



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS
AGRÍCOLAS
CAMPUS MONTECILLO
POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
GANADERÍA

Componentes estructurales de la pared celular de hojas de *Lolium perenne* L. y *Festuca arundinacea* Schreb., en distintas etapas de senescencia y su efecto sobre la adhesión y fermentación *in vitro* por microorganismos ruminales

DANIEL TRUJILLO GUTIÉRREZ

PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO

2016

La presente tesis intitulada: **Componentes estructurales de la pared celular de hojas de *Lolium perenne* L. y *Festuca arundinacea* Schreb., en distintas etapas de senescencia y su efecto sobre la adhesión y fermentación *in vitro* por microorganismos ruminales**, realizada por el alumno: **Daniel Trujillo Gutiérrez**, 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

RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD - GANADERÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:



DR. SERGIO SEGUNDO GONZÁLEZ MUÑOZ

ASESOR:



DR. MARIO ANTONIO COBOS PERALTA

ASESOR:



DR. J. EFRÉN RAMÍREZ BRIBIESCA

ASESOR:



DR. MARCOS MENESES MAYO

ASESOR:



DR. JOSÉ LUIS BÓRQUEZ GASTELUM

Montecillo, Texcoco, México, 07 de marzo del 2016

**COMPONENTES ESTRUCTURALES DE LA PARED CELULAR DE HOJAS DE
LOLIUM PERENNE L. Y *FESTUCA ARUNDINACEA* SCHREB., EN DISTINTAS
ETAPAS DE SENESCENCIA Y SU EFECTO SOBRE LA ADHESIÓN Y
FERMENTACIÓN *IN VITRO* POR MICROORGANISMOS RUMINALES**

Daniel Trujillo Gutiérrez

Colegio de Postgraduados, 2016

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de la agregación de la lignina en hojas senescentes de *Lolium perenne* y *Festuca arundinacea* sobre la degradación *in vitro* de los componente celulares del tejido foliar realizada por bacterias ruminales adheridas a residuos de tejido celular. Tres etapas de senescencia foliar (0 %, 30 %, 60%) de los pastos fueron medidos en dos épocas de corte (verano, invierno). Los componentes estructurales de la pared celular de las dos gramíneas se describieron, valoraron y cuantificación mediante histoquímica, y además se realizó una prueba de degradación y fermentación *in vitro*. El diseño experimental fue de parcelas divididas y se usó el procedimiento MIXTO de SAS para evaluar el efecto de época, se realizaron contrastes ortogonales (ESTIMATES) y comparación de medias con la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$; $P \leq 0.01$). La tinción de la lignina aumentó en las fibras de la extensión de la vaina del haz (VH) en las tres etapas de senescencia. La agregación de lignina en la VH fue mayor en la época de verano en los pastos con senescencia 0 %, pero permaneció constante para los pastos con 30 % y 60 % de tejido senescente. La lignina contenida en la nervadura central de la VH de los pastos con senescencia 60 % en verano fue mayor que en

invierno. La época de crecimiento y el grado de senescencia de los pastos tuvo efecto sobre la DIVMS. La producción total de AGV de los tratamientos *Lolium* 30 % y *Festuca* 30 % fueron menores en invierno, pero en verano fueron mayores que los tratamientos con 60 % de senescencia. Para esta investigación se concluye que el envejecimiento celular de las hojas de *Lolium perenne* y *Festuca arundinacea* fue diferente en el ciclo de vida, pero cuando alcanzaron la senescencia máxima mostraron similitudes en cada época de crecimiento. Las hojas de *Festuca arundinacea* con mayor vejez tuvieron un contenido mayor de FDN y FDA, lo cual afecta la respuesta *in vitro* y las variables fermentativas del inóculo ruminal.

Palabras clave: Senescencia foliar, agregación de lignina, degradabilidad *in vitro*, microscopia electrónica de barrido, *Festuca arundinacea*, *Lolium perenne*.

**STRUCTURAL COMPONENTS OF CELLULAR WALL OF *LOLIUM PERENNE* L.
AND *FESTUCA ARUNDINACEA* SCHREB. LEAVES IN DIFFERENT
SENESCENCE STAGES AND THE EFFECT ON *IN VITRO* ADHERENCE AND
FERMENTATION BY RUMINAL MICROORGANISMS**

Daniel Trujillo Gutiérrez

Colegio de Postgraduados, 2016

ABSTRACT

The objective of this research was to evaluate the effect of lignin aggregation in senescent leaves of *Lolium perenne* and *Festuca arundinacea* upon *in vitro* degradation of cell components of foliar tissues performed by ruminal bacterias adhered to cell tissue residues. Three stages of leaf senescence (0 %, 30 %, 60 %) were measured in cutting stages (summer, winter). Structural components of the cell wall of the two grasses were described, evaluated and quantified using histochemistry; besides, an *in vitro* degradation and fermentation test was carried out. The experimental design was split plot and MIXED procedure of SAS was used to evaluate the stage effect, orthogonal constrats were performed and means were compared with Tukey test ($P \leq 0.05$; $P \leq 0.01$). Lignin stain was increased in fibers of the sheath vascular bundles extension. Lignin aggregation in bundle sheath (BS) was higher in the summer season for grasses with 0 % senescence, but it remained constant for grasses with 30 % and 60 % of senescent tissue. Lignin content in BS central vein of grasses with 60 % senescence in summer was higher than in winter. Stage of growth and stage of senescence had an effect on IVDMD. Total VFA production of *Lolium* 30 % and *Festuca* 30 % treatments were lower in winter, but in

summer they were higher than treatments with 60 % senescence. For this research, it is concluded that leaves cell aging of *Lolium perenne* and *Festuca arundinacea* was different during the life cycle, but when the highest senescence was reached, there were similarities for each stage of growth. The oldest leaves of *Festuca arundinacea* showed higher NDF and ADF, which affect *in vitro* response and fermentative variables of the ruminal inoculum.

Key words: Leaf senescence, lignin aggregation, *in vitro* degradation, Scanning Electron Microscopy, *Festuca arundinacea*, *Lolium perenne*.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por la beca otorgada para la realización de los estudios de Postgrado.

Al Dr. Sergio Segundo González Muñoz, al que le estaré agradecido infinitamente por sus consejos, sugerencias y apoyo. Sobre todo por su gran calidez humana y amistad.

A la Dra. Hilda Araceli Zavaleta Mancera le agradezco su valiosa contribución, disposición, sugerencias, y facilidades que me otorgó en el Laboratorio de Histoquímica y Anatomía Vegetal, así como en la Unidad de Microscopía Electrónica.

A los Doctores que formaron parte de mi Consejo Particular: Dr. Mario Antonio Cobos Peralta, Dr. Marcos Meneses Mayo, Dr. J. Efrén Ramírez Bribiesca y Dr. José Luis Bórquez Gastelum por su apoyo, sugerencias y disposición para realizar el presente estudio.

A mi esposa e hijas, que me han dado el ánimo y han sabido esperar durante todo este tiempo, mil gracias.

Agradezco al Sr. Francisco propietario de las parcelas de *Lolium perenne* y *Festuca Arundinacea* por las facilidades otorgadas en el experimento de campo y por su amistad.

DEDICATORIA

A mi esposa Nancy Ayamaín, a mis hijas Lizeth Ayamaín y Daniela Isabella, quienes son lo más importante en mi vida.

Al Dr. José Luis Bórquez Gastelum maestro y amigo, quien en mis años de estudiante de licenciatura fue la persona que me oriento y guio en este camino, mil gracias.

A mis suegros Edmundo, María del Socorro, cuñados Héctor y Perla Diana, quienes siempre han estado a nuestro lado apoyándonos.

A mis amigos, Enrique, Sonia, Juan, Alicia, Damián, Crecencia, Ilya, Santos, y José Guadalupe, con quienes he tenido la dicha de compartir momentos agradables.

A mis primos José Villalba y Angélica Gutiérrez por su apoyo y amistad.

CONTENIDO

	Página
RESUMEN.....	II
ABSTRACT.....	IV
AGRADECIMIENTOS.....	VI
DEDICATORIA.....	VII
CONTENIDO.....	VIII
LISTA DE CUADROS.....	XIII
LISTA DE FIGURAS.....	XV
CAPITULO 1. INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO 2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1 Importancia de los carbohidratos estructurales	3
2.2 Utilización de carbohidratos estructurales de las plantas en la ganadería	3
2.3 Componentes de la pared celular de las gramíneas	4
2.3.1 Pared primaria	4
2.3.2 Pared secundaria	4
2.4 Sistemas de tejidos en plantas con semilla	5
2.5 Morfología y estructura del tallo de gramíneas forrajeras.....	6
2.6 Morfología y estructura de la hoja de gramíneas forrajeras	7
2.6.1 Epidermis	8
2.6.2 Tejido vascular	8
2.6.3 Mesófilo.....	9
2.7 Composición química de los carbohidratos y polímeros estructurales en plantas	10

2.7.1 Celulosa	10
2.7.2 Hemicelulosa y xilanos.....	12
2.7.3 Lignina	13
2.7.4 Biosíntesis de monolignoles en pastos	14
2.8 Muerte celular programada y senescencia en plantas	20
2.9 Degradación enzimática de carbohidratos y polímeros estructurales de la pared celular.....	21
2.10 Degradación enzimática por hongos	21
2.11 Degradación de carbohidratos por microorganismos ruminales.....	22
2.12 Enzimas ruminales relacionadas a la degradación de polímeros de la pared celular vegetal	25
2.12.1 Mecanismo de degradación de celulosa	27
2.12.2 Mecanismo de degradación de hemicelulosas y xilanos	28
CAPÍTULO 3. ESTRUCTURA Y LIGNIFICACIÓN DE LAS HOJAS DE <i>LOLIUM PERENNE</i> L. Y <i>FESTUCA ARUNDINACEA</i> SCHREB., EN TRES ETAPAS DE SENESCENCIA FOLIAR (0, 30 Y 60 %) Y DOS ESTACIONES DE CRECIMIENTO (VERANO E INVIERNO).....	31
3.1 Justificación.....	31
3.2 Objetivos	32
3.3 Hipótesis.....	32
3.4 Material y métodos	32
3.4.1 Localización del sitio experimental vegetal	32
3.4.2 Obtención del material biológico y establecimiento del experimento	35

3.4.3 Crecimiento y senescencia foliar	36
3.4.4 Materia seca y componentes botánicos	36
3.4.5 Contenido químico de los forrajes.....	37
3.4.6 Medición histoquímica de lignina	37
3.5 Análisis estadísticos y diseños experimentales	38
3.5.1 Efecto de la estacionalidad del año sobre el crecimiento y senescencia	38
3.5.2 Diferencias en época de crecimiento	39
3.6 Resultados y discusión	39
3.6.1 Crecimiento y senescencia	39
3.6.2 Contenido químico	41
3.6.3 Anatomía foliar de <i>Lolium perenne</i> con crecimiento en verano en tres etapas de senescencia foliar	45
3.6.4 Anatomía foliar de <i>Festuca arundinacea</i> en tres etapas de senescencia foliar y dos estaciones de crecimiento.....	50
3.6.5 Área relativa de tejido lignificado de <i>Lolium perenne</i> L. y <i>Festuca arundinacea</i> Schreb. en invierno y verano en tres etapas de senescencia.	55
3.6.5.1 Área relativa de tejido lignificado en corte transversal de la hoja.	55
3.6.5.2 Agregación de lignina en el haz vascular de la nervadura central de la hoja (HVNC).....	59
CAPITULO 4. FERMENTACIÓN <i>IN VITRO</i> Y ADHERENCIA BACTERIANA EVALUADA EN TEJIDO FOLIAR DE <i>LOLIUM PERENNE</i> L. Y <i>FESTUCA ARUNDINACEA</i> SCHREB. CON DISTINTA MADUREZ.....	61
4.1 Justificación.....	61

4.2	Objetivos	62
4.3	Hipótesis.....	62
4.4	Material y métodos	62
4.4.1	Homogenización y esterilización del material biológico	63
4.4.2	Clarificado de fluido ruminal.....	63
4.4.3	Recuperación de inóculo de bacterias totales.....	64
4.4.4	Preparación del medio de cultivo	64
4.4.5	Medición de pH a las 72 h fermentación del medio de cultivo inoculado con bacterias ruminales.....	66
4.4.6	Medición del potencial REDOX del medio de cultivo inoculado con fluido ruminal a las 72 h después de la incubación	66
4.4.7	Preparación de la muestra y medición de los AGV	67
4.4.8	Filtración y secado del material degradado <i>in vitro</i>	67
4.4.9	Preparación y observación mediante microscopía electrónica de barrido (MEB).....	68
4.5	Análisis estadísticos y diseños experimentales	69
4.5.1	Efecto de época de crecimiento	69
4.5.2	Diferencias en época de crecimiento	69
4.6	Resultados y discusión.....	70
4.6.1	Degradación <i>in vitro</i> de tejido foliar de <i>Lolium perenne</i> y <i>Festuca arundinacea</i> inoculado con poblaciones microbianas totales de rumen	70
4.6.2	Perfil de ácidos grasos volátiles producidos por la degradación de tejido vegetal de los forrajes.....	74

4.6.3 Adherencia de bacterias ruminales a residuos sólidos de tejido foliar degradados <i>in vitro</i>	78
CAPITULO 5. CONCLUSIONES.....	85
CAPÍTULO 6. LITERATURA CITADA.....	87

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Microorganismos ruminales de mayor importancia en la degradación de ingredientes en la dieta.....	23
Cuadro 2. Enzimas ruminales degradadoras de carbohidratos y polímeros de la pared celular vegetal.....	26
Cuadro 3. Eventos meteorológicos durante el período de medición de crecimiento y senescencia en la época de invierno.....	35
Cuadro 4. Eventos meteorológicos durante el período de medición de crecimiento y senescencia en la época de verano.....	35
Cuadro 5. Comportamiento promedio de senescencia foliar de <i>Lolium perenne</i> L. y <i>Festuca arundinacea</i> Schreb. durante los períodos de crecimiento.....	40
Cuadro 6. Promedio de senescencia foliar y componentes botánicos de <i>Lolium perenne</i> L. y <i>Festuca arundinacea</i> en invierno y verano.....	41
Cuadro 7. Contenido químico (g kg ⁻¹) de tejido foliar en tres etapas de senescencia foliar.....	43
Cuadro 8. Contrastes ortogonales para el contenido de MS en <i>Lolium perenne</i> y <i>Festuca arundinacea</i> entre épocas de crecimiento.....	44
Cuadro 9. Área relativa (%) de tejido lignificado en corte tansversal de la hoja entera	

y en nervadura central de <i>Festuca arundinacea</i> y <i>Lolium perenne</i> medidas en verano e invierno.....	56
Cuadro 10. Contrastes ortogonales para el porcentaje relativo de agregación de lignina en la vaina del haz de las especies <i>Lolium perenne</i> y <i>Festuca arundinacea</i>	58
Cuadro 11. Contrastes ortogonales para el porcentaje relativo de agregación de lignina en el haz vascular de la nervadura central de las especies <i>Lolium perenne</i> y <i>Festuca arundinacea</i>	59
Cuadro 12. Composición del medio de cultivo G-FR utilizado para evaluar variables fermentativas y degradación <i>in vitro</i> de la materia seca de las gramíneas en estudio.....	65
Cuadro 13. Variables de degradación <i>in vitro</i> de tejido foliar de las gramíneas inoculadas con poblaciones totales de rumen.....	72
Cuadro 14. Contrastes ortogonales de la DIVMS de <i>Lolium perenne</i> y <i>Festuca arundinacea</i>	73
Cuadro 15. Perfil de AGV's de la degradación <i>in vitro</i> de tejido foliar de <i>Lolium perenne</i> y <i>Festuca arundinacea</i>	75
Cuadro 16. Contrastes ortogonales de la concentración total de AGV's de la fermentación <i>in vitro</i> de <i>Lolium perenne</i> y <i>Festuca arundinacea</i>	77

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Modelo de la pared celular de plantas y orientación de microfibrillas en la pared primaria y capas de una célula de xilema.....	5
Figura 2. Morfología de una gramínea típica.....	7
Figura 3. Diagrama de anatomía Kranz en pasto C4 (<i>Panicum capillare</i>).....	9
Figura 4. Estructura anatómica de la hoja C3 de <i>Lolium perenne</i>	10
Figura 5. Estructura detallada de la pared celular.....	11
Figura 6. Representación de un polímero de lignina.....	15
Figura 7. Precursores de ligninas que producen nuevas ligninas en los pastos.....	17
Figura 8. Ruta biosintética a monolignoles en pastos.....	18
Figura 9. Mecanismo de degradación enzimática de celulosa.....	27
Figura 10. Degradación enzimática de hemicelulosas.....	29
Figura 11. Condiciones climatológicas del período de medición agosto 2012 – marzo 2013.....	33
Figura 12. Condiciones climatológicas del período de medición mayo 2013–septiembre 2013.....	34
Figura 13. Efecto de la época de crecimiento sobre el contenido de MS de <i>Lolium perenne</i> y <i>Festuca arundinacea</i>	45

Figura 14. Anatomía foliar de <i>Lolium perenne</i> L. en verano con senescencia 0 % (A, B, C; verde, con lígula expuesta y pre senescente), 30 % (D, E, F) y 60% (G, H, I) de senescencia.....	47
Figura 15. Anatomía foliar de <i>Lolium perenne</i> L. en invierno con senescencia 0 % (A, B, C; verde, con lígula expuesta y pre senescente), 30 % (D, E, F) y 60% (G, H, I).....	49
Figura 16. Anatomía foliar de <i>Festuca arundinacea</i> Scherb. en verano con senescencia 0 % (A, B, C; verde, con lígula expuesta y pre senescente), 30 % (D, E, F) y 60 % (G, H, I).....	51
Figura 17. Anatomía foliar de <i>Festuca arundinacea</i> Scherb. en invierno con senescencia 0 % (A, B, C; verde, con lígula expuesta y pre senescente), 30 % (D, E, F) y 60% (G, H, I).....	53
Figura 18. Comportamiento a través de las épocas de medición de la agregación de lignina en el área total de la hoja de <i>Lolium perenne</i> y <i>Festuca arundinacea</i>	58
Figura 19. Agregación promedio de lignina en HVNC de las especies <i>Lolium perenne</i> y <i>Festuca arundinacea</i> entre las épocas de medición.....	60
Figura 20. Degradación <i>in vitro</i> de la materia seca de tejido foliar de <i>Lolium perenne</i> y <i>Festuca arundinacea</i>	73
Figura 21. Perfil de ácidos grasos volátiles producido por la fermentación <i>in vitro</i> de	

tejido foliar de <i>Lolium perenne</i> y <i>Festuca arundinacea</i>	78
Figura 22. Microestructura observada con MEB de tejido foliar de verano previo degradacion <i>in vitro</i> de <i>Lolium perenne</i> (A; 0%, B; 30%, C; 60% senescencia) y <i>Festuca arundinacea</i> (D; 0%, E; 30%, F; 60% de senescencia).....	81
Figura 23. Microestructura (MEB) de tejido foliar de invierno, previo a incubación <i>in vitro</i> , de <i>Lolium perenne</i> (A; 0%, B; 30%, C; 60% senescencia) y <i>Festuca arundinacea</i> (D; 0%, E; 30%, F; 60% senescencia).....	82
Figura 24. Microestructura observada con MEB de tejido foliar de verano, degradado <i>in vitro</i> , de <i>Lolium perenne</i> (A; 0%, B; 30%, C; 60% senescencia) y <i>Festuca arundinacea</i> (D; 0%, E; 30%, F; 60% senescencia).....	83
Figura 25. Microestructura observada con MEB de tejido foliar de invierno degradado <i>in vitro</i> de <i>Lolium perenne</i> (A; 0%, B; 30%, C; 60% senescencia) y <i>Festuca arundinacea</i> (D; 0%, E; 30%, F; 60% senescencia).....	84

CAPITULO 1. INTRODUCCIÓN

Los sistemas de producción semiintensivos y de traspastio de rumiantes predominan en países en desarrollo y se caracterizan por usar forrajes de mediana a baja calidad con distintas proporciones de componentes estructurales en la pared celular. En la mayoría de los vegetales la pared celular contiene 40-45 % de celulosa, 30-35 % de hemicelulosa y 20-23 % de lignina (Bhat y Hazlewood, 2003). La biomasa lignocelulósica de las plantas es una fuente potencial de energía para diversas especies pecuarias debido a su alto contenido de carbohidratos. Para incrementar la disponibilidad de nutrientes es necesario romper los enlaces entre la celulosa, hemicelulosa y lignina; así, la población de microorganismos adheridos a sólidos en el rumen es más activa durante la degradación de polisacáridos de la pared celular vegetal (Allen, 1997). Por lo tanto, la actividad enzimática bacteriana es un proceso importante en la liberación de fuentes de carbono. La senescencia foliar involucra una serie de reacciones bioquímicas y estructurales regulada por los genes asociados a la senescencia (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2003), y es promovida por factores ambientales extremos, edad, desarrollo reproductivo, niveles de fitohormonas y estrés oxidativo (McCarthy *et al.*, 2001). Los factores endógenos más importantes que inducen la senescencia son la edad de las hojas y estado de desarrollo de la planta. En láminas foliares de gramíneas anuales después de la expansión completa, se presenta una disminución continua en la tasa de fotosíntesis, (Shusheng, 2007). En la diferenciación de los elementos traqueales, la pared celular se engrosa y lignifica, seguido por la muerte y rompimiento del protoplasma por autólisis. Los genes expresados durante esta fase incluyen a los codificantes de

fenilalanina amonio liasa (PAL), tirosina amonio liasa (TAL), ácido cinámico 4-hidrolasa (C4H), cinamil alcohol deshidrogenasa (CAD), y otras enzimas del metabolismo del fenilpropanoide (Russel *et al.*, 2013); la lignina utiliza los monómeros de este metabolismo como iniciadores en la adición de unidades de acetato a su estructura (Petersen *et al.*, 2010). Cambios en las condiciones ambientales tienden a aumentar los constituyentes de la pared celular en *Festuca arundinacea*, lo cual reduce la degradación *in vitro* (Deinum y Dirven, 1971). Según Jung y Engels (2002), la digestibilidad disminuye con la madurez de la planta debido al incremento de la proporción de la pared celular en tallo y hoja, lo cual tiene un efecto sobre la calidad de los pastos disponibles para los rumiantes.

CAPÍTULO 2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Importancia de los carbohidratos estructurales

Los forrajes y granos se usan en la alimentación de rumiantes y la biomasa lignocelulósica también es importante en usos industriales y para producción de biocombustibles como el etanol (Pinheiro y Policastro, 2012). A lo anterior se suma la creciente preocupación ambiental por la generación de residuos orgánicos contaminantes y la consecuente emisión de gases de efecto invernadero (Martínez *et al.*, 2009). En los sistemas de producción pecuaria el precio de los alimentos es elevado y la viabilidad de la explotación depende de los costos relativos y valor nutritivo de los ingredientes. Si los alimentos no son digeridos de manera eficiente, ocurren pérdidas económicas para el productor y daños al ambiente.

2.2 Utilización de carbohidratos estructurales de las plantas en la ganadería

Todos los forrajes están compuestos de un conjunto heterogéneo de moléculas con características únicas que determinan la disponibilidad de los polisacáridos para los microorganismos del rumen (Jung y Allen, 1995). La disminución de la digestibilidad de los forrajes está asociada al incremento de la pared celular y lignificación de los tejidos a medida que maduran (Terashima *et al.*, 1993). La utilización en sistemas pecuarios de biomasa vegetal para la generación de alimento de origen animal, demanda el empleo de nuevas tecnologías que permitan procesos eficientes de transformación y uso de los recursos naturales (Gasser *et al.*, 2003).

2.3 Componentes de la pared celular de las gramíneas

2.3.1 Pared primaria

La pared celular primaria está compuesta de microfibrillas de celulosa, hemicelulosa, glucoarabinosilanos, β -D glucanos, xiloglucanos (pared Tipo I), glucomananos, proteínas ricas en hidroxiprolina (HRGPs), en prolina (PRPs) y en glicina (GRPs: Cassab, 1998), además de compuestos aromáticos, sílice (Carpita, 1996) y pectinas (Bidlack *et al.*, 1992), los cuales forman una matriz viscosa que cementa a las paredes celulares adyacentes. Las microfibrillas de celulosa están compuestas de cadenas lineales de D-glucosa unidas por enlaces β -(1 \rightarrow 4) formando un largo arreglo cristalino, alrededor de cada célula. La pared primaria de células adyacentes está separada por la lámina media y ambas estructuras no se lignifican (Wilson, 1993). La composición molecular precisa varía entre tipos de células, tejidos y especies de plantas, con un estimado aproximado de 30 % celulosa, 25 % hemicelulosa, 35 % pectina y 10 % proteína (Gadd, 2001).

2.3.2 Pared secundaria

La pared secundaria se produce cuando la célula ha terminado de crecer y su principal característica es la presencia de lignina en la pared. Está formada por tres capas (S1, S2, y S3) diferenciadas por la orientación de las microfibrillas de celulosa, está ubicada en el lado interno de la pared primaria y se sintetiza cuando la expansión celular termina (Himmel, 2008; Figura). Las microfibrillas de celulosa se orientan en diferentes ángulos, en cada nivel de las tres capas secundarias de la pared, lo cual proporciona mayor longitud y está relacionado de manera particular

con la orientación de las microfibrillas de celulosa cristalina (Gadd, 2001). Las paredes celulares con engrosamiento secundario están constituidas por 35 % celulosa, 25 % hemicelulosa incluyendo pectina y más de 35 % de lignina, lo cual depende de la especie de planta. Los xilanos son los polisacáridos más abundantes no celulósicos de la pared secundaria en angiospermas (Awano *et al.*, 2002).

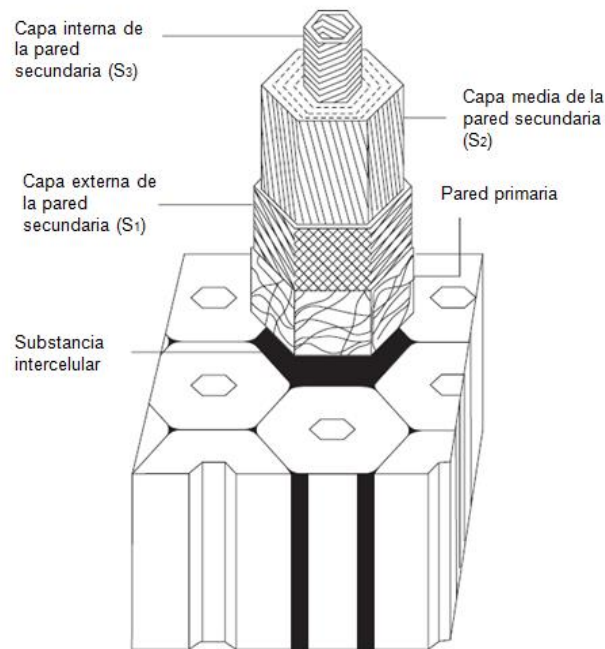


Figura 1. Modelo de la pared celular de plantas y orientación de microfibrillas en la pared primaria y capas de una célula de xilema (Modificado de Himmel, 2008).

2.4 Sistemas de tejidos en plantas con semilla

Las plantas vasculares están compuestas principalmente por tres sistemas de tejidos: epidermal, vascular y fundamental. La epidermis proviene de la protodermis, meristemo primario presente en el embrión, este tejido es la capa más externa de la planta y le da protección al medio mediante con una capa cerosa llamada cutícula (Esau, 1977; Evert, 2006) El tejido vascular proviene del procambium, meristemo

primario presente en el embrión y está formado por el floema y xilema. El tejido fundamental proviene del meristemo fundamental y constituye el tejido de relleno, como el mesófilo de las hojas, corteza de tallos, raíces y médula de tallos. La distribución de estos tejidos depende del grupo taxonómico, parte vegetal y tipo de fotosíntesis en hoja (C_3 o C_4). El tejido vascular se encuentra dentro del fundamental y la epidermis forma la cubierta más externa. La principal variación depende de la distribución y proporción de tejido vascular y fundamental, tanto en tallo como en hoja (Esau, 1977).

2.5 Morfología y estructura del tallo de gramíneas forrajeras

Las gramíneas constan de un tallo, caña o culmo cilíndrico y está articulado en ciertos puntos llamados nudos, en los cuales se insertan las hojas a lo largo del tallo, en posición alterna y opuesta (Posada, 2005; Figura 2). El tallo de las gramíneas tiene una estructura rígida en la cual hay grandes proporciones de tejidos lignificados (Akin, 1989). Mediante un corte transversal se observa que los tallos contienen haces vasculares dispersos que forman un cilindro continuo de esclerénquima, hebras fibrosas entre haces pequeños y epidermis, y hebras de clorénquima alternadas con las de fibra (Esau, 1977). Las células del parénquima ocupan 50 a 60 % del área transversal y varían en digestibilidad e histología de la lignina, lo cual depende de la especie y edad de la planta. La epidermis, anillo de esclerénquima y xilema vascular ocupan 28 a 34 % del área transversal, reaccionan con floroglucinol-HCl (F-HCl) para tinción de lignina y es resistente a la biodegradación (Akin, 1989; Akin, 2007).

2.6 Morfología y estructura de la hoja de gramíneas forrajeras

Las hojas de los pastos consisten de una lámina estrecha y una vaina rodeando el tallo. Las hojas de pastos de zonas templadas tienen vía fotosintética C_3 , se caracterizan por haces vasculares espaciados y mesófilo con un arreglo determinado esponjoso (Wilson *et al.*, 1983; Akin, 1989), que determinarán el grado de degradación realizada por bacterias y enzimas ruminales. Esta estructura tiende a ser degradada de manera rápida, dado que sólo el esclerénquima, tejido vascular y cutícula pueden afectar la degradación (Akin, 1989).

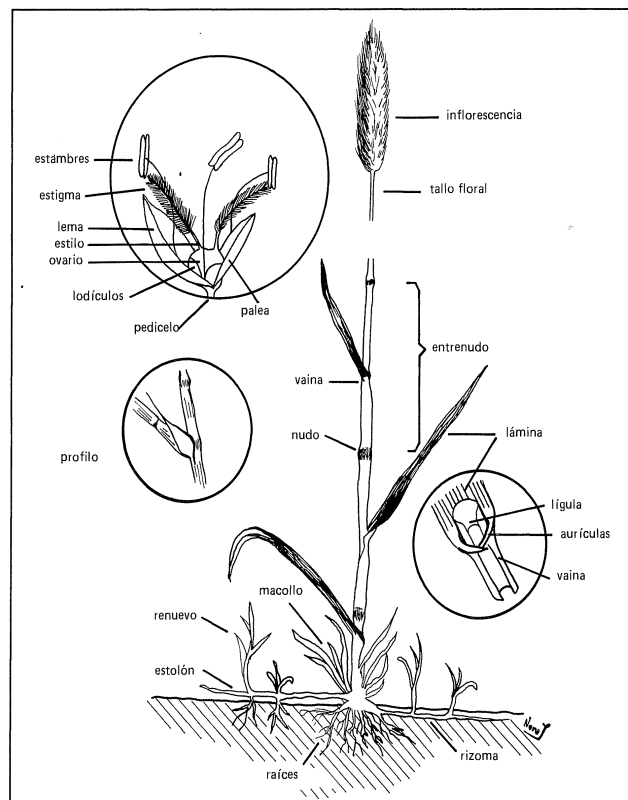


Figura 2. Morfología de una gramínea típica (Modificado de Ruiz, 1988).

2.6.1 Epidermis

La epidermis está unida al cuerpo de la hoja a través de células del mesófilo (Figura 4), pero en pastos de zonas tropicales y en algunos de zonas templadas, está unida al haz vascular a través de células de esclerénquima, lo cual dificulta su desdoblamiento. El desarrollo de la epidermis se caracteriza por un engrosamiento tangencial de la pared y presencia de una cubierta cerosa en la capa más externa de sus células, llamada cutícula, que inhibe la penetración y digestión microbiana (Essau, 1977).

2.6.2 Tejido vascular

El xilema y floema constituyen el sistema vascular encontrado en hoja, raíz y tallo. El xilema provee el soporte estructural de las plantas (Park, 2009) y está compuesto por miembros de vaso en angiospermas con distinto engrosamiento de la pared celular y traqueidas, mientras que el floema está constituido por miembros de tubo criboso con células acompañantes (Essau, 1977; Evert, 2006). El tejido vascular del tallo a lo largo del pecíolo y hoja a menudo forman una vena, con algunas protuberancias conspicuas debajo de la superficie de la hoja. En plantas con anatomía Kranz, la vaina del haz en la periferia de los haces vasculares está modificada como tejido de reducción fotosintética de carbono (RFC). Las células del haz vascular (Figura 3) son largas en comparación con sus contrapartes en especies C3, tienen gran número de cloroplastos, almidón y un arreglo asimétrico de componentes citoplásmicos (Carolin *et al.*, 1973). Las células del mesófilo son similares a sus homologas en especies C3 pero son alargadas en dirección radial, un arreglo que permite estar en contacto con

el tejido RFC (Brown, 1975). El volumen intercelular de espacios de aire es más bajo en plantas C4 que en algunas especies C3 y en ambos la forma de las células de la vaina del haz (CVH) y el arreglo de las células del mesófilo reduce el contacto entre la superficie de las células y el espacio de aire intercelular (Rowan y Russell, 1998; Byott, 1976).

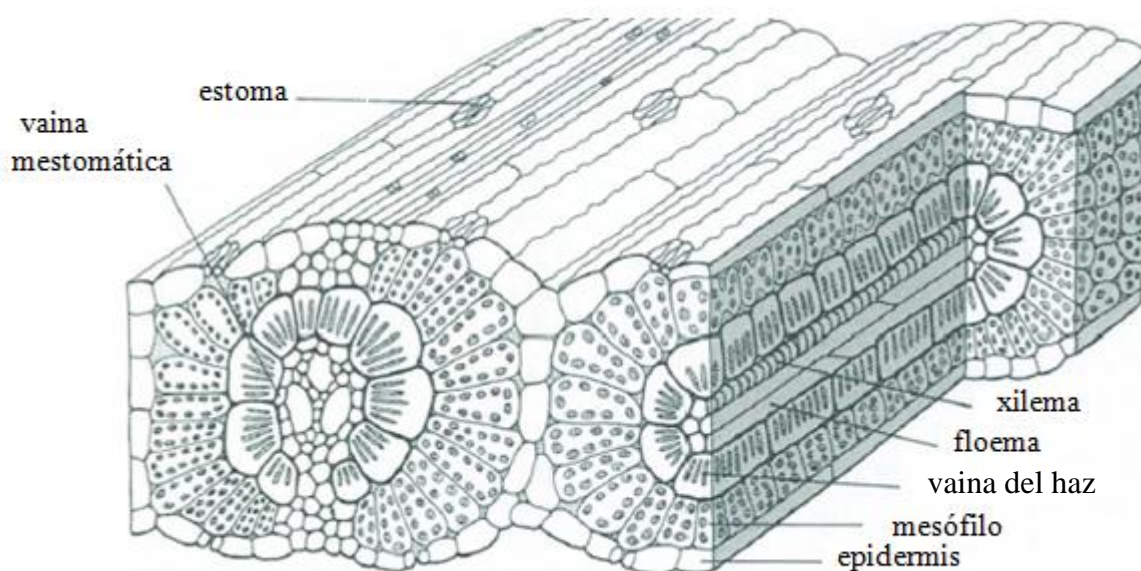


Figura 3. Diagrama de anatomía Kranz en pasto C4 (*Panicum capillare*). Modificado de Rowan y Russell (1998).

2.6.3 Mesófilo

Las células del mesófilo (colénquima) se localizan entre la epidermis adaxial y abaxial, son fácilmente digestibles, constituyen el principal volumen de tejido en la hoja y es casi totalmente digestible (Essau, 1977). El espacio intercelular en hoja de pastos C3 es mayor que en pastos C4, lo cual se relaciona con una mayor penetración de bacterias y por lo tanto, una mejor digestibilidad; sus células están

rodeadas por aire que permite el movimiento de gases (Figura 4); además representa el tejido fotosintético de la hoja. En este se encuentran el xilema y floema (Evert, 2006).

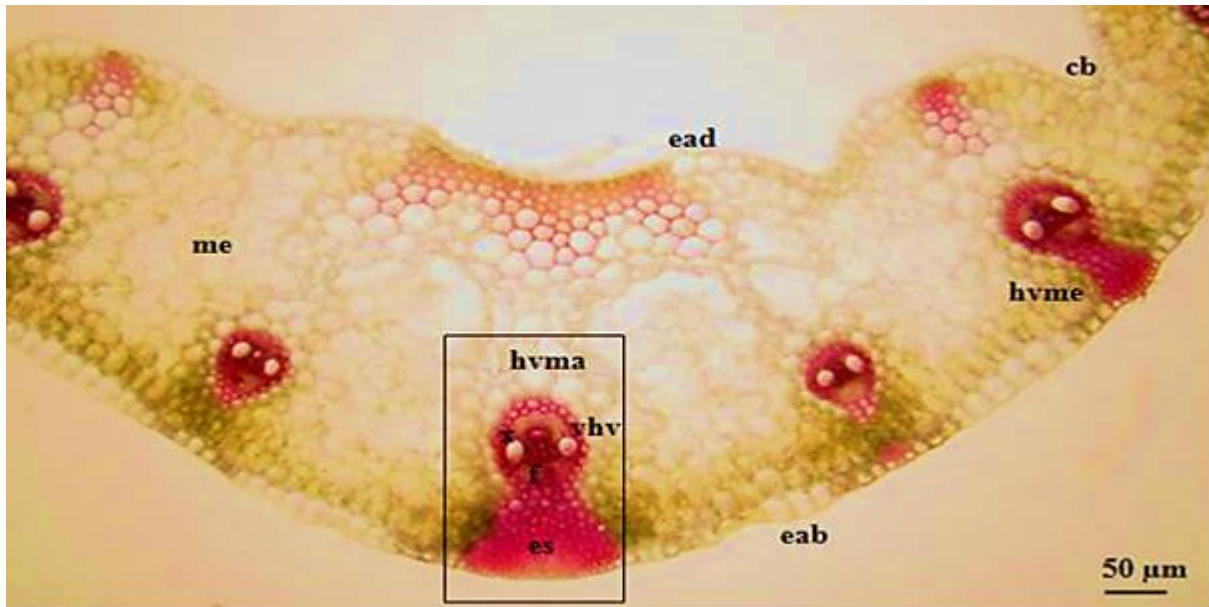


Figura 4. Estructura anatómica de la hoja C3 de *Lolium perenne* (Trujillo, 2015). ead, epidermis adaxial; eab, epidermis abaxial; me, mesófilo; hvh, vaina del haz vascular; hvma, haz vascular mayor; hvme, haz vascular menor; f, floema; x, xilema; cb, células bisagra; es, esclerénquima de la extensión de la vaina del haz. Imagen tomada en Laboratorio de Histoquímica y Anatomía Vegetal, Colegio de Postgraduados.

2.7 Composición química de los carbohidratos y polímeros estructurales en plantas

2.7.1 Celulosa

Este componente de la pared celular vegetal está formado por polimerización de

moléculas D-glucosa unidas con enlaces de hidrogeno en posición (1→4) β-D-glucano en cadenas lineales formada por unidades de celobiosa en cadenas paralelas (Figura 5), formando microfibrillas de 3 nm aproximado de diámetro por 25 nm de largo (Evert, 2006). Estas microfibrillas cristalinas están colocadas bajo diferentes orientaciones dentro de la pared primaria y dan soporte estructural a la pared. Las moléculas de celulosa tienen una fuerza de 50-160 kg mm⁻², que evita su rompimiento (Frey-Wyssling, 1976).

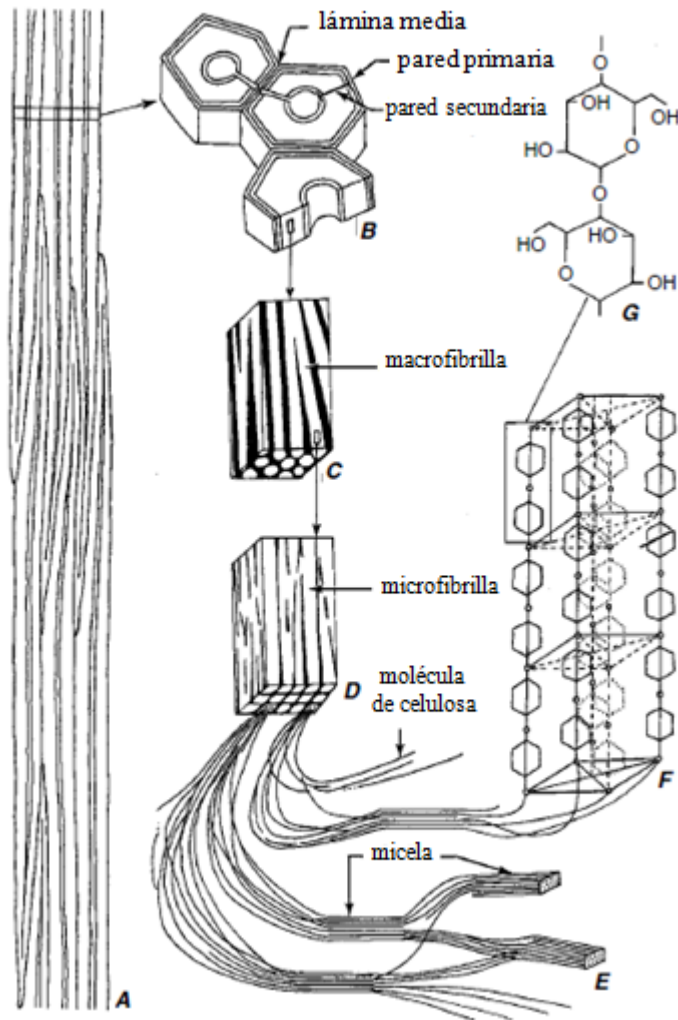


Figura 5. Estructura detallada de la pared celular. A, hebra de fibras; B, sección transversal de fibras, mostrando engrosamiento de capas: una capa de pared

primaria y tres capas de pared secundaria; C, fragmento de la capa media de la pared secundaria mostrando microfibrillas; D, fragmento de una microfibrilla mostrando. E, estructura de microfibrillas: moléculas unidas a la cadena de celulosa en el cual algunas partes de las microfibrillas son arregladas ordenadamente (micelas). F, fragmento de una micela mostrando partes de una cadena de celulosa unida a moléculas. G, dos moléculas de glucosa unidas por un átomo de oxígeno (Modificado de Essau, 1977).

2.7.2 Hemicelulosa y xilanos

La hemicelulosa es un grupo heterogéneo de glucanos no cristalinos unidos estrechamente en la pared celular y cuya proporción varía entre especies. Dentro de la pared celular esta mezcla de polímeros de diferentes polisacáridos, en su fase neutra o ácida, está adherida a la superficie de las microfibrillas de celulosa, a través de enlaces de hidrógeno unidos en los grupos OH de los azúcares, lo cual mejora la fuerza de la pared celular (Rose, 2003). Los polisacáridos pécticos están unidos covalentemente a la hemicelulosa (Gadd, 2001). Los xiloglucanos son las hemicelulosas principales de la pared celular primaria de dicotiledóneas y en cerca de la mitad de las monocotiledóneas consiste en cadenas cortas lineales de (1→4) β -D-glucano como en la celulosa, con cadenas cortas de xilosa, galactosa y a menudo fucosa (Carpita y McCann, 2000). Muchos xiloglucanos estarían unidos de manera estrecha con las microfibrillas de celulosa y tienen una función importante en la regulación del alargamiento de la célula. Las principales hemicelulosas en las paredes celulares de las monocotiledóneas (Poales, Zingiberales, Commelinales y Arecales) son los glucuronoarabinoxilanos, los cuales se caracterizan por tener una

columna de (1→4) β-D-xilosa y pueden unirse por enlaces de hidrógeno a la celulosa. La pared primaria de los pastos se distingue de otras monocotiledóneas por la presencia de enlaces mezclados (1→3), (1→4) β-D-glucanos (Carpita, 1996), y estas células de la pared primaria se llaman pared Tipo II (Darley *et al.*, 2001).

El xilano es el componente mayoritario de la hemicelulosa (Ulvskov, 2011), la cual consiste de polímeros de pentosas (xilosa, arabinosa), hexosas (glucosa, manosa, galactosa), o ácidos urónicos (glucurónico, galacturónico), y la cadena consta de 30-100 unidades de β-D-xilopiranosas con enlaces 1,4-glicosídicos. La hemicelulosa es abundante en las paredes celulares de los cereales (Poaceae) y en plantas maderables, y es un componente menor en las paredes celulares de dicotiledóneas y monocotiledóneas no gramináceas (Darvill *et al.*, 1980; Ebringerova y Hienze, 2000). Los xilanos se encuentran en cereales y son sustituidos en una alta proporción con residuos simples o cadenas cortas de enlaces α-1,2- o α-1,3- enlazados a residuos de l-arabinofuranosa y, por lo tanto, son conocidos como arabinoxilanos (Izydorczyk y Biliaderis, 1995). Los residuos de l- arabinosa pueden ser esterificados con residuos O-5 con ferulil o p-cumaril.

2.7.3 Lignina

La lignina es un polímero fenólico, el más abundante después de la celulosa y tiene una función importante en el soporte estructural de las plantas (Run-Cang, 2010; Whetten y Sederoff, 1995). Es un polímero aromático tridimensional del cual hay muchos polímeros aromáticos (Ralph *et al.*, 2004; Figura 6) y está unido covalentemente a la hemicelulosa. Este compuesto es sintetizado mediante tres tipos

de monolignoles: alcohol *p*-cumaril, alcohol coniferil, y alcohol sinapil; además contiene coniferil aldehído, sinapil aldehído, alcohol dihidroxiconiferil, ferulato tiramina, alcohol 5-hidroxiconiferil, *p*-hidroxi-3-metoxibenzaldehído, *p*-hidroxibenzoato, *p*-cumarato y acetato (Vanholme *et al.*, 2010). Después de la polimerización, las subunidades de lignina se denominan *p*-hidroxifenil (H), guayacil (G) y siringil (S), lo cual depende de sí estos fueron originadas por los alcoholes *p*-cumaril, coniferil y sinapil, respectivamente (Novo Uzal *et al.*, 2009). Los ácidos cinámicos (ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico y ácido sinápico), también forman puentes entre lignina y carbohidratos (Martínez *et al.*, 2009). Todos estos componentes se agregan en diferentes proporciones, las cuales dependen de la especie, etapa fenológica y medio ambiente.

2.7.4 Biosíntesis de monolignoles en pastos

El primer paso en la biosíntesis de monolignoles es la desaminación de la L- fenil alanina o tirosina por la fenil amonio liasa (PAL, enzima clave en el metabolismo secundario) o por tirosina amonio liasa (TAL) y producen ácido cinámico o ácido *p*-cumárico (*p*-CA), respectivamente (Sun, 2010). Las subunidades de PAL son típicamente codificadas por familias multigénicas en angiospermas. La hidroxilación a la posición C4 del ácido cinámico a *p*-CA es catalizada por ácido cinámico 4-hidrolasa (C4H), una monooxigenasa citocromo P450 perteneciente a la subfamilia CYP73 (Teutsch, 1993). La formación de ésteres cinamil-CoA están involucrados en la biosíntesis de una variedad amplia de fenólicos, catalizados por 4-cumarato: ligasa CoA (4CL). La reducción de los tioesteres hidroxicinamil-CoA a los correspondientes hidroxicinamil aldehídos es catalizada por cinamil-CoA reductasa (CCR). La cinamil

alcohol deshidrogenasa (CAD) cataliza el último paso en la biosíntesis de los precursores de la lignina, el cual es la reducción de cinamil aldehídos a cinamil alcoholes.

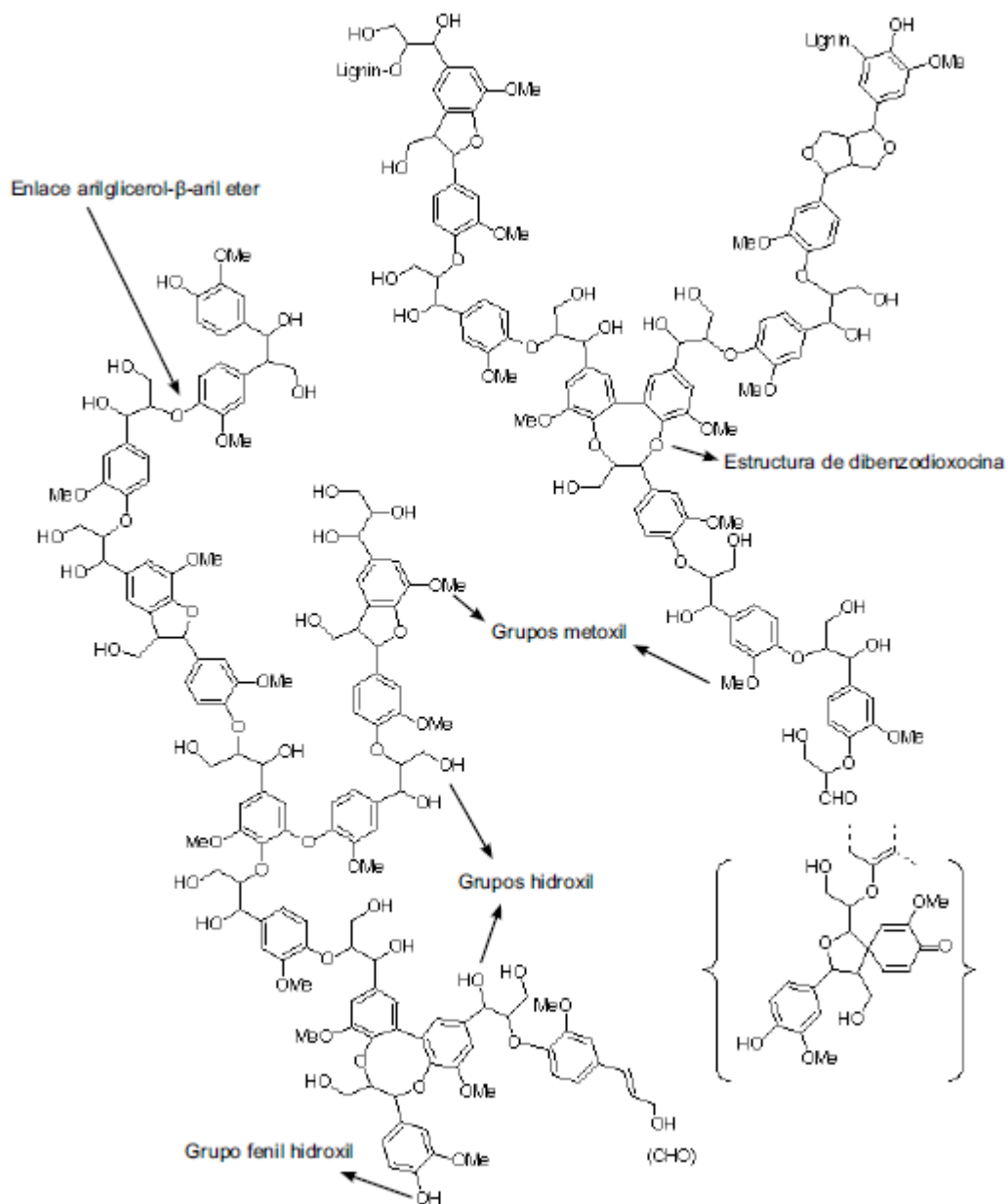


Figura 6. Representación de un polímero de lignina (Modificado de Palonen, 2004).

Según Sun (2010), la enzima p-Cumarato 3-hidrolasa (C3H) catalizaba la hidroxilación en el C3 de p-CA a la forma de ácido cafeico. Sin embargo, C3H fue clonada de *Arabidopsis* y se mostró que es una monooxigenasa dependiente del citocromo P450 (Teutsch, 1993).

En experimentos enzimáticos se encontró que los ésteres de quinato y shiquimato de p-CA son los sustratos preferidos para C3H. Por lo tanto, solo en la ruta de la biosíntesis de monolignoles de *Arabidopsis*, p-cumarato debería ser primero convertido a p-cumaril-CoA por 4CL seguido por una conversión aciltransferasa-catalizada a p-cumaril shiquimato o cafeil quinato (ácido clorogénico) dentro de cafeil-CoA, el sustrato para CCoAOMT (Hoffman *et al.*, 2003). Sun (2010) purificó p-hidroxicinamil-CoA: quinato shikimato p-hidroxicinamiltransferasa (HTC), una reversible aciltransferasa, y clonó sus genes clonados. La función predominante de CCR es para catalizar la reducción de hidroxical-CoA tioesters a sus correspondientes aldehídos.

Con CCoAOMT se metila cafeil-CoA para producir ferulil-CoA. La ferulato 5-hidroxilasa (F5H) fue primero usada para catalizar la hidroxilación a la posición del C5 de ácido ferúlico a ácido 5-OH ferúlico. Pero, el sustrato preferencial para F5H no fue ácido ferúlico, sino alcohol coniferil aldehído y alcohol coniferil (Humpheys *et al.*, 1999; Osakabe *et al.*, 1999). De manera similar, se planteó usar ácido cafeico O-metiltransferasa (COMT) para la metilación de ácido cafeico/ácido 5-OH ferúlico dentro de ácido ferúlico/ácido cinámico, usando S-adenosil metionina como grupo donador de metilo. Los productos de la hidroxilación catalizada de F5H, 5-hidroxiconiferaldehído y alcohol 5-hidroxiconiferil son buenos sustratos para COMT,

no así el ácido cafeico (Humpheys *et al.*, 1999). La COMT cataliza la O-metilación sobre la posición de C5 de 5-hidroxiciniferilaldehído/ (alcohol ciniferil) y puede actuar sobre la posición del C3 de cafeil-aldehído/alcohol (Do *et al.*, 2007).

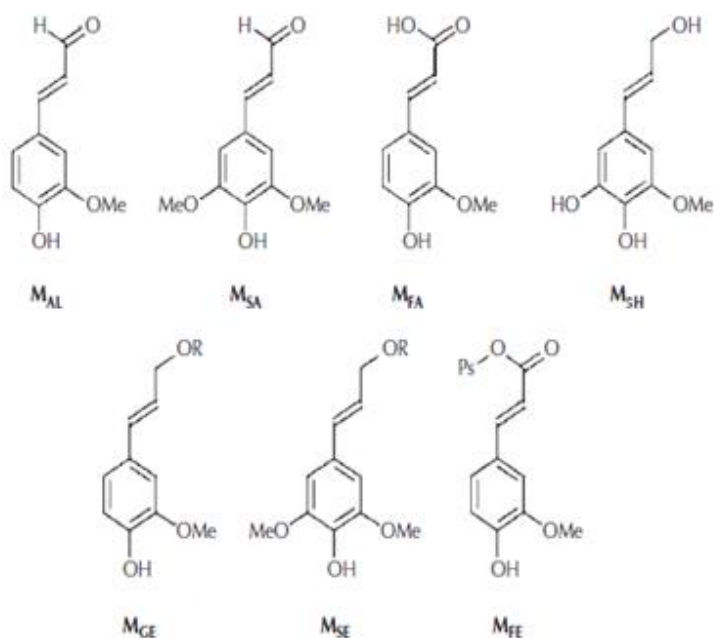


Figura 7. Precursores de ligninas que producen nuevas ligninas en los pastos. M_{AL}, ciniferil aldehído; M_{SA}, sinapil aldehído; M_{FA}, ácido ferulico; M_{SH}, alcohol 5-hidroxifenil; M_{GE}, ester de ciniferil; M_{SE}, ester de sinapil; M_{FE}, ferulato; R, acetato, *p*-hidroxibenzoato, *p*-cumarato; Ps, polisacáridos. Adaptado de Lu y Ralph (2010).

Lu y Ralph (2010) mostraron que las ligninas de los pastos derivan no solo de los tres monolignoles tradicionales, sino también de acetilados de alcoholes sinapil/ciniferil (Figura 7), por lo cual se considera a los ferulatos precursores de las ligninas de los pastos (Lu y Ralph, 2008; Lu y Ralph, 2005; Vanholme *et al.*, 2008).

Esos monolignoles acilados y ferulatos rápidamente copolimerizan con los alcoholes p-cumaril, coniferil y sinapil para producir ligninas de los pastos con características únicas (Figura 8).

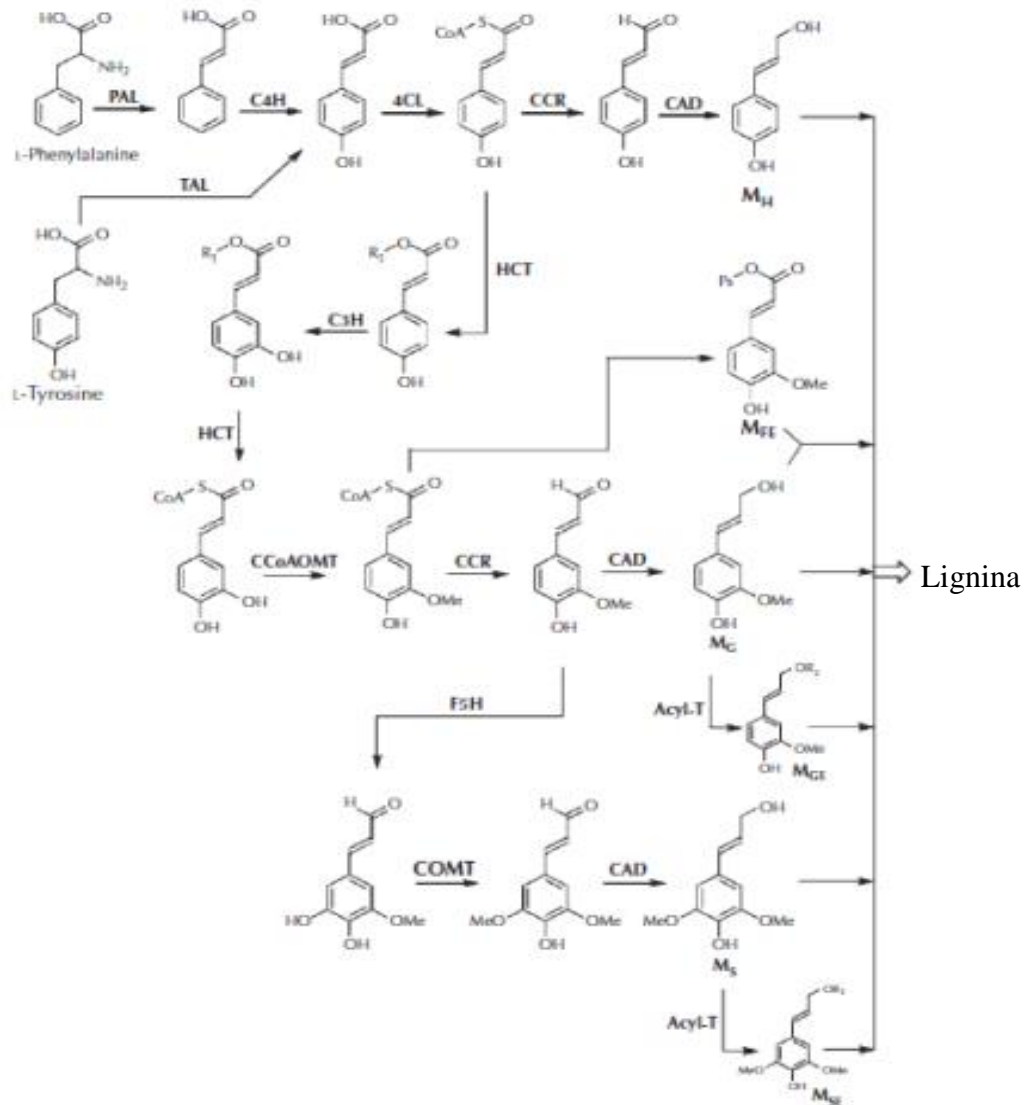


Figura 8. Ruta biosintética a monolignoles en pastos. PAL, fenilalanina amonio liasa; TAL, tirosina amonio liasa; C4H, cinamato 4-hidroxilasa; 4CL, 4-cumarato: CoA ligasa; HCT, p-hidroxicimil-CoA: quinato shiquimato p-

hidroxiconaltransferasa; C3H, *p*-cumarato 3-hidroxilasa; CCoACOMT, cafeil-CoA O-metiltransferasa; CCR, cinamil-CoA reductasa; COMT, ácido cafeico/5-hidroxiconiferaldehído O-metil transferasa; CAD, cinamil alcohol deshidrogenasa; F5H, ferulato 5-hidroxilasa; Acyl-T, acetil transferasa; Ps, polisacáridos; R1, ácido shiquimico o ácido quinico; R2, acetato, *p*-hidroxibenzoato, *p*-cumarato. Adaptado de Vanholme *et al.* (2008).

El lugar donde sucede la lignificación es la matriz de la lámina media y las paredes secundarias. Las nanopartículas de lignina (10-70 nm) están probablemente dispersas en principio y se juntan para formar el polímero de lignina (Lairez *et al.*, 2005; Inomata *et al.*, 1992). Además, la pared secundaria se puede distinguir por las capas que la constituyen S1, S2 y S3, donde las microfibrillas de celulosa se orientan de forma distinta y la composición de la lignina varía. La lignina rara vez se encuentra en la capa S3, en la lámina media está enriquecida con alcoholes cumaril, mientras que el alcohol coniferil es dirigido a la lignina de las paredes primaria y secundaria en las capas S1 y S2 (Achyuthan *et al.*, 2010). El alcohol sinapil se encuentra en las paredes celulares formando fibras (Davin y Lewis, 2005; Sticklen, 2008). La distribución de la masa molecular de la lignina depende de la especie y difiere en cantidad entre las distintas partes de la planta. Además, la organización supramolecular de la lignina varía dependiendo de su localización específica dentro de la estructura de la planta como raíz, tallo u hojas, así como estado de desarrollo, factores bióticos y abióticos y ambiente químico bajo el cual se forman los polímeros de lignina (Moura *et al.*, 2010).

2.8 Muerte celular programada y senescencia en plantas

La muerte celular programada (MCP) son procesos mediante los cuales el protoplasma de las plantas, y algunas veces la pared celular asociada, es eliminada selectivamente como parte de eventos determinados genéticamente (Buchanan-Wollaston, 2003). Es un proceso activo en el cual el metabolismo procede de manera ordenada y depende de fuentes biológicas de energía. La MCP está bajo control de genes específicos que se pueden mostrar en procesos de mutación (Buchanan-Wollaston, 1997), modificación transgénicas o intervención química o por ser necesarios en el metabolismo terminal y eventos celulares en un tiempo y espacio determinado (Russel *et al.*, 2013). La MCP provoca cascadas de actividades bioquímicas en las cuales el encendido de un paso específico desencadena la activación de otras acciones, que propaga la respuesta a través de toda la célula (Gepstein *et al.*, 2003).

La senescencia de la hoja es el último estado de desarrollo que precede a la muerte y es un proceso genéticamente programado (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2003; Yoshida, 2003). La expresión de muchos genes asociados con actividad fotosintética y otros procesos anabólicos disminuyen durante la senescencia foliar (Gepstein, 1988), mientras que otros se expresan, como los genes asociados a la senescencia (SAGs). La predicción de la función de los SAGs puede dar pistas de las rutas bioquímicas, reguladoras o celulares de la senescencia. La activación de SAGs responsables de la ejecución del síndrome de senescencia codifica enzimas líticas: proteinasas (Dangl *et al.*, 2000; Lohman *et al.*, 1994; Thompson *et al.*, 1998), lipasas (Thompson *et al.*, 2000), nucleasas (Lers *et al.*, 2001; Rubinstein, 2000), clorofilasas

(Jacob-Wilk *et al.*, 1999), y enzimas para el reciclaje de nutrientes como glutamato sintetasa (Watanabe *et al.*, 1994). Algunos genes reguladores asociados a la senescencia se definieron como codificantes para factores de transcripción (Eulgem *et al.*, 2000; Hinderhofer y Zentgraf, 2001), receptores para la percepción de la senescencia (Hajouj *et al.*, 2000), y componentes de tráfico de proteínas intracelulares (Guterman *et al.*, 2003). La cantidad de genes expresados durante la senescencia foliar son algunos cuyos niveles de transcritos se acumulan bajo estrés abiótico y biótico (Binyamin *et al.*, 2001; Hanfrey *et al.*, 1996; John *et al.*, 1997; Quirino *et al.*, 1999).

2.9 Degradación enzimática de carbohidratos y polímeros estructurales de la pared celular

La liberación de carbohidratos estructurales del forraje en ambientes con presencia o ausencia de oxígeno, es determinada por factores *per se* de los organismos encargados de esta degradación; el pH en el cual las enzimas son activadas e inactivadas, la presión osmótica ausente en medios aerobios, el potencial de óxido-reducción y la temperatura definirán el grado de degradación de la pared celular, así como la especificidad del sustrato (Moore y Jung, 2001).

2.10 Degradación enzimática por hongos

El rompimiento eficiente de la pared celular de las plantas por hongos está ligado al crecimiento de hifas, el cual provee poder de penetración y un sistema extracelular enzimático altamente especializado en la degradación de la pared celular (Gadd, 2001). La descomposición enzimática de las paredes celulares de las plantas es

sinergista: las enzimas individuales altamente especializadas operan como componentes de sistemas multienzimáticos para degradar eficientemente polímeros específicos (Kuhad *et al.*, 1997). La degradación ocurre de manera extracelular, los sustratos son grandes polímeros y son insolubles o cristalinos. Los dos principales sistemas enzimáticos extracelulares para la degradación de la fracción polimérica son el Sistema Hidrolítico que degrada a los polisacáridos por , y el único Sistema Lignolítico Oxidativo que degrada al polímero de la lignina. Las clases de enzimas son: 1) enzimas con exoacción que liberan monómeros y dímeros de los extremos de la cadena polimérica, 2) enzimas con endoacción que rompen la cadena de azúcares a la mitad y, 3) enzimas (a menudo con exoacción) especializadas en romper los oligosacáridos para liberar sus monómeros (Gamauf *et al.*, 2007). Los polisacáridos sustituidos requieren un conjunto adicional de enzimas para completar sus hidrólisis (Gadd, 2001); en contraste, los componentes de la lignina son un heteropolímero complejo con irregularidad estereoquímica, requieren mecanismos inespecíficos y no estéreo selectivos para su degradación.

2.11 Degradación de carbohidratos por microorganismos ruminales

Hay grandes poblaciones de microorganismos en el tubo gastrointestinal de todos los animales y están estrechamente integrados como una unidad ecológica en el hospedero. Esta población microbiana compleja y mixta comprende bacterias, protozoarios ciliados y flagelados, hongos anaeróbicos y bacteriófagos (Morrison y Nelson, 2005). Las especies celulolíticas predominantes en el rumen son *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* y *R. flavefaciens*, mientras que las especies predominantemente xilanolíticas son *Prevotella ruminicola* y *Butyrivibrio fibrisolvens*

(Kuhad *et al.*, 1997). Esas bacterias se adhieren fuertemente a la superficie de las plantas, poseen complejos enzimáticos y muestran selectividad en la adhesión a diferentes sustratos (Dodd *et al.*, 2009; Mackie y White, 1997). Existen diversos tipos de bacterias (Cuadro 1) que interactúan de manera sinérgica en el rumen de herbívoros, tienen especificidad de sustratos alimenticios y producen enzimas para desdoblar los carbohidratos solubles, estructurales y proteínas del alimento. Las bacterias celulolíticas del rumen son las degradadoras primarias de la fibra y en acción sinérgica, los hongos anaeróbicos pueden colonizar los fragmentos de las plantas (Hespell y Bryant, 1981) penetrando a través de la cutícula y pared celular de tejidos lignificados en el rumen de bovinos y ovinos, alimentados con dietas fibrosas (Bauchop, 1981). Los hongos también tienen una función sinérgica importante en la digestión ruminal de la fibra, por el rompimiento del tejido lignificado en tallos, lo cual permite que otros microorganismos, como las bacterias, se adhieran fácilmente a las porciones digestibles de las plantas (Chen *et al.*, 2008).

Cuadro 1. Microorganismos ruminales de mayor importancia en la degradación de ingredientes en la dieta.

Especies	Función*	Productos **
<i>Fibrobacter (Bacteroides) succinogenes</i>	C,A	F,A,S
<i>Ruminococcus albus</i>	C,X	F,A,E,E,H,C
<i>Ruminococcus flavefancies</i>	C,X	F,A,S,H
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	C,X,PR	F,A,L,B,E,H,C
<i>Clostridium locheadii</i>	C,PR	F,A,B,E,H,C

<i>Streptococcus bovis</i>	A,S,SS,PR	L,A,F
<i>Ruminobacter (Bacteroides) amylophilus</i>	A,P,PR	F,A,S
<i>Prevotella (Bacteroides) ruminicola</i>	A,X,P,PR	F,A,P,S
<i>Succinimonas amylolytica</i>	A,D	A,S
<i>Selenomonas ruminantium</i>	A,SS,GU,LU,PR	A,L,P,H,C
<i>Lachnospira multiparus</i>	P,PR,A	F,A,E,L,H,C
<i>Succinivibrio dextrinosolvens</i>	P,D	F,A,L,S
<i>Methanobrevibacter ruminantium</i>	M,HU	M
<i>Methanosarcina barkeri</i>	M,HU	MC
<i>Treponema byrantii</i>	P,SS	F,A,L,S,E
<i>Megasphaera elsdenii</i>	SS,LU	A,P,B,V,CP,H,C
<i>Lactobacillus sp.</i>	SS	L
<i>Anaerovibrio lipolítica</i>	L,GU	A,P,S
<i>Eubacterium ruminantium</i>	SS	F,A,B,C
<i>Oxalobacter formigenes</i>	O	F,C
<i>Wolinella succinogenes</i>	HU	S,C

* C= celulolítica; X= xilanolítica; A= amilolítica; D= dextrinolítica; P= pectinolítica; PR= proteolítica; L= lipolítica; M= metanogénica; GU= utilizadoras de glicerol; LU=utilizadoras de lactato; SS= mayormente fermentadoras de azucares solubles; HU= utilizadoras de hidrogeno; O= degradadoras de lactato. ** F= formato; A=acetato; E=etanol; P= propionato; L=lactato; B=butirato; S= succinato; V= valerato; CP= caproato; H= hidrógeno; C= dióxido de carbono; M= metano. Modificado de Dehority 1993, Wang y McAllister (2002), Kuhad *et al.* (1997),

Hespell y Bryant (1981), Mackie y White (1997), Hobson y Stewart (1997), Church *et al.* (2002).

2.12 Enzimas ruminales relacionadas a la degradación de polímeros de la pared celular vegetal

Las enzimas más importantes involucradas en la hidrólisis de celulosa son endoglucanasas, exoglucanasas y β -glucosidasas (Bhat y Hazlewood, 2003). Las endoglucanasas hidrolizan cadenas de celulosa al azar para producir oligómeros de celulosa, las exoglucanasas hidrolizan las cadenas de celulosa de las cadenas no reducidas y producen celobiosa, y las β -glucosidasas liberan glucosa de celobiosa e hidrolizan cadenas cortas de celulosa de sus extremos reducidos y no reducidos (Hobson y Stewart, 1997). Las tres enzimas son necesarias para completar la hidrólisis de celulosa.

Las principales enzimas involucradas en la degradación de los xilanos desdoblados de la hemicelulosa a azúcares solubles son los endo β -1,4-xilanasa y β -1,4-xilosidasa, los cuales producen cadenas cortas de xilanos y xilosa (Bhat y Hazlewood, 2003). Otras enzimas actúan sobre la hemicelulosa están involucradas en la digestión de cadenas cortas, como la manosidasa, arabinofuranosidasa, glucoronidasa, galactosidasa, acetil-xilano esterasa y ácido ferúlico esterasa (Wang y McAllister, 2002). En el Cuadro 2 está una lista de enzimas y el sustrato que hidrolizan, así como el enlace molecular donde ocurre la hidrólisis.

Cuadro 2. Enzimas ruminales degradadoras de carbohidratos y polímeros de la pared celular vegetal.

Sustrato	Enlace objetivo de hidrólisis	Enzima
Celulosa	β - 1, 4-glucosa	Endo- β - 1, 4-glucanasa
Celulosa (no reducida)	β - 1, 4-glucosa	Exo- β - 1, 4-glucanasa
Celobiosa	β - 1, 4-glucosa	β - 1, 4-glucosidasa
Celobiooligómeros solubles	β - 1, 4-glucosa	Celulodextrinasa
Celulosa o xilano	β - 1, 4-glucosa o β - 1, 4- xilosa	Xilocelulasa
Xilano	β - 1, 4-xilosa	Endo- β - 1, 4-xilanasa
Xilobiosa	β - 1, 4-xilosa	β - 1, 4-xilosidasa
Arabinoxilano	α -1,3-	α -L-arabinofuranosidasa
Glucuronoxilano	α -1,3- o α -1,2-	α -Glucuronosidasa
Acetilxilano	Acetil ester	O-acetil xilano esterasa
Ácido ferúlico	Ferulil ester	Ácido ferúlico esterasa
Ácido <i>p</i> -cumárico	<i>p</i> -cumaril ester	Ácido <i>p</i> -cumárico esterasa
Laminarina	β - 1, 3-glucanasa	β - 1, 3-hexosa
Liquenina	β -1, 3- y β -1, 4-hexosa	Enlaces mezclados β - 1, 3- y β -1, 4-glucanasa
Poligalacturano	α - 1, 4-galacturonido	Pectato liasa
Pectina	α - 1, 3-galacturonido	Pectina liasa

Modificado de Wang y McAllister (2002), Mackie y White (1997), Hobson y Stewart (1997).

2.12.1 Mecanismo de degradación de celulosa

La hidrólisis de la celulosa a D-glucosa requiere un conjunto mínimo de tres enzimas con acción sinérgica: 1) Las celobiohidrolasas (celobiohidrolasas 1,4- β -D-glucanasa; Zang *et al.*, 2011) actúan en los extremos de la cadena de celulosa para generar principalmente celobiosa (disacárido de glucosa); con base en su secuencia primaria las celobiosahidrolasas de la familia GH6, muestran un mecanismo de intervención y rompimiento de la celulosa del extremo no reducido, pero los miembros de la familia GH7 rompen celobiosa de los extremos reducidos por un mecanismo de retención (Gamauf *et al.*, 2007).

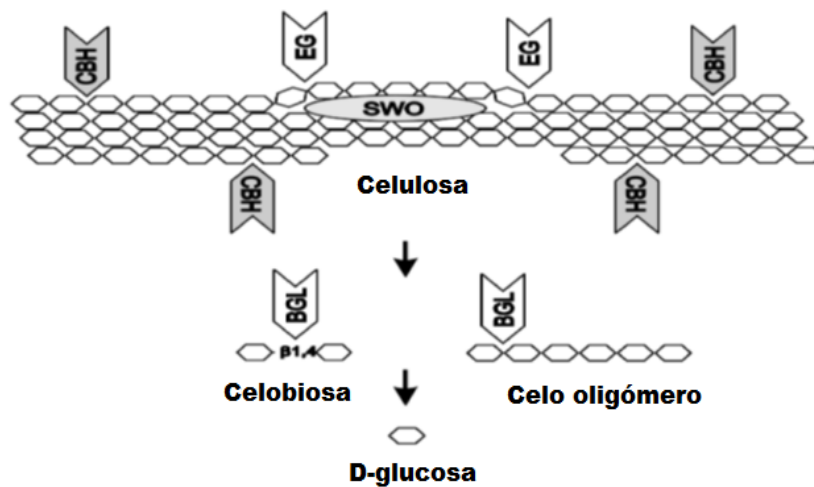


Figura 9. Mecanismo de degradación enzimática de celulosa. CBH, celobiohidrolasas; EG, endoglucanasas; BGL, β -glucosidasas; SWO, celulosa amorfa (Modificado de Beguin, 1990; Teeri, 1997).

2). Las endoglucanasas (1,4- β -D-glucano 4-glucanohidrolasa) atacan internamente las cadenas de celulosa en las regiones amorfas y, por lo tanto, generan sitios adicionales para la función de las celobiohidrolasas (Sukumaran *et al.*, 2005). 3) Las β -glucosidasas degradan oligosacáridos y celobiosa a D-glucosa (Figura 9).

2.12.2 Mecanismo de degradación de hemicelulosas y xilanos

Las hemicelulosas son polímeros heterogéneos de la pared celular, tienen una columna de residuos con enlaces 1,4-, β -D-piranosil, con excepción de arabinogalactanos, y son solubilizados por solución acuosa (O'Neill y Selvendran, 1985; O'Neill y York, 2003). La columna de polisacáridos puede consistir de residuos de xilosil-, glucosil-, arabinosil- o manosil y dependiendo del azúcar dominante son xilanos o arabinogalactanos. La diversidad química de las hemicelulosas de las plantas requiere un gran conjunto de enzimas, las cuales actúan sobre las cadenas principales o los costados de la cadena. Para la degradación de hemicelulosas, la cadena principal es hidrolizada por enzimas con endoacción, mientras enzimas con exoacción liberan los monómeros respectivos (Figura 10). Con un patrón de degradación sinergista, enzimas adicionales hidrolizan los costados de las cadenas de polisacáridos, liberando varios monómeros y disacáridos; en esta ruta la cadena principal se convierte en la más accesible para las enzimas con endo acción. La degradación enzimática de xilanos, la más estudiada, involucra endoxilanasas- β -xilosidasas y enzimas accesorias. La hidrolisis de la columna del xilano involucra a endo-1,4- β -xilanasas (endo-1,4- β -d-xilano xilanohidrolasas) y β -xilosidasas (1,4- β -d-xilano xilohidrolasa). Las endoxilanasas rompen la cadena principal de azúcares, dependiendo del tipo de xilanos, el grado de ramificación y la presencia de sustitutos

diferentes (Polizeli *et al.*, 2005). Los principales productos de la hidrólisis son oligómeros sustituidos o no sustituidos, los cuales son además convertidos por β -xilosidasas a trimonómeros, dimonómeros y monómeros (Gamauf *et al.*, 2007). Las endoxilanasas se clasifican de acuerdo con sus productos finales y habilidad para liberar l-arabinosa de arabinoxilanos (Wong *et al.*, 1988). Algunas enzimas cortan aleatoriamente residuos no sustituidos de D-xilosa, mientras el sitio de rompimiento de algunas endoxilanasas depende de los sustituyentes cercanos de los extremos de la cadena. Las β -xilosidasas pueden ser clasificadas de acuerdo a su afinidad relativa para xilobiosa o xilo oligosacáridos, y liberar β -D-xilopiranos por un mecanismo de retención de extremos no reducidos (Esser, 2007).

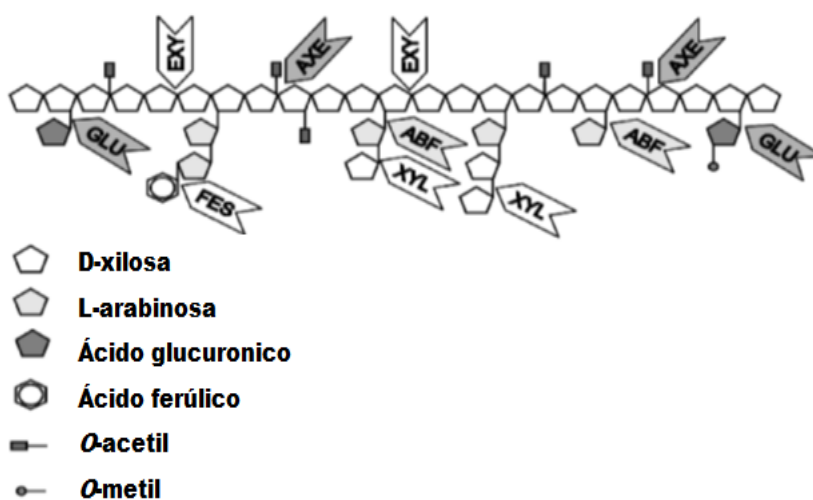


Figura 10. Degradación enzimática de hemicelulosas. EXY, endo-1,4- β -xilanasas; XYL, β -xilosidasas; GLU, xilano- α -1,2-glucuronosidasa, FES; ferulil esterasa; AXE, acetil xilano esterasa; ABF, arabinoxilano arabinofuranohidrolasa (Gamauf *et al.*, 2007).

Las β -xilosidasas son muy específicas para pequeños oligosacáridos no sustituidos de D-xilosa y su actividad disminuye al aumentar la polimerización de los sustratos.

La acumulación de oligosacáridos cortos podría inhibir la acción de endoxilanasas, pero la hidrólisis de esos productos por β -xilosidasas remueve la posible causa de inhibición, y se puede incrementar la eficiencia de hidrólisis de xilanos (Andrade *et al.*, 2004).

CAPÍTULO 3. Estructura y lignificación de las hojas de *Lolium perenne* L. y *Festuca arundinacea* Schreb., en tres etapas de senescencia foliar (0, 30 y 60 %) y dos estaciones de crecimiento (verano e invierno).

3.1 Justificación

La agregación de lignina es probablemente el paso final en la diferenciación de la pared secundaria y sucede después de que muchos polisacáridos se han depositado en la pared. Para especies de pastos como *Lolium perenne* o *Festuca arundinacea*, los tejidos foliares son producidos secuencialmente como una cadena de fitómeros a nivel de macollos individuales, cada uno siguiendo una serie programada de estados de desarrollo y senescencia. Al respecto, la longitud de la hoja disminuye de otoño a invierno debido a la reducción del área verde y senescencia progresiva de la punta hacia la base. Con el avance de la senescencia la proporción de los componentes de la pared celular de los pastos (celulosa, hemicelulosa y lignina) incrementan, mientras la proporción del contenido celular disminuye. El valor nutritivo es afectado principalmente por el estado fenológico, frecuencia de la severidad de la defoliación y factores secundarios como temperatura, germoplasma y disponibilidad de agua y nutrientes en la pradera. Poco se conoce acerca de la forma en que los tejidos envejecen en la hoja y los tejidos lignifican y como estos afectan en la adherencia de la microbiota ruminal, y la relación con el grado de degradación de la pared celular en el conjunto de acción de las enzimas fibrolíticas.

3.2 Objetivos

3.2.1 Conocer la estructura histológica de la hoja de *Lolium perenne* L. y *Festuca arundinacea* Schreb., e identificar los tejidos lignificados en tres etapas de senescencia en invierno.

3.2.2 Evaluar la el área relativa de los tejidos lignificados en la hoja *Lolium perenne* L. y *Festuca arundinacea* Schreb., en tres etapas de senescencia foliar y dos estaciones de crecimiento.

3.3 Hipótesis

El proceso de senescencia y agregación de lignina en el tejido foliar de *Lolium perenne* L. y *Festuca arundinacea* Schreb., no es afectado por la época de crecimiento.

3.4 Material y métodos

3.4.1 Localización del sitio experimental vegetal

Este experimento se realizó en parcelas establecidas en el ejido de Llano Grande, Jiquipilco, Estado de México (99°42'40" O; 19°38'12" N); altitud 2545 m; precipitación anual promedio 800-1300 mm; clima templado subhúmedo con lluvias en verano de mayor humedad C(w2) (García, 2004).

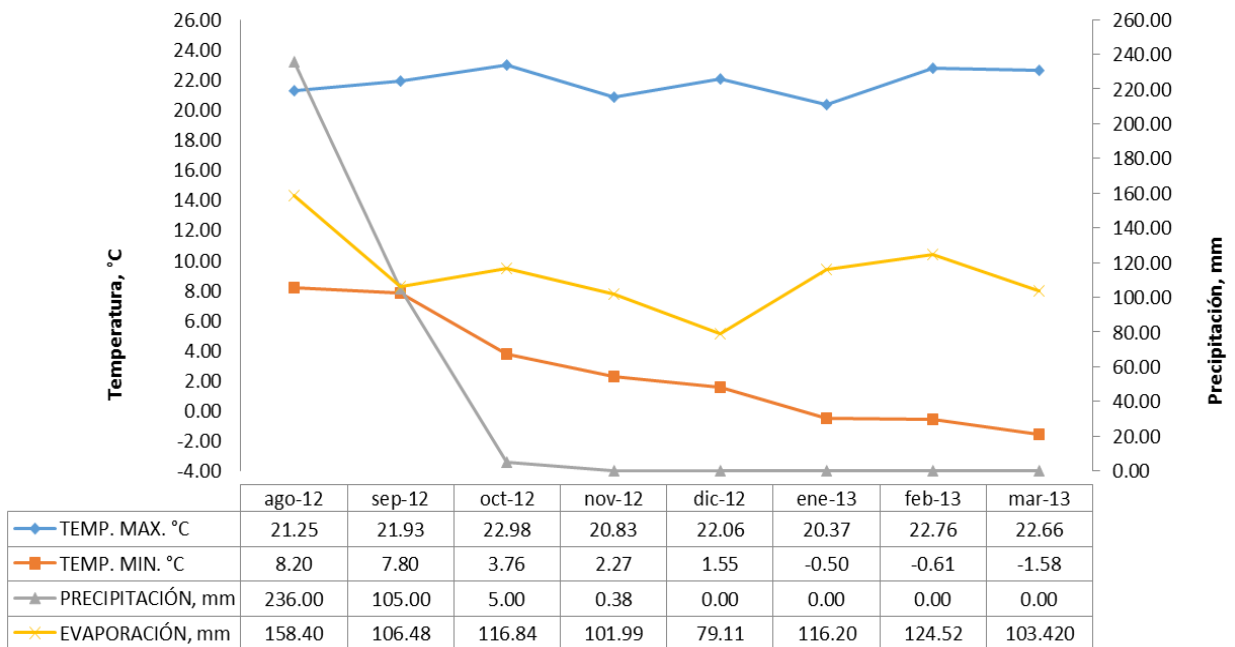


Figura 11. Condiciones climatológicas del período de medición agosto 2012 – marzo 2013; temperatura, precipitación y evaporación, en el ejido de Llano Grande, Jiquipilco, Estado de México. Información proporcionada por Comisión Nacional del Agua, Dirección Local del Estado de México, 2015.

El tipo de suelo es pronasol con dos subtipos eútrico y mólico (IUSS Grupo de Trabajo WRB, 2007). El promedio de las condiciones climáticas de los períodos de medición, verano e invierno se muestra en las Figuras 11 y 12.

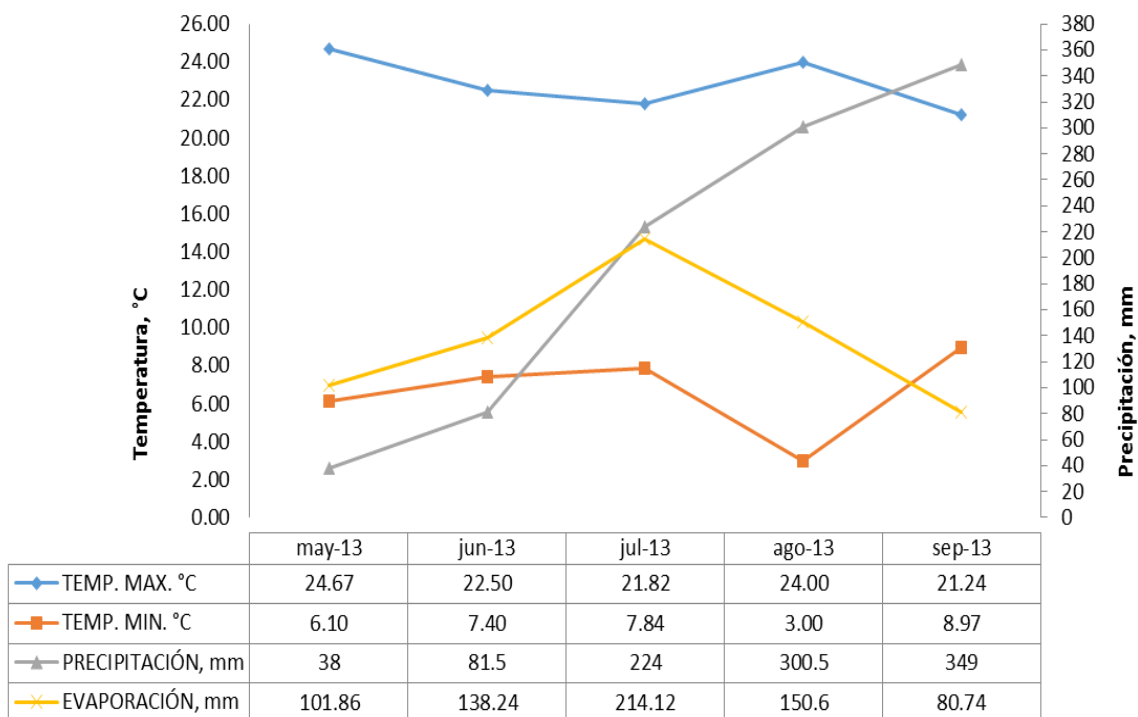


Figura 12. Condiciones climatológicas del período de medición mayo 2013–septiembre 2013; temperatura, precipitación y evaporación, en el ejido de Llano Grande, Jiquipilco, Estado de México. Información proporcionada por Comisión Nacional del Agua, Dirección Local del Estado de México, 2015.

En los Cuadros 3 y 4 se muestran los eventos meteorológicos durante la medición de senescencia foliar.

Cuadro 3. Eventos meteorológicos durante el período de medición de crecimiento y senescencia en la época de invierno.

Concepto	2012			2013	
	Octubre	Noviembre	Diciembre	Enero	Febrero
Helada	0	16	31	24	25
Despejado	27	28	23	23	27
Nublado	3	1	8	7	1
Lluvia	1	1	0	0	0

La información contenida en los Cuadros 3 y 4 fue proporcionada por Comisión Nacional del Agua, Dirección Local del Estado de México, 2015.

Cuadro 4. Eventos meteorológicos durante el período de medición de crecimiento y senescencia en la época de verano.

	2013				
	Mayo	Junio	Julio	Agosto	Septiembre
Helada	0	0	0	0	0
Despejado	29	27	25	17	20
Nublado	1	9	6	14	10
Lluvia	1	7	6	24	10

3.4.2 Obtención del material biológico y establecimiento del experimento

El material biológico de *Lolium perenne* L. y *Festuca arundinacea* Schreb., se obtuvo de parcelas con cinco años de edad, en las cuales se realizó un corte de

homogenización a 3 cm del suelo. La fertilización se efectuó con UREA (46-0-0), 150 kg ha⁻¹ de N y se dieron riegos ligeros cada 15 d solo en la época de invierno.

3.4.3 Crecimiento y senescencia foliar

En un área de 500 m² se establecieron al azar los 12 cuadrantes (1 m² área), dos por tratamiento (0, 30 y 60% de senescencia foliar, los tratamientos sin envejecimiento celular fueron considerados los testigos) para cada época de medición (verano e invierno). En cada uno se seleccionaron 10 tallos y se marcaron con anillos de colores según la metodología descrita por Birchman y Hodgson (1983). De los tallos marcados, cada 15 o 30 d se midió la longitud total de cada hoja (lámina) y la longitud de la parte verde con una regla de 1 mm de precisión, y se tuvo en cuenta que la longitud total es la distancia entre la lígula y el ápice de la hoja. La senescencia foliar se calculó como la longitud relativa de la lámina senescente con respecto a la longitud de la hoja total.

3.4.4 Materia seca y componentes botánicos

El corte del material biológico se realizó cuando los tallos marcados alcanzaron 0 (verde con lígula expuesta), 30 y 60 % de senescencia foliar. El total del material vegetativo por cuadrante, se cortó, se pesó con báscula digital Torrey® L-EQ SERIES con precisión de 1 g y se guardó en bolsas de papel. Después, las muestras se deshidrataron en horno de aire forzado (Thermolab®) a 55 °C por 48 h en el laboratorio de Bromatología de la Facultad de Medicina, Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma del Estado de México, donde se determinó el contenido de materia seca (MS). En las muestras secas se separaron los componentes

morfológicos (hoja, tallo y material muerto) para determinar la proporción hoja: tallo, que se calculó al dividir el peso promedio de la masa total de las hojas entre el peso promedio total de los tallos obtenidos en los cortes selectivos y destructivos. De igual manera se estimó la relación hoja: no hoja, mediante el cálculo del cociente del peso promedio de la masa total de hojas de los cortes destructivos entre el peso promedio total de tallos más el material muerto.

3.4.5 Contenido químico de los forrajes

Las variables evaluadas fueron contenido de materia seca (MS) y orgánica (MO) y cenizas de los forrajes (AOAC, 1990) y fibra detergente neutro (FDN) y fibra detergente ácido (FDA) (Van Soest *et al.*, 1991). Este análisis se realizó en el Laboratorio de Nutrición Animal, del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo.

3.4.6 Medición histoquímica de lignina

Este estudio se realizó en el laboratorio de Anatomía e Histoquímica Vegetal del Postgrado en Botánica, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Estado de México. De cada etapa de senescencia foliar (0 % verde con lígula expuesta, 30 % y 60 %) y de cada cuadrante para cada período estacional (verano e invierno). Se mostraron al azar 10 hojas de las cuales se obtuvieron 5 cm de la parte media. Los fragmentos fueron fijados en solución FAA (10 % formaldehído al 37 %, 5 % ácido acético glacial, 50 % etanol 96 % y 35 % agua) según Ruzin (1999), por al menos 48h y luego se lavaron y colocaron en etanol 50 %. De cada fragmento se obtuvieron tres cortes transversales (100 μ m) con un micrótopo manual (R. Jung, AG-Heidelberg, Alemania). La tinción de lignina se efectuó con floroglucinol al 2 % en

etanol (96 %), y HCl al 50 % según Krishnamurthy (1999) y el color rojo indicó la presencia de lignina. Los tejidos se observaron en un fotomicroscopio Axiostar Plus (Carl Zeiss, Alemania) y se capturaron imágenes de la nervadura central hacia el borde de la lámina con una cámara digital (DSC-S85, CyberShoot 4.1 MP SONY). El área relativa del tejido lignificado se calculó segmentando primero la imagen con el programa GIMP ver 2.8.10 (GNU Image Manipulation Program, Public License), y finalmente se analizaron con el software Image Tool 3.0 (UTHSCSA ImageTool Version 3.0 UTHSCSA).

3.5 Análisis estadísticos y diseños experimentales

3.5.1 Efecto de la estacionalidad del año sobre el crecimiento y senescencia

Para este análisis el diseño experimental fue de parcelas divididas en el cual la parcela mayor fue la época de crecimiento de los forrajes (verano e invierno) y las parcelas menores fueron los tiempos de senescencia (0 %, 30 % y 60 %). Los datos se analizaron con el procedimiento MIXTO (SAS, 2002) con estructura de covarianza AR(1), método de estimación REML1 y se hicieron contrastes ortogonales de las diferencias de los estimadores de los tratamientos de invierno - tratamientos de verano ($P \leq 0.01$). El modelo estadístico fue (Steel *et al.*, 1997):

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \gamma_k + (\alpha\gamma)_{ik} + \xi_{ijk}$$

Dónde: $Y_{ij(k)}$ = Medición de la variable de respuesta en la etapa de senescencia k sobre la parcela j th asignada al forraje i ; μ = Media general; α_i = Efecto del factor época; verano e invierno; γ_k = Efecto de los niveles de senescencia j : 0, 30 y 60 %;

($\alpha\gamma$)= Interacción de los factores α y γ ; ξ_{ijk} = Error aleatorio asociado con la parcela j th asignada en la época del año i en la edad de senescencia k .

3.5.2 Diferencias en época de crecimiento

El diseño experimental fue completamente al azar por época de crecimiento para evaluar la composición química de los pastos estudiados (Steel y Torrie, 1988), empleando el procedimiento GML de SAS (2002). La comparación de medias se realizó con la prueba de Tukey (Steel *et al.*, 1997). El modelo estadístico utilizado fue el propuesto por Martínez (1988):

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \xi_{ij}$$

Dónde: Y_{ij} = Variable de respuesta en la j -ésima repetición, i -ésimo tratamiento; μ = Media general; T_i = Efecto de tratamientos; ξ_{ij} = Error experimental, $\xi_{ij} \sim N(0, \sigma^2)$.

3.6 Resultados y discusión

3.6.1 Crecimiento y senescencia

El crecimiento de las primeras tres hojas hasta la exposición de la lígula se prolongó más allá de 30 d después del corte. El porcentaje de senescencia foliar para las gramíneas estudiadas alcanzó su nivel máximo a los 140 d en verano y 120 d en invierno (Cuadro 5). Para la época de invierno la temperatura y precipitación mostraron un descenso hasta alcanzar puntos mínimos (Figura 11) en febrero y marzo de 2013, y hubo heladas constantes desde noviembre 2012 hasta febrero 2013 (Cuadro 3). En el verano la temperatura máxima fue superior a 21 °C en

promedio y la mínima fue 3 °C. La precipitación aumentó de manera evidente desde junio 2013 alcanzando 349 mm en septiembre (Figura 12), y en este período no se presentaron heladas. Además se observó que con el decremento de la temperatura la evaporación disminuyó.

Cuadro 5. Comportamiento promedio de senescencia foliar de *Lolium perenne* L. y *Festuca arundinacea* Schreb., durante de los períodos de crecimiento.

Gramínea	Días después del corte					
	15	30	45	75	90	120
Invierno	(% de senescencia)					
<i>Lolium perenne</i>	0.00	0.0	7.15	28.17	35.74	58.53
<i>Festuca arundinacea</i>	0.00	0.13	9.11	22.49	38.49	58.50
Verano						
<i>Lolium perenne</i>	0.00	0.00	3.21	26.59	30.47	59.07
<i>Festuca arundinacea</i>	0.00	0.26	11.57	20.07	38.13	58.47

El promedio de senescencia de los forrajes se muestra en el Cuadro 5. Para el período de invierno *Festuca arundinacea* mostró mayor grado de agregación que *Lolium perenne*, pero tuvieron comportamiento similar cuando alcanzaron los niveles máximos de envejecimiento celular (Cuadro 6).

Las hojas con 0 % y 30 % de senescencia tuvieron una mejor relación hoja:tallo con valores inferiores o cercanos a 1, comparado con forrajes con 60 % de envejecimiento celular, donde la proporción se invirtió. Para invierno hubo un comportamiento similar a lo acontecido en verano respecto a los procesos de envejecimiento de la planta. Sin embargo, la relación hoja:tallo no fue favorable para

Lolium perenne, al acumular mayor cantidad de tallo.

Cuadro 6. Promedio de senescencia foliar y componentes botánicos de *Lolium perenne* L. y *Festuca arundinacea* en invierno y verano.

Gramínea	Senescencia (%)		
	0	30	60
Invierno			
<i>Lolium perenne</i>	0.00±0.00	28.17±7.42	58.53±4.13
Relación toja:tallo	1.33	0.99	0.80
<i>Festuca arundinacea</i>	0.13±0.31	35.34±2.27	58.50±1.71
Relación toja:tallo	1.72	0.70	0.53
Verano			
<i>Lolium perenne</i>	0.00±0.00	30.47±4.36	59.07±5.34
Relación toja:tallo	1.64	0.48	0.43
<i>Festuca arundinacea</i>	0.00±0.00	34.04±3.90	58.47±2.48
Relación toja:tallo	2.51	1.87	0.65

3.6.2 Contenido químico

El análisis realizado con el procedimiento MIXTO evidenció que no hubo efecto ($P>0.05$) de la época de medición sobre la MS ($p>0.01$). Pero Scheneiter *et al.* (2014) reportaron que la cantidad de MS producida por hectárea cambió entre el régimen de irrigación (natural vs riego; 96-160 mm primavera y 32-40 mm otoño), con el período y año de cosecha de *Festuca arundinacea*. El análisis estadístico de los datos de la época de crecimiento mostró que el contenido de MS fue mayor

($p \leq 0.01$) para *Lolium-60* y *Festuca-60* en invierno (Cuadro 7). Para verano el tratamiento *Festuca-60* acumuló más MS ($p \leq 0.01$) que el resto de los tratamientos. La cantidad de MO para invierno fue mayor ($p \leq 0.01$) para *Lolium-0* comparado con los demás tratamientos con diferente envejecimiento. *Festuca-60* tuvo más ($p \leq 0.01$) FDN, pero no se encontraron diferencias ($p > 0.05$) en el contenido de FDA. En el período de verano *Festuca-0* mostró el contenido más alto de MO ($p \leq 0.01$). Los tratamientos *Festuca-60*, *Lolium-60* y *Lolium-30* tuvieron un contenido mayor de FDN ($p \leq 0.01$) respecto a los demás tratamientos, mientras que *Festuca-60* obtuvo el contenido más alto de FDA. King *et al.* (2012) reportaron que para *Lolium perenne* y *Festuca arundinacea*, los contenidos de FDN, FDA y LDA aumentaron con la edad de corte y el contenido mayor de FDN fue para *Festuca*. Scheneiter *et al.* (2014) concluyeron que el valor nutritivo de *Festuca arundinacea* en el año no está relacionado con la cantidad de materia seca producida en la parcela. Los cambios en las concentraciones de FDN, FDA y MO reflejan el avance del envejecimiento celular y agregación de lignina en estructuras celulares de hojas de las dos especies en estudio.

Cuadro 7. Contenido químico (g kg⁻¹) de tejido foliar en tres etapas de senescencia foliar.

Invierno					
Tratamiento	MS	MO	Cenizas	FDN	FDA
<i>Lolium</i> -0	177.4 ^c	913.73 ^a	86.27 ^b	209.62 ^c	165.43 ^a
<i>Lolium</i> -30	241.2 ^b	909.43 ^{ab}	90.57 ^{ab}	231.84 ^b	169.16 ^a
<i>Lolium</i> -60	400.4 ^a	895.29 ^b	104.71 ^a	233.20 ^b	170.77 ^a
<i>Festuca</i> -0	266.9 ^b	907.94 ^{ab}	92.06 ^{ab}	185.05 ^d	165.07 ^a
<i>Festuca</i> -30	255.4 ^b	898.07 ^{ab}	101.93 ^{ab}	202.31 ^c	176.73 ^a
<i>Festuca</i> -60	397.0 ^a	895.33 ^b	104.67 ^a	264.22 ^a	179.07 ^a
EE [†]	0.712	3.63	3.63	2.82	3.24
Verano					
<i>Lolium</i> -0	163.4 ^e	889.80 ^b	110.19 ^c	198.81 ^c	162.05 ^c
<i>Lolium</i> -30	234.3 ^c	883.19 ^{cbd}	116.81 ^{abc}	246.63 ^a	171.70 ^b
<i>Lolium</i> -60	251.3 ^{cb}	879.48 ^{cd}	120.52 ^{ab}	250.24 ^a	176.68 ^b
<i>Festuca</i> -0	201.1 ^d	912.74 ^a	87.26 ^d	193.54 ^c	165.05 ^c
<i>Festuca</i> -30	260.1 ^b	889.02 ^b	110.98 ^{bc}	216.77 ^b	174.20 ^b
<i>Festuca</i> -60	434.5 ^a	876.03 ^d	123.97 ^a	248.40 ^a	187.79 ^a
EE [†]	0.592	2.14	2.14	1.81	1.29

MS: Materia seca, MO: materia orgánica, FDN: Fibra detergente neutro, FDA: Fibra detergente ácido. [†]Error estándar de la media. Medias con distinta letra en una columna son estadísticamente diferentes (Tukey, p≤0.05).

Los contrastes mostraron que el contenido de MS de los forrajes de invierno para las tres etapas de senescencia (0 %, 30 % y 60 %) fue superior a los forrajes crecidos en verano con 0 % y 30 % de senescencia (Cuadro 8), pero la cantidad de MS, en verano fue mayor en forrajes con senescencia 60%. Esto pudo deberse a una mayor temperatura y radiación solar en la época de verano, asociada a una mayor tasa de fotosíntesis y crecimiento (Ohlsson, 1991). Macadam y Nelson (2002) concluyeron que a medida que la hoja se alarga el contenido de MS es mayor debido a la agregación de lignina y engrosamiento radial de células del xilema en *Festuca arundinacea*. Scheneiter *et al.* (2014) mencionaron a medida que el fotoperíodo es más largo se acumula una cantidad más alta de FDN. En nuestro estudio, los meses de medición de invierno presentaron mayor número de días soleados (Cuadro 3) y hubo numéricamente mayor contenido de FDN que en verano (Cuadro 7). Allinson (1971) encontró que el fotoperíodo y la temperatura afecta la composición de la pared celular de *Festuca arundinacea*.

Cuadro 8. Contrastes ortogonales para el contenido de MS en *Lolium perenne* y *Festuca arundinacea* entre épocas de crecimiento.

Época	Contraste	Senescencia (%)	Verano		
			0	30	60
Invierno		0	0.91	0.45	-12.07
		30	3.53	3.06	-9.46
		60	18.57	18.10	5.58

Hubo una disminución en el contenido de MS de la época de invierno a verano para

los tratamientos con senescencia 30 y 60% (Figura 13), pero aquellos tratamientos no senescentes tuvieron comportamiento similar en las dos épocas de crecimiento.

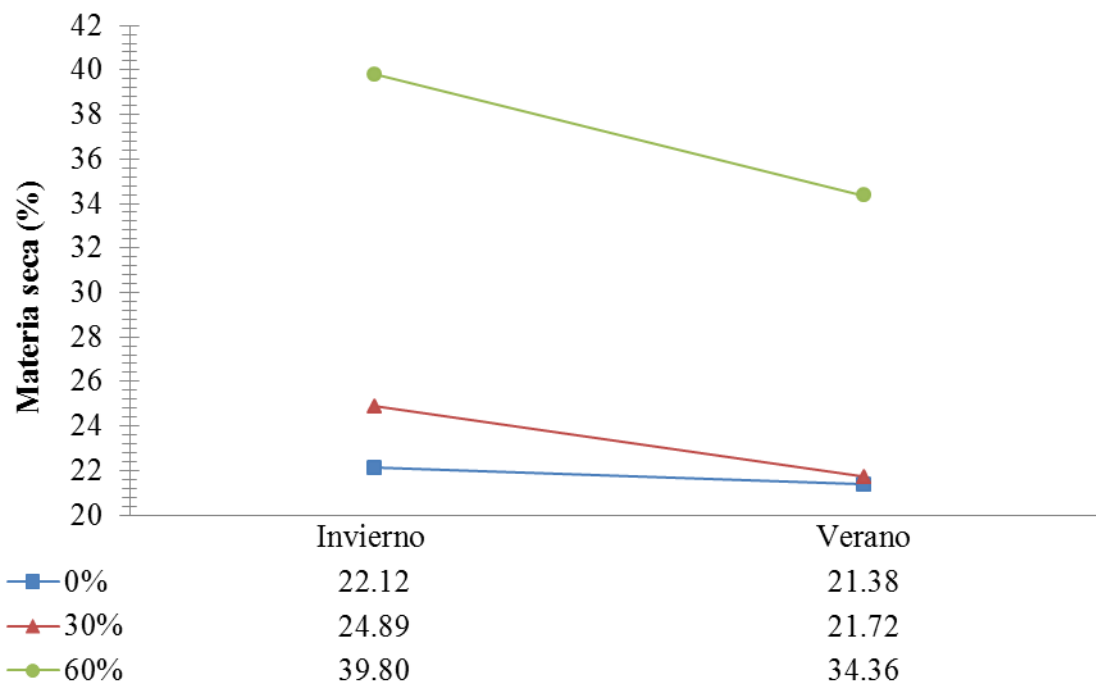


Figura 13. Efecto de la época de crecimiento sobre el contenido de MS de *Lolium perenne* y *Festuca arundinacea*.

3.6.3 Anatomía foliar de *Lolium perenne* con crecimiento en verano en tres etapas de senescencia foliar

La epidermis en esta especie no presenta cloroplastos y tiene una cutícula delgada. La epidermis adaxial está formada por células pequeñas, isodiamétricas, sin cloroplastos, intercaladas por células buliformes de dimensiones 3-4 veces mayores que las epidérmicas en los valles formados entre las costillas de las nervaduras. La epidermis abaxial está formada por células isodiamétricas, cuyo tamaño es dos veces el de las epidérmicas adaxiales.

El tejido vascular está constituido por un conjunto de haces paralelos asociados a nervaduras, orientados hacia el envés de la lámina de tres tamaños: 1) grandes (central), 2) medianos, y 3) chicos. Estos haces se distribuyen en las nervaduras como sigue: 1) una nervadura central con un haz mayor y dos pequeños, 2) nervaduras secundarias con haces medianos, y 3) nervaduras terciarias con haces vasculares pequeños los cuales alternan de manera regular en el siguiente orden: nervadura central, luego nervadura secundarias, seguido de nervaduras terciarias, seguida de nervaduras terciarias hacia el borde de la lamina. Todos los haces, excepto los haces menores del haz central mayor, forman crestas o costillas que forman las nervaduras. Al respecto:

1) El haz vascular mayor se encuentra en la nervadura central, xilema abaxial formado por laguna de protoxilema, metaxilema con fibras y floema en sentido abaxial. La vaina del haz vascular no lignificada se lignifica con la senescencia. Presenta extensión de la vaina del haz hacia el envés la cual se lignifica con la senescencia (Figura 14 C, I).

2) Los haces medianos de las nervaduras medianas, tienen una anatomía similar al haz mayor, pero son menores y no tienen laguna de protoxilema y la extensión de la vaina del haz está formada por pocas células que se lignifican poco durante la senescencia.

3) Los haces menores no presentan extensión de la vaina del haz vascular en dirección abaxial, solo se desarrolla la adaxial, con 3 a 4 estratos subepidérmicos abaxiales que con la senescencia se engosan y lignifican.

4) El mesófilo se forma por células de un solo tipo, no están diferenciadas en

empalizada y parénquima esponjoso, las células tienen abundantes cloroplastos.

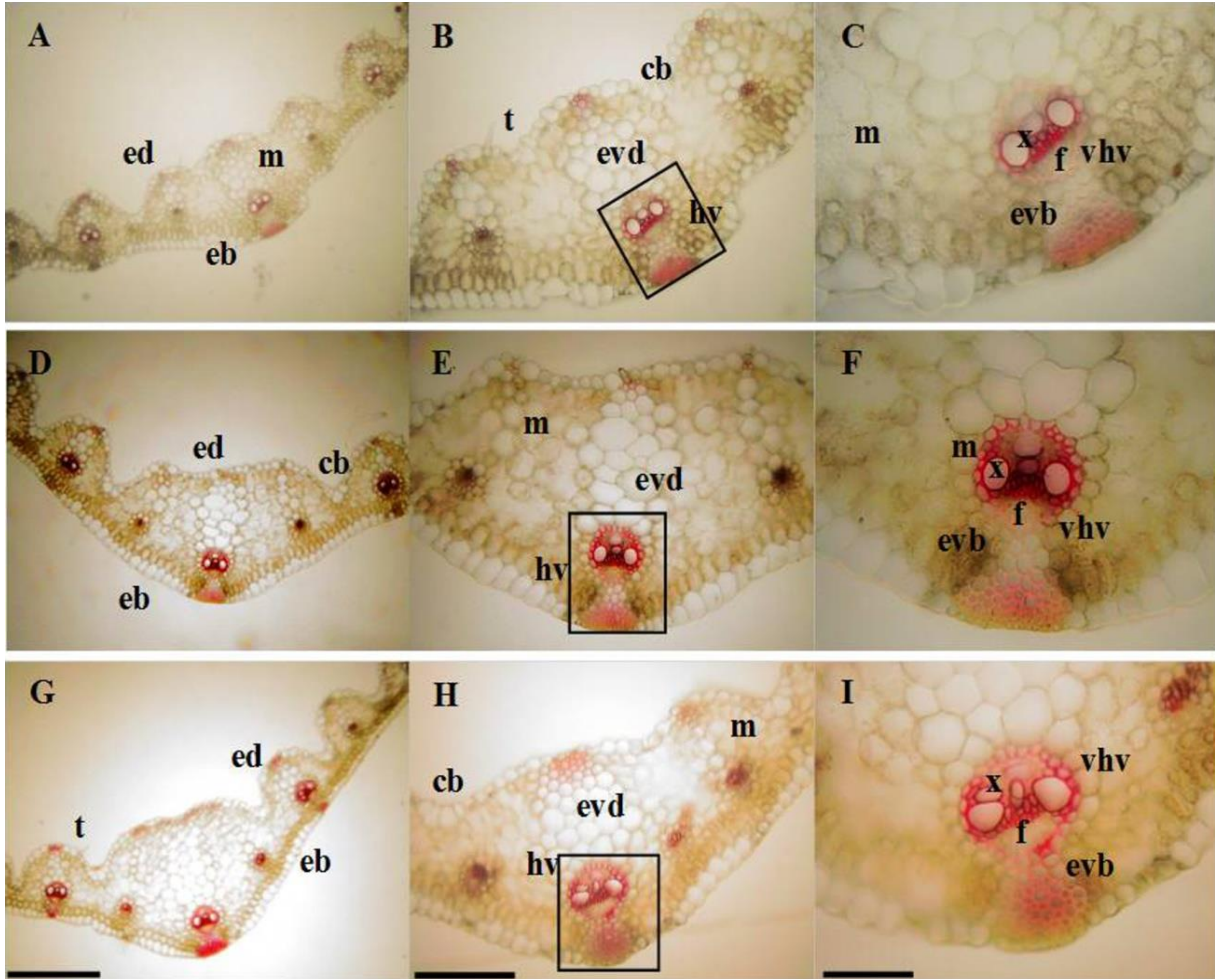


Figura 14. Anatomía foliar de *Lolium perenne* L. en verano con senescencia 0 % (A, B, C; verde, con lígula expuesta y pre senescente), 30 % (D, E, F) y 60% (G, H, I) de senescencia. cb, células buliformes bisagra; ed, epidermis adaxial; eb, epidermis abaxial; evb, extensión de la vaina del haz abaxial; evd, extensión de la vaina del haz adaxial; f, floema; hv, haz vascular; m, mesófilo; t, tricoma; vhv, vaina del haz vascular; x, xilema. Barras: A, D, G (100 μ m); B, E, H (50 μ m); C, F, I (25 μ m). Lignina en rojo.

3.6.4 Anatomía foliar de *Lolium perenne* con crecimiento en invierno en tres etapas de senescencia

La epidermis de *Lolium* cultivada en invierno es similar a la que presentan las hojas de verano descritas en el apartado anterior. Las principales diferencias entre épocas de crecimiento se observaron en la nervadura central. Las hojas presenescentes (0 % senescencia) tienen un mayor número de células, en la extensión de la vaina del haz abaxial, y parcialmente lignificadas (tinción rojo pálido) (Figura 15 A-C). Al 30 % de senescencia el xilema del haz central mostró mayor lignificación que en verano (Figura 15 D-F). Al 60 % de senescencia todo el haz vascular presentó una fuerte lignificación incluyendo un paquete de fibras que rodea al xilema y floema y todas las células de la extensión de la vaina del haz abaxial presentaron una marcada lignificación con paredes muy engrosadas (Figura 15 G-I).

Otra diferencia importante entre *Lolium* de verano e invierno es el aumento en el tejido lignificado subepidérmico adaxial (haz), en especial en la nervadura central y en la extensión de la vaina de los haces medianos. Esta lignificación no se presenta en este pasto en la misma etapa de senescencia pero de verano (Figura 15 G-1).

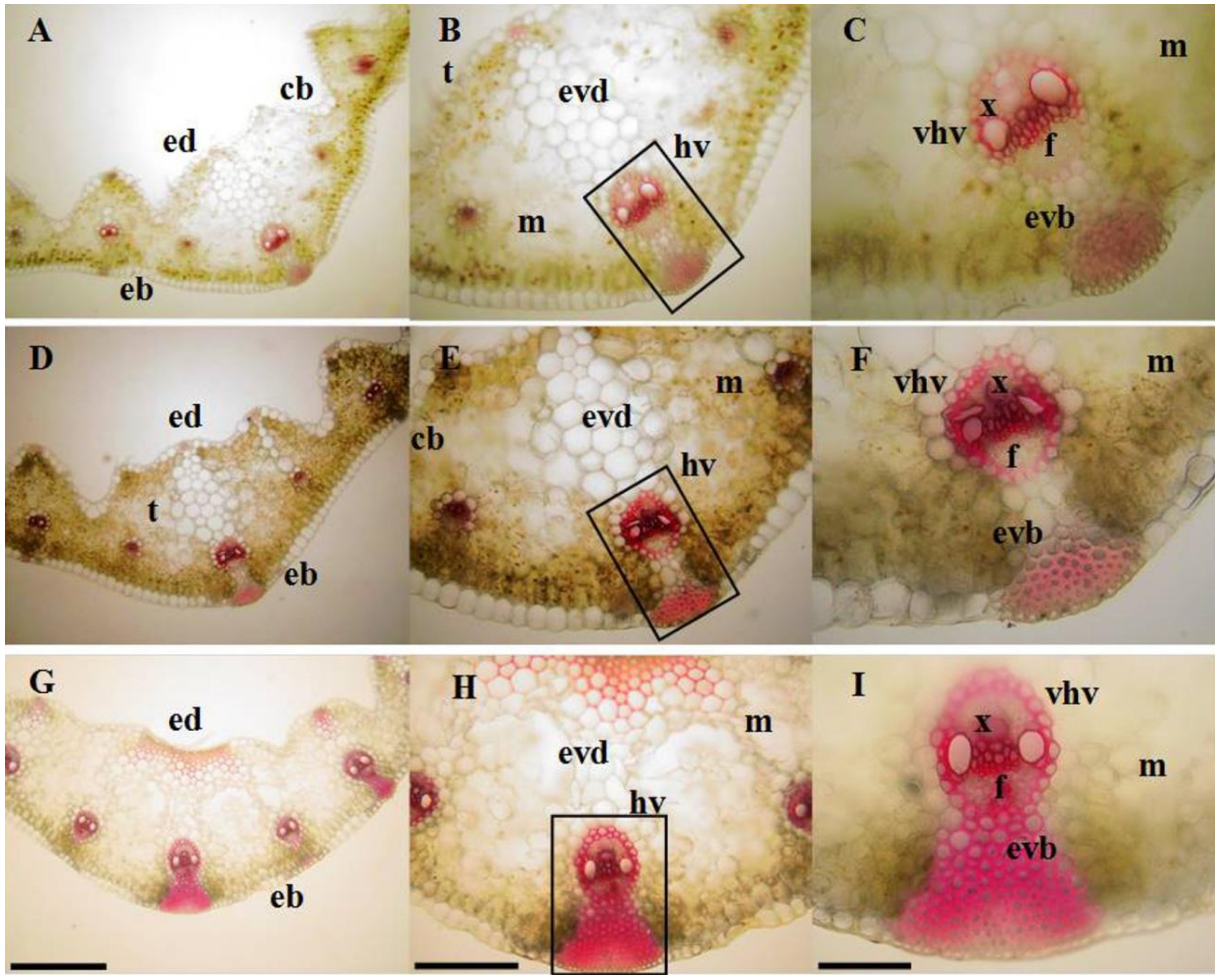


Figura 15. Anatomía foliar de *Lolium perenne* L. en invierno con senescencia 0 % (A, B, C; verde, con lígula expuesta y pre senescente), 30 % (D, E, F) y 60 % (G, H, I). cb, células buliformes bisagra; eb, epidermis abaxial; ed, epidermis adaxial; evb, extensión de la vaina del haz abaxial; evd, extensión de la vaina del haz adaxial; f, floema; hv, haz vascular; m, mesófilo; t, tricoma; vhh, vaina del haz vascular; x, xilema. Barras: A, D, G (100 μ m); B, E, H (50 μ m); C, F, I (25 μ m). Lignina tiñe en rojo.

3.6.4 Anatomía foliar de *Festuca arundinacea* en tres etapas de senescencia foliar y dos estaciones de crecimiento.

Crecimiento en verano

La epidermis adaxial está formada por células pequeñas, isodiamétricas, sin cloroplastos, intercaladas por células buliformes de dimensiones 3-4 veces mayores que las epidérmicas en los valles entre las costillas de las nervaduras. La epidermis abaxial está formada por células isodiamétricas, del doble de tamaño que las epidérmicas adaxiales, con presencia de tricomas.

El tejido vascular está constituido por un conjunto de haces asociados a nervaduras paralelas con crestas más pronunciadas las de *Lolium*. El haz vascular de las nervaduras están orientados hacia el envés de la lámina en tres tamaños: 1) grande (nervadura central), 2) medianos (nervaduras secundarias), y 3) chicos (nervaduras terciarias). Estos haces se alternan de manera regular en el siguiente orden: haz mayor central acompañado de dos haces menores, luego los haces medianos y chicos se alternan predominando los chicos hacia el margen. Todos los haces con excepción de los haces menores del haz central mayor, forman las nervaduras con crestas rectangulares y pronunciadas.

1) Paquete mayor en la nervadura central, el xilema es abaxial con una laguna de protoxilema, metaxilema con fibras y floema Este tejido no cambia con la senescencia (Figura 16 A-C). En contraste, la vaina del haz vascular abaxial cambia, las paredes engrosan y lignifican, y en 60 % de senescencia presenta fibras gruesas y muy lignificadas (Figura 16 I). La extensión de la vaina del haz, la forman células grandes sin cloroplastos y no lignificadas, pero con la senescencia las células sub

epidérmicas se lignifican (Figura 16). Los haces medianos presentan menos lignificación, en la extensión de la vaina abaxial y adaxial (2-3 células subepidérmicas). Los haces menores y más jóvenes que los anteriores no presentan extensión de la vaina abaxial y tampoco laguna de protoxilema.

2) El mesófilo está formado por un solo tipo celular, con abundantes cloroplastos el cual rellena las crestas de las nervaduras. Este tejido no se lignifica con el envejecimiento (Figura 16).

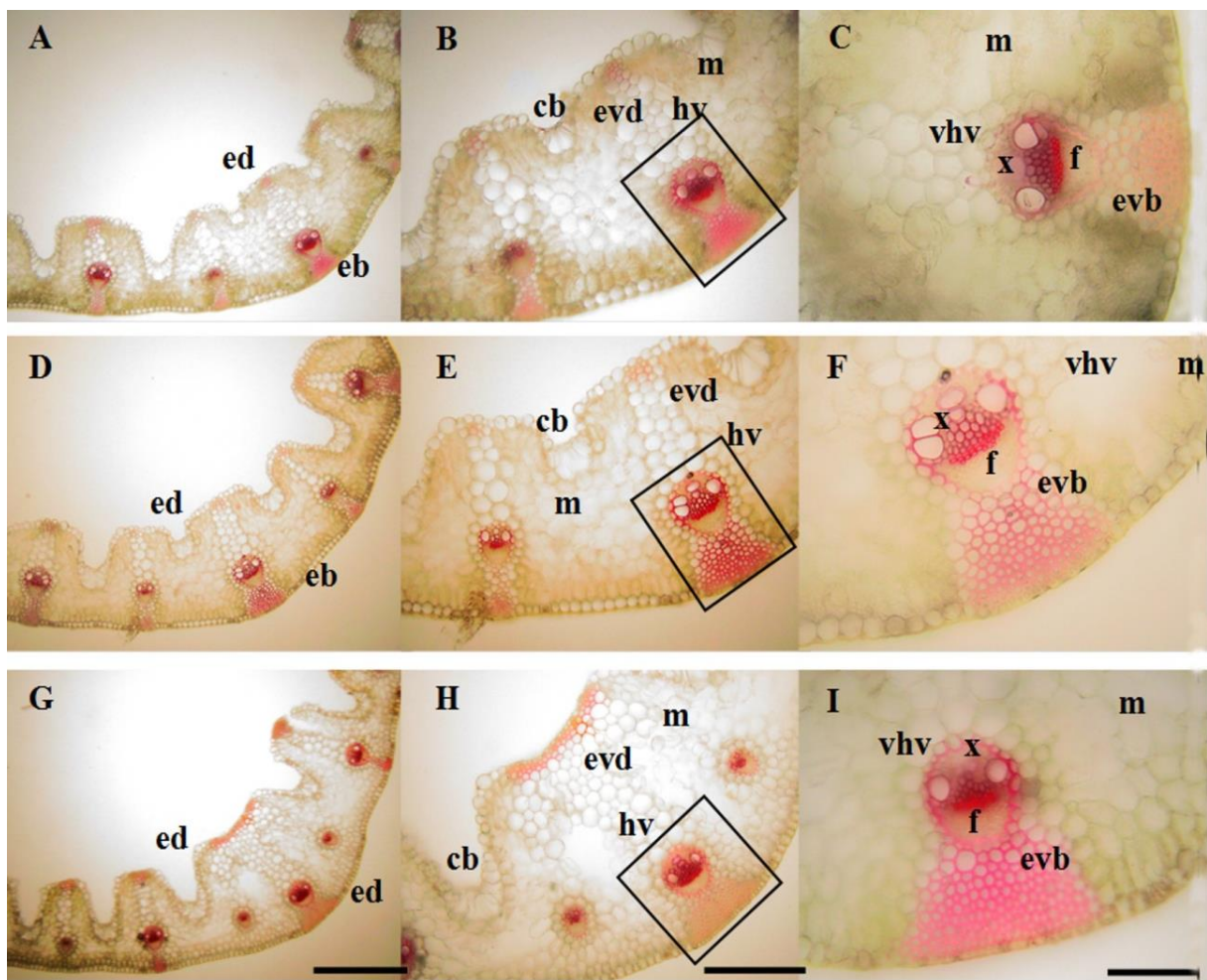


Figura 16. Anatomía foliar de *Festuca arundinacea* Scherb. en verano, senescencia 0 % (A, B, C; verde, con lígula expuesta y presenescente), 30 % (D, E, F) y 60 % (G, H, I): cb, células buliformes bisagra; ed, epidermis adaxial; eb,

epidermis abaxial; evb, extensión de la vaina del haz abaxial; evd, extensión de la vaina del haz adaxial; f, floema; hv, haz vascular; m, mesófilo; t, tricoma; vhv, vaina del haz vascular; x, xilema. Tamaño de barra: A, D, G (100 μm); B, E, H (50 μm); C, F, I (25 μm). Lignina tiñe rojo.

Crecimiento en invierno

La epidermis adaxial y abaxial de la hoja de *Festuca* en invierno fue similar a la que presenta durante el crecimiento de verano pero con cutícula más gruesa.

El tejido vascular presentó una estructura similar que en verano y durante la senescencia el pasto se lignificó con un patrón similar al presentado por las hojas de verano (Figura 17). Los haces de *Festuca* de invierno no lignifican las células externas del haz vascular como lo hacen los haces de *Lolium* en invierno. *Festuca* presentó menos cambios celulares atribuidos a la época de crecimiento comparado con *Lolium*.

El mesófilo de las hojas de invierno mostró una estructura similar al mesófilo de las hojas de verano, aunque su verdor fue menos intenso. En resumen, *Lolium* fue más afectado por la época de crecimiento; las hojas de invierno lignifican más sus tejidos con la senescencia, respecto a las hojas de *Festuca* en el mismo periodo. En verano los dos pastos se comportaron de manera similar durante la senescencia, pero *Lolium*, por su genotipo, presentó una mayor proporción de tejido digestible.

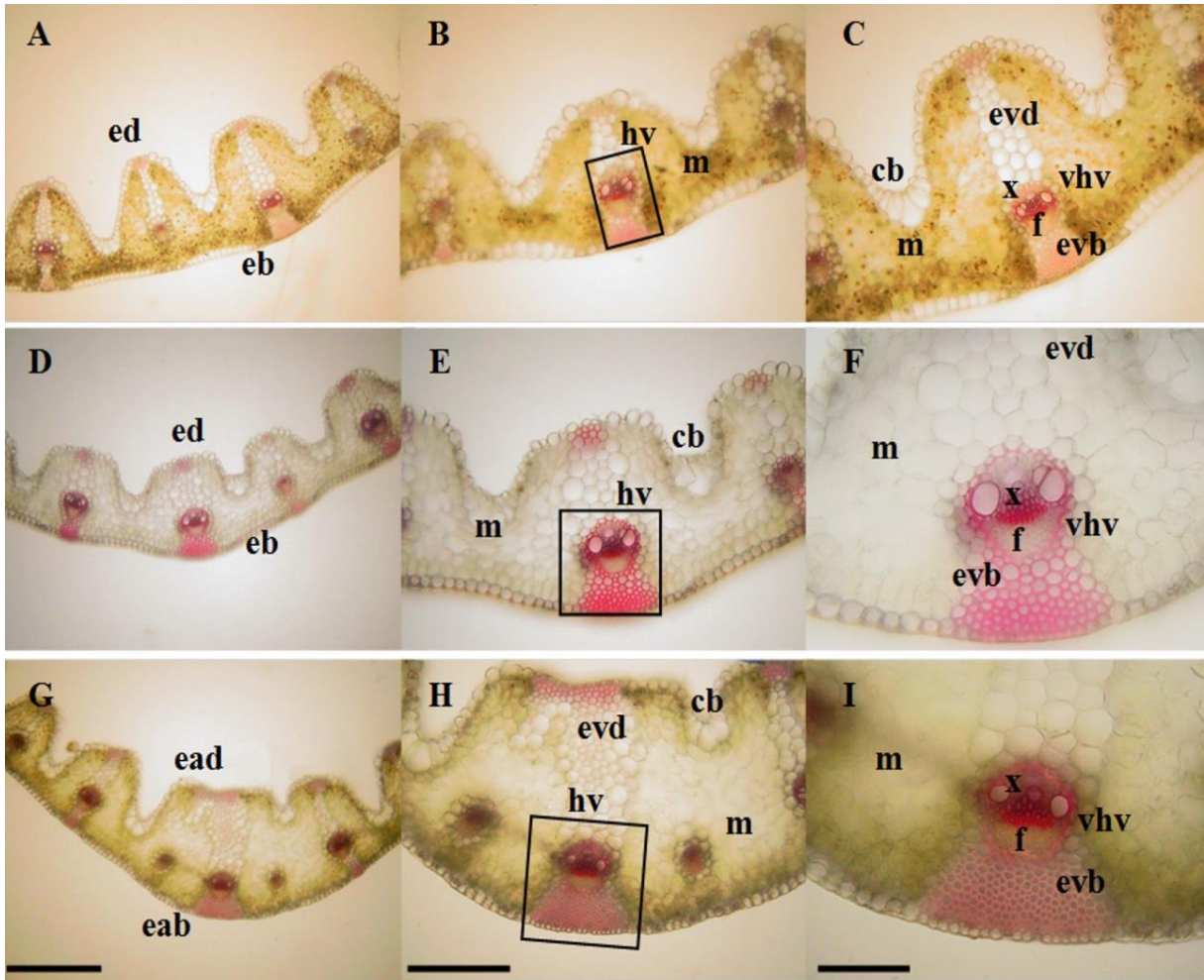


Figura 17. Anatomía foliar de *Festuca arundinacea* Scherb. en invierno con senescencia 0 % (A, B, C; verde, con lígula expuesta y presenescente), 30 % (D, E, F) y 60 % (G, H, I): cb, células buliformes bisagra; ed, epidermis adaxial; eb, epidermis abaxial; evb, extensión de la vaina del haz abaxial; evd, extensión de la vaina del haz adaxial; f, floema; hv, haz vascular; m, mesófilo; t, tricoma; vhw, vaina del haz vascular; x, xilema. Barras: A, D, G (100 μ m); B, E, H (50 μ m); C, F, I (25 μ m). Tinción de lignina en rojo.

La tinción con floroglucinol-HCl proporciona información sobre la proporción de cinamil aldehídos presentes en xilema, fibras y traqueidas (Adler, 1977), y se puede

diferenciar entre los cinamil aldehídos y otros compuestos fenólicos. En la presente investigación el empleo de esta prueba mostró que las células de la extensión de la vaina orientadas hacia el haz se ensancharon y aumentó el número de las células subepidérmicas con engrosamiento y lignificación de la pared secundaria, conforme avanza senescencia de *Lolium* y *Festuca*. Hibino *et al.* (1995) reportaron que una tinción rojo intensa es indicador de una mayor abundancia de grupos de cinamil aldehídos en la lignina. Cuando floroglucinol-HCl reacciona con coniferil aldehído, sinapil aldehído, vanillina y siringil aldehídos, se producen pigmentación rosa (Pomar *et al.*, 2002). Los resultados de la presente investigación indicaron una mayor abundancia de grupos cinamil aldehídos en el xilema y en las fibras del floema. En contraste, el tejido lignificado de las extensiones de la vaina del haz presentaron tonalidades de rosadas tenues (0 % y 30 % senescencia) a tonalidades más intensas (senescencia 60 %) con una mayor abundancia de grupos coniferil aldehído, sinapil aldehído y siringil aldehído. La transición de estados de desarrollo vegetativo a reproductivos en monocotiledóneas se caracteriza por el incremento en contenido de subunidades siringil y disminución de unidades guayacil (Chen *et al.*, 2004). Una excepción fue el tratamiento de *Lolium* en invierno, cuyos tejidos lignificados por envejecimiento (senescencia 60 %) de la extensión de la vaina del haz abaxial, fueron más rojas y acumularon más cinamil aldehídos que *Festuca*. Nuestros hallazgos concuerdan con lo descrito por (Macadam y Nelson, 2002) acerca de que después de 75 mm de elongación de la lámina foliar de *Festuca arundinacea*, se hace evidente la expansión radial de los elementos del metaxilema, vaina del haz vascular, haces de fibras abaxiales y disminuye el área del haz vascular mayor. King

et al. (2012) determinaron que el área transversal promedio, área total del haz vascular y haces de esclerénquima fue mayor en *Festuca* que en *Lolium*.

En el tejido estudiado, las lagunas del protoxilema aumentaron en tamaño y número conforme aumentó el grado de senescencia en los dos pastos en dos épocas de crecimiento (Figura 14-17). Groover y Jones (1999) mencionaron que la síntesis de la pared secundaria está coordinada con los procesos de muerte celular programada y diferenciación de los elementos traqueales del xilema (Bollhöner *et al.*, 2012), así como su lignificación (Ros Barceló, 2005). Pruebas histoquímicas han mostrado que el aldehído coniferil ligado a O-4 es ensamblado durante estados tempranos de lignificación del xilema, y sinapil aldehído es incorporado en estados tardíos de desarrollo, fungiendo éstos como puntos de nucleación del proceso de lignificación (Pomar *et al.*, 2002). Hay evidencia (Moghaddam y Wilman, 1998) que *Festuca arundinacea* contiene un número mayor de células engrosadas en el área total transversal de la hoja y en células del epidermis que *Lolium perenne*.

3.6.5 Área relativa de tejido lignificado de *Lolium perenne* L. y *Festuca arundinacea* Schreb. en invierno y verano en tres etapas de senescencia.

3.6.5.1 Área relativa de tejido lignificado en corte transversal de la hoja.

Al comparar las épocas de crecimiento con el procedimiento MIXTO se encontró una interacción ($P \leq 0.05$) de la época de corte con la senescencia foliar sobre la lignificación del HVNC, pero no hubo efecto ($P > 0.05$) de la época sobre ATH. Los resultados de ATH indicaron que *Festuca arundinacea* acumuló más estructuras lignificadas en invierno que durante el verano (Cuadro 9), lo cual confirma que la

aparición de lignina en plantas aumenta con la madurez (Brink y Fairbrother, 1984). En las épocas de crecimiento invierno y verano *Festuca-30* y *Festuca-60* presentaron mayor grado de agregación de lignina en ATH. Para invierno y verano las hojas no senescentes mostraron un grado menor de tejido lignificado. El área relativa (%) de tejido lignificado en ATH de *Lolium perenne* aumentó con la senescencia; en *Lolium-60* el área relativa de tejido lignificado aumentó 67.55 % respecto al estado no senescente. En contraste, durante el verano el ATH de *Lolium* acumuló menos lignina con un aumento de 55.10 % cuando la hoja alcanzó 60 % de envejecimiento celular.

Cuadro 9. Área relativa (%) de tejido lignificado en corte tansversal de la hoja entera y en nervadura central de *Festuca arundinacea* y *Lolium perenne* medidas en verano e invierno.

Tratamiento	Hoja entera		Nervadura central	
	Invierno	Verano	Invierno	Verano
<i>Lolium-0</i>	5.62 ^c	6.82 ^c	7.23 ^c	9.01 ^{bc}
<i>Lolium-30</i>	6.17 ^c	7.54 ^c	7.74 ^{bc}	7.88 ^c
<i>Lolium-60</i>	9.40 ^c	10.58 ^b	12.59 ^a	13.48 ^a
<i>Festuca-0</i>	7.54 ^{cb}	11.68 ^b	11.63 ^b	14.73 ^a
<i>Festuca-30</i>	14.78 ^a	10.80 ^b	15.87 ^a	14.71 ^a
<i>Festuca-60</i>	12.91 ^a	12.95 ^a	12.54 ^a	12.01 ^{ab}
EE [†]	0.564	0.489	0.987	0.965

Medias con distinta letra en una columna son estadísticamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$). [†]Error estándar de la media.

Las hojas en verano con 60 % de senescencia acumularon 10.87 % de tejido lignificado con respecto al estado no senescente (0 %); en contraste, en invierno aumentó el tejido lignificado 71.22 %. Los contrastes ortogonales (Cuadro 10) mostraron que los forrajes de verano en las tres etapas de senescencia tuvieron mayor ($P \leq 0.05$) agregación de lignina en la hoja entera que los forrajes de invierno con senescencia 0 % (Cuadro 9). Esta respuesta se observó de manera clara en *Lolium* en el cual hubo una lignificación evidente de la extensión de la vaina del haz en invierno. En verano, al contar con temperatura y precipitación óptimas, es probable que los forrajes crecen y maduran más rápido y alcanzan el período de floración, comparado con el crecimiento en temperaturas frías (Buxton y Fales, 1994). Moura *et al.* (2010) mencionaron cambios en los niveles de lignina y sus precursores, los cuales aumentan en condiciones de estrés por temperaturas bajas.

Según El Kayal *et al.* (2006), temperaturas bajas aumentan la actividad en la expresión genética del gen codificante para cinamato 3-hidroxilasa (C3H), una monooxigenasa dependiente del citocromo P450 involucrado en la biosíntesis de fenilpropanoides y lignina en la aclimatación de *Rhododendrum* a bajas temperaturas. Esto puede explicar la mayor acumulación de lignina en invierno, y particularmente en *Lolium*.

Cuadro 10. Contrastes ortogonales para el porcentaje relativo de agregación de lignina en la vaina del haz de las especies *Lolium perenne* y *Festuca arundinacea*.

Época		Verano		
Contraste	Senescencia (%)	0	30	60
	0	-2.67	-3.66	-4.12
Invierno	30	1.23	0.23	-0.22
	60	1.91	0.92	0.46

La agregación de lignina en la hoja total incrementó en la época de verano para los pastos con senescencia 0 % (Cuadro 10), pero en los forrajes con 30 % y 60 % de tejido senescente se mantiene constante entre épocas de crecimiento (Figura 18).

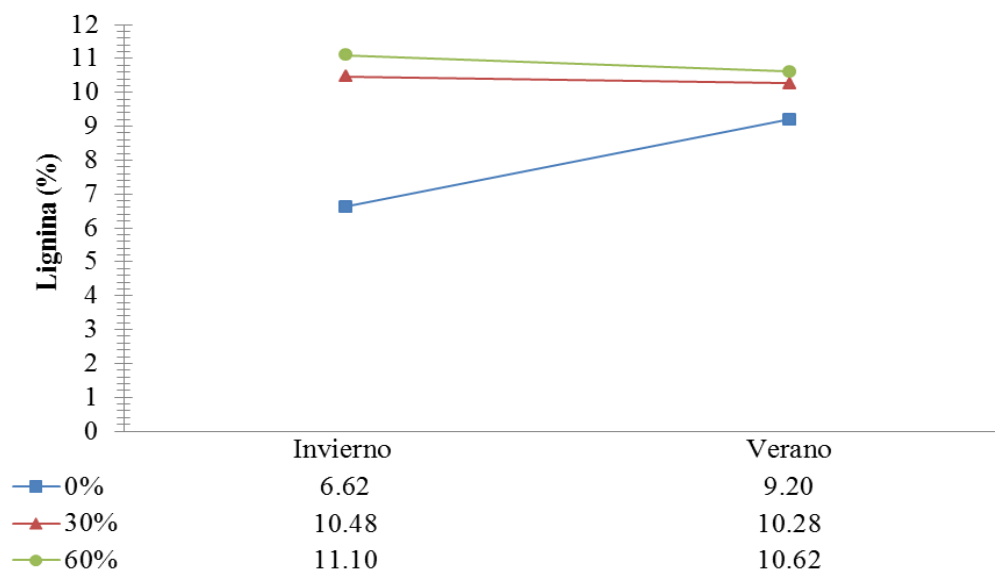


Figura 18. Comportamiento a través de las épocas de medición de la agregación de lignina en el área total de la hoja de *Lolium perenne* y *Festuca arundinacea*.

3.6.5.2 Agregación de lignina en el haz vascular de la nervadura central de la hoja (HVNC).

La agregación de lignina en HVNC en la época de invierno fue mayor ($P \leq 0.05$) en *Festuca-30*, *Festuca-60* y *Lolium-60*, en cambio en verano el tratamiento de *Lolium-30* fue menor ($P \leq 0.05$) al resto (Cuadro 9). Los contrastes (Cuadro 11) mostraron mayor agregación de lignina en HVNC de los forrajes de verano que en invierno para aquellos con senescencia 60 %, mientras que el contenido de lignina para los forrajes con 30 % de senescencia foliar fue mayor en invierno.

Cuadro 11. Contrastes ortogonales para el porcentaje relativo de agregación de lignina en el haz vascular de la nervadura central de las especies *Lolium perenne* y *Festuca arundinacea*.

Época	Senescencia (%)	Verano		
		0	30	60
Invierno	0	-2.44	-1.67	-3.32
	30	-0.06	0.70	-0.94
	60	0.69	1.47	-0.18

La Figura 19 corrobora lo hallado con los contrastes, donde la agregación de lignina para HVNC de los tratamientos con 30 % de senescencia resultó marginalmente mayor en verano que en invierno.

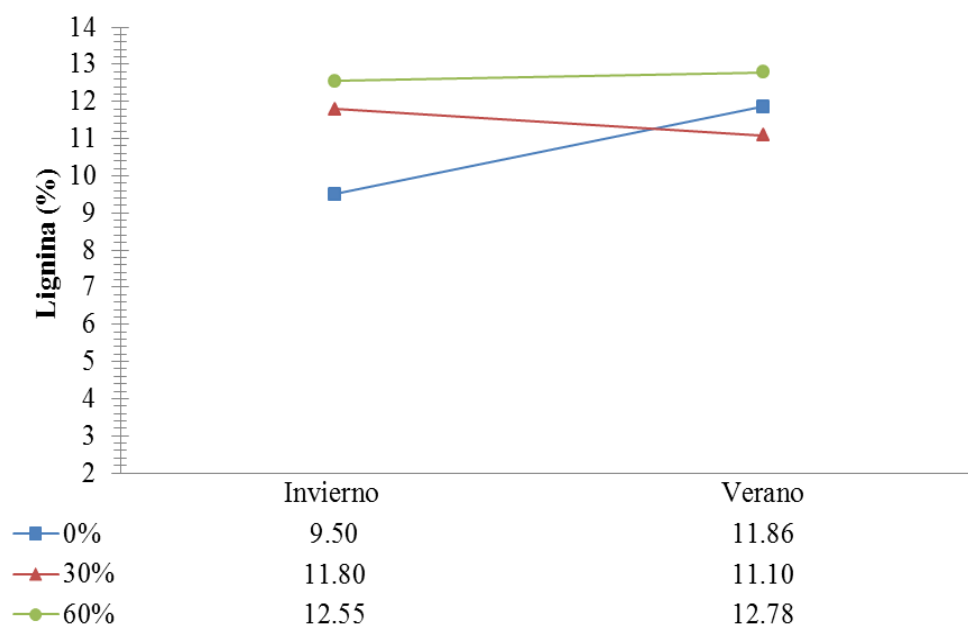


Figura 19. Agregación promedio de lignina en HVNC de las especies *Lolium perenne* y *Festuca arundinacea* entre las épocas de medición.

CAPITULO 4. Fermentación *in vitro* y adherencia bacteriana evaluada en tejido foliar de *Lolium perenne* L. y *Festuca arundinacea* Schreb. con distinta madurez

4.1 Justificación

Las características morfológicas, químicas y digestibilidad de una planta dependen de la especie, ciclo de crecimiento, estado de desarrollo y ambiente. La edad de corte de los pastos tiene un impacto considerable sobre la composición química e influye sobre la anatomía de los tejidos. En pastos tropicales, la humedad y temperaturas altas tienden a acelerar los procesos de muerte celular programada comparados con forrajes de clima templado. Los procesos de senescencia en la hoja provocan engrosamiento y lignificación de las paredes celulares. En forrajes, las características estructurales que limitan la degradación de los nutrientes son principalmente tejidos de soporte con alta lignificación localizados en el esclerénquima y xilema; además, la presencia de componentes fenólicos con densidad alta y baja en el haz de la vaina en parénquima y epidermis, disminuye el acceso y acción de los microorganismos ruminales. La digestibilidad de los nutrientes de las plantas es alta durante estados tempranos de desarrollo y está correlacionada negativamente con la madurez. Aunque la edad de corte y composición química de los forrajes se estudiado, en la literatura revisada no hay información sobre el efecto de la época de crecimiento y el grado de agregación de la lignina en los componentes celulares de hoja de *Lolium perenne* y *Festuca arundinacea*, y como cambia la adherencia de microorganismos ruminales y las variables de fermentación

in vitro de estos tejidos.

4.2 Objetivos

Evaluar la fermentación y degradación *in vitro* de los componentes de tejido foliar de *Lolium perenne* L. y *Festuca arundinacea* Schreb., en tres etapas de senescencia, inoculados con extracto total de bacterias ruminales.

Identificar y describir la adherencia de bacterias ruminales a las estructuras de tejido celular en residuos sólidos de hojas degradadas *in vitro*.

4.3 Hipótesis

La fermentación y degradación de los componentes celulares de tejido de hoja de *Lolium perenne* y *Festuca arundinacea* no es afectado por el estado de madurez y época de crecimiento de estos pastos.

La adhesión bacteriana a estructuras residuales de la fermentación *in vitro* de tejido de hoja con distinta senescencia no es afectada por la agregación de lignina.

4.4 Material y métodos

Para evaluar el efecto del grado de madurez de los forrajes sobre variables fermentativas de bacterias ruminales *in vitro*, se empleó la técnica de degradación *in vitro* de la materia seca (DIVMS) y producción de biogás en el Laboratorio de Microbiología Ruminal y Genética Microbiana del Colegio de Postgraduados, Campus, Montecillo.

4.4.1 Homogenización y esterilización del material biológico

La homogenización de las muestras de los dos pastos se realizó por tratamiento, considerando que cada tratamiento (0 %, 30 % y 60% de senescencia; el testigo fue 0 %, sin envejecimiento celular) tuvo dos repeticiones biológicas (cuadrantes), por lo cual se obtuvieron 12 muestras, una por cada tratamiento en estudio en las dos épocas de crecimiento (verano e invierno). Las muestras de los pastos fueron trituradas en un molino Wiley (malla 2x2 mm), se pesaron aproximadamente 0.0500 g de muestra por repetición analítica (siete repeticiones) y se pusieron en tubos de cultivo de 18x150 ml con tapón de caucho. Enseguida se agregaron 500 µL de agua destilada por tubo, para evitar que la muestra se quemara en la autoclave, previo a la esterilización en el equipo TUTTNAWER, 2540 E, programado a 121 °C con 084 k/20 PSI.

4.4.2 Clarificado de fluido ruminal

Para la obtención de fluido ruminal clarificado se utilizó contenido ruminal de una vaca adulta Holstein con cánula en rumen, peso aproximado de 600 kg, alimentada con alfalfa, heno de avena y concentrado. El contenido ruminal se extrajo a las 0830 h y se puso en una cubeta de plástico para separar con tela de manta la parte líquida y sólida. El residuo sólido de contenido ruminal se reintegró al rumen de la vaca. Después el fluido ruminal se trasladó al laboratorio, donde se midió el pH con un potenciómetro ORION 720A+ y potencial de óxido-reducción (REDOX) con un equipo ORION, 710 A pH /15 E meter, ambos equipos ya calibrados. Enseguida, el fluido ruminal se centrifugó 10 min en Eppendorf, Centrifugue 5810 R 15 AMP a

10000 rpm, se separó el sobrenadante y se almacenó en matraces de bola de 500 mL, y este procedimiento se repitió hasta centrifugar todo el fluido ruminal recolectado. Después, el sobrenadante se esterilizó en un autoclave TUTTNAWER, 2540 E, programado a 121 °C con 084 k/20 PSI, durante 54 min. Los matraces se taparon y sellaron con papel aluminio y cinta adhesiva para evitar su contaminación. Una vez terminada la esterilización se repitió el procedimiento y finalmente el fluido ruminal clarificado se dejó enfriar y se almacenó en refrigeración para su conservación.

4.4.3 Recuperación de inóculo de bacterias totales

El fluido ruminal se obtuvo a las 0800 h de una vaca Holstein con cánula en el rumen, peso aproximado de 600 kg, alimentada con alfalfa, heno de avena y concentrado. El fluido se filtró a través de tela de manta con el fin de separar las partículas de alimento, y se centrifugó 3 min a 3000 rpm para separar los protozoarios de las bacterias. Enseguida las bacterias fueron vertidas en un vaso de precipitado de 500 mL con flujo constante de CO₂ y en baño de agua a 38°C, hasta ser utilizadas.

4.4.4 Preparación del medio de cultivo

El medio de cultivo utilizado en este experimento tuvo como componentes principales glucosa y fluido ruminal (G-FR). La composición del medio de cultivo se describe en el Cuadro 12. La preparación se realizó con la técnica de Hungate (1950) en matraces de bola de 500 mL con flujo constante de CO₂, y se taparon con papel aluminio sellados con cinta adhesiva, después se vertieron 9 mL del medio en tubos

de cultivo 18X150 con 0.0500 g de sustrato esterilizado y fue secado a peso constante en ambiente estricto de anaerobiosis. Enseguida los tubos de cultivo se colocaron 72 h en una incubadora a 39 °C para comprobar condiciones de esterilidad. Después de inocularon siete tubos por tratamiento con 1 mL del extracto de bacterias en condiciones anaeróbicas, se sellaron con tapón de hule y se pusieron en una incubadora a 39 °C.; desde ese momento el tiempo de fermentación se midió hasta las 72 h. A las 24 y 48h se hicieron dos revisiones de viales para extraer el gas acumulado. Una vez detenida la fermentación se midió el pH, potencial REDOX y se determinó la degradación de la materia seca (MS) por diferencia de peso.

Cuadro 12. Composición del medio de cultivo G-FR utilizado para evaluar variables fermentativas y degradación *in vitro* de la materia seca de las gramíneas en estudio.

Compuesto	Cantidad en 100 mL de medio
Agua destilada	52.6
Líquido ruminal clarificado	30.00
Solución mineral I	5.00
Solución mineral II	5.00
Resarzurina 0.1, (mL)	0.10
Solución de carbonato de sodio 8 %, (mL)	5.00
Solución de cisteína sulfito de sodio (mL)	2.00
Peptona de soya (g)	0.20
Extracto de levadura (g)	0.01
Glucosa (g)	0.02

Peptona de soya, BDBioxon código 211811 (nitrógeno total, 8.5% o más; pérdida en el secado, 5 % o menos; residuo de ignición 15 % o menos; proteína coagulante, trazas o negativo; pH [solución al 2 %], 6.5 a 7.5 a 25 + 1°C). Extracto de levadura. Solución mineral I: 6g de K_2HPO_4 por 1000 mL de H_2O . Solución mineral II: 6 g de KH_2PO_4 ; 6 g $(NH_4)_2SO_4$; 12 g $NaCl$; 2.45 g $MgSO_4$ y 1.6 g de $CaCl$. H_2O por 1000 mL de H_2O (Bryant y Robinson, 1962). Resazurina 0.1, modo de preparación: Agregar 0.1 mL de solución al 1 % en agua y aforar a 100 mL de agua destilada. Carbonato de sodio, sol. 8 %, contiene 8 g de carbonato de sodio en 100 mL de agua destilada. Solución de cisteína sulfito de sodio, contiene 2.5 g de L-cisteína (disuelta en 15 mL de 2N de $NaOH$); 2.5 g de $Na_2S \cdot 9H_2O$ y 0.1 mL de resazurina en volumen final de 100 mL.

4.4.5 Medición de pH a las 72 h fermentación del medio de cultivo inoculado con bacterias ruminales

Al cabo de las 72 h después de la incubación se extrajo una alícuota por vial (3 repeticiones por tratamiento) en un vaso de precipitado de 50 mL y se midió el pH con el potenciómetro ORION 720A+, ya calibrado con las soluciones amortiguadoras 7.0 y 4.0. Para este procedimiento el electrodo se enjuagó con agua destilada y fue secado con papel absorbente entre cada medición.

4.4.6 Medición del potencial REDOX del medio de cultivo inoculado con fluido ruminal a las 72 h después de la incubación

La muestra usada fue la utilizada para medir pH, y la medición se hizo con el equipo ORION, Model 710 A pH /15 E meter, ya calibrado a +220 mV Rel. Para este

procedimiento el electrodo se enjuagó con agua destilada y fue secado con papel absorbente entre mediciones.

4.4.7 Preparación de la muestra y medición de los AGV

Las muestras para medición de los AGV se prepararon con 1.5 mL del contenido de los viales después de la incubación, se agregaron 0.25 mL de ácido metafosfórico al 25 % en tubos de plástico Eppendorf, para microcentrífuga. Enseguida los viales se centrifugaron 10 min a 12000 rpm, y el sobrenadante se transfirió a viales de cristal para cromatografía de gases. Las muestras fueron leídas en el Cromatógrafo de Gases Clarus 500, Perkin Elmer con detector de ionización de flama (FID). Las condiciones de trabajo para el cromatógrafo fueron: 1 μ L de volumen de inyección; columna 15 m x 0.32 mm (Elite FFAP; temperatura de horno (130 °C); inyector (250 °C); columna (250 °C), se utilizó nitrógeno como gas acarreador (flujo 8 mL min⁻¹), H₂ y O₂ como gases para generar flama (flujo 45 y 450 mL min⁻¹), los tiempos de retención (minutos) fueron 1.26 acetato (1.26), propionato (1.60) y butirato (2.09).

4.4.8 Filtración y secado del material degradado *in vitro*

Para este proceso se usó un soporte de crisoles conectado a una bomba de vacío, las muestras se pusieron en papel filtro (Whatman No. 541) y se lavaron con agua destilada caliente hasta eliminar todo el contenido líquido en el crisol. Después se colocaron 72 h en estufa de aire forzado a 60 °C, se pesó el papel filtro más la muestra y se calculó la degradabilidad de la MS por diferencia de peso.

4.4.9 Preparación y observación mediante microscopía electrónica de barrido (MEB)

Este estudio se realizó en la Unidad de Microscopía Electrónica del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Estado de México, para evaluar las estructuras intactas de los tejidos de *Lolium perenne* L. y *Festuca arundinacea* Schreb., y la adherencia bacteriana a residuos sólidos. Dos tubos de cultivo se tomaron de la prueba de degradación *in vitro*, y se agregaron 4 mL de glutaraldehído al 2 % en amortiguador de fosfatos Sørensen 0.1 M y pH 7.2 (Ruzin, 1999), para fijar las bacterias ruminales y los residuos de los tejidos. Después de 48 h los tejidos se deshidrataron gradualmente en etanol:agua (50:50, 70:30, 80:20, 100:0 y 100:0) con 10 min entre cambio. Previo a la deshidratación, las muestras no se enjuagaron, con el propósito de mantener imperturbable el ambiente en los tubos. Después los tejidos intactos y los residuos sólidos se deshidrataron a punto crítico con CO₂ líquido en una secadora Samdri-780, Tousimis. Luego, los tejidos intactos y los residuos sólidos de la fermentación se montaron en portamuestras de cobre cubiertos con cinta adhesiva de cobre y se cubrieron por 10 min con oro:paladio (80:20) en la ionizadora (Ion Sputter JFC-1100, JEOL Fine Coat, Japón). Cada tratamiento tuvo cuatro repeticiones. Las muestras se observaron en el microscopio electrónico de barrido (JEOL JSM 6390) operado a 20 kV, magnificaciones X1000 y X2000. La observación hizo énfasis en las estructuras de los haces vasculares en la región de la vista transversal de la hoja.

4.5 Análisis estadísticos y diseños experimentales

4.5.1 Efecto de época de crecimiento

Para el estudio del efecto de la época de crecimiento sobre las variables fermentativas de degradación de componentes foliares de *Lolium perenne* y *Festuca arundinacea*, el diseño experimental fue de parcelas divididas donde la parcela mayor fue la época de crecimiento de los forrajes (verano e invierno) y las parcelas menores fueron las etapas de senescencia (0 %, 30 % y 60%). Los datos se analizaron con el procedimiento MIXTO (SAS, 2002) con estructura de covarianza AR (1), método de estimación REML1 y se hicieron contrastes ortogonales de las diferencias de los estimadores de los tratamientos de invierno - tratamientos de verano ($P \leq 0.01$). El modelo estadístico fue (Steel *et al.*, 1997):

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \gamma_k + (\alpha\gamma)_{ik} + \xi_{ijk}$$

Dónde: $Y_{ij(k)}$ = Medición de la variable respuesta en la etapa de senescencia k sobre la parcela jth asignada al forraje i; μ = Media general; α_i = Efecto del factor época; verano e invierno; γ_k = Efecto de las etapas de senescencia j: 0 %, 30 % y 60%; $(\alpha\gamma)$ = Interacción de los factores α y γ ; ξ_{ijk} = Error aleatorio asociado con la parcela jth asignada en la época del año i en la etapa de senescencia k

4.5.2 Diferencias en época de crecimiento

El diseño experimental fue completamente al azar por época de crecimiento para evaluar el comportamiento de las variables fermentativas (Steel y Torrie, 1988) y se usó el procedimiento de GML (SAS, 2002). La comparación de medias se realizó con

la prueba de Tukey (Steel *et al.*, 1997). El modelo estadístico utilizado fue el propuesto por Martínez (1988):

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \xi_{ij}$$

Dónde: Y_{ij} = Variable de respuesta en la j-ésima repetición, i-ésimo tratamiento; μ = Media general; T_i = Efecto del tiempo i; ξ_{ij} = Error experimental, $\xi_{ij} \sim N(0, \sigma^2)$

4.6 Resultados y discusión

4.6.1 Degradación *in vitro* de tejido foliar de *Lolium perenne* y *Festuca arundinacea* inoculado con poblaciones microbianas totales de rumen

El análisis con el procedimiento mixto mostró un efecto de la época de crecimiento ($P \leq 0.05$) y grado de senescencia ($P \leq 0.01$) de los forrajes sobre la DIVMS. Ohlsson (1991) reporta que un incremento en temperatura de 10 a 20 °C entre épocas de crecimiento con forrajes con la misma madurez, reduce la digestibilidad hasta 0.7 unidades por 1 °C de aumento en la temperatura e hipotetizó que los pastos producidos en latitudes y altitudes altas tienden a ser de mejor calidad que los producidos en latitudes y altitudes bajas, lo cual es un comportamiento similar a lo encontrado en nuestra investigación.

La comparación de medias mostró que la DIVMS de *Lolium-0* y *Festuca-60* fue diferente ($P \leq 0.05$) en las épocas de invierno y verano, debido probablemente a la mayor agregación de lignina en el ATH y HVNC de *Festuca-60* en verano e invierno (Cuadro 13); además, con estos tratamientos hubo una relación hoja:tallo menor

(Cuadro 6) y contenido de FDN y FDA mayor (Cuadro 7). Según Akin (1989), las células de la vaina del haz y epidermis se degradan parcialmente de manera lenta o permanecen intactas en estructuras del xilema. Hartley y Jones (1977) reportaron que en la lámina de hoja senescente de *Lolium mutiflorum* el contenido de paredes celulares en hoja y vaina fue 611.0 g kg⁻¹ MS, compuestos fenólicos (4.9 mg g⁻¹), y la degradación por celulasas del tejido fue 529 g kg⁻¹ MS. Los intervalos de pH en nuestro experimento fueron similares a los reportados por Sutton *et al.* (2003) en fluido ruminal de vacas lecheras alimentadas con una dieta compuesta por 385 g FDN kg⁻¹ MS, 216 g FDA kg⁻¹ MS, y 307 g almidón kg⁻¹ MS.

El pH del proceso de fermentación fue similar ($P > 0.05$) para los tratamientos de invierno, pero en verano *Lolium-0* y *Festuca-0* fueron diferentes ($P \leq 0.01$; Cuadro 13), probablemente por el mayor depósito de azúcares y contenido celular debido a la menor lignificación del tejido celular. El potencial redox de *Lolium-30* y *Festuca-30* fue distinto ($P \leq 0.05$) en invierno, y en verano *Festuca-30* fue menor ($P \leq 0.05$) al resto. Según Dijkstra (1994), el pH afecta el metabolismo bacteriano debido a la disponibilidad de nutrientes del sustrato y es necesario mantener el balance redox mediante la reducción y reoxidación del NAD para controlar las reacciones de fermentación; la falta de control causa cambios en la producción de AGV debido a la composición del sustrato, tasa de despolimerización, disponibilidad de sustrato, preferencias del sustrato y estrategias de fermentación de especies bacterianas.

Cuadro 13. Variables de degradación *in vitro* de tejido foliar de las gramíneas nocoladas con poblaciones totales de rumen.

Tratamiento	DIVMS (g kg ⁻¹ MS)		pH		Potencial REDOX	
	Invierno	Verano	Invierno	Verano	Invierno	Verano
	Media					
<i>Lolium</i> -0	740.60 ^a	767.80 ^a	6.80 ^a	6.84 ^a	-262.13 ^b	-278.93 ^a
<i>Lolium</i> -30	673.90 ^{bc}	705.50 ^{abc}	6.77 ^a	6.79 ^{ab}	-258.30 ^b	-266.00 ^{abc}
<i>Lolium</i> -60	677.80 ^{bc}	677.60 ^{bc}	6.77 ^a	6.75 ^{ab}	-270.86 ^{ab}	-274.50 ^{ab}
<i>Festuca</i> -0	713.70 ^{ab}	752.80 ^{ab}	6.82 ^a	6.71 ^b	-269.80 ^{ab}	-261.83 ^{bc}
<i>Festuca</i> -30	689.90 ^{abc}	737.20 ^{abc}	6.79 ^a	6.77 ^{ab}	-288.53 ^a	-257.93 ^c
<i>Festuca</i> -60	640.20 ^c	658.80 ^c	6.75 ^a	6.76 ^{ab}	-277.06 ^{ab}	-276.66 ^a
EE [†]	1.191	1.884	0.024	0.027	5.004	2.834

[†] Error estándar de la media. Medias con distinta letra en una columna son estadísticamente diferentes (Tukey, P≤0.05).

La Figura 20 muestra que los forrajes de verano con 0 %, 30 % y 60 % de senescencia tienen mayor DIVMS que aquellos crecidos en invierno, pero al ser analizados con contrastes ortogonales, los forrajes con 60 % de senescencia foliar muestran una variación marginal sobre la DIVMS en ambas épocas de crecimiento (Cuadro 14).

Cuadro 14. Contrastes ortogonales de la DIVMS de *Lolium perenne* y *Festuca arundinacea*.

Época		Verano		
Contraste	Senescencia (%)	0	30	60
	0	-3.31	0.57	5.89
Invierno	30	-7.84	-3.95	1.37
	60	-10.13	-6.23	-0.91

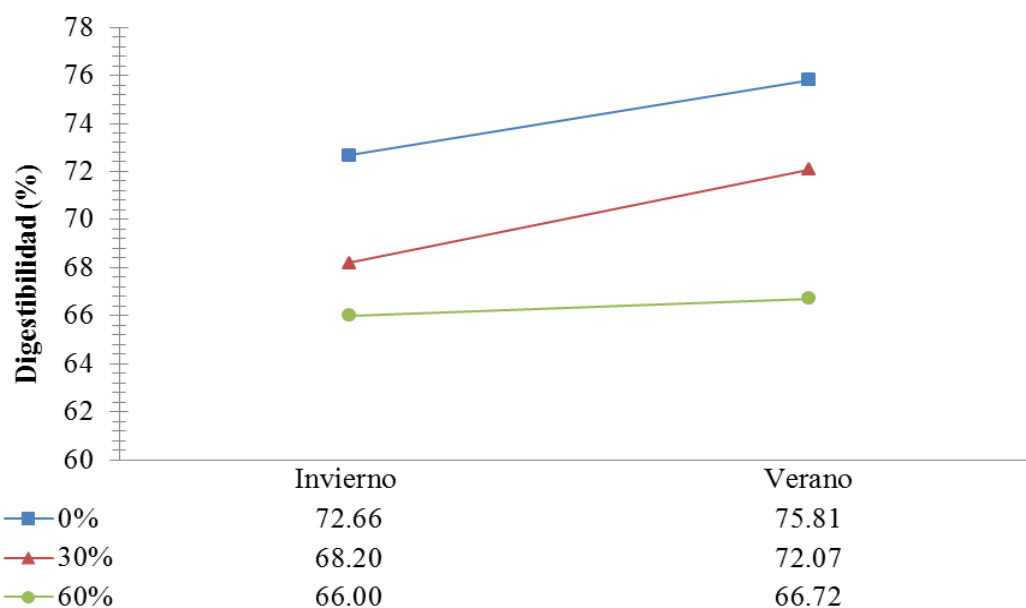


Figura 20. Degradación *in vitro* de la materia seca de tejido foliar de *Lolium perenne* y *Festuca arundinacea*.

4.6.2 Perfil de ácidos grasos volátiles producidos por la degradación de tejido vegetal de los forrajes

De acuerdo con el análisis de procedimiento MIXTO hubo un efecto ($P \leq 0.05$) de la etapa de senescencia del tejido foliar sobre la respuesta fermentativa y producción de AGV. El perfil de AGV producto de la fermentación *in vitro* del tejido foliar obtenido en verano (Cuadro 13), no muestra diferencias ($P > 0.05$) entre tratamientos para el promedio total y el porcentaje de ácido butírico, consecuencia de la fermentación de los componentes de la pared celular.

La comparación de medias en épocas de crecimiento no mostró diferencias ($P > 0.05$) en la producción total de AGV para los tratamientos de verano, pero en invierno *Lolium*-30 fue menor ($P \leq 0.05$) a *Lolium*-0, *Festuca*-30 y *Festuca*-60. El porcentaje de acetato fue distinto ($P \leq 0.05$) entre *Lolium*-0 y *Festuca*-0, así como el mayor porcentaje de propionato ($P \leq 0.05$) fue para *Festuca*-0 y *Festuca*-60 en verano (Cuadro 15). En invierno la producción total de AGV fue mayor ($P \leq 0.05$) en *Lolium*-0, *Festuca*-30 y *Festuca*-60, mientras que el porcentaje de acetato fue mayor ($P \leq 0.05$) en *Festuca*-0 y *Festuca*-60 para la época de invierno, debido probablemente al mayor contenido de FDN (Cuadro 7). Los tratamientos *Lolium*-30 y *Festuca*-0 fueron diferentes ($P \leq 0.05$) en butirato para el tejido foliar de invierno. La concentración molar total en este estudio fue cerca de la mitad de la concentración de AGV reportada por Sutton *et al.* (2003) en fluido ruminal de vacas lecheras alimentadas con una dieta heno de *Lolium* (600 g kg^{-1}) y concentrado (400 g kg^{-1} ; concentración total, 85 mmol L^{-1} ; acetato; 68, propionato, 19; butirato, 13% molar). Según Gordon *et al.* (1985), la composición de carbohidratos en hoja de *Lolium perenne* con diferente

madurez fue glucosa (43.51-46.57 % MS), xilosa (21.35-25.01 % MS), compuestos fenólicos totales (5.31-5.01 % MS) en rebrote y corte temprano, respectivamente, y estos carbohidratos son fermentados por bacterias ruminales y contribuyen de manera directa a la mayor producción de AGV, pero la suma total de compuestos fenólicos y lignina en hoja fue 5.38-6.02 % MS, valores similares a nuestros hallazgos de lignina y compuestos fenólicos agregados a las estructuras celulares del ATH (Cuadro 9).

Cuadro 15. Perfil de ácidos grasos volátiles (AGV) de la degradación *in vitro* de tejido foliar de *Lolium perenne* y *Festuca arundinacea*.

Ácidos grasos volátiles (AGV % molar)				
Verano				
Tratamiento	Total (mM L ⁻¹)	Acetato	Propionato	Butirato
<i>Lolium</i> -0	41.32 ^a	36.34 ^a	37.01 ^b	26.64 ^a
<i>Lolium</i> -30	40.28 ^a	35.92 ^{ab}	37.52 ^b	26.54 ^a
<i>Lolium</i> -60	38.44 ^a	33.53 ^{abc}	38.79 ^b	27.66 ^a
<i>Festuca</i> -0	38.03 ^a	31.23 ^c	42.80 ^a	25.96 ^a
<i>Festuca</i> -30	36.97 ^a	34.20 ^{abc}	38.06 ^b	27.72 ^a
<i>Festuca</i> -60	36.48 ^a	31.94 ^{bc}	42.15 ^a	25.90 ^a
EE [†]	1.855	0.938	0.658	0.442
Invierno				
<i>Lolium</i> - 0	43.42 ^a	34.74 ^{ab}	39.03 ^a	26.22 ^{ab}
<i>Lolium</i> - 30	31.72 ^b	31.20 ^b	40.81 ^a	27.97 ^a

<i>Lolium</i> - 60	33.93 ^{ab}	32.99 ^{ab}	40.73 ^a	26.27 ^{ab}
<i>Festuca</i> - 0	38.41 ^{ab}	36.87 ^a	39.19 ^a	23.92 ^c
<i>Festuca</i> - 30	42.02 ^a	35.64 ^{ab}	38.36 ^a	25.98 ^{abc}
<i>Festuca</i> - 60	41.52 ^a	35.83 ^a	39.93 ^a	24.22 ^{bc}
EE [†]	2.240	1.051	0.686	0.518

† Error estándar de la media. Medias con distinta letra en una columna son estadísticamente diferentes (Tukey, $P \leq 0.05$).

La tasa acetato: propionato es cercana a 0.5, debido probablemente a la exclusión de protozoarios del inóculo ruminal. Jouany *et al.* (1988) mencionan que la desfaunación tiende a incrementar las proporciones molares de propionato a expensas de butirato, producto de cambios en pH, fermentación de almidón, y azúcares (Dijkstra, 1994), y el potencial de reducción generado durante la conversión de hexosa a acetato o butirato se usa en parte para la formación de propionato, pero de manera principal para la conversión a metano (France y Dijkstra, 2005).

El cambio en las proporciones molares de ácido acético y ácido propiónico en la presente investigación se puede deber a la mayor disponibilidad de contenido celular en los pastos en la época de verano. Al respecto, Dijkstra (1994) menciona que esto ocurre por una mayor tasa de despolimerización de los nutrientes y está relacionado con el exceso de poder de reducción en el medio.

Cuadro 16. Contrastes ortogonales de la concentración total de ácidos grasos volátiles (AGV) de la fermentación *in vitro* de *Lolium perenne* y *Festuca arundinacea*.

Concentración total de AGV				
Época	Senescencia (%)	Verano		
		0	30	60
Invierno	0	1.24	2.27	3.45
	30	-2.80	-1.75	-0.59
	60	-1.95	-0.90	0.26
Acetato				
Invierno	0	2.02	0.74	3.07
	30	-0.36	-1.63	0.69
	60	0.63	-0.65	1.68
Propionato				
Invierno	0	-0.79	1.32	-1.36
	30	-0.32	1.79	-0.89
	60	0.42	2.54	-0.14
Butirato				
Invierno	0	-1.23	-2.06	-1.70
	30	0.68	-0.15	0.20
	60	-1.05	-1.89	-1.53

El análisis mediante contrastes ortogonales (Cuadro 16) muestra que la producción total de AGV de los tratamientos con 30 % de senescencia fueron menores en el invierno, respecto a los tratamientos de verano, lo cual es corroborado de manera

gráfica en la Figura 21. Los pastos sin envejecimiento celular en invierno produjeron mayor concentración total de AGV y acetato, comparado con los tratamientos de verano. El propionato producido por la fermentación de tejido foliar con 60 % de senescencia fue mayor en verano, y el butirato producido fue menor en pastos con 0 % y 60 % de senescencia en invierno.

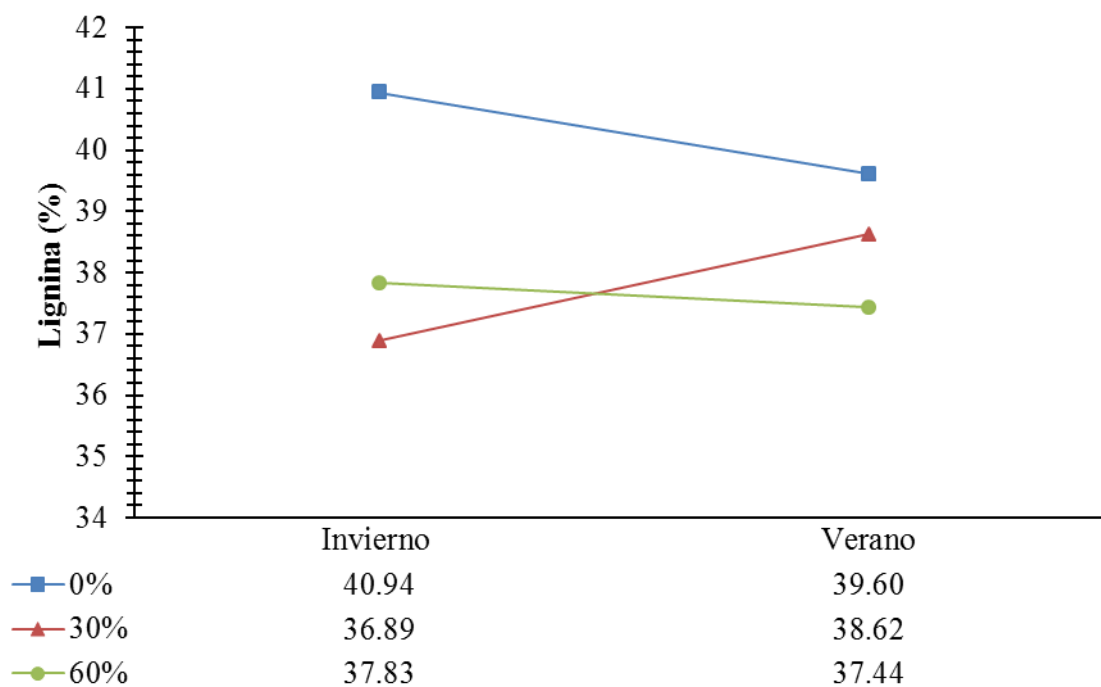


Figura 21. Perfil de ácidos grasos volátiles producido por la fermentación *in vitro* de tejido foliar de *Lolium perenne* y *Festuca arundinacea*.

4.6.3 Adherencia de bacterias ruminales a residuos sólidos de tejido foliar degradados *in vitro*

El tejido foliar de *Lolium perenne* y *Festuca arundinacea* medidos en ambas épocas de crecimiento (Figura 22 y 23) carecieron de adherencia microbiana, previo a la

fermentación y degradación *in vitro*. El efecto de maceración a tamaño de partícula 2 mm, destruyó gran parte del mesófilo y epidermis de las muestras, lo cual causó la observación directa de los haces vasculares. Las estructuras presentes fueron proporciones mínimas de células del mesófilo, elementos de vaso, elementos traqueales, engrosamiento de paredes de elementos del floema (Figura 22B, 23F; Essau, 1977), epidermis adaxial (Figura 22A, 22E) y abaxial (Figura 22F, 23A y 23B). Los tejidos con mayor envejecimiento celular tuvieron expuestas trazas de elementos traqueales con engrosamiento helicoidal y elementos de vaso con punteaduras simples. En los tejidos degradados por acción microbiana, se observaron conjuntos “cluster” de bacterias adheridas con estructuras extracelulares fibrosas a tejido foliar (Figura 24 y 25), y presentaron una biofilm de textura esponjosa, con canales y agujeros abiertos. Los cluster de bacterias estuvieron intactos y revelaron que pueden aglutinarse de manera indistinta sobre las estructuras celulares de la hoja. El tipo de bacterias observadas adheridas a las paredes celulares del tejido por identificación de forma fueron cocos, bacilos, estafilococos y estreptococos. Las bacterias adheridas a los residuos de xilema tienen forma de coco y bacilos, y según Akin (1980) las poblaciones de cocos se adhieren más a las estructuras del esclerénquima que a otros tejidos en *Festuca*. En nuestro estudio predominaron especies de *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens* y *Bacteroides succinogenes*. Akin (1976) menciona que alrededor de 37 % de bacterias adheridas a la pared celular de hoja de *Cynodon dactylon* L. Pers. mediante estructuras extracelulares fueron bacilos gram negativos. En nuestro estudio se observó que la cantidad de clusters disminuyó debido a la decreciente disponibilidad de carbohidratos

en tejidos con mayor contenido de lignina y por el tipo de tejido celular presente. Akin y Amos (1975) concluyen que el anclaje de bacteria a tejido de la pared celular es mediado por componentes extracelulares y la adherencia a estos depende de la presencia y tipo del tejido presente. Las biofilm presentes en el proceso de degradación *in vitro* fueron clase IV y V, caracterizadas por una alta diversidad en ecosistemas microbianos como respuesta a las condiciones ruminales. Estos ecosistemas son complejos debido al grado de interacción entre bacterias en respuesta a competencia por nutrientes, fluidos hidrodinámicos, pH, potencial redox y gradientes de formación intraplaca (Sissons *et al.*, 2000). Estas interacciones incluyen relaciones de adhesión bacteriana, nutrientes de alimentación cruzada, rompimiento de macromoléculas complementarias, factores de defensa antimicrobiano, competición por nutrientes y espacio, antagonismo directo por metabolitos y enzimas (Christensen y Characklis, 1990). Además, el sinergismo entre bacterias está involucrado en la digestión de la pared celular, especialmente en los estados tardíos después del inicio de la digestión (Akin, 1980). Por lo tanto, las diferencias entre conjuntos y especies microbianas reflejan patrones distintos de fermentación por preferencia de sustratos (Dijkstra, 1994), lo cual se refleja en las diferencias encontradas en la DIVMS y producción de ácidos grasos volátiles para ambas épocas de medición en nuestra investigación.

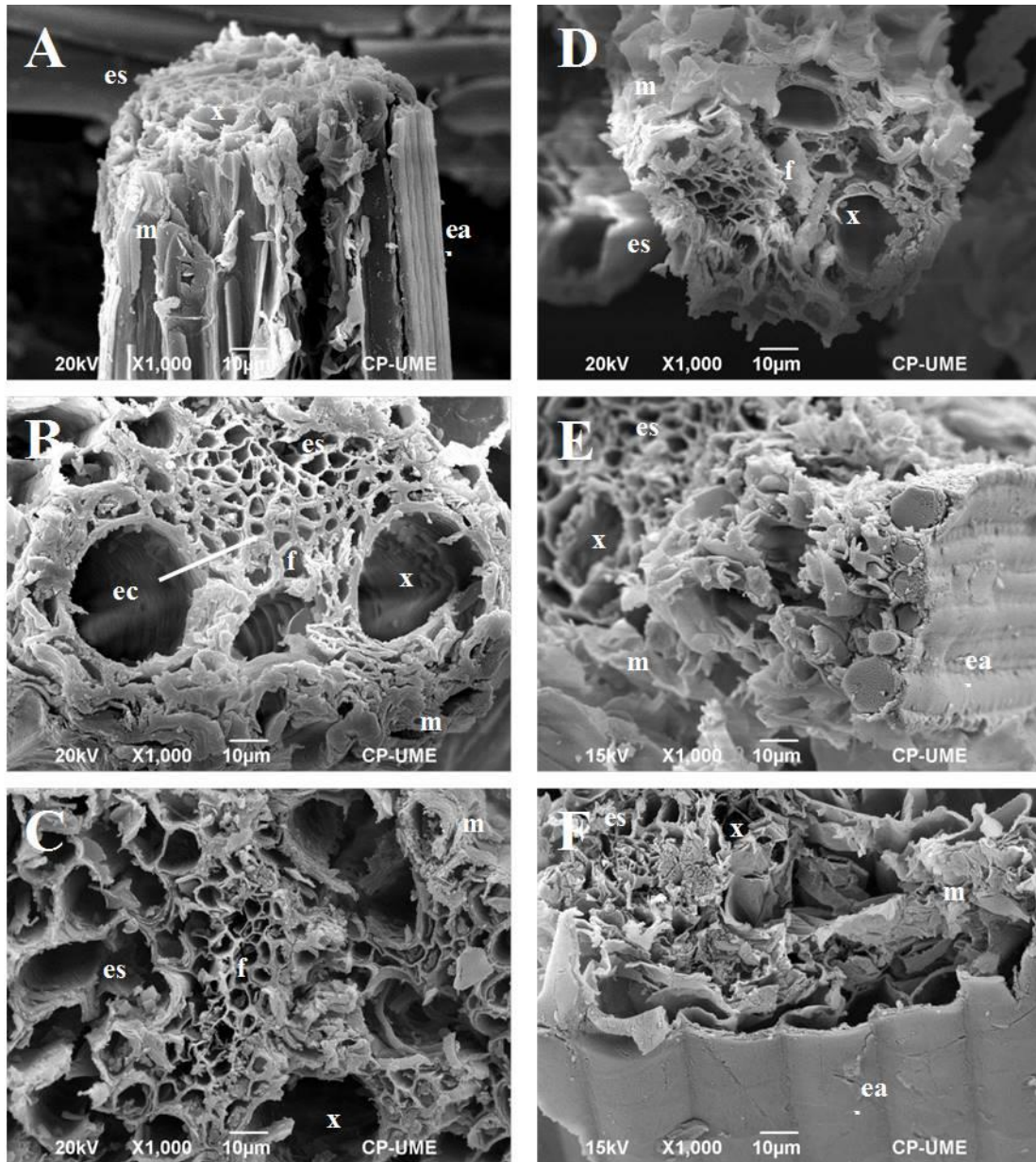


Figura 22. Microestructura observada con MEB de tejido foliar de verano previo degradación *in vitro*, de *Lolium perenne* (A; 0 %, B; 30 %, C; 60 % senescencia) y *Festuca arundinacea* (D; 0 %, E; 30 %, F; 60 % de senescencia): ea, epidermis adaxial; es, esclerénquima de la extensión de la vaina del haz; f, floema; m, mesófilo; x, xilema; ec, engrosamiento secundario.

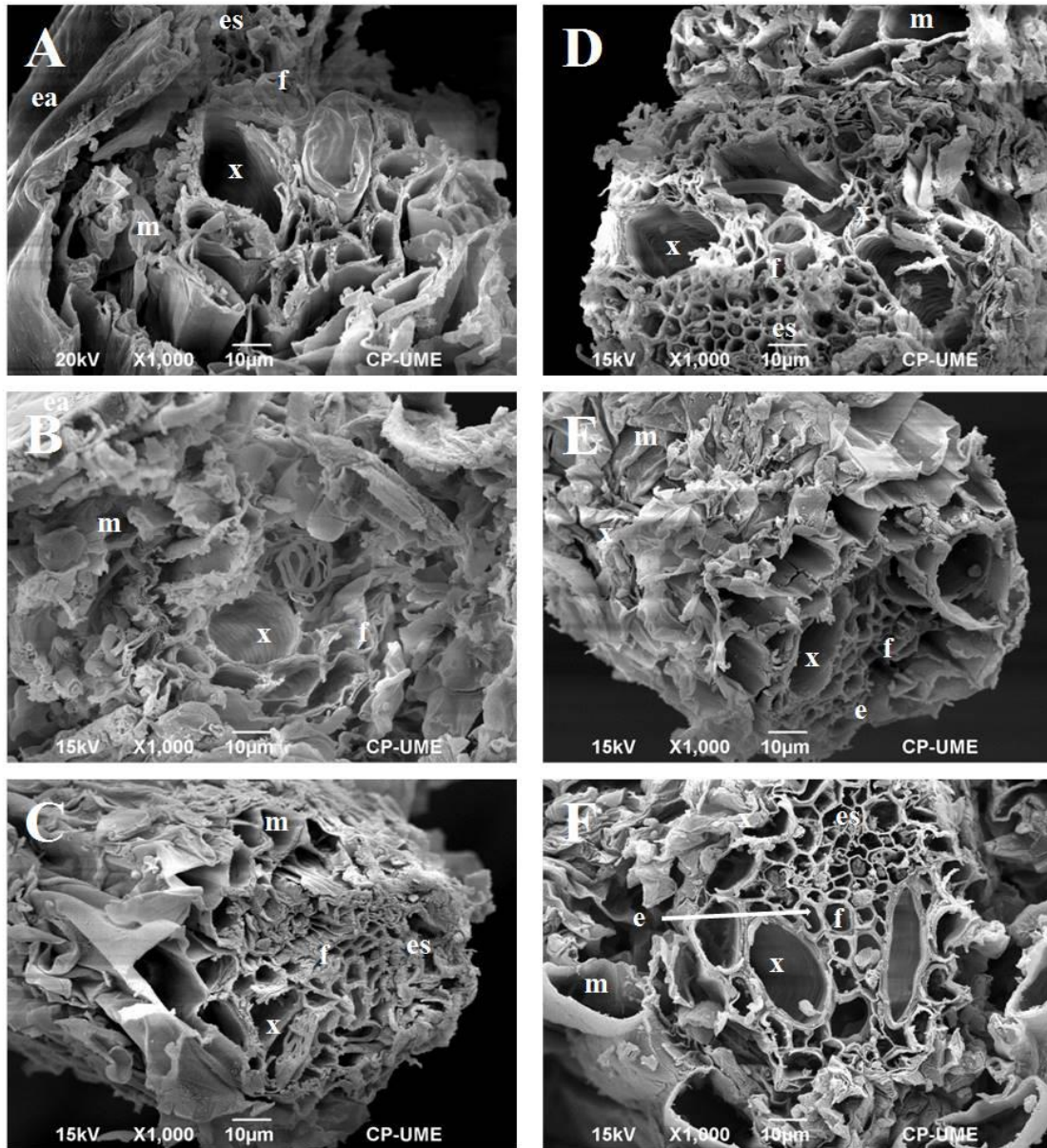


Figura 23. Microestructura observada con MEB de tejido foliar de invierno, previo a incubación *in vitro*, de *Lolium perenne* (A; 0 %, B; 30 %, C; 60 % senescencia) y *Festuca arundinacea* (D; 0 %, E; 30 %, F; 60 % senescencia): ea, epidermis adaxial; es, esclerenquima de la extensión de la vaina del haz; f, floema; m, mesófilo; vhw, vaina del haz vascular; x, xilema; e, elemento de vaso; ec, engrosamiento secundario.

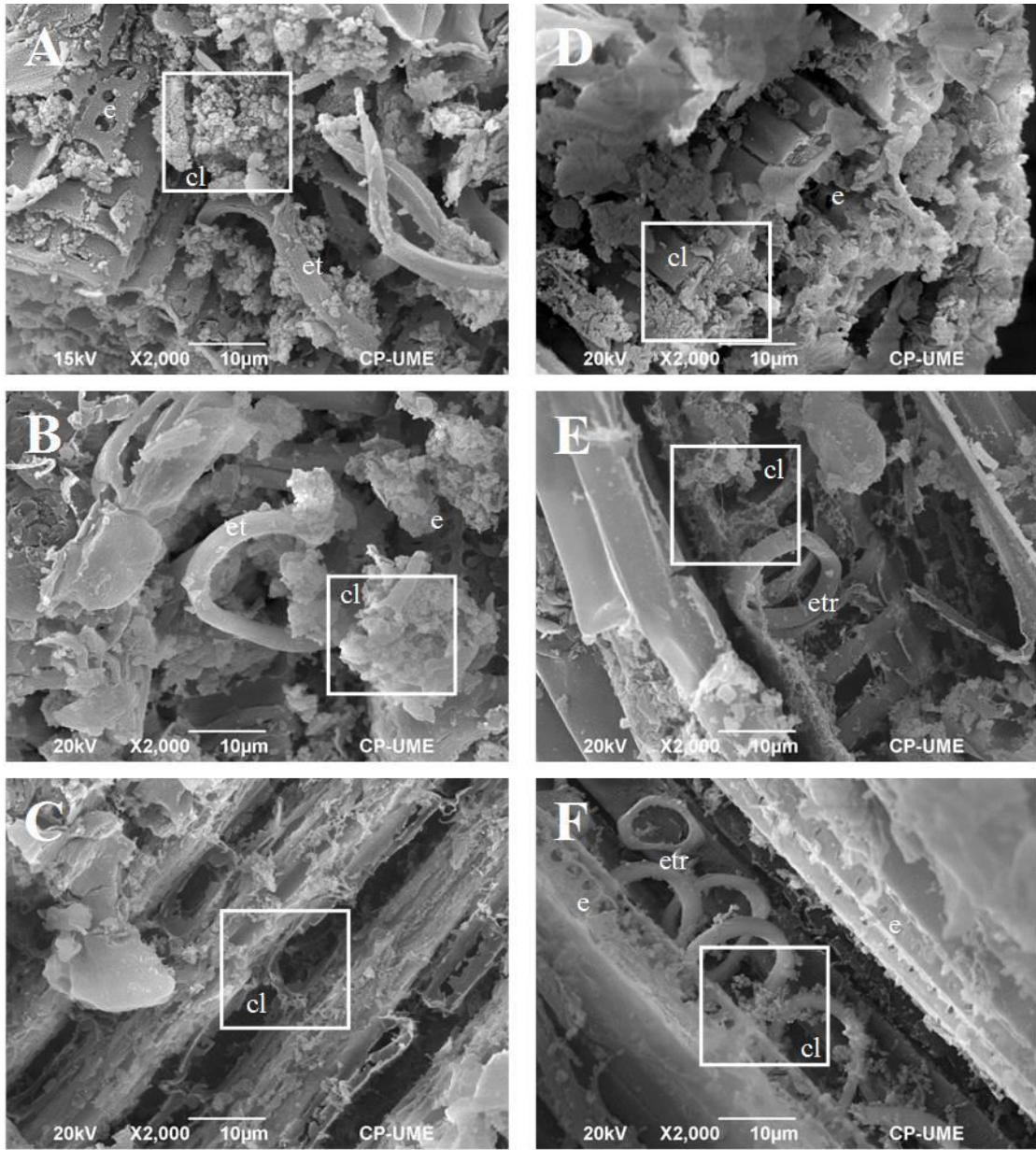


Figura 24. Microestructura observada con MEB de tejido foliar de verano, degradado *in vitro*, de *Lolium perenne* (A; 0 %, B; 30 %, C; 60 % senescencia) y *Festuca arundinacea* (D; 0 %, E; 30 %, F; 60 % senescencia): cl, colonias de microbiota; e, elemento de vaso; etr, elemento vaso con engrosamiento helicoidal.

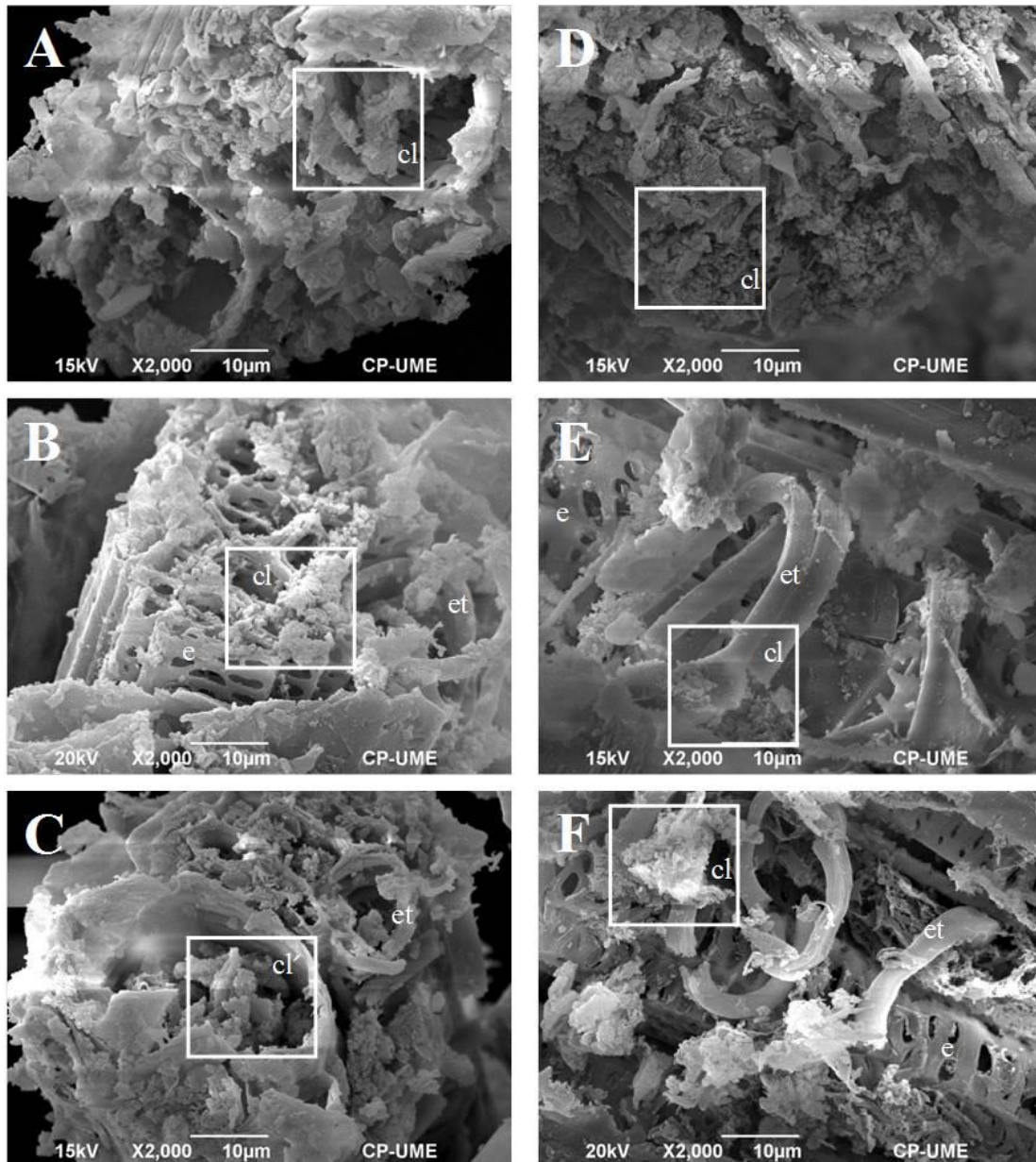


Figura 25. Microestructura observada con MEB de tejido foliar de invierno degradado *in vitro*, de *Lolium perenne* (A; 0 %, B; 30 %, C; 60 % senescencia) y *Festuca arundinacea* (D; 0 %, E; 30 %, F; 60 % senescencia). cl, colonias de microbiota; e, elemento de vaso con punteaduras simples; et, elemento traqueal con engrosamiento helicoidal.

CAPITULO 5. CONCLUSIONES

De acuerdo con el análisis de los resultados se concluye:

- El tiempo requerido por ambos pastos para alcanzar el mayor grado de senescencia foliar fue menor en invierno y coincidió con el descenso de la temperatura y precipitación, pero no afectó el contenido de materia seca para *Lolium perenne* y *Festuca arundinacea*.
- El envejecimiento celular de las hojas de *Lolium perenne* y *Festuca arundinacea* fue diferente a lo largo del ciclo de vida, pero cuando alcanzaron los grados máximos de senescencia mostraron similitudes en cada una de las épocas de crecimiento; las hojas de *Festuca* con mayor vejez tuvieron más contenido de FDN y FDA.
- La agregación de lignina en las estructuras celulares de tejido foliar fue evidente en las células de la extensión de la vaina del haz vascular y células subepidérmicas de la nervadura central en *Lolium perenne* y *Festuca arundinacea* conforme aumentó el grado de senescencia, pero *Lolium* tuvo mayor lignificación en invierno.
- La época de crecimiento y envejecimiento celular tuvieron efecto sobre el grado de lignificación de la vaina del haz vascular y su extensión subepidérmica, pero no en los elementos de conducción y otros componentes

de la nervadura central, ni tampoco sobre los demás tejidos de la hoja.

- La época de crecimiento y envejecimiento celular de estos pastos afecta la degradación *in vitro* de la materia seca, así como las condiciones de fermentación por microorganismos ruminales y producción de ácidos grasos volátiles, pero la diferencia fue mínima en el envejecimiento celular máximo.
- Las bacterias ruminales agregadas en clúster permanecieron adheridas a células con engrosamiento secundario, residuos de epidermis y a los elementos de vaso del xilema después de 72 h de fermentación, mediante estructuras extracelulares fibrosas.
- La evaluación del porcentaje relativo de lignina por este método evidencia la importancia de conocer la relación entre senescencia y engrosamiento secundario de las células que conforman los haces vasculares y esclerénquima en tejido de hoja, para así determinar el alcance de la degradación de los componentes de la pared celular.

CAPÍTULO 6. LITERATURA CITADA

- Achyuthan, K. E., A. M., Achyuthan, P. D., Adams, S. M., Dirk, J. C. Harper, B. A., Simmons, and A. K. Singh. 2010. Supramolecular self-assembled chaos: polyphenolic lignin's barrier to cost-effective lignocellulosic biofuels. *Molecules* 15: 8641-8688.
- Adler, E. 1977. Lignin chemistry—past, present and future. *Wood Science Technology* 11: 169-218.
- Akin, D. E. 1976. Ultrastructure of rumen bacterial attachment to forage cell walls. *Applied Environmental Microbiology* 31: 562–568.
- Akin, D. E. 1980. Evaluation by electron microscopy and anaerobic culture of types of rumen bacteria associated with digestion of forage cell walls. *Applied and Environmental Microbiology* 39: 242-252.
- Akin, D. E., and H. E. Amos. 1975. Rumen bacterial degradation of forage cell walls investigated by electron microscopy. *Applied Microbiology* 29(5): 692–701.
- Akin, D. E. 1989. Histological and physical factors affecting digestibility of forages. *Agronomy Journal* 81: 17-25.
- Akin, D. E. 2007. Grass lignocelluloses: strategies to overcome recalcitrance. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 137(1): 3-15.

- Allen, M. S. 1997. Relationship between fermentation acid production in the rumen and requirement for physically effective fiber. *Journal of Dairy Science* 80: 1447-1462.
- Allinson D.W. 1971. Influence of photoperiod and thermoperiod on the IVDMD and cell wall components of tall fescue. *Crop Science* 11: 456–458.
- Andrade, S. V, M. L. T. M. Polizeli, H. F. Terenzi, and J. A. Jorge. 2004. Effect of carbon source in the biochemical properties of the β -xylosidase produced by *Aspergillus versicolor*. *Process Biochemistry* 39(12): 1931–1938.
- AOAC (Association of Official Analytic Chemist). 1990. Official methods of analysis, 15th ed. Association of Official Analytic Chemist, Washington, DC, USA, 1094 p.
- Awano, T., K. Takabe, and M. Fujita, 2002. Xylan deposition on secondary wall of *Fagus crenata* fiber. *Protoplasma* 219: 106–115.
- Ros Barceló, A. 2005. Xylem parenchyma cells deliver the H₂O₂ necessary for lignification in differentiating xylem vessels. *Planta* 220: 747–756.
- Bauchop, T. 1981. The anaerobic fungi in rumen fibre digestion. *Agricultural and Environment* 6: 339–348.
- Bedford M. R., and G. G. Partridge. 2011. *Enzymes in farm animal nutrition*. 2da. ed. CAB International. 319 p.

- Beguin, P. 1990. Molecular biology of cellulose degradation. Annual Review of Microbiology 44: 219–248.
- Berlyn, G. P., and J. P. Miksche. 1976. Botanical microtechnique and cytochemistry. The Iowa State University Press, Ames, Iowa. 326 p.
- Besle, J., A. Cornu, and P. Jouany. 1994. Roles of structural phenylpropanoids in forage cell wall digestion. Journal of the Science of Food and Agriculture 64: 171-190.
- Bhat, M. K., and G. P. Hazlewood. 2003. Enzymology and other characteristics of cellulases and xilanases. *In*: Bedford, M. R., and G. G. Partridge (Eds). Enzymes in farm animal nutrition. 2a ed. CABI International, U. K. 11-59 pp.
- Bidlack, J., M. Malone, and R. Benson. 1992. Molecular structure and component integration of secondary cell walls in plants. Proceedings Oklahoma Academy of Science 72: 51-56.
- Binyamin, L., M. Falah, V. Portnoy, E. Soudri, and S. Gepstein. 2001. The early light-induced protein is also produced during leaf senescence of *Nicotiana tabacum*. Planta 211: 591-597.
- Birchman, J. and J. Hodgson. 1983. The influence of sward conditions on rates of herbage growth and senescence in mixed swards under continuous grazing management. Grass and Forage Science 38: 323-331.

- Bollhöner, B., J. Prestele, and H. Tuominen. 2012. Xylem cell death: emerging understanding of regulation and function. *Journal of Experimental Botany* 63(3): 1081–1094.
- Borneman, W. S., D. E. Akin, and L. G. Ljungdahl. 1989. Fermentation products and plant cell wall-degrading enzymes produced by monocentric and polycentric anaerobic ruminal fungi. *Applied and Environmental Microbiology* 55(5): 1066-1073.
- Brink, G. E., and T. E. Fairbrother. 1994. Cell wall composition of diverse clovers during primary spring growth. *Crop Science* 34:1666–1671
- Brown, W. V. 1975. Variations in anatomy, associations, and origins of Kranz tissue. *American Journal of Botany* 62: 395-402.
- Bryant, M. P., and I. M. Robinson. 1962. Some nutritional characteristics of predominant culturable ruminal bacteria. *Journal of Bacteriology* 84(4): 605-614.
- Buchanan-Wollaston, V. 1997. The molecular biology of leaf senescence. *Journal of experimental Botany* 48:181-199.
- Buchanan-Wollaston V., S. Earl, E. Harrison, E. Mathas, S. Navabpour, T. Page, and D. Pink. 2003. The molecular analysis of leaf senescence--a genomics approach. *Plant Biotechnol Journal* 1(1): 3-22.

- Buxton, D. R., and S. L. Fales. 1994. Plant Environment and Quality. In: Fahey, Jr., G. C., M. Collins, D. R. Mertens and, L. E. Moser (Eds). Forage quality, evaluation, and utilization. American Society of Agronomy, Madison, WI, USA. 155-199 pp.
- Byott, G. S. 1976. Leaf air space systems in C3 and C4 species. *New Phytologist* 76: 295-299.
- Carolin, R. C., S. W. L. Jacobs, and M. Vesk. 1973. The structure of the cells of the mesophyll and the parenchymatous bundle sheath of the *Gramineae*. *Botanical Journal of the Linnean Society* 66: 259-275.
- Carpita, N. C. 1996. Structure and biogenesis of the cell walls of grasses. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47: 445–476.
- Carpita, N., and M. McCann. 2000. The cell wall. In: B. Buchanan, W. Gruissem, and R. Jones (Eds). *Biochemistry and molecular biology of plants*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD. 52–108 pp.
- Cassab, G. I. 1998. Plant cell wall proteins. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49: 281–309.
- Chen, L., C. Auh, P. Dowling, J. Bell, D. Lehmann, and Z. Wang. 2004. Transgenic down-regulation of caffeic acid O-methyltransferase (COMT) led to improved digestibility in tall fescue (*Festuca arundinacea*). *Functional Plant Biology* 31: 235–245.

- Chen, X., L. J. K. Wang, Y. M. Wu, and J. X. Liu. 2008. Effects of chemical treatments of rice straw on rumen fermentation characteristics, fibrolytic enzyme activities and populations of liquid- and solid-associated ruminal microbes *in vitro*. *Animal Feed Science and Technology* 141: 1-14.
- Chesson, A., A. H. Gordon, and J. A. Lomax. 1983. Substituent groups linked by alkali-labile bonds to arabinose and xylose residues of legume, grass and cereal straw cell walls and their fate during digestion by rumen microorganisms. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 34: 1330-1340.
- Christensen, B. E., and W. G. Characklis. 1990. Physical and chemical properties of biofilms. In: Characklis, W.G., ed: *Biofilms*. Wiley, New York, 93-130 pp.
- Church, D. C., W. G. Pond, and K. R. Pond. 2002. *Fundamentos de la nutrición y alimentación de animales*. Segunda edición. Edit. LIMUSA WILEY. México. 635 p.
- Dangl, J., R. Dietrich, and H. Thomas. 2000. Senescence and programmed cell death. In: Buchanan, B., W. Gruissemann, and R. Jones (Eds). *Biochemistry and molecular biology of plants*. Rockville, Maryland: American Society of Plant Physiologists. 1044-1100 pp.
- Darley, C. P., A. M. Forrester, and S. J. McQueen-Mason. 2001. The molecular basis of plant cell wall extension. *Plant Molecular Biology* 47: 179–195.

- Darvill, J. E., M. McNeil, A. G. Darvill, and P. Albersheim. 1980. Structure of plant cell walls. XI. Glucuronoarabinoxylan, a second hemicellulose in the primary cell walls of suspension-cultured sycamore cells. *Plant Physiology* 66: 1135–1139.
- Davin, L. B., and N. G. Lewis. 2005. Lignin primary structures and dirigent sites. *Current Opinion in Biotechnology* 6: 407-415.
- Dehority, B. A. 1993. Microbial ecology of cell wall fermentation. In: Forage cell wall structure and digestibility. Jung H. G., D. R. Buxton, R. D. Hatfield and J. Ralph (Eds). American Society of Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc. and Soil Science Society of America. Inc., Madison WI, 425-453 pp.
- Deinum, B., and J. G. P. Dirven. 1971. Climate, nitrogen and grass. 4. The influence of age on chemical composition and in vitro digestibility of maize (*Zea mays* L.) and tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.). *Netherlands Journal of Agricultural Science* 19: 264-272.
- Denman, S. E. and C. S. McSweeney. 2006. Development of a real-time PCR assay for monitoring anaerobic fungal and cellulolytic bacterial populations within the rumen. *FEMS Microbiology Ecology* 58: 572–582.
- Dijkstra, J. 1994. Production and absorption of volatile fatty acids in the rumen. *Livestock Product Science* 39: 61–69.
- Do, C. T., B. Pollet, J. Thevenin, R. Sibout, D. Denoue, Y. Barriere, C. Lapierre, and L. Jouanin. 2007. 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* 226: 1117–1129.

Dodd, D., A. S. Kocherginskaya, M. A. Spies, K. E. Beery, C. A. Abbas, R. I Mackie, and I. K. O. Cann. Biochemical analysis of a β -D-Xylosidase and a bifunctional xylanase-ferulic acid esterase from a xylanolytic gene cluster in *Prevotella ruminicola* 23. *Journal of Bacteriology* 191(10): 3328-3338.

Eadie, J. M. and J. C. Gill. 1971. The effect of the absence of rumen ciliate protozoa on growing lambs fed on a roughage-concentrate diet. *British Journal of Nutrition* 26: 95–107.

Ebringerova, A. y T. Hienze. 2000. Xylan and xylan derivatives-biopolymers with valuable properties. 1. Naturally occurring xylans, isolation procedures and properties. *Macromolecular Rapid Communications* 21:542–556.

El Kayal, W., G. Keller, C. Debayles, R. Kumar, D. Weier, C. Teulieres, and C. Marque. 2006. Regulation of tocopherol biosynthesis through transcriptional control of tocopherol cyclase during cold hardening in *Eucalyptus gunnii*. *Physiologia Plantarum* 126: 212–223.

Erwin, E. S., G. J. Marco, and E. M. Emery. 1961. Volatile fatty acid analyses of blood and rumen fluid by gas chromatography. *Journal of Dairy Science* 44 (9): 1768-1770.

Esau, K. 1977. *Anatomy of seed plants*. 2a ed. John Wiley & Sons, New York. 550 p.

- Esser, K., C. P. Kubicek, and I. S. Druzhinina. 2007. *Mycota - a comprehensive treatise on fungi as experimental systems for basic and applied research. IV Environmental and microbial relationships* 2nd ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 345 p.
- Eulgem, T., P. J. Rusthon, S. Robatzek, and I.E. Somssich. 2000. The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends in Plant Science*: 5, 199-206.
- Evert, R. F. 2006. *Esau's plant anatomy, Ed. 3ra*. John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, New Jersey. 601 p.
- Ford, C. W., I. M. Morrison, and J. R. Wilson. 1979. Temperature effects on lignin, hemicellulose and cellulose in tropical and temperate grasses. *Australian Journal of Agricultural Research* 30: 621–633.
- Forsberg, C. W., T. J. Beveridge, and A. Hellstrom. 1981. Cellulase and xylanase release from *Bacteroides succinogenes* and its importance in the rumen. *Applied and Environmental Microbiology* 42(5): 886-896.
- France, J. and J. Dijkstra. 2005. Volatile fatty acid production. In: J. Dijkstra, J. M. Forbes, and J. France (Eds). *Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism*, 2nd edition. 746 p.
- Frey-Wyssling, A. 1976. The plant cell wall. In *Handbuch der Pfl anzenanatomie, Band 3, Teil 4. Abt. Cytologie*, 3rd rev. ed. Gebrüder Borntraeger, Berlin. 294 p.

- Gadd, G. M. 2001. Fungi in bioremediation. British Mycological Society symposium series; 23. The Edinburgh Building, Cambridge CB2 8RU, UK. 496 p.
- Gamauf, G., B. Metz, and B. Seiboth. 2007. Degradation of plant cell wall polymers by fungi. In: Esser K., C.P. Kubicek, I.S. Druzhinina (Eds). *Mycota - a comprehensive treatise on fungi as experimental systems for basic and applied research. IV Environmental and microbial relationships* 2nd ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 345 p.
- García, E. 2004. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köpen. Instituto de Geografía-UNAM. México. 98 p.
- Gasser, M., J. Ramos, A. Vegetti, and J. C. Tivano. 2003. Digestión de láminas foliares de *Bromus auleticus* Trin. ex Nees sometidas a diferentes tiempos de incubación ruminal. *Agricultura Técnica* 65(1): 48-54.
- Gepstein, S. 1988. Photosynthesis in senescence and aging in plants. In: Nooden, L., and A. C. Leopold (Eds). *Senescence and aging in plants*. Academic Press. 85-109 pp.
- Gepstein, S., G. Sabehi, M. -J. Carp, T. Hajouj, M. F. O. Neshar, I. Yariv, C. Dor, and M. Bassani. 2003. Large-scale identification of leaf senescence-associated genes. *Plant Journal* 36: 629-642.
- Gordon, A. H., J. A. Lomax, K. Dalgarno, and A. Chesson. 1985. Preparation and Composition of Mesophyll, Epidermis and fibre cell walls from leaves of

- perennial ryegrass (*Lolium perenne*) and italian ryegrass (*Lolium multiflorum*).
Journal of the Science of Food Agriculture 36: 509-519.
- Goto, M., T. Sato, and O. Morita. 1993. Variations in anatomy and ultraviolet microspectrometry between normal and brown midrib-mutant maizes possessing different rumen degradabilities. Journal of the Science of Food Agriculture 63: 427-434.
- Groleau, D., and C. W. Forsberg. 1981. Cellulolytic activity of the rumen bacterium *Bacteroides succinogenes*. Canadian Journal of Microbiology 27: 517-530.
- Grover A., and A. M. Jones. 1999. Tracheary element differentiation uses a novel mechanism coordinating programmed cell death and secondary cell wall synthesis. Plant Physiology 119: 375–384.
- Guterman, A., T. Hajouj, and S. Gepstein. 2003. Senescence-associated mRNAs that may participate in signal transduction and protein trafficking. Plant Physiology 118: 439-446.
- Hajouj, T., R. Michelis, and S. Gepstein. 2000. Cloning and characterization of a receptor-like protein kinase gene associated with senescence. Plant Physiology 124: 1305-1314.
- Hanfrey, C., M. Fife, and V. Buchanan-Wollatson. 1996. Leaf senescence in Brassica napus expression of genes encoding pathogenesis-related proteins. Plant Molecular Biogy 30: 597-609.

- Harris, P. J., R. D. Hartley, and K. H. Lowry. 1980. Phenolic constituents of mesophyll and non-mesophyll cell walls from leaf laminae of *Lolium perenne*. *Journal of the Science of Food Agriculture* 31: 959–962.
- Harper, S. H. T. and J. M. Lynch. 1981. The chemical components and decomposition of wheat straw leaves, internodes and nodes. *Journal of the Science of Food Agriculture* 32: 1057–1062.
- Hartley, R. D., and E. C. Jones. 1977. Phenolics components and degradability of cell walls of grass and legume species. *Phytochemistry* 16: 1531-1534.
- He L., and N. Terashima. 1991. Formation and structure of lignin in monocotyledons. IV. Deposition process and structural diversity of the lignin in the cell wall of sugarcane and rice plant studied by ultraviolet microscopic spectroscopy. *Holzforschung – International Journal of the Biology, Chemistry, Physics and Technology of Wood* 45: 191-198.
- Hespell, R. B. and M. P. Bryant. 1981. The genera *Butyrivibrio*, *Succinivibrio*, *Lachnospira* and *Selenomonas*. In *The Prokaryotes: A handbook on habitats, isolation and identification of bacteria*, Vol. 2. Starr M. P., H. Stolp, H. G. Truper, A. Balows, and H. G. Schlegel (Eds.). Springer Verlag, Berlin. 1479-1494 pp.
- Hibino, T., K. Takabe, T. Kawazu, D. Shibata and T. Higuchi. 1995. Increase of cinnamaldehyde groups in lignin of transgenic tobacco plants carrying an

antisense gene for cinnamyl alcohol dehydrogenase. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 59(5): 929-931.

Himmel, M. E. 2008. *Biomass recalcitrance: Deconstructing the plant cell wall for bioenergy*. Blackwell Publishing Ltd. 539 p.

Hinderhofer, K., and U. Zentgraf. 2001. Identification of a transcription factor specifically expressed at the onset of leaf senescence. *Planta* 213: 469-473.

Hobson, P. N., and C. S. Stewart. 1997. *The rumen microbial ecosystem*. Blackie Academic & Professional. London, UK. 740 p.

Hoffmann, L., S. Maury, F. Martz, P. Geoffroy, and M. Legrand. 2003. Purification, cloning, and properties of an acyltransferase controlling shikimate and quinate ester intermediates in phenylpropanoid metabolism, *Journal Biological Chemistry* 278: 95–103.

Humphreys, J. M., M. R. Hemm, and C. Chapple. 1999. New routes for lignin biosynthesis defined by biochemical characterization of recombinant ferulate 5-hydroxylase, a multifunctional cytochrome P450-dependent monooxygenase. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 96(18): 10045–10050.

Hungate, R. E. 1950. The anaerobic mesophilic cellulolytic bacteria. *Bacteriology Review*. 14:1-49.

- Inomata, F., K. Takabe, and H. Saiki. 1992. Cell wall formation of conifer tracheid as revealed by rapid freeze and substitution method. *Journal Electron Microscopy* 41: 369-374.
- IUSS Grupo de Trabajo WRB. 2007. Base referencial mundial del recurso suelo - informes sobre recursos mundiales de suelos No. 103. FAO, Roma. 130 p.
- Izydorczyk, M. S. and C. D. Biliaderis. 1995. Cereal arabinoxylans: advances in structure and physiochemical properties. *Carbohydrate Polymers* 28: 33–48.
- Jacob-Wilk, D., D. Holland, E. E. Goldschmidt, J. Riov, and Y. Eyal. 1999. Chlorophyll breakdown by chlorophyllase: isolation and functional expression of the chlase 1 gene from ethylene-treated citrus pulp fruit and its regulation during development. *Plant Cell* 20: 653-661.
- Jouany, J. P., D. I. Demeyer, and J. Grain. 1988. Effect of defaunating the rumen. *Animal Feed Science and Technology* 21: 229-265.
- John, L., R. Hacket, W. Cooper, R. Drake, A. Farrell, and D. Grierson. 1997. Cloning and characterization of tomato leaf senescence-related cDNAs. *Plant Molecular Biology* 33: 641-651.
- Jung, H. G., and F. M. Engels. 2002. Alfalfa stem tissues: cell wall deposition, composition, and degradability. *Crop Science* 42: 524-534.

- Jung, H. G., and M. S. Allen. 1995. Characteristics of plant cell walls affecting intake and digestibility of forages by ruminants. *Journal of Animal Science* 73: 2774-2790.
- King, C., J. McEniry, M. Richardson, and P. O'Kiely. 2012. Characterization for industrial purposes of the fibre anatomy of perennial ryegrass and tall fescue stem and leaf at three stages in the primary growth. *Grass and Forage Science* 69: 64–73.
- Krishnamurthy, K. V. 1999. *Methods in cell wall cytochemistry*. CRC Press, U.S.A. 318 p.
- Kuhad R. C., A., Singh, and E. Karl-Erik. 1997. Degradation of plant fiber cell walls. In: Scheper Th., S. Belkin, P. M. Doran, M. B. Gu, W. -S. Hu, B. Mattiasson, J. Nielsen, H. Seitz, G. N. Stephanopoulos, R. Ulber, A. P. Zeng, J. J. Zhong, and W. Zhou (Eds). *Advances in Biochemical Engineering, Biotechnology*, Vol. 57. Springer-Verlag berlin Heidelberg. 81 p.
- Lairez, D., Cathala, B., Monties, B., Bedos-Behal, F., Duran, H., and L. Gorrichon. 2005. Aggregation during coniferyl alcohol polymerization in pectin solution: a biomimetic approach of the first steps of lignification. *Biomacromolecules* 6: 763-774.
- Lers, A., E. Lomariéc, S. Burd, and A. Khalchitski. 2001. The characterization of *lenuc1*, a nuclease associated with leaf senescence of tomato. *Physiologia Plantarum* 112: 176-182.

- Lohman, K. N., S. Gan, M. C. Jhon, and R. M. Amasino. 1994. Molecular analysis of natural leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum* 92: 322-328.
- Lowry, O., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry* 193: 265-275.
- Lu, F. C., and J. Ralph. 2005. Novel β - β -structures in natural lignins incorporating acylated monolignols, in: Thirteenth international symposium on Wood, Fiber, and Pulping Chemistry, APPITA, Auckland, New Zealanda. 233–237 pp.
- Lu, F. C. and J. Ralph. 2008. Novel tetrahydrofuran structures derived from β - β -coupling reactions involving sinapyl acetate in Kenaf lignins, *Organic and Biomolecular Chemistry* 6: 3681–3694.
- Lu, F., and J. Ralph. 2010. Lignin. In: Sun, R.C. Cereal straw as a resource for sustainable biomaterials and biofuels - chemistry, extractives, lignins, hemicelluloses and cellulose. Elsevier, B.V. UK. 169-198 pp.
- Macadam, J. W., and C. J. Nelson. 2002. Secondary cell wall deposition causes radial growth of fibre cells in the maturation zone of elongation tall fescue leaf blades. *Annals of Botany* 89: 89-96.
- Mackie, R. I. and B. A. White. 1997. Gastrointestinal ecosystem and fermentations, Vol 1. Chapman & Hall Microbiology Series. Kluwer Academic Publisher. New York, USA. 666 p.

- Makkar, H. P. S., and G. J. Viljoen. 2005. Applications of gene-based technologies for improving animal production and health in developing countries. Springer. Netherlands. 787p.
- Martínez, G. A. 1988. Diseños experimentales. Métodos y elementos de teoría. Edit. Trillas. México. 756 p.
- Martínez, A., F. J. Ruíz-Dueñas, M. J. Martínez, J. C. del Rio, and A. Gutiérrez. 2009. Enzymatic delignification of plant cell wall: from nature to mill. *Current Opinion in Biotechnology* 20: 348–357.
- McCarthy, J. J., O. F. Canziani, N. A. Leary, D. J. Dokken, and K. S. White. 2001. *Climate change 2001: Impacts, adaptation, and vulnerability*. Cambridge University Press, New York. 1005 p.
- Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* 31(3): 426-428.
- Miller, G. L., R. Blum, W. E. Glennon, and A. L. Broton. 1960. Measurement of carboxymethylcellulase activity. *Annals of Biochemistry* 2: 127-132.
- Moghaddam, P. R., and D. Wilman. 1998. Cell wall thickness and cell dimensions in plant parts of eight forage species. *J Agri Sci*, 131, 59-67.
- Moore, K. J., and H. J. G. Jung. 2001. Lignin and fiber digestion. *Journal of Range Management* 54(4): 420–30.

- Morrison, I. M. 1979. The degradation and utilization of straw in the rumen, In: Grossbard E. (Ed). Straw decay and its effect on disposal and utilization, Wiley, Chichester. 237–245 pp.
- Morrison M., and K. E. Nelson. 2005. Rumen microbial genomics. In: Makkar H. P. S., and G. J. Viljoen (Eds.), Applications of gene-based technologies for improving animal production and health in developing countries, Netherlands. 349-355 p.
- Moura, J. C. M. S., C. A. V., Bonnie, J. O. F., Viana, M. C., Dornelas, and P. Mazzafera. 2010. Abiotic and biotic stresses and changes in lignin content and composition in plants. *Journal of Integrative Plant Biology* 52: 360-376.
- Novo Uzal E., R. L. V. Gómez, F. Pomar, M. A. Bernal, A. Paradela, J. P. Albar, and A. Ros Barceló. 2009. The presence of sinapyl lignin in *Ginkgo biloba* cell cultures changes our views of the evolution of lignin biosynthesis. *Physiologia Plantarum* 135: 196–213.
- Ohlsson, C. 1991. Growth, development, and composition of temperate forage legumes and grasses in varying environments. Ph.D. Diss. Iowa State Univ., Ames (Diss. Abstr. 91-26231).
- O'Neill, M. A., and R. R. Selvendran. 1985. Hemicellulosic complexes from the cell walls of runner bean (*Phaseolus coccineus*). *Biochemical Journal* 227: 475–481.

- O'Neill, M. A., and W. S. York. 2003. The composition and structure of plant primary walls. In: Rose J. K. C. (Ed) The plant cell wall. Blackwell, Oxford. 1–54 pp.
- Orskov, E. R., and J. McDonald. 1979. The estimation of protein degradability in the rumen for incubation measurements weighted according to rate of passage. *Journal Agricultural Science* 92: 499 -503.
- Osakabe, K., C. C. Tsao, L. G. Li, J. L. Popko, T. Umezawa, and D. T. Carraway. 1999. Coniferyl aldehyde 5-hydroxylation and methylation direct syringyl lignin biosynthesis in angiosperms. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 96: 8955–8960.
- Palonen, H. 2004. Role of Lignin in the enzymatic hydrolysis of Lignocellulose. Espoo, Finland. VTT Technical Research Centre of Finland. 84 p.
- Park, S. N. 2009. Physicochemical and environmental plant physiology, 4th edition. Elsevier Inc. 604 p.
- Petersen M., J. Hans, and U. Matern. 2010. Biosynthesis of phenylpropanoids and related compounds. In. Wink M. (Ed). *Biochemistry of plant secondary metabolism. Annual Plant Reviews* 40: 182-257.
- Pinheiro, L. M. A., and N. A. P. Policastro. 2012. Bioethanol. InTech. Rijeka, Croatia. 302 p.

- Pomar F., F. Merino, and A. Ros Barceló. 2002. O-4-Linked coniferyl and sinapyl aldehydes in lignifying cell walls are the main targets of the Wiesner (phloroglucinol-HCl) reaction. *Protoplasma* 220: 17–28.
- Polizeli, M. L., A. C. Rizzatti, R. Monti, H. F. Terenzi, J. A. Jorge, and D. S. Amorim. 2005. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 67: 577–59.
- Posada, J. O. S. 2005. Fundamentos para el establecimiento de pasturas y cultivos forrajeros. 2ª ed. Editorial Universidad de Antioquia. 246 p.
- Quirino, B. F., J. Normanly, and R. M. Amasino. 1999. Diverse range of gene activity during *Arabidopsis thaliana* leaf senescence includes pathogen-independent induction of defense-related genes. *Plant Molecular Biology* 40: 267-278.
- Ralph J., K. Lundquist, G. Brunow, F. Lu, H. Kim, P. F. Schatz, J. M. Marita, R. D. Hatfield, S. A. Ralph, and J. H. Christensen. 2004. Lignins: natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxyphenylpropanoids. *Phytochemistry Reviews* 3: 29–60.
- Roderick I. M., and I. K. O. Cann. 2005. A review of gastrointestinal microbiology with special emphasis on molecular microbial ecology approaches. *In*: Makkar H. P. S., and G. J. Viljoen (Eds). *Applications of gene-based technologies for improving animal production and health in developing countries*, Netherlands. 175-198 p.

- Rose, J. K. C. 2003. The plant cell wall. Annual Plant Reviews. Blackwell Publishing Ltd. 399 p.
- Rowan, F. S, and K. M. Russell. 1998. C4 plant biology . Academic Press. Elsevier Inc. 599 p.
- Rubinstein, B. 2000. Regulation of cell death in flower petals. Plant Molecular Biology 44: 303-318.
- Ruiz, I. N. 1988. Praderas para Chile. Instituto de investigaciones agropecuarias, Ministerio de Agricultura. Santiago de Chile. p. 723.
- Run-Cang, S. 2010. Cereal straw as a resource for sustainable biomaterials and biofuels chemistry, extractives, lignins, hemicelluloses and cellulose. Elsevier. 300 p.
- Russel, J., H. Ougham, H. Thomas, and S. Waaland. 2013. The molecular life of plants. Wiley-Blackwell. American Society of Plant Biologist. Oxford, U. K. 742 p.
- Ruzin, S. E. 1999. Plant microtechnique and microscopy. Oxford University Press, U. S. A. 336 p.
- SAS. 2002. SAS user´s guide. Ver. 9.0. SAS. Institute. Cary, N. C. USA.
- Scheneiter, J. O., J. Camarasa, J. R. Carrete, and C. Amendola. 2014. Is the nutritive value of tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) related to the accumulated forage mass? Grass and Forage science 71(1): 1-10.

- Schulein, M. 1988. Cellulases of *Trichoderma reesei*. In: W. A. Wood, and J. N. Abelson. (Eds.), Methods in enzymology. Vol. 160, Academic Press, New York. 234–242 pp.
- Sissons, C. H., L. Wong, and Y. H. An. 2000. Laboratory culture and analysis of microbial biofilms. In: H. An Yuehuei, and J. R. Freedman. Handbook of bacterial adhesion: principles, methods, and applications. Humana Press Inc. p. 150.
- Steel, G. D. R. y Torrie, H. J. (1988). Bioestadística. Principios y procedimientos. ed 2. Edit. McGraw Hill / Interamericana. 622 p.
- Steel, G. D. R., H. J. Torrie, and D. A. Dickey. 1997. Principles and procedures of statistics a biometrical approach. Ed 3. Edit. McGraw Hill Companies, Inc. 666 p.
- Sticklen, M. B. 2008. Plant genetic engineering for biofuel production: towards affordable cellulosic ethanol. Nature Reviews Genetics 9: 433-443.
- Sukumaran, R. K., R. R. Singhanian, and A. Pandey. 2005. Microbial cellulases- Production, applications and challenges. Journal of Scientific and Industrial Research 64: 832–844.
- Sun, J. X., F. Xu, Z. C. Geng, X. F. Sun, and R. C. Sun. 2005. Comparative study of cellulose isolated by totally chlorine-free method from wood and cereal straw, Journal of Applied Polymer Science 97: 322–335.

- Sun, R. C. 2010. Cereal straw as a resource for sustainable biomaterials and biofuels - chemistry, extractives, lignins, hemicelluloses and cellulose. Elsevier B.V. UK. 289 p.
- Sun, R. C., J. Tomkinson, P. L. Ma, and S. F. Liang. 2000. Comparative study of hemicelluloses from rice straw by alkali and hydrogen peroxide treatments, *Carbohydrate Polymers* 42: 111–122.
- Sutton, J. D., M. S. Dhanoa, S. V. Morant, J. France, D. J. Napper, and E. Schuller. 2003. Rates of production of acetate, propionate and butyrate in the rumen of lactating dairy cows given normal and low-roughage diets. *Journal Dairy Science* 86: 3620–3633.
- Teeri, T. 1997. Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases. *Trends in Biotechnology* 15:160–167.
- Terashima, N., K. Fukushima, L.-F. He, and K. Takabe. 1993. Comprehensive model of the lignified plant cell wall. In: Jung H. G., D. R. Buxton, R. D. Hatfield, and J. Ralph (Eds). *Forage cell wall structure and digestibility*. ASA-CSSA-SSSA, Madison, WI. 247 p.
- Teutsch, H.G., M.P. Hasenfratz, A. Lesot, C. Stoltz, J.M. Garnier, J. M. Jeltsch, Werckreichhart. 1993. Isolation and sequence of a cDNA encoding the Jerusalem artichoke cinnamate 4-hydroxylase, a major plant cytochrome P450 involved in the general phenylpropanoid pathway, *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 90: 4102–4106.

- Thompson, J. E., C. D. Froese, E. Madey, M. D. Smith, and Y. Hong. 1998. Lipid metabolism during plant senescence. *Progress in Lipid Research* 37: 119-141.
- Thompson, J., C. Taylor, and T. W. Wang. 2000. Altered membrane lipase expression delays leaf senescence. *Biochemical Society Transactions* 28: 775-777.
- Ulvskov, P. 2011. Plant polysaccharides, biosynthesis and bioengineering. *Annual Plant Reviews, Volume 41*. Blackwell Publishing Ltd. 506 p.
- Vanholme, R., B. Demedts, K. Morreel, J. Ralph, and W. Boerjan. 2010. Lignin biosynthesis and structure. *Plant Physiology* 153: 895-905.
- Vanholme, R., K. Morreel, J. Ralph, and W. Boerjan. 2008. Lignin engineering. *Current Opinion in Plant Biology* 11: 278–285.
- Van Soest, P. J., J. B. Robertson, and B. A. Lewis. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Animal Science* 74: 3583-3597.
- Wang, Y., and T. A. McAllister. 2002. Rumen microbes, enzymes and feed digestion - a review. *Asian-Australasian Journal of Animal Science* 15(11): 1659-1676.
- Watanabe, A., K. Hamada, H. Yokoi, and A. Watanabe. 1994. Biphasic and differential expression of cytosolic glutamine synthetase genes of radish during seed germination and senescence of cotyledons. *Plant Molecular Biology* 26: 1807-1817.

Whetten R., and R. Sederoff. 1995. Lignin biosynthesis. *Plant Cell* 7: 1001-1013.

Wilson, J. R. 1993. Organization of forage plant tissue. In: Jung, H. G., D. R. Buxton, R. D. Hatfield, and J. Ralph (Eds). *Forage cell wall structure and digestibility*. Madison, Wisconsin. 1-32 pp.

Wilson, J. R., R. H. Brown, and W. R. Windham. 1983. Influence of leaf anatomy on the dry matter digestibility of C3, C4, and C3/C4 intermediate types of *Panicum* species. *Crop Science* 23: 141-155.

Wong, K. K., L. U. Tan, and J. N. Saddler. 1988. Multiplicity of β -1,4- xylanase in microorganisms: functions and applications. *Microbiol Reviews* 52: 305–317.

Yoshida, K. 2003. Molecular regulation of leaf senescence. *Current Opinion in Plant Biology* 6: 79-84.

Zang, B., D. Ziyu, S.-Y. Ding, and C. E. Wyman. Enzymatic of cellulosic biomass. *Biofuels* 2(4): 421-450.