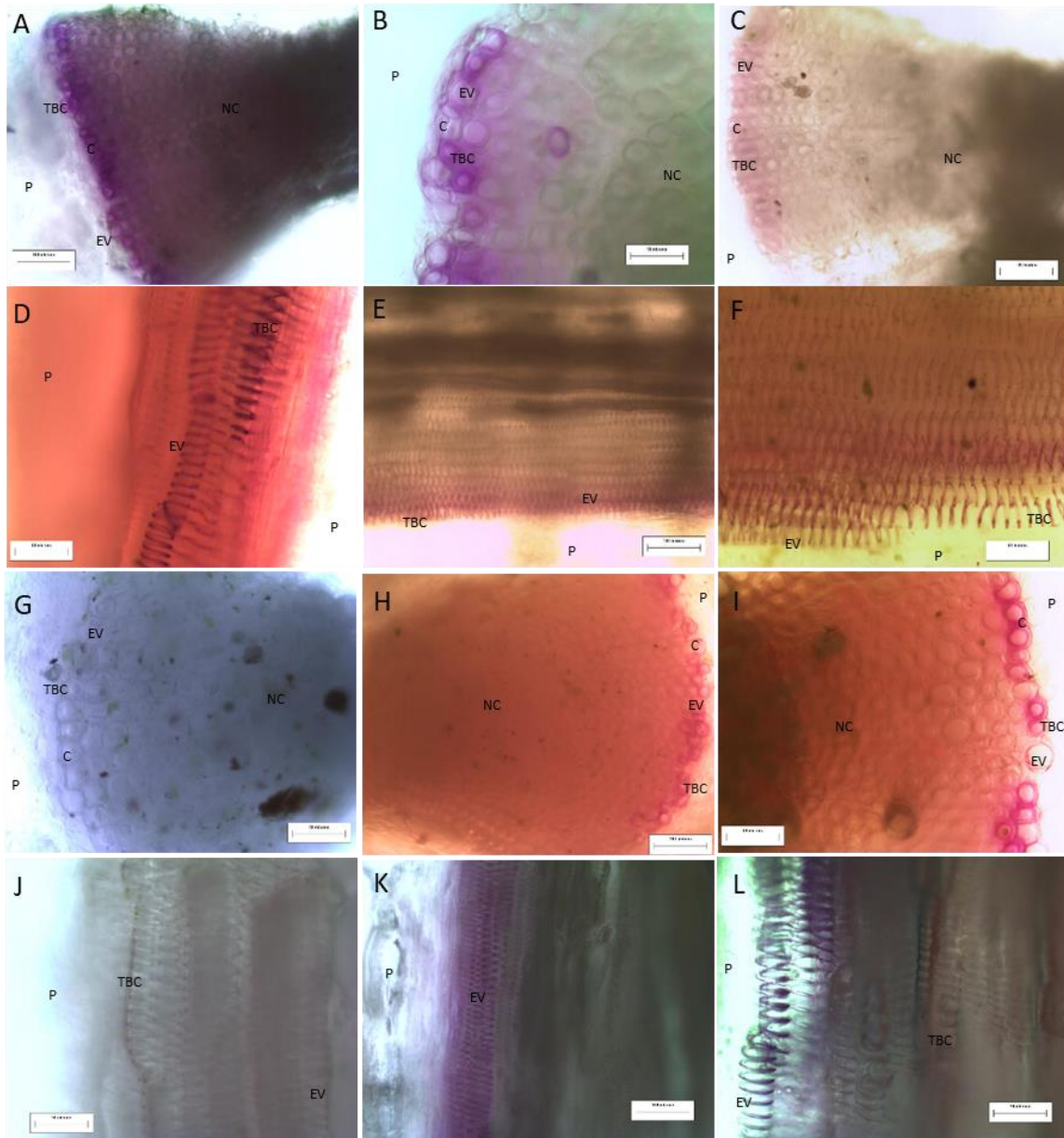


Figura 5.2. Imágenes del tejido fresco de *Echinocereus*. A, D, G, J: plantas con riego constante y aplicación de colorante de un lado de la raíz (Er). B, E, H, K: plantas con periodo de sequía y aplicación de agua de un lado de la raíz y del otro lado colorante (Es1). C, F, I, L: plantas con periodo de sequía y aplicación de colorante de un lado de la raíz (Es2). EV: Elementos de vaso. TBA: Traqueidas de banda ancha. P: Parénquima. C: Elementos conductores. NC: Elementos no conductores. Escala A, C, E, H, K: 100 μ m. B, D, F, G, I, J, L: 50 μ m.

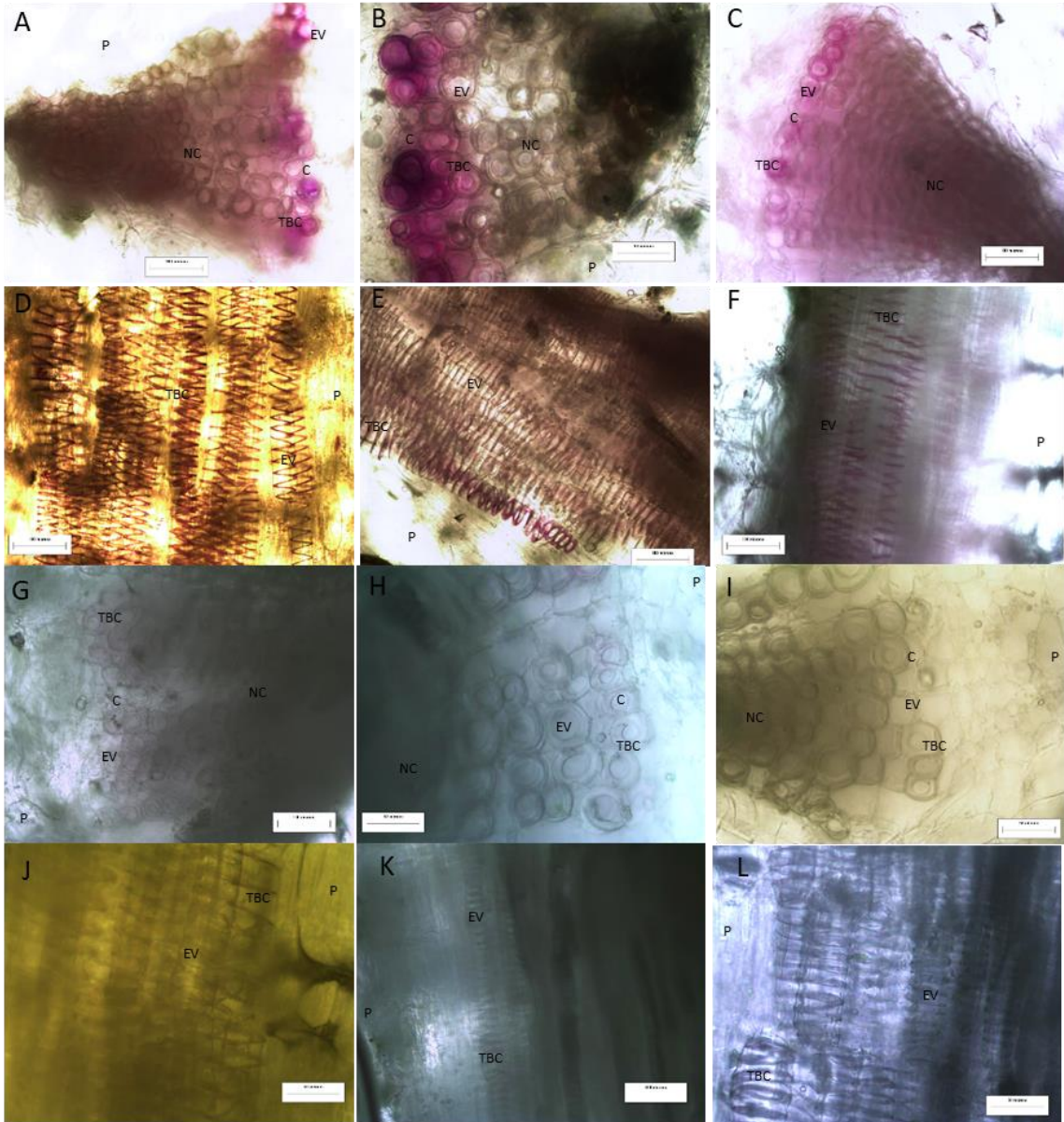


Figura 5.3. Imágenes del tejido fresco de *Mammillaria*. A, D, G, J: plantas con riego constante y aplicación de colorante de un lado de la raíz (Mr). B, E, H, K: plantas con periodo de sequía y aplicación de agua de un lado de la raíz y del otro lado colorante (Ms1). C, F, I, L: plantas con periodo de sequía y aplicación de colorante de un lado de la raíz (Ms2). EV: Elementos de vaso. TBA: Traqueidas de banda ancha. P: Parénquima. C: elementos conductores. NC: elementos no conductores. Escala A, C-G, K, 100 μ m. B, H-J, L: 50 μ m.

Cuadro 5.1. Comparación de medias con U de Mann-Whitney de diámetro total, diámetro lumen y conductividad hidráulica teórica relativa entre cada elemento conductor y entre EV y TBA en *Echinocereus* y *Mammillaria*.

Especie	Célula	Diámetro total (μm)	Diámetro lumen (μm)	Conductividad hidráulica
<i>Echinocereus</i>	EV	17.4±2.5 ^{Ab}	13.6±2.0 ^{Aa}	9.6E-19±5.4E-19 ^{Aa}
<i>Mammillaria</i>	EV	32.3±3.5 ^{Aa}	27.3±3.7 ^{Aa}	1.5E-17±8.9E-18 ^{Aa}
<i>Echinocereus</i>	TBA	22.5±2.0 ^{Ab}	14.5±1.9 ^{Aa}	1.2E-18±5.1E-19 ^{Aa}
<i>Mammillaria</i>	TBA	27.6±3.6 ^{Aa}	19.1±3.5 ^{Aa}	4.0E-18±3.0E-18 ^{Aa}

Letras en mayúsculas muestran comparación entre *Echinocereus* y *Mammillaria*. Letras en minúsculas muestran comparación entre EV y TBA para cada especie. ^A y ^a: Diferencias significativas ($p < 0.05$).

Cuadro 5.2. Comparación de la conductividad hidráulica teórica entre elementos conductores teñidos y no teñidos para cada tratamiento de dos especies de Cactaceae

Especie	Elemento conductor	Tratamiento	Conductividad hidráulica teórica ($\text{m}^4 \text{MPa}^{-1} \text{s}^{-1}$)	
			Teñido	No teñido
<i>Echinocereus</i>	EV	Er	9.0E-19±3.9E-19	6.6E-19±3.8E-19 ^B
		Es1	1.4E-18±6.8E-19	6.9E-19±3.3E-19 ^a
		Es2	8.7E-19±5.5E-19	10.0E-19±5.8E-19 ^b
	TBA	Er	1.1E-18±6.5E-19	6.2E-19±1.3E-19 ^b
		Es1	8.6E-15±1.0E-15	5.7E-15±5.0E-15 ^b
		Es2	1.7E-18±1.1E-19	1.3E-18±1.1E-19 ^b
<i>Mammillaria</i>	EV	Mr	1.9E-17±8.3E-18	1.2E-17±6.0E-18 ^a
		Ms1	1.9E-17±1.7E-17	1.5E-17±5.3E-18 ^b
		Ms2	1.5E-17±6.8E-18	1.12E-17±5.4E-18 ^B
	TBA	Mr	7.4E-18±3.7E-18	4.4E-18±1.4E-18 ^B
		Ms1	5.4E-18±3.3E-18	1.8E-18±7.3E-19 ^a
		Ms2	2.5E-18±1.3E-18	1.4E-18±7.6E-19 ^B

Letras mayúsculas corresponden a ANDEVA. Letras minúsculas corresponden a U de Mann-Whitney. ^a: diferencias significativas ($p < 0.05$). ^B y ^b: Sin diferencias significativas ($p > 0.05$).

5.5 DISCUSIÓN

5.5.1 Técnica de tinción

La tinción con fucsina ácida con la técnica de absorción de raíz marcó el flujo de agua a través del xilema de ambas especies. La fucsina ácida se ha utilizado en estudios histológicos ^[52] e *in vivo* para el marcar el flujo del agua a través del tejido vascular y entre elementos conductores con las células parenquimáticas radiales y axiales ^[53-55]. El uso de fucsina como marcador de flujo de agua se debe a su solubilidad en agua y a que se distribuye junto con el agua en comparación a tinciones básicas como safranina o fucsina básica ^[49]; por su solubilidad en agua recorre toda la distancia de ascenso del agua a través del tejido vascular ^[51]. La solución acuosa de fucsina ácida recomendada es de 0.1 % a 5 % para experimentos de flujo de agua ^[56], ya que en concentraciones mayores el ascenso es lento y en concentración menor a 0.1 % la calidad de tinción es baja ^[51].

Para marcar el flujo de agua, en árboles se ha utilizado la técnica de inyección del colorante y medición del flujo un metro posterior al sitio de inyección ^[49-51]. Esta técnica se probó en este estudio en las plantas de cactáceas; sin embargo, la inyección con jeringa ejerció presión al tejido parenquimatoso no lignificado y a los elementos conductores con engrosamientos helicoidales y anulares, el colorante se dispersó en parénquima y cilindro vascular. Esto indicó que la tinción fue inadecuada pues no reflejó el flujo del agua. Esto concuerda con diversos autores que mencionan que las técnicas de inyección no se pueden comparar ni probar en diferentes tratamientos que muestren el flujo de agua de una especie ^[57], es una técnica invasiva que genera un flujo artificial en el tejido conductor ^[58], y se puede mal interpretar la conducción del agua si los procedimientos no son bien definidos ni estandarizados ^[51,58].

La segunda técnica empleada se ha propuesto para plantas con altura máxima de 10 cm y consiste en quitar el sustrato de una raíz, cortarla bajo el agua para evitar embolismos y agregar el colorante ^[59]. Esta técnica se implementó en este estudio con la diferencia principal que no se realizó el corte de raíz y el colorante se agregó directamente y marcó el flujo del agua a través del xilema que permitió realizar comparaciones entre tratamientos como propone Geitmann ^[57].

5.5.2 Análisis del flujo de agua

En las especies estudiadas, los tres tratamientos reflejaron tres condiciones posibles: disponibilidad de agua constante, ausencia de riego en ambos lados y riego solo en un lado. La ausencia de agua fue de 30 d debido a que las cactáceas pueden soportar hasta un 81 % de pérdida de agua ^[30] y algunas especies como *F. acanthodes* soporta condiciones de ausencia de agua hasta por 40 d ^[26]. En este estudio no se produjo estrés por más de 30 d debido a que algunas raíces pueden morir después de 35 d ^[34] e interferir con la absorción del colorante.

En las dos especies la absorción del agua fue detectada en los tres tratamientos. En Cactaceae no se ha propuesto los límites de albura y duramen. Sin embargo, la tinción de las primeras dos o tres hileras de EV y TBA cercanas al cambium vascular representan la región activa de conducción (transporte de agua y nutrientes) y se puede interpretar como albura con base en la definición propuesta por Longui et al. ^[60] y Díaz-Maroto et al. ^[61]. Las regiones no teñidas revelaron los elementos no conductores y podrían asociarse al duramen de la planta que Meerts ^[62], Taylor et al. ^[63] y Latorraca et al. ^[64] definen como la región caracterizada por vasos no conductores, de acumulación de reservas y compuestos secundarios. El estudio de otras especies no fibrosas, dimorfas y fibrosas con la técnica de absorción de agua y otras técnicas como la tomografía de resistividad eléctrica (ERT) ^[65], permitirán delimitar ambas regiones en Cactaceae.

En ambas especies, los EV tuvieron diámetros de 17.3-32.9 μm , valores bajos comparados con el diámetro de otras angiospermas como *Paxistima myrsinites* con diámetro de 17 o de *Poureria montana* con diámetro de 150 μm ^[66]. Algunos autores sugieren que existe relación entre largo y diámetro de vasos ^[67], por lo que el largo de los vasos puede ser 100 a 10000 veces más largo que su diámetro ^[68]. Sin embargo, la variabilidad en el tamaño de los vasos es muy amplia en las angiospermas y algunas especies presentan vasos cortos y amplios ^[69].

Las dos especies difirieron en el flujo del agua entre los tratamientos Es1-Es2 y Ms1-Ms2, según los resultados de los elementos conductores y la conductividad hidráulica teórica relativa. En *Mammillaria*, los EV tuvieron valores mayores de diámetro y conductividad hidráulica (Cuadro 5.1) con respecto a *Echinocereus*. El lumen con diámetro amplio aumenta

la conductividad hidráulica de acuerdo a la ecuación de Hagen-Poiseuille ^[66,70], por lo tanto, son susceptibles a cavitación ^[71]. Sin embargo, el tamaño de la planta *in situ* de *M. bocasana* es de máximo 10 cm de altura ^[72] mientras que *E. reichenbachii* var. *fitchii* alcanza una altura de 40 cm *in situ* ^[73]; además de que ambas especies presentan parénquima cortical y medular donde acumulan agua para soportar el estrés hídrico ^[14,74-76].

Debido a que la conductividad hidráulica teórica en EV de *Echinocereus* es menor con respecto a *Mammillaria* (Cuadro 5.1), los haces corticales cumplen la función de distribuir el agua en el tejido cortical y en las regiones del cilindro vascular sin disponibilidad de agua ^[77,78]. En *Mammillaria* también se observó tinción de algunos haces corticales, pero fueron escasos (Figura 5.4). Los haces corticales se presentan en la subfamilia Cactoideae ^[79] y su desarrollo facilita el almacenaje de agua a lo largo del parénquima cortical del tallo ^[80,81].

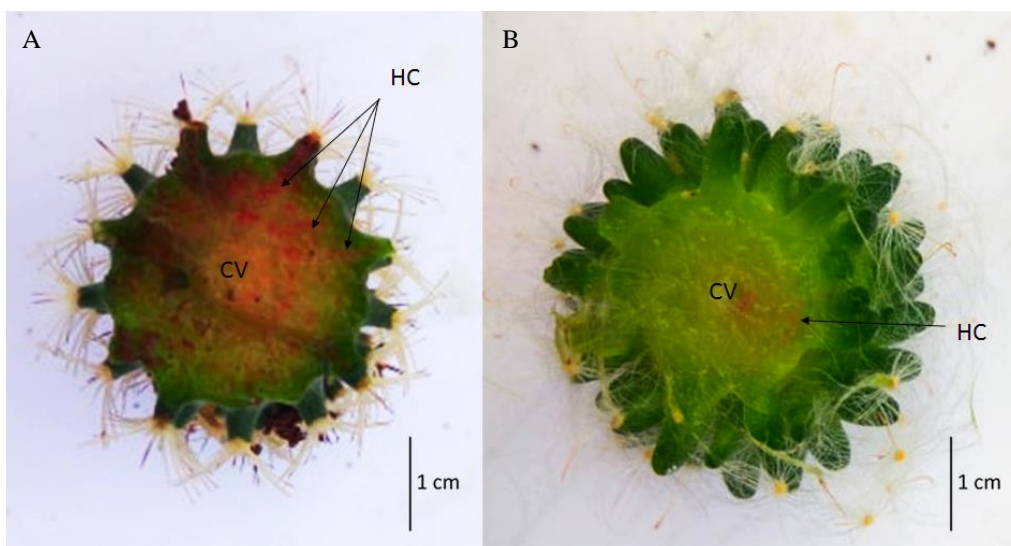


Figura 5.4. Comparación de la tinción del xilema y haces corticales entre *Echinocereus* (A) y *Mammillaria* (B). CV: cilindro vascular. HC: Haces corticales.

En ambas especies, algunos tratamientos presentaron diferencias en conductividad hidráulica entre EV y TBA teñidos de los no teñidos. Sin embargo, estas no se observaron en todos los tratamientos por lo que pueden ser producto de la variación propia de los elementos conductores ^[82] y no derivado de condiciones ambientales como mencionan Pande et al. ^[83] y Qaderi et al. ^[84].

La presencia de TBA en *Echinocereus* y *Mammillaria* (Cuadro 5.1) evita que los EV caviten al impedir la dispersión de embolismos y transferir eficientemente el agua a través

de la pared primaria ^[43,80,85]. En ambas especies, las TBA presentes en las primeras filas del fascículo también se tiñeron con fucsina, lo que permitió confirmar la hipótesis propuesta por Mauseth et al. ^[43] que indica que las TBA participan en el flujo de agua y en su almacenamiento.

En Cactaceae, con excepción de Pereskioideae ^[81], las TBA están presentes en casi todas las especies ^[85] y su función es similar ^[86]. Se presentan en etapas juveniles en especies fibrosas ^[42,87] y en especies adultas ^[22]. Tienen dos tamaños principalmente relacionados con las células fusiformes iniciales y radiales ^[82]. El desarrollo de las TBA con paredes secundarias de tipo anular y helicoidal permite a las plantas deshidratarse sin dañar el tejido vascular ^[88], además que pueden ser resultado de adaptaciones a condiciones de luz intensa y temperaturas altas ^[89], por lo que tanto en Cactaceae, como en otras familias relacionadas (Portulacaceae y Azoiceae), han aparecido evolutivamente varias veces de forma independiente ^[78,85,90-92]. El estudio experimental de la conducción de agua, por primera vez mostró que hay diferencias en el flujo de agua entre especies no fibrosas, por lo tanto, es necesario realizar estudios comparativos con otras no fibrosas, dimorfas y fibrosas que permitan comprender la forma en que el flujo de agua ocurre entre las diferentes especies.

5.6 CONCLUSIONES

La técnica de absorción de fucsina ácida al 0.2 % a través de la raíz fue adecuada para marcar el flujo de agua en las dos especies de cactáceas por lo que puede ser empleada para delimitar las regiones conductivas y las no conductivas de Cactaceae. El flujo a través del xilema secundario en *Echinocereus* fue diferente al de *Mammillaria* y posiblemente se relaciona con el tamaño y conductividad hidráulica teórica relativa de ambas especies. La tinción de las paredes secundarias de las TBA confirma la hipótesis de que participan en la conducción del flujo de agua además de su almacenamiento.

5.7 SECCIÓN EXPERIMENTAL

5.7.1 Técnica de tinción

Plantas de un año de edad de *Mammillaria bocasana* Poselg. (*Mammillaria*) y *Echinocereus reichenbachii* var. *fitcii* (Britton & Rose) (*Echinocereus*) se obtuvieron del Jardín Botánico de la UNAM. El flujo de agua a través del tejido vascular se evaluó con la técnica de raíz

dividida basado en Kassaw y Frugoli ^[93] con algunas modificaciones. El procedimiento consistió en seleccionar al azar 15 individuos de cada especie. Un corte en la base de la raíz y el tallo se realizó con una navaja previamente esterilizada. Para evitar la infección por hongos se aplicó un fungicida y se dejó cicatrizar durante dos semanas sin riego.

Las plantas se trasplantaron a macetas especiales divididas a la mitad y separadas con un plástico, el cual permitió mantener las raíces separadas. El sustrato utilizado fue tezontle con tres tamaños de partícula 0.45 mm, 1 mm y 1.4 mm, en proporciones similares. Las plantas se mantuvieron durante tres meses en cámaras con ambiente controlado, a 25 °C con fotoperiodo de 12 h luz/12 h oscuridad y riegos cada tres semanas. A los tres meses se observaron raíces nuevas y se hicieron las observaciones anatómicas (Figura 5.5).

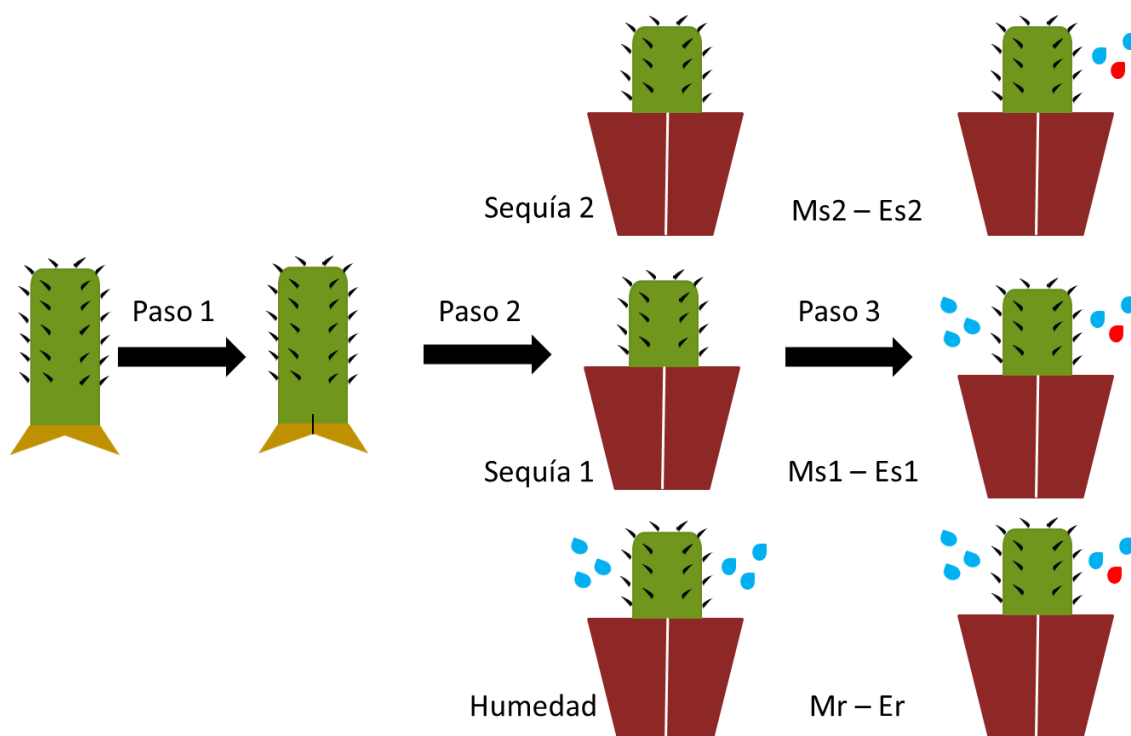


Figura 5.5. Representación del proceso de división y tinción de xilema de *Mammillaria* y *Echinocereus*. Paso 1. División de la raíz y cicatrización. Paso 2. Trasplante y separación entre tratamientos con riego y sequía. Paso 3. Aplicación de colorante en cada tratamiento y toma de muestras. Mr o Ms = *Mammillaria* riego o sequía, Er o Es = *Echinocereus* riego o sequía.

El diseño experimental fue al azar, seis tratamientos, dos especies y tres condiciones hídricas, con cinco unidades experimentales (plantas). Durante dos meses se mantuvieron condiciones de un solo riego a la semana. Al tercer mes, el primer tratamiento de cada especie

Mammillaria riego y *Echinocereus* riego (Mr y Er) se mantuvo por un mes con un riego a la semana en ambas raíces. El segundo *Mammillaria* sequía 1 y *Echinocereus* sequía 1 (Ms1 y Es1) y tercer tratamiento *Mammillaria* sequía 2 y *Echinocereus* sequía 2 (Ms2 y Es2) se mantuvieron durante 30 días sin agua para provocar estrés hídrico como proponen Huang y Nobel ^[34] y Nerd y Neumann ^[27] (Figura 5.5).

Siete días después del último riego, los tratamientos Mr y Er se regaron con agua destilada de un lado de la raíz y del otro lado se agregó el colorante. A los 31 días de estrés hídrico, un lado de la raíz de los tratamientos Ms1 y Es1 se mantuvo sin agua y el otro lado se agregó el colorante. A los tratamientos Ms2 y Es2 se agregó agua destilada de un lado de la raíz y del otro lado colorante a los 31 días (Figura 5.5).

El colorante empleado fue el propuesto por Kitin et al. ^[53]. Una solución acuosa de fucsina ácida al 0.2 % se filtró a través de una membrana de nylon de con poros de diámetro de 0.45 μm . Una prueba preliminar se realizó para determinar la técnica adecuada para el marcado del flujo del agua. La técnica de inyección de Sano et al. ^[49] se comparó con la técnica de Salguero-Gómez y Casper ^[59]; ambas técnicas se probaron con algunas modificaciones. La primera técnica consistió en inyectar con jeringa 0.1 mL de colorante en un lado de la raíz y las observaciones se realizaron 3 h después. La segunda técnica, consistió en que las raíces de un lado se descubrieron cuidadosamente para agregar lentamente 5 mL del colorante; las raíces se cubrieron nuevamente con el sustrato y se agregaron 20 mL de agua destilada. Las observaciones se hicieron 24 h después. La prueba mostró que la segunda técnica fue efectiva para marcar el flujo de agua por lo que se aplicó a cada tratamiento de ambas especies.

5.7.2 Análisis del flujo de agua

Después de 24 h de aplicar el colorante, se quitó cuidadosamente el sustrato; la corteza y el parénquima cortical se eliminaron y se dejó únicamente el tejido vascular. Los cortes se realizaron en el material fresco sin ningún tipo de preparación; los cortes longitudinales y transversales tuvieron grosores de más de 50 μm . Las imágenes se tomaron con un microscopio de campo claro para realizar las descripciones anatómicas. Con el programa ImageJ se tomaron aleatoriamente 10 fotografías para cuantificar las medidas de los

elementos de vaso y traqueidas de banda ancha y calcular la conductividad hidráulica teórica relativa con base en la fórmula propuesta por Gibson et al. ^[94] y Ewers y Fisher ^[95].

$$K_{vt,i} = \frac{\pi D_{vt,i}^4}{128\mu}$$

Donde $K_{vt,i}$ es la conductividad hidráulica teórica de los vasos y TBA i con diámetro de lumen $D_{vt,i}$, μ es la viscosidad del agua a 1 atm y 20 °C (0.001 Pa·s) ^[96].

Para las medidas de diámetro interno de los vasos, longitud de vasos y conductividad hidráulica se calculó la media y desviación estándar. Los análisis estadísticos utilizados para comparar entre especies fueron la prueba U de Mann-Whitney y ANDEVA con base en la normalidad de cada variable. Las comparaciones se realizaron entre elementos conductores de cada especie, entre especies y entre elementos conductores teñidos con los no teñidos.

5.8 REFERENCIAS

- [1] M. Vázquez-Sánchez, T. Terrazas, Y. S. Arias, 'El hábito y la forma de crecimiento en la tribu Cactaceae (Cactaceae, Cactoideae)', *Bot. Sci.* **2012**, *90*, 97–108.
- [2] R. David Valdez-Cepeda, F. Blanco-Macías, C. Gallegos-Vázquez, G. E. Salinas-García, R. E. Vázquez-Alvarado, 'Freezing Tolerance of *Opuntia* spp.', *J. Prof. Assoc. Cactus Dev.* **2001**, *4*, 581.
- [3] H. Schwager, T. Masselter, T. Speck, C. Neinhuis, 'Functional morphology and biomechanics of branch-stem junctions in columnar cacti', *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **2013**, *280*, 20132244.
- [4] H. Kim, K. Kim, S. J. Lee, 'Hydraulic strategy of cactus root–stem junction for effective water transport', *Front. Plant Sci.* **2018**, *9*, 799.
- [5] C. Gómez-Hinostrosa, H. M. Hernández, 'Diversity, geographical distribution, and conservation of Cactaceae in the Mier y Noriega region, Mexico', *Biodivers. Conserv.* **2000**, *9*, 403–418.
- [6] D. L. Ferguson, J. J. Burke, 'Influence of Water and Temperature Stress on the Temperature Dependence of the Reappearance of Variable Fluorescence following Illumination', *Plant Physiol.* **1991**, *97*, 188–192.
- [7] J. Lipiec, C. Doussan, A. Nosalewicz, K. Kondracka, 'Effect of drought and heat stresses on plant growth and yield: A review', *Int. Agrophysics* **2013**, *27*, 463–477.
- [8] J. L. Hatfield, J. H. Prueger, 'Temperature extremes: Effect on plant growth and development', *Weather Clim. Extrem.* **2015**, *10*, 4–10.
- [9] M. Sajeve, J. D. Mauseth, 'Leaf-like Structure in the Photosynthetic, Succulent Stems

- of Cacti', *Ann. Bot.* **1991**, 68, 405–411.
- [10] E. J. Edwards, M. J. Donoghue, 'Pereskia and the Origin of the Cactus Life-Form', *Am. Nat.* **2006**, 167, 777–793.
- [11] U. Lüttge, 'Ecophysiology of Crassulacean Acid Metabolism (CAM)', *Ann. Bot.* **2004**, 93, 629–52.
- [12] J. L. Andrade, E. De la Barrera, C. Reyes-García, M. F. Ricalde, G. Vargas-Soto, J. C. Crevera, 'El metabolismo ácido de las crasuláceas: diversidad, fisiología ambiental y productividad', *Bot. Sci.* **2007**, 81, 37–50.
- [13] M. E. Stone-Palmquist, J. D. Mauseth, 'The structure of enlarged storage roots in cacti', *Int. J. Plant Sci.* **2002**, 163, 89–98.
- [14] P. S. Nobel, 'Parenchyma-chlorenchyma water movement during drought for the hemiepiphytic cactus *Hylocereus undatus*', *Ann. Bot.* **2006**, 97, 469–474.
- [15] M. W. Dulin, B. K. Kirchoff, 'Paedomorphosis, Secondary Woodiness, and Insular Woodiness in Plants', *Bot. Rev.* **2010**, 76, 405–490.
- [16] S. Arias, T. Terrazas, 'Variación en la anatomía de la madera de *Pachycereus pecten-aboriginum* (Cactaceae)', *An. del Inst. Biol. Univ. Nac. Autónoma México* **2001**, 72, 157–169.
- [17] T. Terrazas, S. Loza-Cornejo, H. J. Arreola-Nava, 'Anatomía caulinar de las especies del género *Stenocereus* (Cactaceae)', *Acta Botánica Venez.* **2005**, 28, 321–336.
- [18] A. C. Gibson, 'Dimorphism of Secondary Xylem in two Species of Cacti', *Flora* **1978**, 167, 403–408.
- [19] J. D. Mauseth, 'Comparative structure-function studies within a strongly dimorphic plant, *Melocactus intortus* (Cactaceae)', *Bradleya* **1989**, 7, 1–12.
- [20] J. D. S. Garcia, E. Scremin-Dias, P. Soffiatti, 'Stem and root anatomy of two species of *Echinopsis* (Trichocereae: Cactaceae)', *Rev. Mex. Biodivers.* **2012**, 83, 1036–1044.
- [21] M. Vázquez-Sánchez, T. Terrazas, D. Grego-Valencia, S. Arias, 'Growth form and wood evolution in the tribe Cacteeae (Cactaceae)', *Willdenowia* **2017**, 47, 49–67.
- [22] A. Maceda, M. Soto-Hernández, C. B. Peña-Valdivia, T. Terrazas, 'Chemical Composition of Cacti Wood and Comparison with the Wood of Other Taxonomic Groups', *Chem. Biodivers.* **2018**, 15, e1700574.
- [23] J. D. Mauseth, B. J. Plemons-Rodriguez, 'Evolution of extreme xeromorphic characters in wood: A study of nine evolutionary lines in Cactaceae', *Am. J. Bot.* **1998**, 85, 209–218.
- [24] J. D. Mauseth, M. E. Stone-Palmquist, 'Root wood differs strongly from shoot wood within individual plants of many Cactaceae', *Int. J. Plant Sci.* **2001**, 162, 767–776.
- [25] E. Pimienta-Barrios, S. Loza Cornejo, M. E. González del Castillo-Aranda,

- ‘Caracterización anatómica y conductividad hidráulica teórica de los elementos de vaso de variedades silvestres y cultivadas de nopal tunero (*Opuntia*)’, *Acta Bot. Mex.* **2003**, *62*, 21.
- [26] P. S. Nobel, F. B. Lopez, D. M. Alm, ‘Water Uptake and Respiration of Root Systems of Two Cacti: Observations and Predictions Based on Individual Roots’, *J. Exp. Bot.* **1991**, *42*, 1215–1223.
- [27] A. Nerd, P. M. Neumann, ‘Phloem water transport maintains stem growth in a drought-stressed crop cactus (*Hylocereus undatus*)’, *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* **2004**, *129*, 486–490.
- [28] N. Wang, H. Zhang, P. S. Nobel, ‘Phloem-xylem water flow in developing cladodes of *Opuntia ficus-indica* during sink-to-source transition’, *J. Exp. Bot.* **1997**, *48*, 675–682.
- [29] N. Wang, H. Zhang, P. S. Nobel, ‘Carbon flow and carbohydrate metabolism during sink-to-source transition for developing cladodes of *Opuntia ficus-indica*’, *J. Exp. Bot.* **1998**, *49*, 1835–1843.
- [30] W. Barcikowski, P. S. Nobel, ‘Water Relations of Cacti During Desiccation: Distribution of Water in Tissues’, *Bot. Gaz.* **1984**, *145*, 110–115.
- [31] I. P. Ting, ‘Photosynthesis of arid and subtropical succulent plants’, *Aliso* **1989**, *12*, 387–406.
- [32] M. Cui, P. S. Nobel, ‘Nutrient status, water uptake and gas exchange for three desert succulents infected with mycorrhizal fungi’, *New Phytol.* **1992**, *122*, 643–649.
- [33] G. B. North, P. S. Nobel, ‘Drought-Induced Changes in Hydraulic Conductivity and Structure in Roots of *Ferocactus acanthodes* and *Opuntia ficus-indica*’, *New Phytol.* **1992**, *120*, 9–19.
- [34] B. Huang, P. S. Nobel, ‘Hydraulic conductivity and anatomy along lateral roots of cacti: changes with soil water status’, *New Phytol.* **1993**, *123*, 499–507.
- [35] K. Kim, H. Kim, S. H. Park, S. J. Lee, ‘Hydraulic strategy of cactus trichome for absorption and storage of water under arid environment’, *Front. Plant Sci.* **2017**, *8*, 1777.
- [36] F. T. Malik, R. M. Clement, D. T. Gethin, M. Kiernan, T. Goral, P. Griffiths, D. Beynon, A. R. Parker, ‘Hierarchical structures of cactus spines that aid in the directional movement of dew droplets’, *Philos. Trans. A. Math. Phys. Eng. Sci.* **2016**, *374*, 20160110.
- [37] D. A. Lewis, P. S. Nobel, ‘Thermal Energy Exchange Model and Water Loss of a Barrel Cactus, *Ferocactus acanthodes*’, *Plant Physiol.* **1977**, *60*, 609–616.
- [38] J. D. Mauseth, J. F. Stevenson, ‘Theoretical considerations of vessel diameter and conductive safety in populations of vessels’, *Int. J. Plant Sci.* **2004**, *165*, 359–368.
- [39] J. F. Stevenson, J. D. Mauseth, ‘Effects of environment on vessel characters in cactus wood’, *Int. J. Plant Sci.* **2004**, *165*, 347–357.

- [40] M. E. Loik, P. S. Nobel, 'Water relations and mucopolysaccharide increases for a winter hardy cactus during acclimation to subzero temperatures', *Oecologia* **1991**, 88, 340–346.
- [41] J. D. Mauseth, B. J. Plemons, 'Developmentally variable, polymorphic woods in cacti', *Am. J. Bot.* **1995**, 82, 1199–1205.
- [42] V. R. Godofredo, G. F. Melo-de-Pinna, 'Occurrence of wide-band tracheids in Cactaceae: wood variation during *Pilosocereus aurisetus* development 1', *J. Torrey Bot. Soc.* **2008**, 135, 94–102.
- [43] J. D. Mauseth, Y. Uozumi, B. J. Plemons, J. V. Landrum, 'Structural and systematic study of an unusual tracheid type in cacti', *J. Plant Res.* **1995**, 108, 517–526.
- [44] T. T. Kozłowski, C. H. Winget, 'Patterns of Water Movement in Forest Trees', *Bot. Gaz.* **1963**, 124, 301–311.
- [45] E. de Fay, V. Vacher, F. Humbert, 'Water-related Phenomena in Winter Buds and Twigs of *Picea abies* L. (Karst.) until Bud-burst: A Biological, Histological and NMR Study', *Ann. Bot.* **2000**, 86, 1097–1107.
- [46] K. R. Hargrave, K. J. Kolb, F. W. Ewers, S. D. Davis, 'Conduit diameter and drought-induced embolism in *Salvia mellifera* Greene (Labiatae)', *New Phytol.* **1994**, 126, 695–705.
- [47] A.-C. Tang, J. S. Boyer, 'Xylem tension affects growth-induced water potential and daily elongation of maize leaves', *J. Exp. Bot.* **2008**, 59, 753–764.
- [48] G. S. Ellmore, F. W. Ewers, 'Fluid Flow in the Outermost Xylem Increment of a Ring-Porous Tree, *Ulmus americana*', *Am. J. Bot.* **1986**, 73, 1771–1774.
- [49] Y. Sano, Y. Okamura, Y. Utsumi, 'Visualizing water-conduction pathways of living trees: selection of dyes and tissue preparation methods', *Tree Physiol.* **2005**, 25, 269–275.
- [50] Y. Sano, H. Morris, H. Shimada, L. P. Ronse De Craene, S. Jansen, 'Anatomical features associated with water transport in imperforate tracheary elements of vessel-bearing angiosperms', *Ann. Bot.* **2011**, 107, 953–964.
- [51] T. Umebayashi, Y. Utsumi, S. Koga, S. Inoue, Y. Shiiba, K. Arakawa, J. Matsumura, K. Oda, 'Optimal conditions for visualizing water-conducting pathways in a living tree by the dye injection method', *Tree Physiol.* **2007**, 27, 993–999.
- [52] J. E. Kraus, H. C. De Sousa, M. H. Rezende, N. M. Castro, C. Vecchi, R. Luque, 'Astra blue and basic fuchsin double staining of plant materials', *Biotech. Histochem.* **1998**, 73, 235–243.
- [53] P. Kitin, S. L. Voelker, F. C. Meinzer, H. Beckman, S. H. Strauss, B. Lachenbruch, 'Tyloses and phenolic deposits in xylem vessels impede water transport in low-lignin transgenic poplars: a study by cryo-fluorescence microscopy', *Plant Physiol.* **2010**, 154, 887–898.
- [54] M. Fritz, R. Ehwald, 'Radial transport of salt and water in roots of the common reed

- (*Phragmites australis* Trin. ex Steudel)', *Plant. Cell Environ.* **2013**, *36*, 1860–1870.
- [55] R. Jupa, V. Didi, J. Hejátko, V. Gloser, 'An improved method for the visualization of conductive vessels in *Arabidopsis thaliana* inflorescence stems', *Front. Plant Sci.* **2015**, *6*, 211.
- [56] I. Iida, G. J. Zhao, W. C. Shi, W. T. Wang, 'Dyeing of xylem utilizing the sap flow of living trees. (3) Investigation of permeable dyes for wood', *Bull. Kyoto Prefect. Univ. For.* **1992**, *36*, 29–36.
- [57] A. Geitmann, 'Experimental approaches used to quantify physical parameters at cellular and subcellular levels', *Am. J. Bot.* **2006**, *93*, 1380–1390.
- [58] H. K. Kim, J. Park, I. Hwang, 'Investigating water transport through the xylem network in vascular plants', *Journal of Experimental Botany* **2014**, *65*, 1895–1904.
- [59] R. Salguero-Gómez, B. B. Casper, 'A hydraulic explanation for size-specific plant shrinkage: Developmental hydraulic sectoriality', *New Phytol.* **2011**, *189*, 229–240.
- [60] E. L. Longui, D. Romeiro, E. S. Alves, 'Differences in anatomy and potential hydraulic conductivity between root and stem of *Caesalpinia echinata* Lam. (Fabaceae)', *Hoehnea* **2012**, *39*, 649–655.
- [61] I. J. Diaz-Maroto, P. Vila-Lampeiro, S. Tahir, 'Assessment of anatomical characteristics of wood-bark, sapwood and heartwood- in hardwoods species of Galician oaks by image processing: relationship with age', *Wood Res.* **2017**, *62*, 763–772.
- [62] P. Meerts, 'Mineral nutrient concentrations in sapwood and heartwood: A literature review', *Ann. For. Sci.* **2002**, *59*, 713–722.
- [63] A. M. Taylor, B. L. Gartner, J. J. Morrell, 'Heartwood Formation and Natural Durability—A Review', *Wood Fiber Sci.* **2002**, *34*, 587–611.
- [64] J. V. F. Latorraca, O. Dünisch, G. Koch, 'Chemical composition and natural durability of juvenile and mature heartwood of *Robinia pseudoacacia* L.', *An. Acad. Bras. Cienc.* **2011**, *83*, 1059–1068.
- [65] D. Bieker, S. Rust, 'Non-destructive estimation of sapwood and heartwood width in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.)', *Silva Fenn.* **2010**, *44*, 267–273.
- [66] J. S. Sperry, U. G. Hacke, J. Pittermann, 'Size and function in conifer tracheids and angiosperm vessels', *Am. J. Bot.* **2006**, *93*, 1490–500.
- [67] J. S. Sperry, U. G. Hacke, J. K. Wheeler, 'Comparative analysis of end wall resistivity in xylem conduits', *Plant, Cell Environ.* **2005**, *28*, 456–465.
- [68] R. Pan, J. Geng, J. Cai, M. T. Tyree, 'A comparison of two methods for measuring vessel length in woody plants', *Plant. Cell Environ.* **2015**, *38*, 2519–2526.
- [69] A. B. Roddy, 'Testing the benefits of early vessel evolution', *J. Exp. Bot.* **2019**, *70*, 3024–3027.

- [70] D. J. Ellerby, A. R. Ennos, 'Resistances to fluid flow of model xylem vessels with simple and scalariform perforation plates', *J. Exp. Bot.* **1998**, *49*, 979–985.
- [71] A. L. Jacobsen, R. B. Pratt, 'Going with the flow: Structural determinants of vascular tissue transport efficiency and safety', *Plant. Cell Environ.* **2018**, *41*, 2715–2717.
- [72] E. F. Anderson, *The Cactus Family*, Timber Press, USA, **2001**.
- [73] N. P. Taylor, *The Genus Echinocereus*, Royal Botanic Gardens, USA, **1985**.
- [74] J. D. Mauseth, 'Ontogenetic mechanisms and the evolution of cactaceae', *G. Bot. Ital.* **1995**, *129*, 429–435.
- [75] A. C. Secorun, L. A. De Souza, 'Morphology and anatomy of *Rhipsalis cereuscula*, *Rhipsalis floccose* subsp. *hohenauensis* y *Lepismium cruciforme* (Cactaceae) seedlings', *Rev. Mex. Biodivers.* **2011**, *82*, 131–143.
- [76] A. Scalisi, B. Morandi, P. Inglese, R. Lo Bianco, 'Cladode growth dynamics in *Opuntia ficus-indica* under drought', *Environ. Exp. Bot.* **2016**, *122*, 158–167.
- [77] D. J. Hearn, 'Developmental patterns in anatomy are shared among separate evolutionary origins of stem succulent and storage root-bearing growth habits in *Adenia* (Passifloraceae)', *Am. J. Bot.* **2009**, *96*, 1941–1956.
- [78] R. M. Ogburn, E. J. Edwards, 'The ecological water-use strategies of succulent plants', *Adv. Bot. Res.* **2010**, *55*, 179–225.
- [79] J. D. Mauseth, 'Collapsible water-storage cells in cacti', *Bull. Torrey Bot. Club* **1995**, *122*, 145–151.
- [80] J. D. Mauseth, 'Medullary Bundles and the Evolution of Cacti', *Am. J. Bot.* **1993**, *80*, 928.
- [81] J. D. Mauseth, 'Structure-function relationships in highly modified shoots of cactaceae', *Ann. Bot.* **2006**, *98*, 901–926.
- [82] G. F. Melo-de-Pinna, E. Arruda, D. D. Abreu, 'Wide-band tracheids in Brazilian cacti', *Bradleya* **2006**, *24*, 53–60.
- [83] P. K. Pande, L. Chauhan, M. Singh, 'Wood anatomical variations within the genus *Castanopsis*', *J. Trop. For. Sci.* **2005**, *17*, 366–371.
- [84] M. M. Qaderi, A. B. Martel, S. L. Dixon, 'Environmental factors influence plant vascular system and water regulation', *Plants* **2019**, *8*, 65.
- [85] J. D. Mauseth, 'Wide-band tracheids are present in almost all species of Cactaceae', *J. Plant Res.* **2004**, *117*, 69–76.
- [86] V. G. Perrotta, A. M. Arambarri, 'Cladodes anatomy of *Opuntia* (Cactaceae) from the province of Buenos Aires (Argentina)', *Boletín la Soc. Argentina Botánica* **2018**, *53*, 345–357.
- [87] E. Arruda, G. F. Melo-de-Pinna, 'Wide-band tracheids (WBTs) of photosynthetic and non-photosynthetic stems in species of Cactaceae 1', *J. Torrey Bot. Soc.* **2010**, *137*,

16–29.

- [88] S. Loza-Cornejo, T. Terrazas, ‘Morfo-anatomía de plántulas en especies de Pachycereae: ¿hasta cuándo son plántulas?’, *Bol. la Soc. Bot. Mex.* **2011**, 88, 1–13.
- [89] J. Victor Landrum, ‘Wide-Band Tracheids from a Southern African Succulent and Their Responses to Varying Light Intensities: A Pre-Adaptation for Future Water Stress?’, *Int. J. Bot.* **2008**, 4, 99–103.
- [90] J. V. Landrum, ‘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.* **2001**, 227, 49–61.
- [91] J. V Landrum, ‘Wide-band tracheids in genera of Portulacaceae: novel, non-xylary tracheids possibly evolved as an adaptation to water stress’, *J. Plant Res.* **2006**, 119, 497–504.
- [92] O. Speck, M. Schlechtendahl, F. Borm, T. Kampowski, T. Speck, ‘Humidity-dependent wound sealing in succulent leaves of *Delosperma cooperi* - An adaptation to seasonal drought stress’, *Beilstein J. Nanotechnol.* **2018**, 9, 175–186.
- [93] T. K. Kassaw, J. A. Frugoli, ‘Simple and efficient methods to generate split roots and grafted plants useful for long-distance signaling studies in *Medicago truncatula* and other small plants’, *Plant Methods* **2012**, 8, 38.
- [94] A. C. Gibson, H. W. Calkin, P. S. Nobel, ‘Xylem Anatomy, Water Flow, and Hydraulic Conductance in the Fern *Cyrtomium falcatum*’, *Am. J. Bot.* **1984**, 71, 564.
- [95] F. W. Ewers, J. B. Fisher, ‘Techniques for Measuring Vessel Lengths and Diameters in Stems of Woody Plants’, *Am. J. Bot.* **1989**, 76, 645.
- [96] A. Mrad, J. C. Domec, C. W. Huang, F. Lens, G. Katul, ‘A network model links wood anatomy to xylem tissue hydraulic behaviour and vulnerability to cavitation’, *Plant Cell Environ.* **2018**, 41, 2718–2730.

CONCLUSIONES GENERALES

La lignina es el polímero que refuerza la pared celular del tejido vascular y evita el contacto de la celulosa con el agua. Tiene una estructura heterogénea compuesta por monolignoles acetilados, hidroxicinamatos, coniferaldeídos, sinapaldeídos, ácido ferúlico y alcohol 5-hidroxiconiferaldeído. El estudio de la misma debe incluir métodos analíticos y cualitativos que permiten caracterizar la composición de la molécula y determinar la distribución en xilema de las plantas. De esta forma, se ha identificado el proceso de biosíntesis, la polimerización en la pared celular, la lignificación cooperativa entre las células del tejido vascular y la evolución de la ruta biosintética de los monómeros de lignina.

En Cactaceae, la composición química del xilema secundario mostró que la acumulación de lignina es el componente principal que permite la separación de las especies con madera no fibrosa, fibrosa y dimorfa. Además, se relaciona con el tipo de matriz celular y el engrosamiento de la pared secundaria de las especies; la lignificación es importante en la adaptación de las especies a las condiciones climáticas y de su hábitat. La proporción de siringilo/guayacilo en el tejido vascular de especies con madera no fibrosa mostró la presencia de mayor acumulación de monómeros de siringilo que confieren a la pared celular resistencia al ataque de patógenos. Los porcentajes de celulosa cristalina mayores al 60 % dan rigidez estructural a la pared primaria en especies no fibrosas.

En xilema primario, el porcentaje de tejido libre de extraíbles, compuestos solubles en agua y holocelulosa son los principales compuestos que se acumulan debido al bajo costo energético comparado con el proceso de lignificación. La presencia de engrosamientos helicoidales y anulares se observó en la mayoría de plántulas, en *M. carnea* la presencia de este tipo de engrosamientos en xilema primario y secundario confirma el proceso de paedomorfosis en especies no fibrosas. El porcentaje mayor de guayacilo confiere resistencia y flexibilidad a los vasos del xilema primario de Cactaceae, la presencia de siringilo en las regiones s2 y s3 de la pared secundaria de las TBA, permite un eficiente flujo de agua a través del lumen celular.

Los cladodios de las tres especies de *Opuntia* tuvieron porcentajes del 90 % de agua por lo que pueden ser fermentadas para producir biocombustibles. La proporción de siringilo/guayacilo mayor a 1.5 y los porcentajes de celulosa cristalina mayor al 60 % muestra

el potencial aprovechamiento en la deslignificación durante el proceso Kraft y en la utilización de la celulosa cristalina en materiales de nanofibras de celulosa.

En cuanto al estudio del flujo de agua, la técnica de absorción de fucsina ácida al 0.2 % permitió identificar el flujo de agua a través del xilema secundario. Esta técnica puede ser utilizada para delimitar las regiones conductoras de las no conductoras, además de las diferencias en el flujo de agua por medio de la tinción de los engrosamientos de la pared secundaria. La tinción de las TBA confirmó la hipótesis de que conducen agua además de almacenarla en el lumen celular.