



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

Facultad de Estudios Superiores  
IZTACALA

**“Estudio de cuerpos proteicos y proteínas de  
reserva en la madera *Haematoxylon  
brasiletto* (Fabaceae)”**

**T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
B I Ó L O G O  
P R E S E N T A:  
JOSÉ LUIS ZÁRATE CASTREJÓN**

**Directores de tesis: Dr. Alfonso Miguel Torre Blanco  
M. en C. Paz Alejandra Quintanar Isaías**



**IZTACALA**

**LOS REYES IZTACALA, ESTADO DE MÉXICO**

**2005**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

*Dice Nicolai Bakunin que el conocimiento debe ser compartido, nunca en una elite, porque empieza otra vez la dominación, pero ahora por el conocimiento.*

*"Una nueva verdad científica no es usualmente presentada en una forma tal que convenza a sus opositores; más bien ellos desaparecen gradualmente, y la nueva generación se familiariza con la verdad desde el comienzo."  
Max Planck.*

*"Siempre suspiramos por visiones de belleza, siempre soñamos mundos desconocidos."  
Máximo Gorki.*

*"El gran torrente de la historia no podrá nunca lograr, en su fluir, la culminación definitiva en un estado ideal absoluto. La humanidad no dirá jamás: ¡Basta, no avanzamos más!"  
A. Spirkin.*

*"He podido ver cómo un botánico volvía a plantar, con ternura, una planta que había arrancado de raíz sin querer; nos encontrábamos en una desierta ladera tibetana, donde no era probable que un ser humano la volviera a ver"  
Sir Francis Edward.*

*"A este mundo venimos a dormir,  
venimos a soñar, porque no es verdad,  
no es verdad, que hayamos venido  
para vivir la realidad"  
Canto Azteca.*



**"Por mi raza hablará el espíritu"**



# Dedicatorias

*Este trabajo se lo dedico a mi madre y mis hermanas (Elizabeth y Brenda).*

A mi gran amigo dramaturgo Francisco Olivie Carrión.

Mis amigos: Augusto, Ignacio, Maria de Jesús, Noé, Abdiel, A. Granillo, Enrique, Miguel, Cynthia, Alejandra, Jorge, Mireya, Beatriz, Antonio, Adriana y Sergio.

A mis niños Eduardo y Dolores y sus padres.

También lo dedico a todos mis amigos que he conocido durante mi estancia por las aulas universitarias de la FES-Iztacala; en especial a: Edgar Oaxaca Hernández, Eduardo Jiménez Quiroz, José Manuel Ayala Razo, Enrique Ávila Bocanegra, Eufrosina Hinojosa Loaiza, Carmen Castillo, Patricia Chaires Grijalva, Andrés Rodríguez Velázquez, Sara Rosales Lemus, Jennie Suárez Melo, Luis Enrique Páez Gerardo, Hugo Trujillo Hernández, Rigoberto Romualdo Romualdo, Valentín López, Mónica Rangel Villafranco, Israel Cárdenas Camargo, Moisés Aguilar, Eduardo Mendiola, Oscar Pineda, Bernardo, Guadalupe Márquez, Mariana Castillo Vellanoweth y Alejandro Soto Castruita.

A mis compañeros de la UAM-Iztapalapa: Jesús Rivera Tapia, Julieta Curiel Meza, Bernabé Galicia Rodríguez, Mariana Velázquez Núñez, Daría Razo Balcázar, Sergio, Noemí Garfias, Ramón Rosas, Gabriela de la Rosa, Patricia, Juanita, Araceli, Hugo, Reyes, Julio y a todas aquellas personas que he tenido oportunidad de conocerlas en esta institución.

# Agradecimientos

Al programa PROBETEL, de la Facultad de Ciencias, por su apoyo económico. A mis directores de tesis, M. en C. Alejandra Quintanar Isaías y Dr. Alfonso Torre Blanco quienes, a lo largo de mi estancia en sus laboratorios, aprendí de ellos lo que me hizo falta en las aulas.

A mis revisores de tesis: M. en C. Leonor Abundis, Dra. Silvia Aguilar y M. en C. Daniel Tejero, que por sus observaciones se mejoró el escrito.

A mi *alma mater*, UNAM, por darme la oportunidad de conocer a muchas personas que, actualmente, son parte importante en mi vida académica y personal. A todos mis profesores de la UNAM, pero en especial a Edith López Villafranco y Esthela Sandoval Zapotitla por adentrarme al mundo de las plantas tanto en lo cultural como en lo microscópico y el profesor Ismael Ledesma Mateos por inculcarnos la filosofía en la Biología.

# Índice

Resumen .....	1
1. Introducción .....	2
2. Antecedente .....	4
3. Hipótesis .....	6
4. Objetivos .....	6
5. Descripción del área de estudio .....	7
5.1 Localización .....	7
5.2 Clima .....	7
5.3 Hidrografía .....	7
5.4 Edafología .....	8
5.5 Actividades humanas .....	8
5.6 Vegetación .....	8
5.6.1 Características de <i>Haematoxylon brasiletto</i> ....	8
5.6.1.1 Nombres comunes .....	8
5.6.1.2 Descripción botánica de la especie ....	9
5.6.1.3 Corteza .....	9
5.6.1.4 Madera .....	9
5.6.1.4.1 Características microscópicas	9
5.6.1.5 Usos .....	9
5.6.1.6 Distribución .....	10
6. Materiales y métodos .....	12
6.1 Muestreo y colecta .....	12

6.2	Procesamiento de las ramas .....	12
6.3	Cuantificación de proteínas .....	13
6.3.1	Cuantificación de proteínas .....	13
6.3.2	Electroforesis .....	13
6.4	Citoquímica .....	14
6.5	Análisis estadísticos .....	15
7.	Resultados .....	16
7.1	Fenología .....	16
7.2	Proteínas totales .....	16
7.3	Electroforesis .....	29
7.4	Citoquímica .....	29
8.	Discusión .....	40
9.	Conclusiones .....	43
10.	Bibliografía .....	44
11.	Axeso .....	49

## Resumen

En este trabajo se estudiaron las proteínas de reserva y los cuerpos proteicos en la madera de una especie de selva baja caducifolia del Estado de Morelos. El objetivo de la investigación fue observar los cambios estacionales de las proteínas en el xilema secundario de *Haematoxylon brasiletto*.

Se muestrearon mensualmente ramitas (0.5-1 cm), ramas medianas (3-4 cm), ramas grandes (5-7 cm) ésta última con duramen. Se cuantificó la cantidad de proteína del xilema secundario por el método de Bradford. Las proteínas solubilizadas se analizaron en SDS-PAGE y se realizaron pruebas citoquímicas específicas para proteínas en la época de sequía y de lluvia.

En la cuantificación total de proteínas se observa de manera general una tendencia a la disminución hacia los meses de lluvia. Se observó que el duramen es la parte donde se almacena menor cantidad de proteínas que las ramitas, ramas medianas y la albura. Los datos de la electroforesis muestran que las proteínas más prominentes en la madera de *H. brasiletto* son de 35-38 kDa; se ha observado que dichos tamaños moleculares pertenecen a proteínas de reserva. Así mismo se observó que las ramitas de la especie aquí estudiada tuvieron mayor presencia de proteínas de reserva. Los datos citoquímicos revelan que los cuerpos proteicos se encontraron, en su mayor parte, en las células de parénquima radial y en menor proporción en parénquima axial. La mayor presencia de los cuerpos proteicos fue en las ramitas y en ramas medianas. La mayor presencia de los cuerpos proteicos en las épocas estudiadas fue en la época de sequía.



# 1. Introducción

La madera de las angiospermas está constituida por diferentes tipos celulares (Figura 1) y se arreglan o disponen en diversos patrones, dando como resultado distintas arquitecturas internas. Entre las células que se disponen en sentido vertical se encuentran: las fibras, vasos, traqueidas vasculares o vasicéntricas, parénquima axial y canales gomíferos; por otro lado, en el sistema horizontal están las células de parénquima radial. Este tipo de parénquima se puede organizar en una o más series (Quintanar, 1999). Los radios tienen la capacidad de almacenar almidones, lípidos y proteínas que posteriormente mantienen el crecimiento y el desarrollo del árbol cuando no puede realizar la fotosíntesis, por ejemplo durante la época de sequía (Sauter y Wellenkamp, 1988; Sauter *et al.* 1989).

Estos compuestos se pueden translocar, dentro del árbol, por diferentes vías: apoplástica, simplástica o transcelular (Figura 2).

El almacenamiento constituye la acumulación de sustancias que pueden ser translocadas en el futuro. Aerts y Chapin (2000) plantean tres categorías de almacenamiento: la acumulación que implica el incremento de compuestos que no promueve directamente el crecimiento y ocurre cuando la adquisición del recurso excede a la demanda para crecer y mantenerse; la reserva, que involucra síntesis metabólicamente regulada de compuestos de reserva que pueden promover directamente el crecimiento; y finalmente el reciclamiento, que es la reutilización de compuestos que contribuyen a la función fisiológica inmediata para crecer, paralelo a la senescencia de las hojas.

El almacenamiento de las proteínas de reserva materializadas como cuerpos proteicos se presenta en diferentes niveles. En semillas (Adler y Müntz, 1983; Salisbury, 1994; Heldt, 1999; Hernan y Larkins, 1999; Marty, 1999), raíz (Tagliavini *et al.*, 1999), *cambium* vascular (Wetzel *et al.*, 1989a), corteza (Kang y Titus, 1980a, 1980b; Greenwood *et al.*, 1986; Wetzel y Greenwood, 1991; Stepien y Sauter, 1994) y madera. La detección de las proteínas de reserva en la madera y los cuerpos proteicos, son de vital importancia para entender el almacenamiento y la movilización de estos compuestos; además de su relación que puede tener con la fenología, en este caso, de *Haematoxylon brasiletto*.

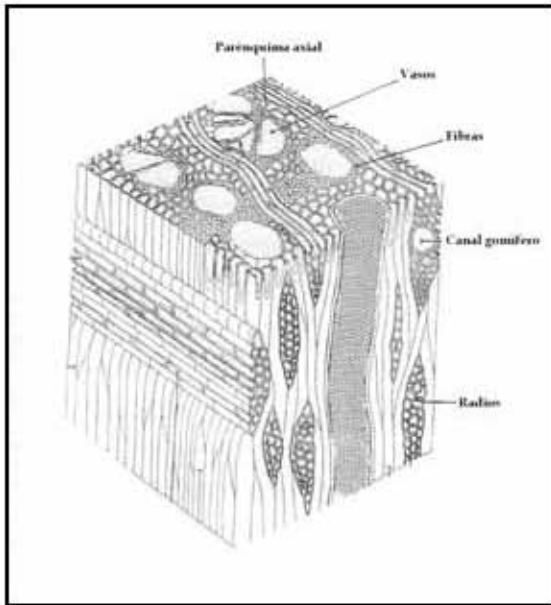


Figura 1. Estructura microscópica del xilema secundario

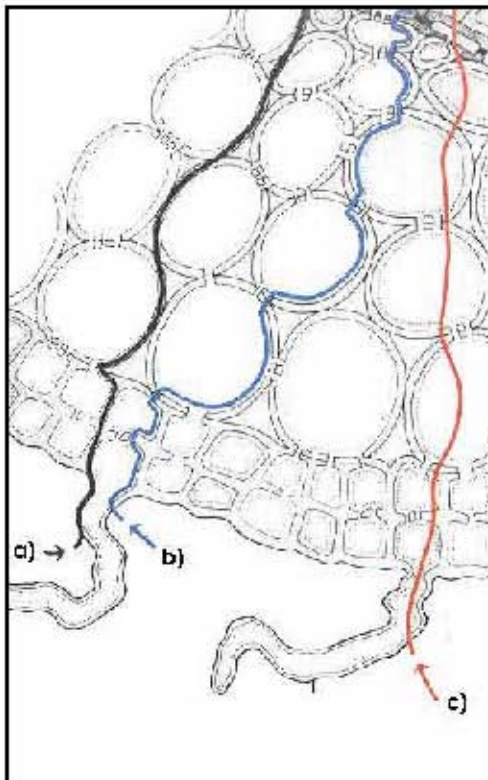


Figura 2. Mecanismos de transporte en las células vegetales, donde: a) vía apoplástica, b) vía simplástica y c) vía transcelular. Fuente: Raven, 1999.

## 2. Antecedentes

Harms y Sauter (1992), con microscopía electrónica observaron que en la madera de *Taxodium distichum* se hallan protoplastos densamente organizados con presencia de material proteico. Una proteína de 32 kDa, reportada como de reserva, fue detectada por inmunolocalización durante la época de sequía. Así mismo, Sauter y van Cleve (1992) encontraron que la variación de aminoácidos en la savia de *Populus x canadensis* está relacionada con la movilización e hidrólisis de cuerpos proteicos en primavera; para llegar a esta conclusión el trabajo se apoyó con microscopía electrónica, que ayudaría a evidenciar la presencia de los cuerpos proteicos en el citoplasma de las células radiales. En *Dalbergia odorifera*, Hao y Wu (1993) apreciaron que el almacenamiento de las proteínas en parénquima de tallo ocurrió durante la senescencia de las hojas y cuando las ramitas detienen su crecimiento. Las proteínas que se encontraron en el xilema provenían de los compuestos nitrogenados translocados de las hojas. Para evidenciar la naturaleza de dichos compuestos se hizo una digestión con pepsina. Sauter y Wellenkamp (1988), realizaron estudios de microscopía de luz y electrónica en *Salix caprea*, los resultados muestran que los cuerpos proteicos encontrados durante la latencia del árbol desaparecieron en el verano y para demostrar la naturaleza proteica de dichos cuerpos se sometieron a digestión enzimática con pepsina.

Por otro lado se han realizado estudios para conocer el tamaño de las proteínas de reserva. Sauter y van Cleve (1990), localizaron proteínas de 32 kDa en los cuerpos proteicos con técnicas de inmunolocalización en radios de xilema secundario. La presencia de estos cuerpos en el otoño y su posterior desaparición de los lugares de almacén en la primavera fue simultánea a los cambios en la cantidad de proteínas a lo largo de tres años. Langheinrich y Tischner (1991), localizaron en la madera de *Populus* proteínas de 32 y 36 kDa por inmunomarcaje. Éstas comenzaron a acumularse durante el verano tardío y permanecieron en altos niveles durante el invierno. Harms y Sauter (1992), localizaron una proteína de 35 kDa en las células radiales de xilema secundario de *Taxodium distichum* por inmunolocalización, durante la temporada de latencia y ésta proteína desaparece cuando las nuevas ramas han crecido completamente.

Hasta el momento solo se reportan dos trabajos sobre proteínas de reserva en plantas de clima tropical, Hao y Wu (1993) y el de Razo (2003). En el primer trabajo *Dalbergia odorifera*

fue cultivada en condiciones controladas e hicieron observaciones en microscopio de luz y electrónico. El segundo estudio se realizó en *Haematoxylon brasiletto* y *Lysiloma tergemina*, enfocándose a la temporada de sequía y a la de lluvia. Los resultados de electroforesis sugieren que las proteínas de 21 y 38 kDa son de reserva porque se presentaron en la temporada de sequía y desaparecen en la de lluvia. Estas proteínas no se han reportado como proteínas de reserva ni forman parte de cuerpos proteicos.

### **3. Hipótesis**

Las proteínas contenidas en las hojas se translocan hacia los sitios de almacenamiento. Las especies estudiadas de clima templado (*Populus, Fagus, Fraxinus, Tilia, Alnus, Betula, Quercus, Gleditsia, Robinia, Salix, Sambucus* y *Malus*) acumulan proteínas al comenzar la temporada de sequía y antes de que ocurriera la pérdida de sus hojas, por lo que se espera que la concentración de proteínas totales y la presencia de los cuerpos proteicos en *Haematoxylon brasiletto* sea menor en la temporada de lluvia que en la de sequía. Si los cuerpos proteicos desaparecen en la época de crecimiento, las proteínas de pesos moleculares reportados como de reserva, y que están asociadas a dichos cuerpos, disminuirán hacia la época de lluvia en *Haematoxylon brasiletto*.

## 4. Objetivos

### Objetivo general

Analizar la presencia de proteínas de reserva en la época de lluvia y sequía en la madera de *Haematoxylon brasiletto* y relacionarlo con la fenología del árbol.

### Objetivos particulares

- Observar cambios estacionales en la cantidad de proteínas en la madera.
- Conocer el peso molecular de las proteínas de reserva y correlacionarlo con la presencia de los cuerpos proteicos.
- Analizar la presencia de cuerpos proteicos en la época de sequía y en la de lluvia y determinar cualitativamente si existen diferencias entre ambas épocas.

## 5. Descripción del área de estudio

### 5.1 Localización

El lugar de colecta se localiza en el Municipio de Tlaquiltenango, Estado de Morelos. La ubicación geográfica extrema del Municipio está entre los paralelos 18° 40' y 18° 20' de latitud Norte; meridianos 98° 55' y 99° 14' de longitud Oeste. Colinda al Norte con los Municipios de Jojutla, Tlaltizapán, Ayala y Tepalcingo; al Este con Municipio de Tepalcingo y el Estado de Puebla; al Sur con los Estados de Puebla y Guerrero; al Oeste con los Municipios de Puente de Ixtla y Jojutla y con el Estado de Guerrero (INEGI, 1999). En particular el lugar de colecta se localiza aproximadamente a 1 km al sur del poblado de Valle de Vázquez (Figura 3).

### 5.2 Clima

El clima que predomina en el Estado de Morelos es cálido. Éste rige sobre todo en las zonas bajas de los ríos Amacuzac y Nexpa. Por su extensión es el más importante de la entidad, se distribuye en el centro y sur del Estado (INEGI, 1981). Para determinar el tipo de clima en el municipio de Tlaquiltenango se consultaron los datos de precipitación y temperatura para la estación de Huautla (INEGI, 1999). Estos datos se interpretaron con las claves de García (1964). El tipo de clima en Tlaquiltenango es:  $Aw_0(w)ig$ . Cálido subhúmedo, con lluvias en verano y con porcentaje invernal de 1.95%. La precipitación total anual promedio fue de 901 mm; la precipitación máxima se presenta en junio (206 mm) y la mínima en marzo (2 mm). La temperatura media anual fue de 24.4 °C; la temperatura promedio del mes más caliente es en mayo, con 26 °C y la más baja en enero, con 22.9 °C. Es de tipo Ganges, que se refiere a la marcha de la temperatura señalando el mes más caliente y se presenta antes del solsticio de verano que es el mes de Junio

### 5.3 Hidrografía

Los ríos que se localizan dentro del Municipio son: el Amacuzac que atraviesa al Municipio del Oeste al Sur; el Cuautla que corre por la parte Norte y se une hacia el Sur con el río Amacuzac; el Yautepec lo atraviesa por el Noroeste para juntarse con el Jojutla hacia el río Apatlaco (Secretaría de Gobernación, 1988).

## 5.4 Edafología

Los tipos de suelo en Valle de Vázquez son: Feozem calcárico, contiene cal en todos sus horizontes. Rendzina, se caracteriza por poseer una capa superficial rica en *humus* que descansa sobre roca caliza o material rico en cal. Castañozem, tiene acumulación de caliche suelto en pequeñas manchas blancas dispersas o en una capa de color claro de menos de 15 cm de espesor. Feozem háplico, tiene una capa superficial oscura, suave y rica en materia orgánica y nutrimento (INEGI, 1981)

## 5.5 Actividades humanas

Agricultura. En el Municipio se cultiva caña de azúcar, arroz, cebolla, sorgo, jitomate, maíz y frijol (Secretaría de Gobernación, 1988).

Ganadería. Se cría ganado vacuno, bovino, porcino, caprino, ovino y caballo (Secretaría de Gobernación, 1988).

## 5.6 Vegetación

El tipo de vegetación que predomina en el Municipio de Tlaquiltenango es el bosque tropical caducifolio y cubre un 57% del municipio (INEGI, 1999).

De manera general, las especies arbóreas de esta vegetación, pierden sus hojas en la época seca del año durante un periodo que oscila alrededor de seis meses. Este tipo de vegetación se localiza en México entre 0 y 1900 metros de altitud, frecuentemente por debajo de 1500 metros (Rzedowsky, 1978). Está representada por *Bursera copallifera*, *B. longipes*, *B. bipinnata*, *B. fagoroides*, *B. bicolor*, *B. schlechtendalii*, *B. glabrifolia*, *Lysiloma acapulcensis*, *L. divaricata*, *Pithecellobium dulce*, *Guazuma ulmifolia*, *Crescentia alata*, *Pseudosmodium perniciosum*, *Ipomea sp.* *Leucaena sp.* *Comocladia engleriana*, *Conzattia multiflora*, *Ceiba parviflora*, *Byrsonima crassifolia* y *Haematoxylon brasiletto* (Ramírez, 1990).

### 5.6.1 Características de *Haematoxylon brasiletto* Karst

#### 5.6.1.1 Nombres comunes

Brasil, Azulillo, Campeche, Huchagago, Palo del brasil, palo de tinta (Martínez, 1979).



### 5.6.1.2 Descripción botánica de la especie

Árbol de 10 a 15 m de altura y 40 cm de anchura (d.a.p.). El tronco es irregular y muy acanalado. Las hojas son compuestas. Presenta racimos de flores amarillas. Los frutos son legumbres largas y aplanadas (Martínez, 2001).

### 5.6.1.3 Corteza

La corteza de aspecto liso, aunque ligeramente granuloso, de color gris, ligeramente verdoso a parduzco, con abundantes lenticelas pequeñas de 1 a 2 mm.

### 5.6.1.4 Madera

Albura de color castaño pálido 10YR (8/3) y duramen rojo oscuro 10R (3/6) a castaño rojizo oscuro 2YR (2.5/4). El duramen no es cilíndrico sino que es de acuerdo a la forma del tallo. Hilo entrecruzado, de textura fina y veteado pronunciado. La albura sin sabor, duramen sabor amargo. Sin olor característico (Razo, 2003).

#### 5.6.1.4.1 Características microscópicas de la madera

Razo, en 2003, hace la descripción de la madera de *H. brasiletto*, la que presenta porosidad difusa, poros solitarios, algunos son múltiples radiales de 2 a 3 células y agrupados. Los elementos del vaso de diámetros tangenciales pequeños (76  $\mu\text{m}$ ) y de longitud corta (234  $\mu\text{m}$ ). Con punteaduras areoladas alternas y placas de perforación simple. Las punteaduras de vaso a radio parecidas a las intervasculares. Parénquima axial en bandas. Radios homogéneos, uni y multiseriados. Los radios multiseriados son muy bajos (602  $\mu\text{m}$ ) y moderadamente finos (50  $\mu\text{m}$ ). Fibras de tipo libriforme de longitud moderadamente corta (794  $\mu\text{m}$ ) con paredes gruesas (7  $\mu\text{m}$ ).

### 5.6.1.5 Usos

Fuente importante de agentes colorantes para la industria cosmética y textil. Se le utiliza como medicinal. Algunos estudios biológicos permitieron demostrar que los extractos de madera y corteza tienen propiedades antimicrobianas (Martínez, 2001); Se usa en leña y mampostería (INEGI, 1999).

#### **5.6.1.6 Distribución**

La especie se distribuye ampliamente en el país, principalmente en los Estados de Baja California Sur, Sonora, Nayarit, Michoacán, Guerrero, Oaxaca, Veracruz, Campeche, Yucatán, Puebla, Estado de México y Morelos. Habita en lugares templados, semisecos, semicálidos y cálidos. Es una planta silvestre. Se le puede encontrar en bosques tropicales caducifolios, bosques tropicales subcaducifolios, matorral xerófilo, así como en bosques espinosos, mesófilo de montaña y de encino-pino (Anónimo, 1994).

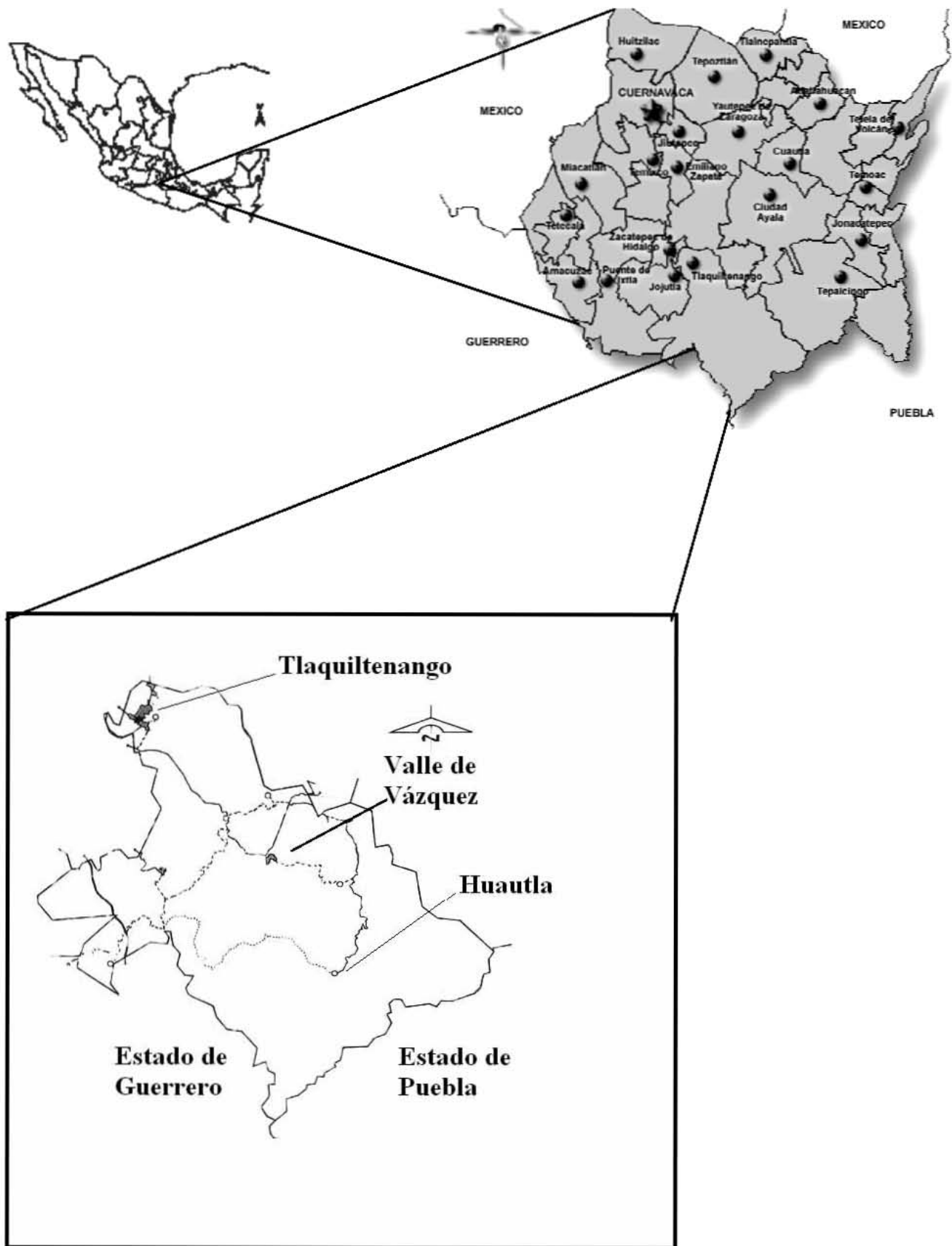


Figura 3. Ubicación del área de estudio (Fuente: INEGI 1998 y Secretaría de Comunicaciones y Transportes 1999)

## 6. Materiales y métodos

### 6.1 Muestreo y colecta

Se muestrearon cuatro árboles sanos de *H. brasiletto* durante los meses de abril a septiembre, con un máximo de cuatro muestreos continuos para evitar un daño severo. De cada árbol se seleccionó una rama de aproximadamente 7 cm de diámetro, con duramen. De la base del corte se seleccionó una porción de 5 a 7 cm de longitud dependiendo de la cantidad de duramen, de esta zona se obtuvieron albura y duramen. Se muestrearon porciones de ramas a las que se les consideró medianas, con diámetros entre 3 y 4 cm y longitud de 15 cm. Por último se cortaron varias ramitas de aproximadamente 0.5-1 cm de diámetro y 15 cm de longitud. Las zonas muestreadas y estudiadas se identificaron como: albura, duramen, rama mediana y ramita. Todas las porciones se congelaron inmediatamente en hielo seco y se trasladaron al laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Ciencias (UNAM) donde se depositaron en un ultracongelador (REVCO) a -70 °C hasta su procesamiento. Las muestras se colectaron mensualmente a partir del mes de abril de 2002 hasta septiembre del mismo año.

Por otro lado, en los meses de junio (2002) y marzo (2003) que representan la época de lluvia y sequía en la localidad, respectivamente, se cortaron pequeños cubos aproximadamente de 0.5 cm de albura, duramen, rama mediana y ramita. Se depositaron en frascos viales con fijador de Karnovsky (glutaraldehído 3%/folmaldehído 3% en un buffer de cacodilato de sodio 0.2 M, pH 7.2) (Daves, 1971). Se dejaron en refrigeración hasta su procesamiento. El material fue procesado en el laboratorio de Anatomía y Tecnología de la Madera de la UAM Unidad Iztapalapa. Cabe mencionar que de cada árbol se tomaron muestras durante un máximo de cuatro meses continuos, para evitar la destrucción de los mismos y permitir su regeneración.

### 6.2 Procesamiento de las ramas

De las muestras que se mantuvieron en el ultracongelador se obtuvieron virutas de ramitas, ramas medianas, albura y duramen, (dando un total de 16 muestras por mes). Estas virutas se pulverizaron con nitrógeno líquido utilizando un molino criogénico (spex 6750). El polvo obtenido se procesó para la extracción de proteínas.

## 6.3 Extracción de proteínas

Para esta fase se pesaron 0.8 g de polvo de madera y 0.2 g de PVPP. A esta mezcla se agregó 5.4 mL de buffer de extracción (Ácido bórico 50 mM, ácido ascórbico 50 mM,  $\beta$ -ME 1%, PMSF 1 mM, pH 9.0) a 4 °C. Con el  $\beta$ -ME se garantiza la reducción de los puentes de disulfuro; la PMSF inhibe enzimas proteolíticas y la PVPP forma complejos con fenoles y alcaloides para su eliminación, previniendo la modificación de las proteínas y la interferencia que pudieran causar en las determinaciones espectrofotométricas. Las muestras se homogenizaron (Polytron Brinkmann Instruments) por 30 segundos, evitando calentar la muestra en este proceso. Posteriormente los tubos se dejaron en agitación durante una noche bajo refrigeración. Los tubos se centrifugaron a 51500 g (gravidades) durante 30 minutos (Beckman J2-MC centrifuge). Se recuperó el sobrenadante donde se encuentran las proteínas solubilizadas para continuar con el ensayo de proteínas y la electroforesis.

### 6.3.1 Cuantificación de proteínas

Para este micro-ensayo se utilizó el método de Bradford (Bradford 1976 Bio-Rad protein assay).

Se construyó una curva estándar usando albúmina sérica bovina (BSA) a una concentración de 1  $\mu$ g en 10  $\mu$ L.

Para construir la curva se prepararon cinco microtubos de 1.5 mL. Cada uno se le agregó 200  $\mu$ L de reactivo de Bradford y cantidades distintas de BSA y agua para llevarlo a 1 mL. El intervalo de la curva fue de 1 a 8  $\mu$ g/mL. Para la cuantificación de las proteínas solubilizadas se tomaron 10  $\mu$ L, 200  $\mu$ L de reactivo de Bradford y se llevó a 1 mL de agua. Se midió la absorbancia a 595 nm.

### 6.3.2 Electroforesis

La electroforesis es un sistema que separa moléculas según su tamaño y carga. Durante la electroforesis hay una interacción de la muestra, buffer de la matriz del gel y la corriente eléctrica que se aplica. El resultado es la separación de bandas que representan a moléculas de un mismo tamaño.

De las proteínas solubilizadas se tomaron 100  $\mu$ L y posteriormente se precipitó con TCA 72% y DOC 0.15% y se mantuvieron en hielo. Cuando la concentración de la proteína era

menor de 1 mg/mL se dejaba en un concentrador, Speed Vac Plus RC 110A (Savant), hasta casi secarse; la finalidad de esto es concentrar lo más posible la proteína. Se centrifugó a 16,000 g durante 15 m a 4°C. En ambos casos se lavó la pastilla con acetona pura y se dejó secar durante toda la noche. Se resuspendió la pastilla en “buffer muestra” (Tris-HCl 0.065 M, glicerol 10%, SDS 2%,  $\beta$ -ME 5%, azul de bromofenol 0.5%, pH 6.8). Las muestras se desnaturalizaron a 95 °C en baño seco.

Los geles de poliacrilamida se prepararon de acuerdo a la técnica estándar de Laemmli (1970) (Apéndice 1).

Los geles se cargaron con una concentración de 40  $\mu$ g de proteína por cada 20  $\mu$ L de buffer muestra y se corrieron a 200 volts evitando que el colorante del gel saliera. En realidad este colorante es un indicador del límite de corrimiento de la muestra. Terminada esta operación, los geles se tiñeron con Azul brillante de Coomassie al 0.1 % preparado en etanol:agua:ácido acético (5:4:1, v/v) durante una noche y se colocaron en una solución desteñidora con agua:etanol:ácido acético (67:25:8 v/v) para eliminar el exceso de colorante.

## 6.4 Citoquímica

Se obtuvieron cortes transversales, tangenciales y radiales de 10-12  $\mu$ m de grosor utilizando un criostato (Leica CM 1510-3) a -20 °C, las muestras se incluyeron en un medio de congelación conocido como Tissue-tek # 4583. Los cortes se recogieron en portaobjetos preparados, previamente, con poli-L-lisina que es usada como adherente.

Para la tinción se preparó azul de Coomassie 0.02% en etanol-ácido acético glacial, en proporción 3:1 y rojo Ponceau 2R 0.5 %, ácido peryódico 2 %, pH 1.5; que son colorantes específicos para proteínas.

Para demostrar la naturaleza proteica de estos cuerpos, las laminillas consideradas como controles se sometieron a digestión con pepsina (0.5 % en 0.1 N HCl con 0.5 % Triton X-100) durante 48 horas a 37 °C de incubación. Después se tiñeron con azul de Coomassie y rojo Ponceau. Se tomaron fotografías en fresco.

Las laminillas experimentales no se trataron con pepsina y se tiñeron directamente con los colorantes. Se tomaron fotografías en fresco.

## 6.5 Análisis estadísticos

Se utilizaron diagramas de caja para observar la distribución de los datos utilizando para ello el paquete estadístico Stata corporation (2001).

Para comprobar si existen diferencias entre los meses se aplicó un análisis de varianza de una vía, con un nivel de alfa de 0.05 y el estadístico de Kruskal-Wallis para observar si existen diferencias significativas entre los meses; se utilizó el paquete estadístico NSCC (2000).

## 7. Resultados

### 7.1 Fenología

La aparición de las primeras hojas en *H. brasiletto* fue en el mes de abril. El desarrollo del dosel ocurrió en mayo. El tiempo de presencia de follaje fue desde abril hasta diciembre. El fenómeno de caducidad se completó a principios de enero. La floración ocurrió en el mes de febrero y para marzo había culminado la fructificación (Figura 4).

### 7.2 Proteínas totales

Los resultados de la cuantificación de proteínas totales por el método colorimétrico de Bradford se registra en la Tabla 1 donde se muestra la parte del árbol y los meses analizados.

Las Figuras (5, 6, 7 y 8) muestran la cantidad de proteínas durante los seis meses de muestreo siguiendo la secuencia de cada árbol; las líneas continuas unen los datos de un mismo árbol a diferentes intervalos de tiempo y los números representan la clave del árbol colectado.

En ramas chicas se observa, en general, que la cantidad de proteína disminuye conforme pasa el tiempo (Figura 5). En ramas medianas hay fluctuaciones grandes entre los individuos durante los meses de abril a julio y posteriormente hay una disminución entre los meses de agosto y septiembre (Figura 6). En albura las variaciones individuales son grandes y no parece haber una tendencia a la disminución como en el caso de las ramitas y ramas medianas (Figura 7). En duramen hay poca variación entre los individuos del primer mes hasta el último mes de muestreo (Figura 8).



	Ene	Feb	Mar	Abr	May	Jun	Jul	Ago	Sep	Oct	Nov	Dic
Flores		◆◆◆	◆									
Frutos			◆◆◆	◆								
Yemas			◆	◆◆◆								
Follaje				◆	◆◆	◆◆◆	◆◆◆	◆◆◆	◆◆◆	◆◆◆	◆◆◆	◆◆
Cuerpos proteicos			◆◆◆			◆						

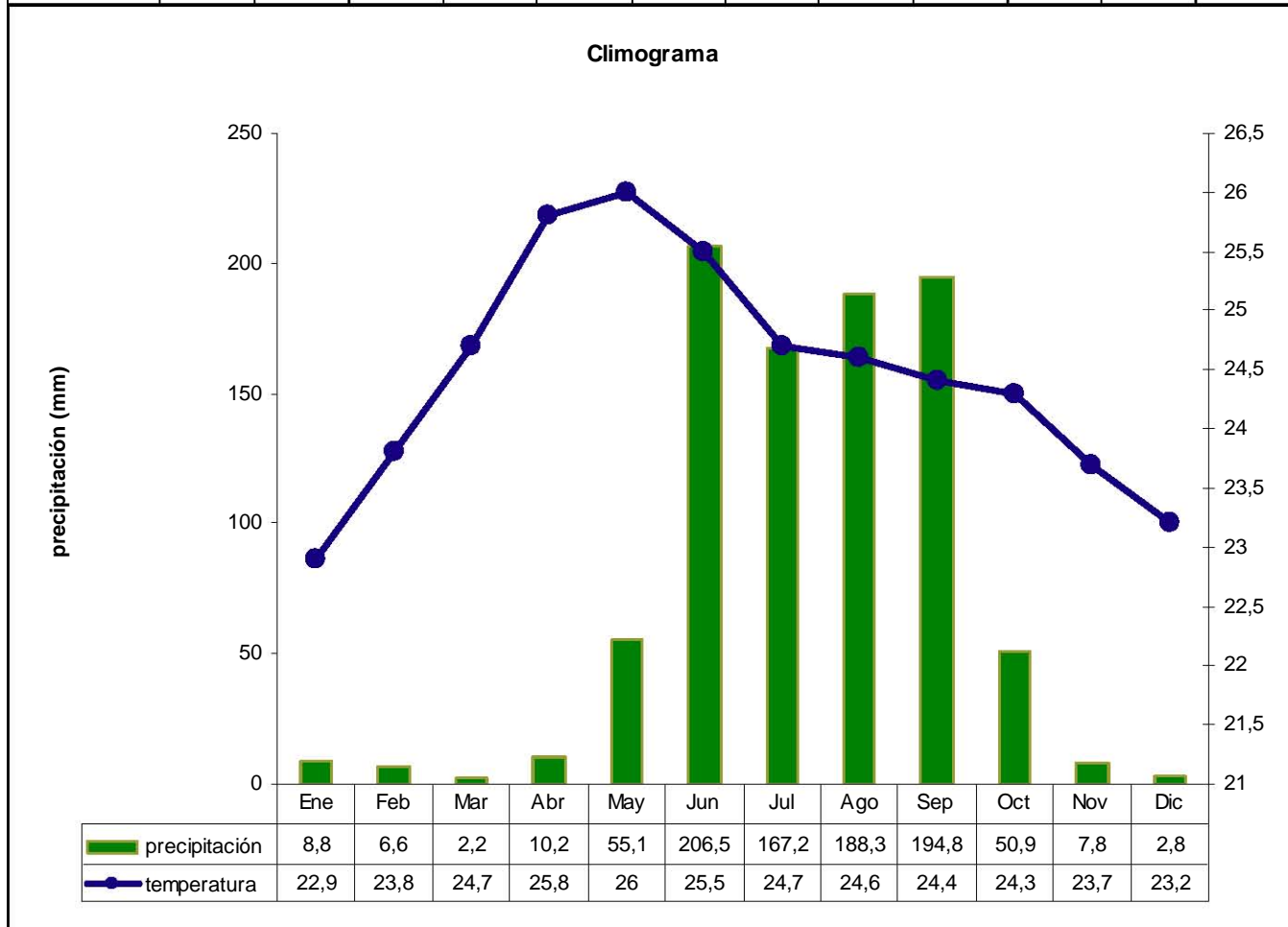


Figura 4. Fenología de *H. brasiletto* y precipitación mensual en el Municipio de Tlaquiltenango de acuerdo con los datos obtenidos de la estación meteorológica de Huautla de 1962 a 1997. ◆=baja presencia; ◆◆=mediana presencia; ◆◆◆=alta presencia.

Parte del árbol	Proteínas totales (µg/mg tejido)					
	abril	mayo	junio	julio	agosto	septiembre
RAMITAS	2.5 (1)	1.93 (1)	1.66 (1)	----	----	----
	0.66 (2)	1.06 (2)	0.9 (2)	----	----	----
	4.16 (3)	6.17 (3)	4.13 (3)	5.66 (3)	----	----
	3.53 (4)	2.53 (4)	0.56 (4)	----	----	----
	----	----	----	1.93 (5)	----	----
	----	----	----	4.86 (6)	2.06 (6)	----
	----	----	----	1.86 (7)	1.46 (7)	0.34 (7)
	----	----	----	----	1.33 (8)	0.24 (8)
	----	----	----	----	1 (9)	1.23 (9)
	----	----	----	----	----	1.5 (10)
RAMAS MEDIANAS	0.44 (1)	4.46 (1)	1.73 (1)	----	----	----
	0.046 (2)	1.2 (2)	0.6 (2)	----	----	----
	4.2 (3)	2.46 (3)	4.6 (3)	4.46 (3)	----	----
	* (4)	1.46 (4)	0.63 (4)	----	----	----
	----	----	----	4.93 (5)	----	----
	----	----	----	3.6 (6)	1 (6)	----
	----	----	----	1.26 (7)	1.2 (7)	0.28 (7)
	----	----	----	----	0.66 (8)	1 (8)
	----	----	----	----	1.2 (9)	1.4 (9)
	----	----	----	----	----	1.33 (10)
ALBURA	2.2 (1)	2 (1)	1.26 (1)	----	----	----
	0.86 (2)	2.2 (2)	0.8 (2)	----	----	----
	6 (3)	6.12 (3)	5.93 (3)	4 (3)	----	----
	2.03 (4)	1.6 (4)	1.9 (4)	----	----	----
	----	----	----	3.8 (5)	----	----
	----	----	----	2.73 (6)	3.2 (6)	----
	----	----	----	1.4 (7)	1.53 (7)	0.73 (7)
	----	----	----	----	0.53 (8)	1.26 (8)
	----	----	----	----	2.66 (9)	3.6 (9)
	----	----	----	----	----	* (10)
DURAMEN	2.56 (1)	1.33 (1)	1.4 (1)	----	----	----
	1.06 (2)	1.8 (2)	0.83 (2)	----	----	----
	* (3)	2.06 (3)	1.4 (3)	0.8 (3)	----	----
	2.4 (4)	2.6 (4)	0.06 (4)	----	----	----
	----	----	----	0.93 (5)	----	----
	----	----	----	1.46 (6)	0.4 (6)	----
	----	----	----	0.2 (7)	2.8 (7)	0.6 (7)
	----	----	----	----	1.86 (8)	0.63 (8)
	----	----	----	----	1.53 (9)	0.66 (9)
	----	----	----	----	----	0.6 (10)

Tabla 1. Cuantificación de proteínas totales por el método de Bradford (1976). Los números entre paréntesis corresponden la clave del árbol colectado. \*No hubo muestra para el análisis ----No muestreados

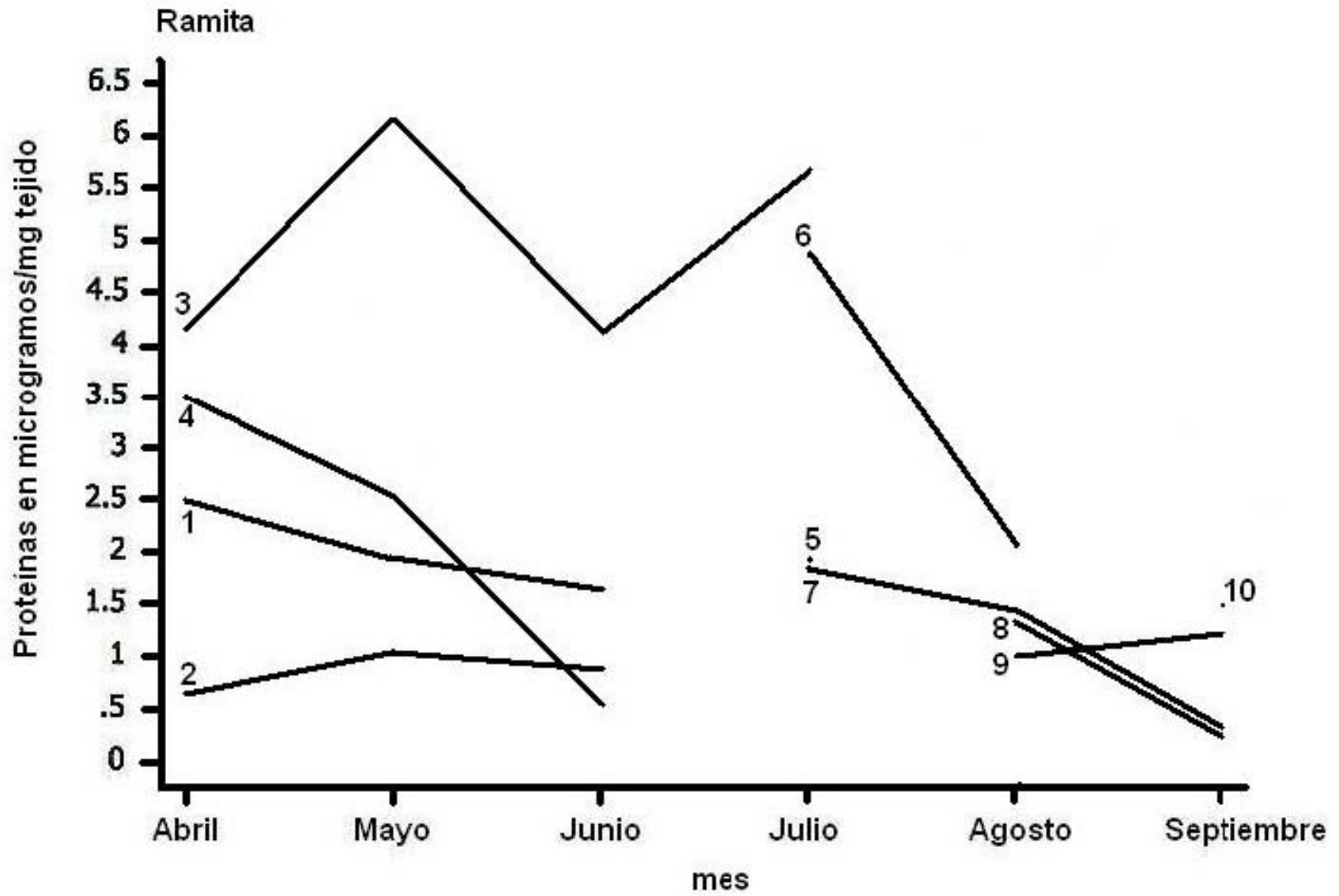


Figura 5. Proteínas totales en ramita y por árbol de abril a septiembre

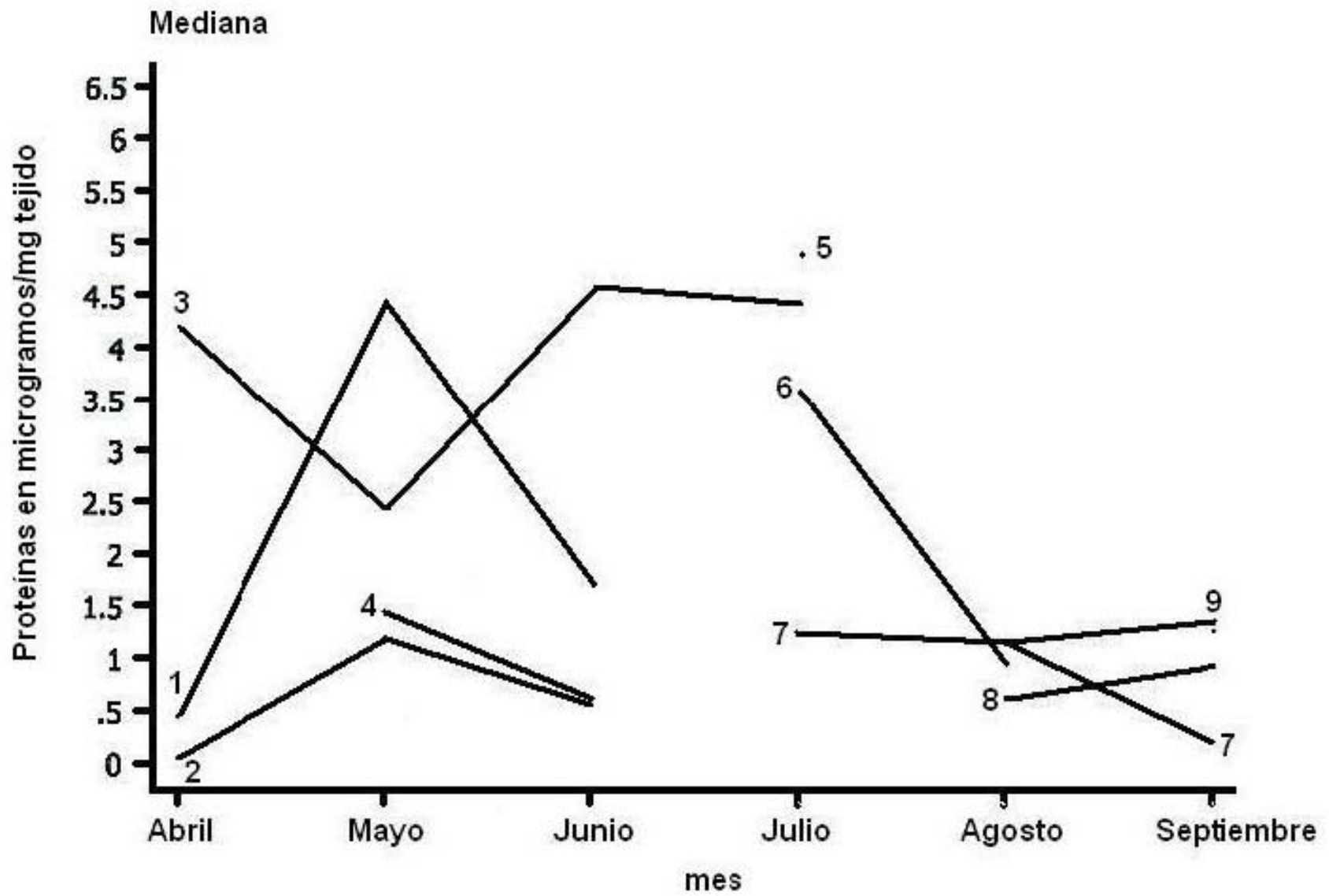


Figura 6. Proteínas totales en rama mediana y por árbol de abril a septiembre.

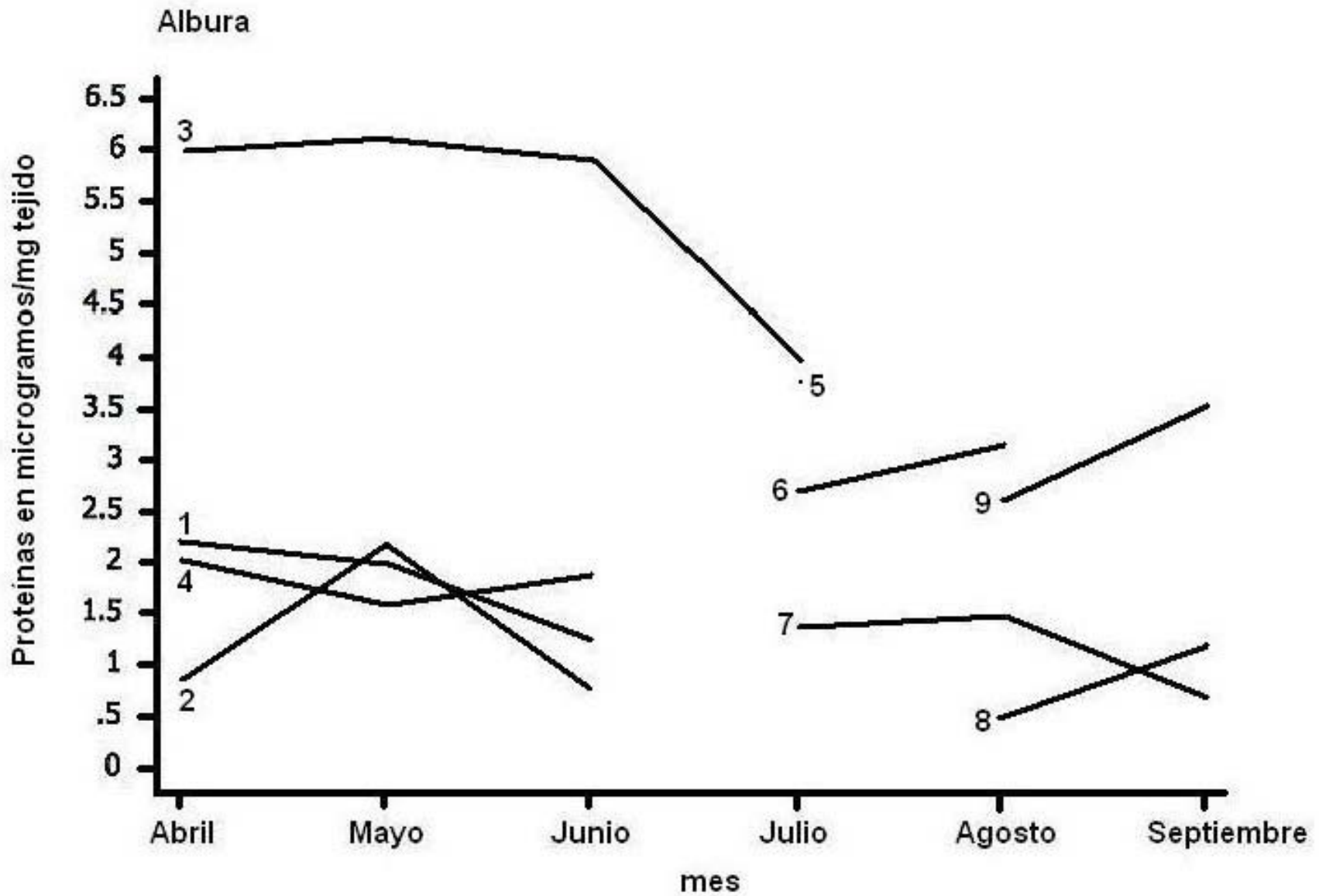


Figura 7. Proteínas totales en albura y por árbol de abril a septiembre.

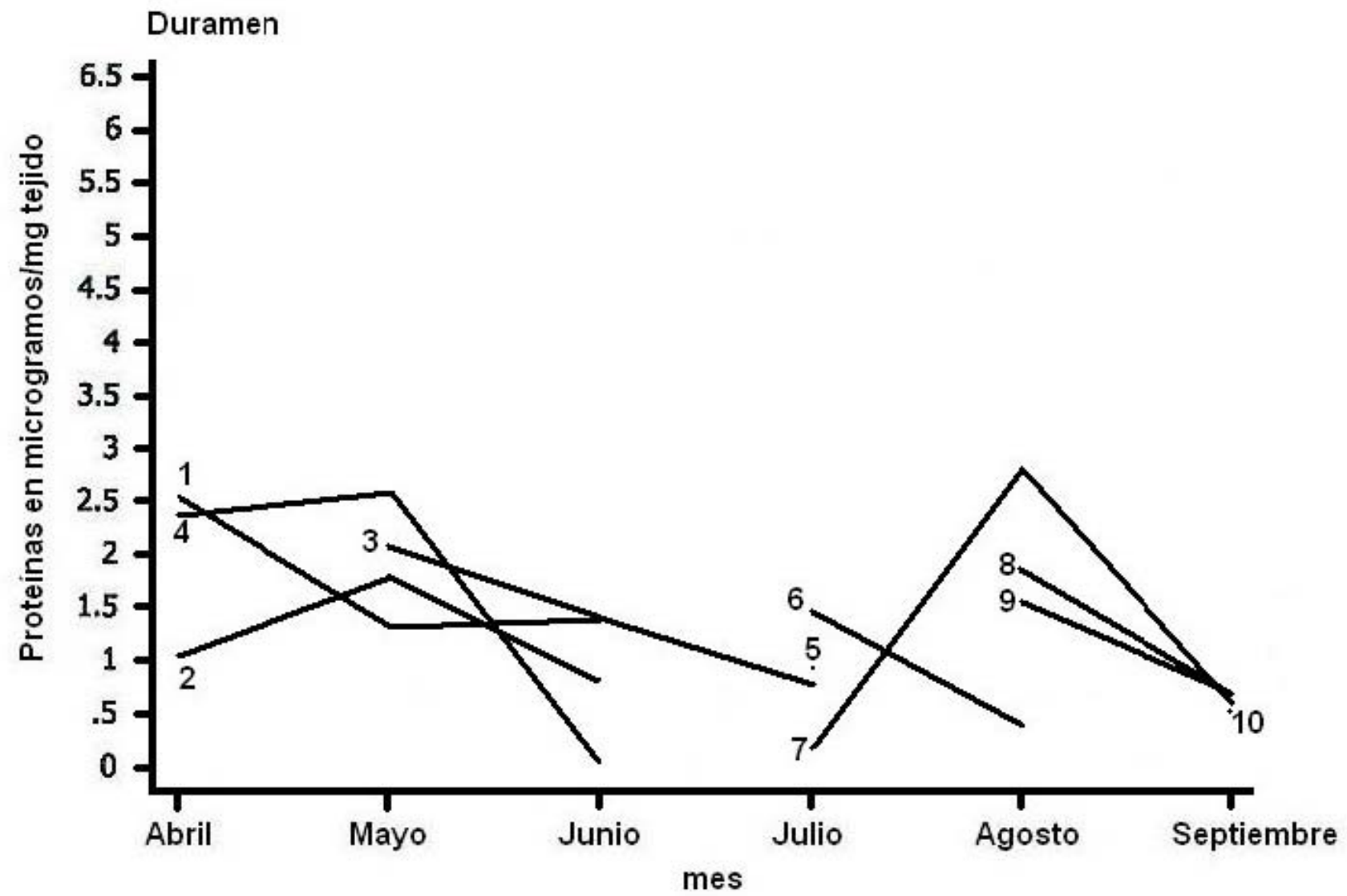


Figura 8. Proteínas totales en duramen y por árbol de abril a septiembre.

La Figura 9 muestra los diagramas de caja de los datos de la Tabla 1, donde se observa su distribución con respecto de sus medianas (línea que atraviesa a la mitad de la caja) y la dispersión de los valores en ramitas, ramas medianas, albura y duramen. Se observa que para los meses de abril, mayo, junio y julio, las diferencias individuales son muy acentuadas por la dispersión de los datos. En los meses de agosto y septiembre la dispersión de los valores es menor; así mismo se aprecia una ligera tendencia a la disminución en la cantidad de las proteínas.

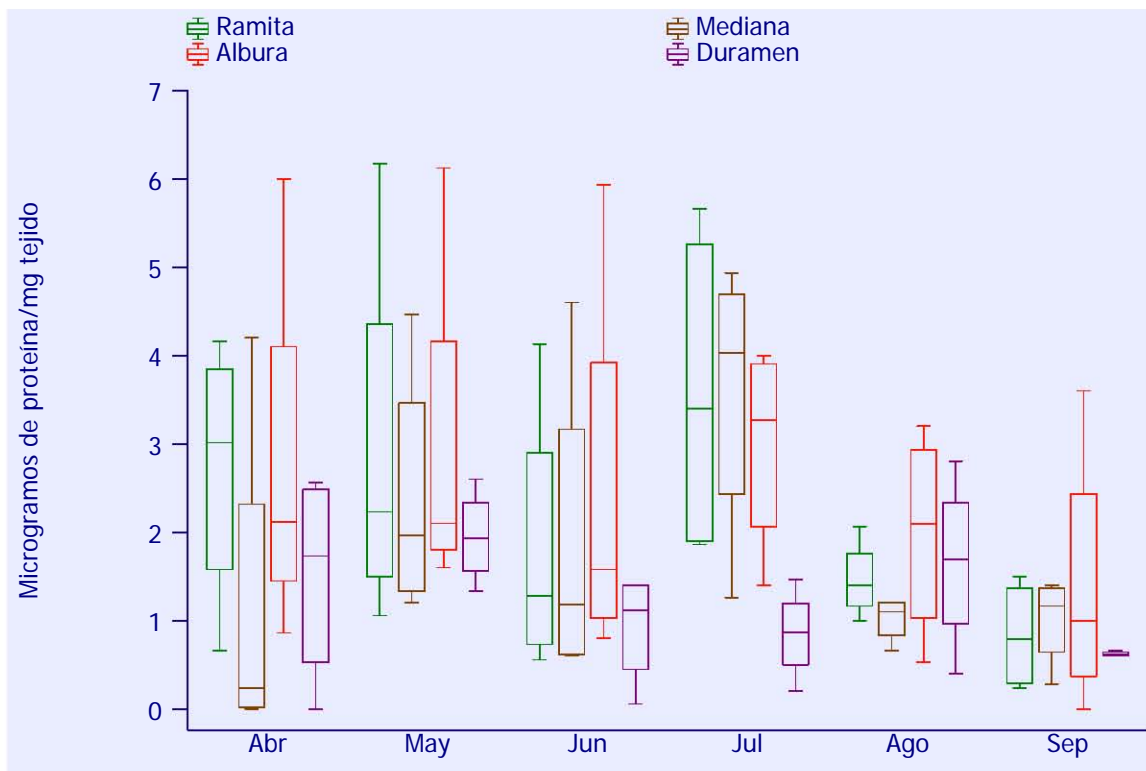


Figura 9. Cuantificación de proteínas en diagramas de caja por mes.

La Figura 10 muestra los diagramas de caja del contenido total de proteínas por regiones, durante los seis meses de estudio en ramitas, ramas medianas, albura y duramen; con este análisis no se puede definir cuál zona del árbol es la que almacena mayor cantidad de proteína.

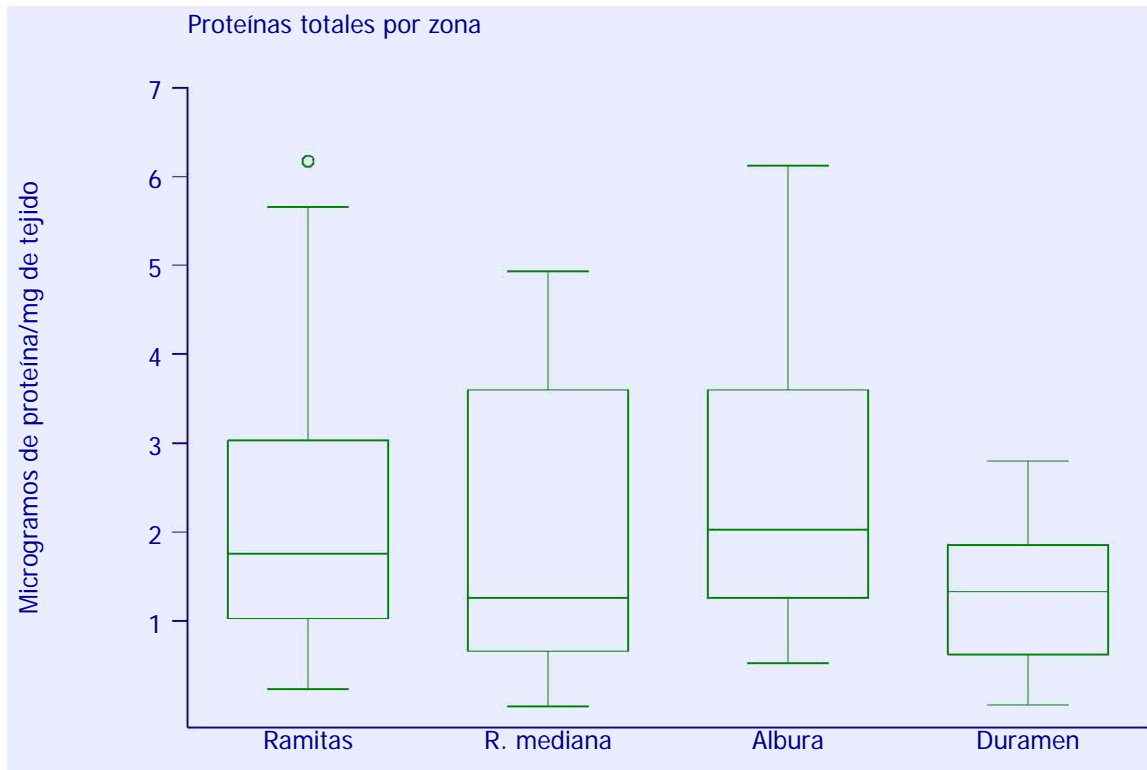


Figura 10. Cuantificación de proteínas totales por zona del árbol en diagramas de caja.

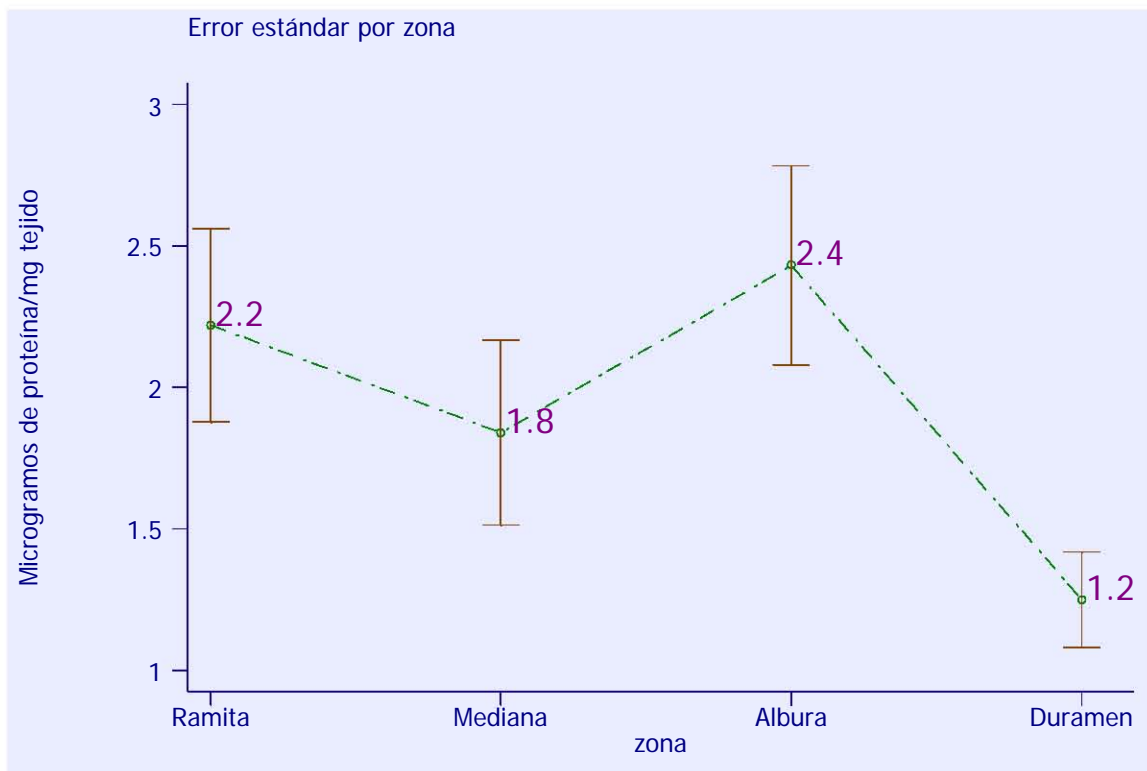


Figura 11. Error estándar para la cantidad total de proteínas por zona



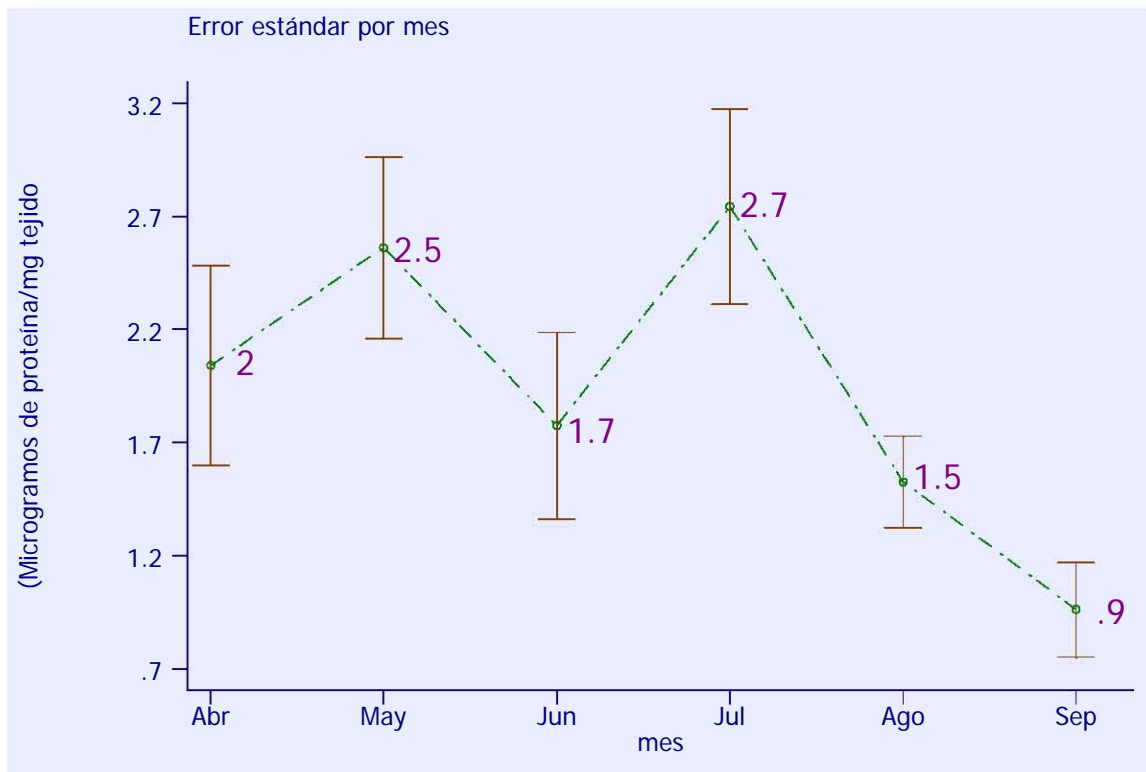


Figura 12. Error estándar para la cantidad total de proteínas por mes.

El error estándar es un parámetro que ayuda a definir gráficamente las diferencias entre grupos de datos. Este parámetro se calcula dividiendo la desviación estándar entre la raíz cuadrada del número de muestras. La Figura 11 muestra el promedio y error estándar de los datos de concentración de proteínas en las cuatro zonas estudiadas durante los seis meses de estudio; se observa que la concentración de proteínas en el duramen es claramente menor que en las otras tres regiones.

La Figura 12 muestra el promedio y error estándar de los datos de concentración de proteínas totales de las cuatro zonas y árboles por mes durante los meses de estudio. Se observa que septiembre fue el mes con menor cantidad de proteína

Así mismo se graficaron las medias con sus respectivos errores estándares para observar la tendencia de la proteína por zona (Figuras 13, 14, 15 y 16).

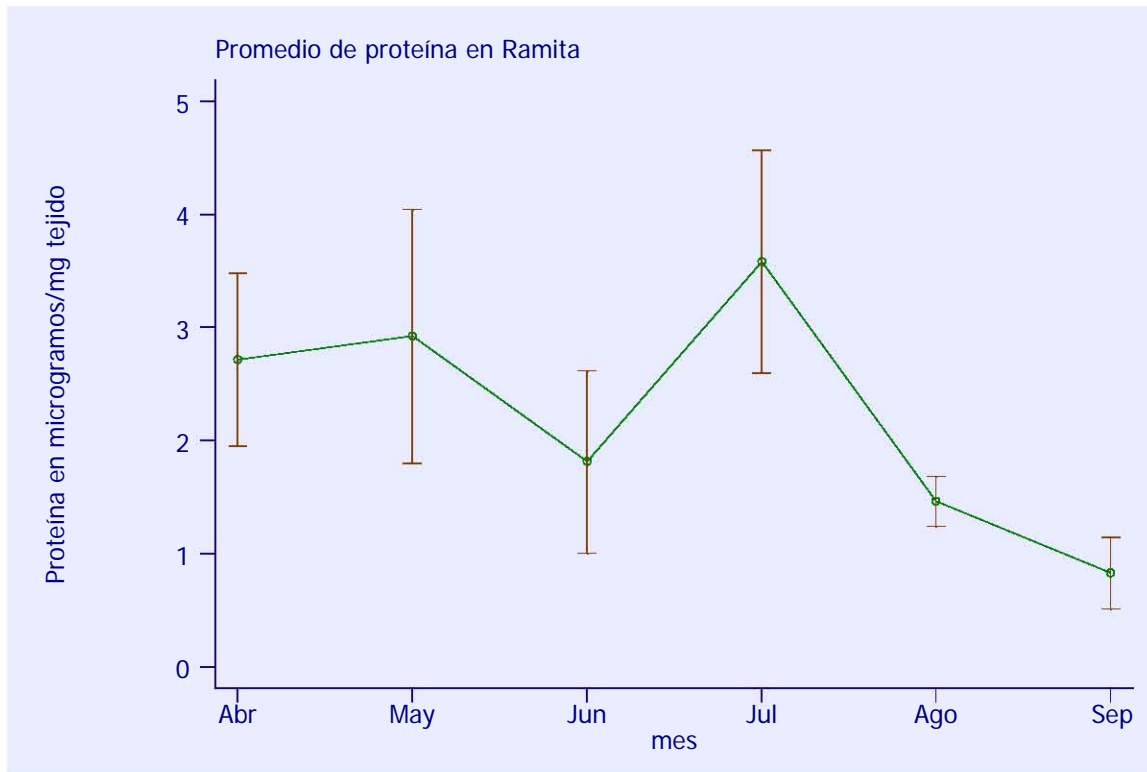


Figura 13. Promedio de proteínas con sus respectivos errores estándares en Ramita por mes.

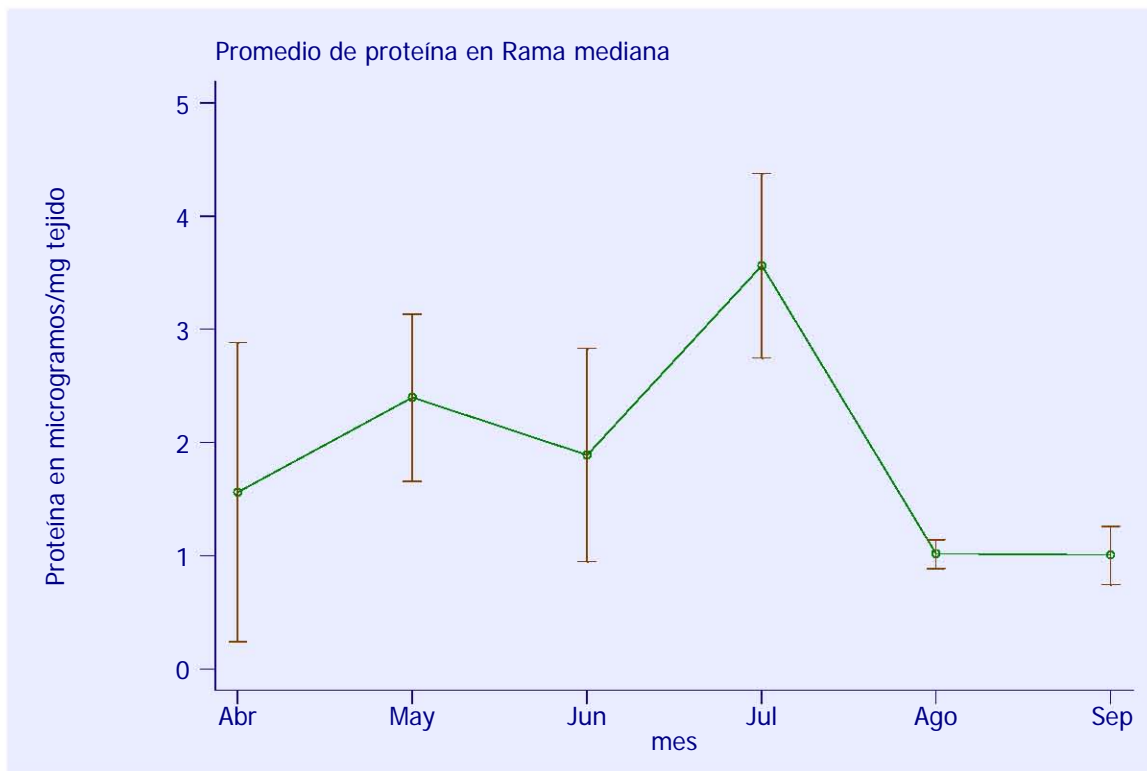


Figura 14. Promedio de proteínas con sus respectivos errores estándares en Rama mediana por mes.

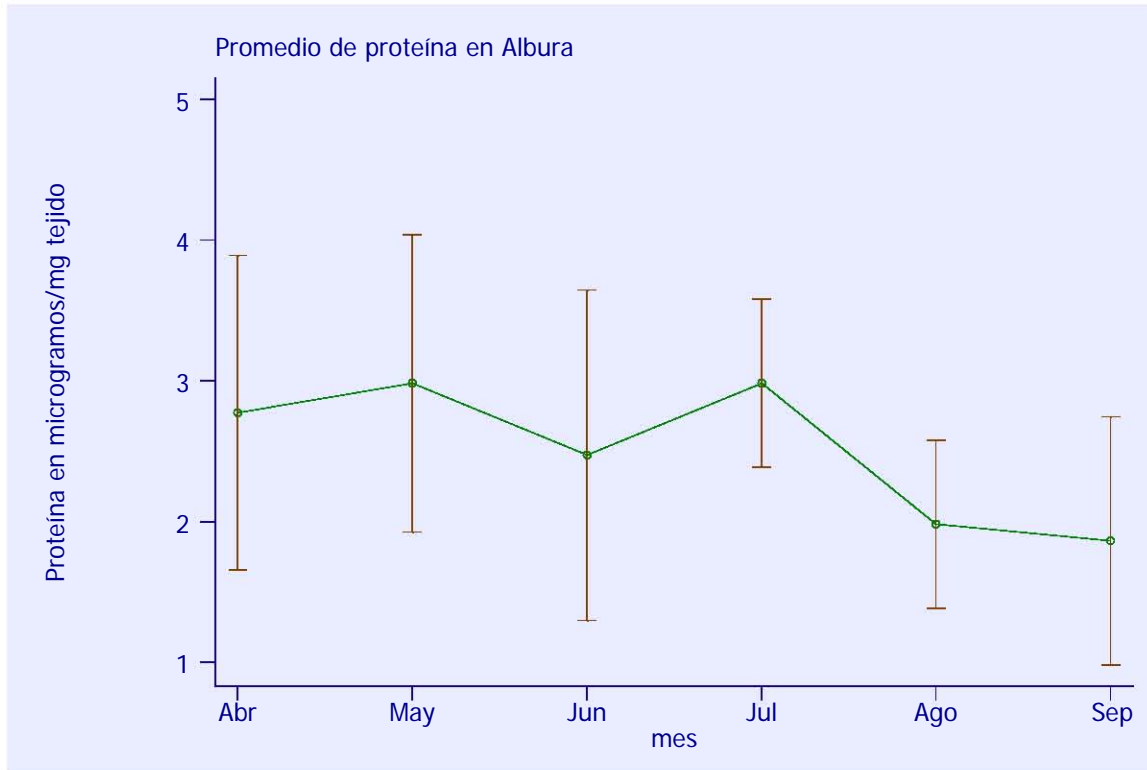


Figura 15. Promedio de proteínas con sus respectivos errores estándares en Albura por mes.

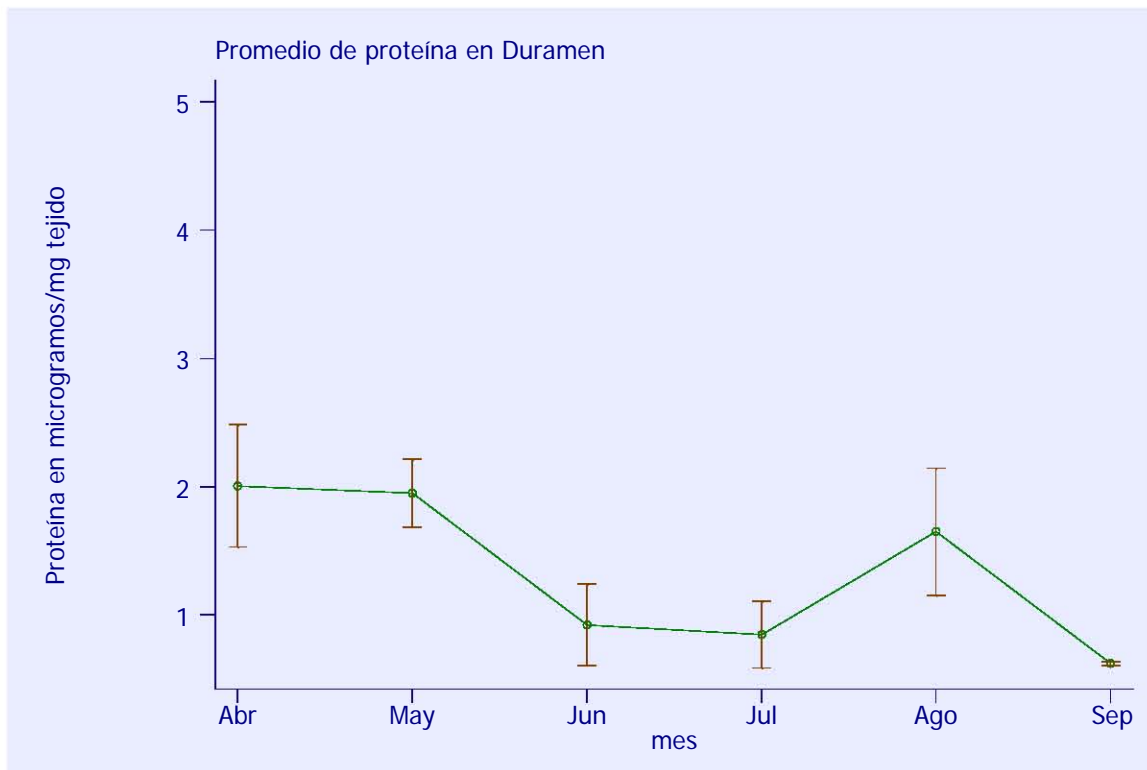


Figura 16. Promedio de proteínas con sus respectivos errores estándares en Duramen por mes.

Para saber si existen diferencias significativas entre los meses se le aplicó el estadístico de Kruskal-Wallis. Los resultados de la prueba muestran que hay diferencias entre los meses (Tabla 2).

Mes	Abril	Mayo	Junio	Julio	Agosto	Septiembre
Abril	0.0000	0.8087	1.2702	0.6283	1.0867	<b>2.6549</b>
Mayo	0.8087	0.0000	<b>2.1519</b>	0.1867	<b>1.9619</b>	<b>3.5686</b>
Junio	1.2702	<b>2.1519</b>	0.0000	<b>1.9652</b>	0.1900	1.4517
Julio	0.6283	0.1867	<b>1.9652</b>	0.0000	1.7752	<b>3.3849</b>
Agosto	1.0867	<b>1.9619</b>	0.1900	1.7752	0.0000	1.6385
Septiembre	<b>2.6549</b>	<b>3.5686</b>	1.4517	<b>3.3849</b>	1.6385	0.0000

Tabla 2. Prueba de comparación múltiple de Kruskal-Wallis entre los meses estudiados. Prueba regular: Medianas significativamente diferentes si el valor de  $z > 1.9600$ . Los números marcados en negritas indican diferencias significativas.

Lo anterior revela que el contenido de proteínas sufre una variación a lo largo de los meses estudiados siendo el mes de septiembre el que almacena menos proteínas.

Para saber cuál de las diferentes zonas del árbol acumula más proteína se aplicó un análisis de Kruskal-Wallis (Tabla 3); para este análisis se tomaron todos los valores de la Tabla 1.

Zona	Ramita	Mediana	Albura	Duramen
Ramita	0.0000	0.9459	0.8679	1.8155
Mediana	0.9459	0.0000	1.7948	0.8605
Albura	0.8679	1.7948	0.0000	<b>2.6553</b>
Duramen	1.8155	0.8605	<b>2.6553</b>	0.0000

Tabla 3. Prueba de comparación múltiple de Kruskal-Wallis para las diferentes zonas del árbol. Prueba regular: Medianas significativamente diferentes si el valor de  $z > 1.9600$ . Los números marcados en negritas indican diferencias significativas.

### 7.3 Electroforesis

En los geles de poliacrilamida se evidencian los tamaños relativos de las proteínas en la madera. Éstas se manifiestan en los geles en forma de bandas cuya velocidad de migración es proporcional al tamaño molecular.

De los resultados de electroforesis se obtuvieron un total de 105 bandas de proteína en seis meses (Figuras 17, 18, 19, 20, 21 y 22).

Para el mes de agosto no se tiene fotografía porque las bandas fueron muy tenues por lo que la cámara no pudo captarlas. En septiembre no se encontró ninguna banda de proteína en el gel.

Se observa que en *H. brasiletto* hay una tendencia hacia la disminución del número de bandas para los meses de lluvia (Figura 23).

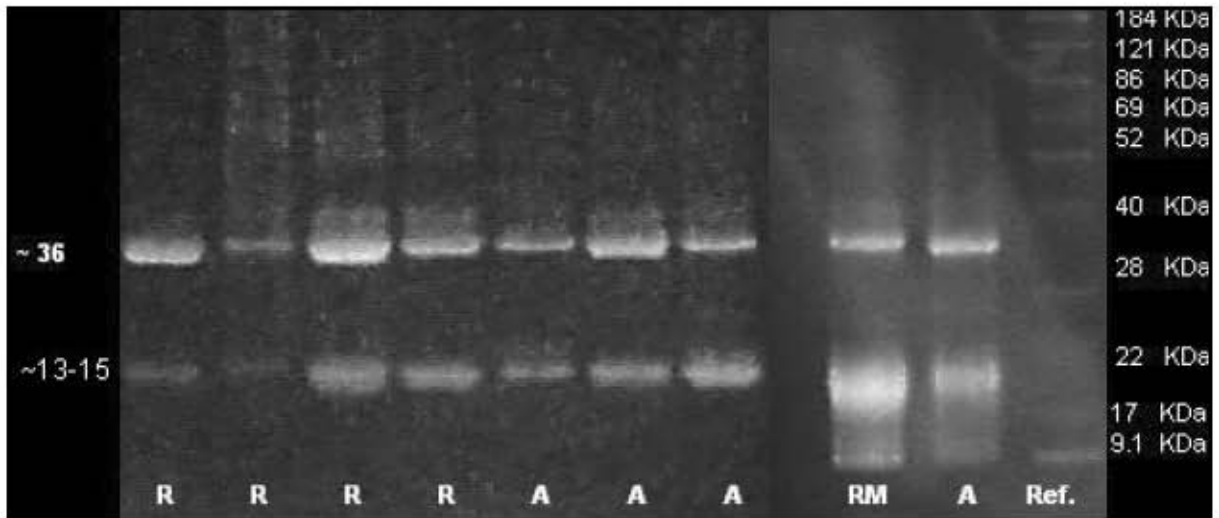


Figura 17. Gel de poliacrilamida al 12% de extracto de proteínas en diferentes zonas del árbol para el mes de abril de 2002. Donde: R = ramita, RM = rama media, A = albura y Ref = estándar de peso molecular.

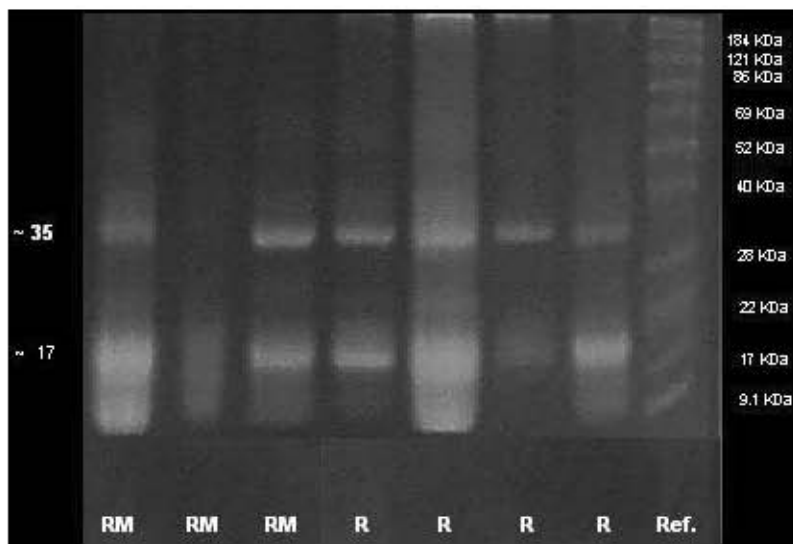


Figura 18. Gel de poliacrilamida al 12% de extracto de proteínas en diferentes zonas del árbol para el mes de mayo de 2002. Donde: R = ramita, RM = rama mediana y Ref = estándar de peso molecular.

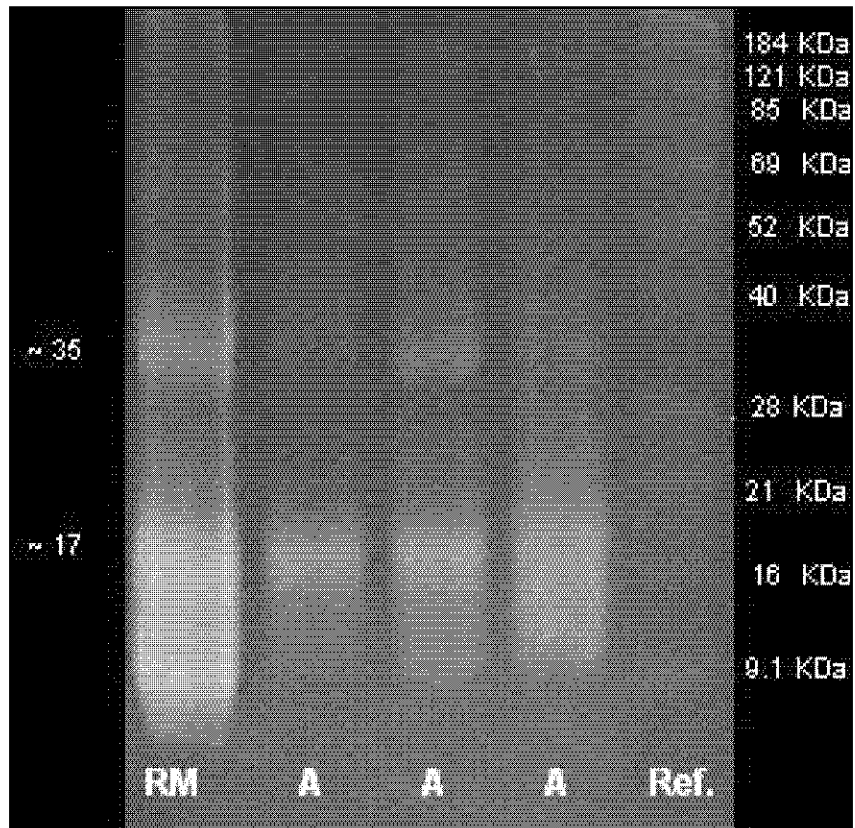


Figura 19. Gel de poliacrilamida al 12% de extracto de proteínas en diferentes zonas del árbol para el mes de mayo de 2002. Donde: R = ramita, RM = rama mediana y Ref = estándar de peso molecular.

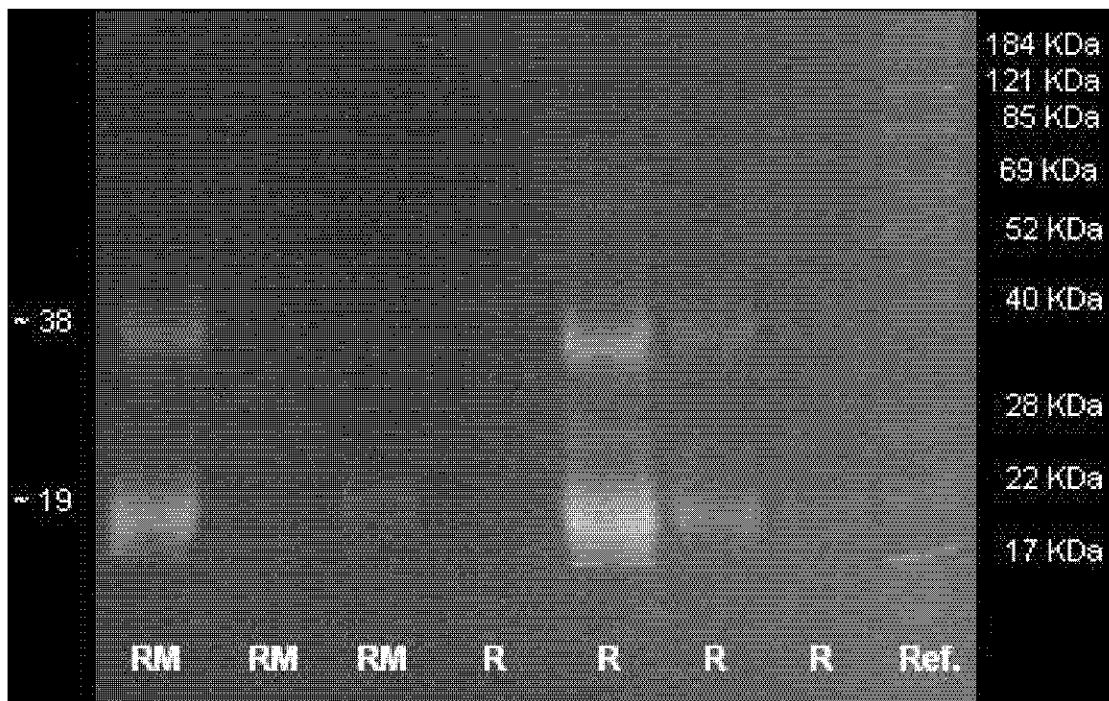


Figura 20. Gel de poliacrilamida al 12% de extractos de proteínas en diferentes zonas del árbol para el mes de Junio de 2002. Donde: R = ramita, RM = rama mediana y Ref = estándar de peso molecular.

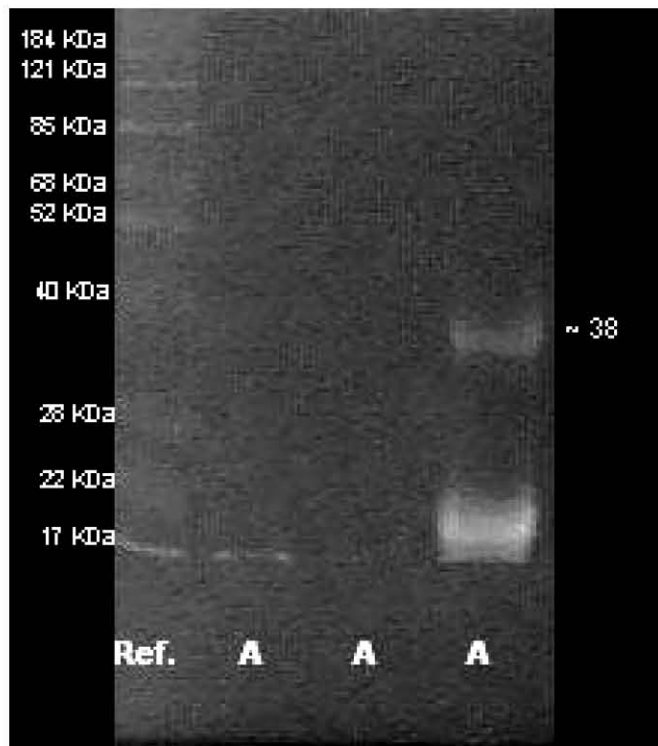


Figura 21. Gel de poliacrilamida al 12% de extractos de proteínas en diferentes zonas del árbol para el mes de Junio de 2002. Donde: A = albura y Ref = estándar de peso molecular.

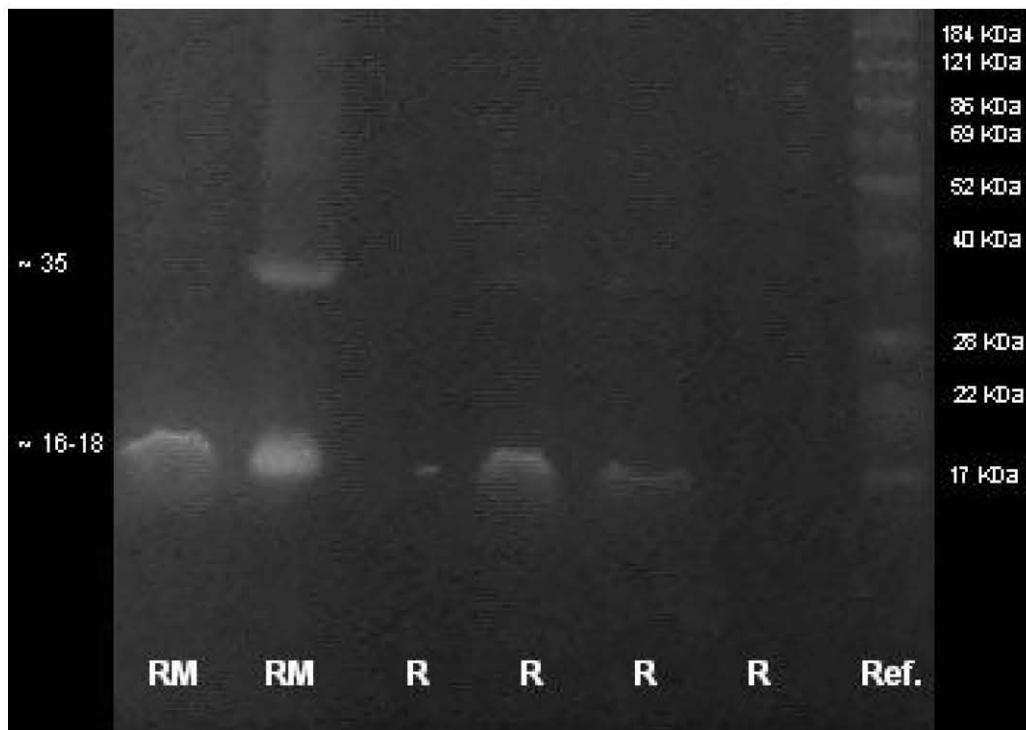


Figura 22. Gel de poliacrilamida al 12% de extractos de proteínas en diferentes zonas del árbol para el mes de Julio de 2002. Donde: R = ramita, RM = rama media y Ref = estándar de peso molecular.



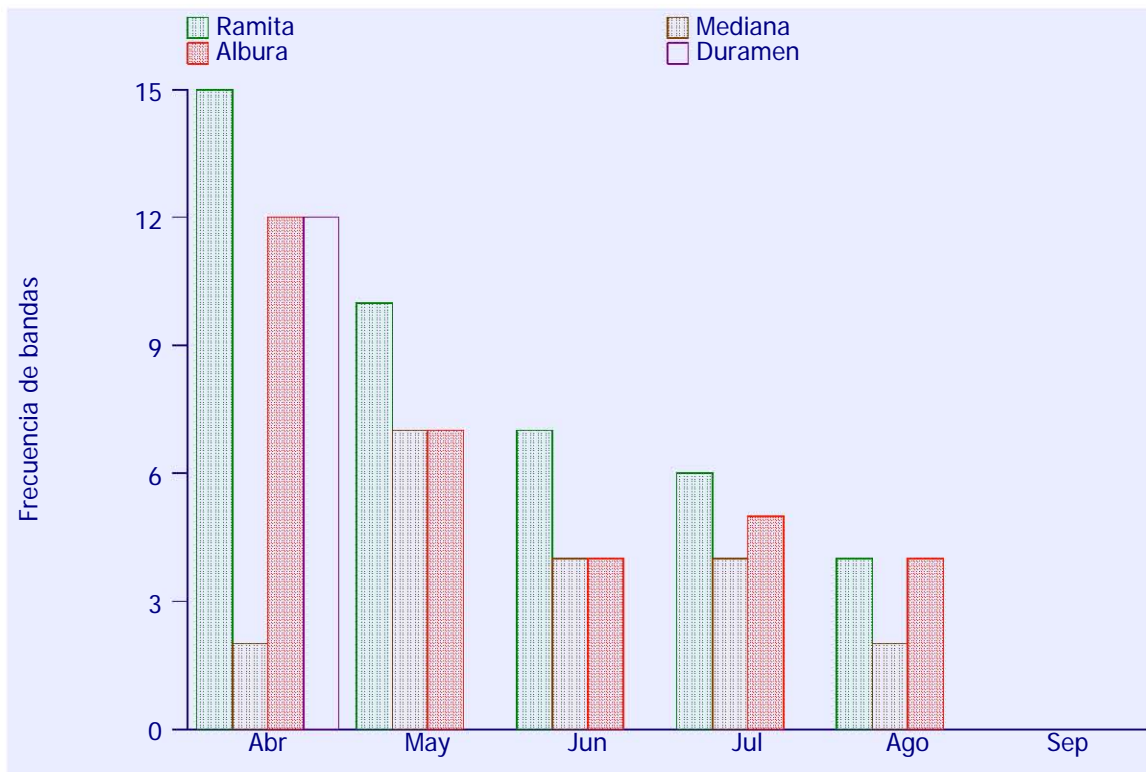


Figura 23. Número de bandas totales reveladas en el gel.

Si se consideran sólo a las bandas de proteínas de reserva cuyos pesos moleculares van de 30 hasta 38 kDa (Sauter *et al*, 1988; Sauter y Wellenkamp, 1988; Wetzel *et al*, 1989a; Wetzel, 1989b; Harms y Sauter, 1992; van Cleve y Apel, 1993; Stepien y Sauter, 1994 y Razo, 2003) se observa que en *H. brasiletto* su número disminuye conforme avanza el régimen de lluvias. En septiembre cuando casi finalizan las lluvias, no se observó ninguna banda proteína (Figura 23); es notable que en el mes de abril, el duramen presentara bandas de proteína de alto peso molecular y ninguna dentro del rango de 30-38 kDa.

La banda de 35 kDa se expresa con más frecuencia en los meses de abril, mayo y julio. Para el mes de junio hubo una proteína con un peso de 38 kDa. Cabe señalar que en ningún momento aparece el polipéptido de aproximadamente 30-32 kDa que se ha reportado y localizado en cuerpos proteicos (Wetzel, 1989a; Sauter, 1999 y Stepien, 1994).

## 7.4 Citoquímica

En la temporada de sequía, cuando la célula se encuentra llena de almidón, las proteínas teñidas casi no forman corpúsculos, en lugar de esto los cuerpos teñidos son amorfos y se encuentran dispersos en el poco espacio disponible en las ramitas y ramas medianas (Figura 24). En albura y duramen se observan corpúsculos teñidos con los colorantes (Figura 25).

Por otro lado en lluvias se observa que los cuerpos proteicos son corpusculares y hay poca presencia de almidón (Figura 26 y 27).

Para demostrar la naturaleza proteica de estos cuerpos, los controles se sometieron a digestión con pepsina (Figura 28).

Los resultados citoquímicos muestran que aún en época de lluvias las proteínas están presentes. Se localizan en células radiales y en menor proporción en las células axiales. Esto muestra que las proteínas no se utilizan en un solo momento y los cuerpos proteicos se presentan en las células radiales de xilema secundario, aunque la presencia es menor con respecto a los meses de sequía; se observa que en las ramitas hay mayor presencia de cuerpos proteicos (Figura 26B) y menor en albura y casi nada en duramen (Figura 26).

El duramen tiene la característica de ser un lugar destinado al depósito de metabolitos secundarios. Es importante señalar esto porque el estudio citoquímico muestra que en este sitio se localizan corpúsculos tanto en parénquima radial como axial (Figura 25C). Para la misma especie Razo (2003) no reportó proteínas en el parénquima axial.

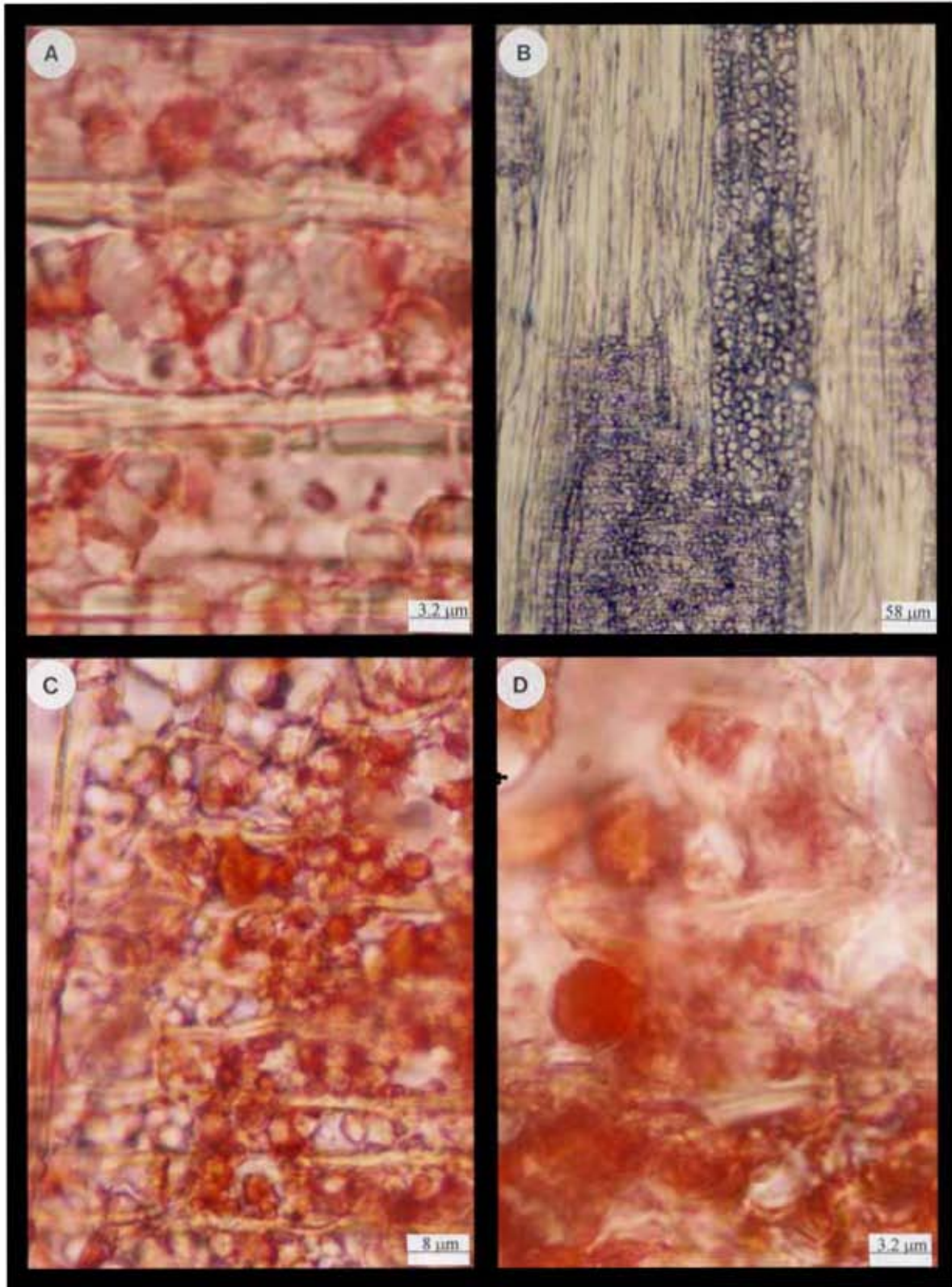


Figura 24. Tinción directa en época de sequía. A. Ramita, corte radial, (100X), rojo ponceau. B. Ramita, corte radial, (10X), azul de coomassie. C. Rama mediana, corte radial, (40X), azul de coomassie. D. Rama mediana, corte radial, (100X), rojo ponceau.

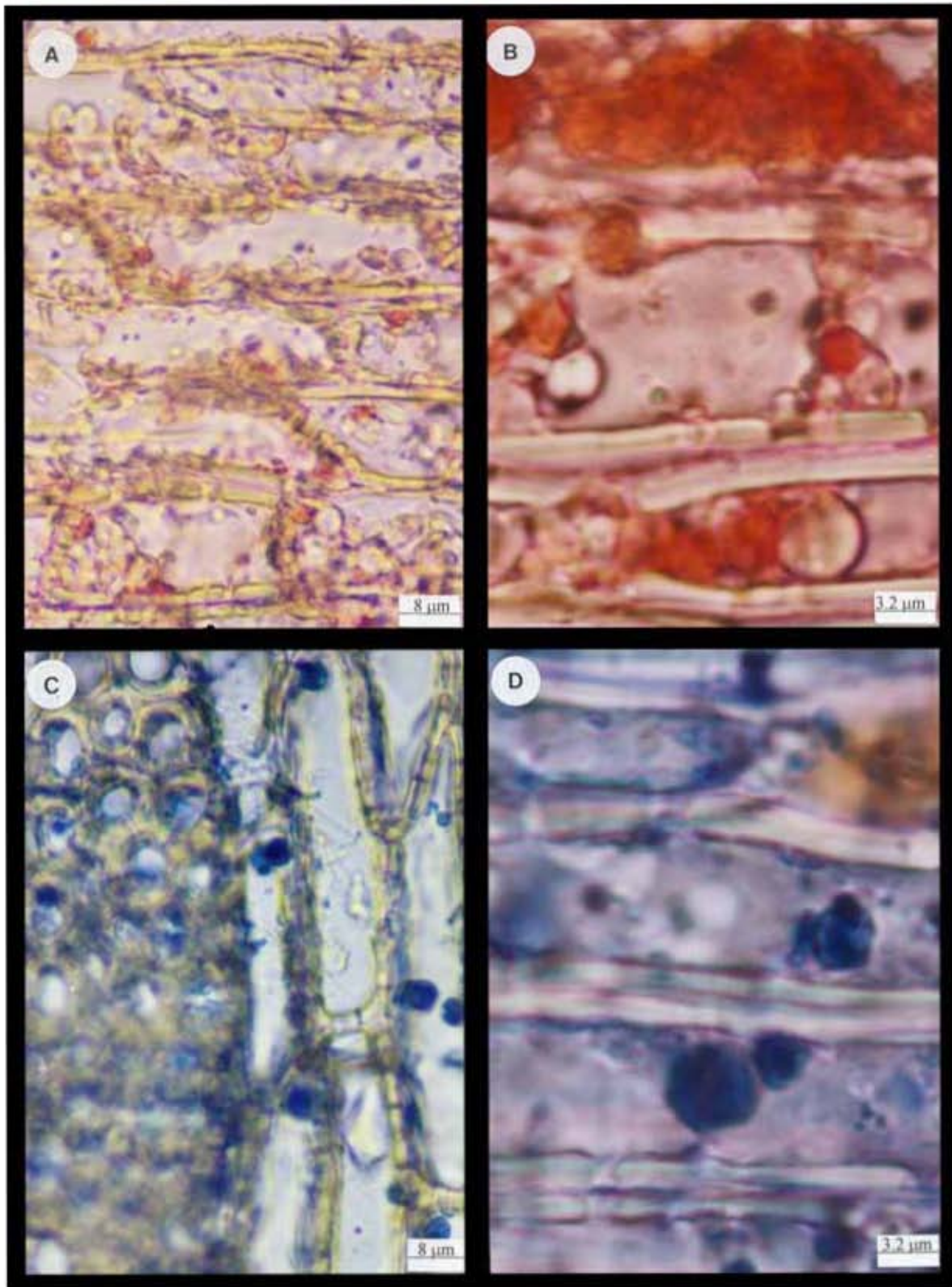


Figura 25. Tinción directa en época de sequía. A. Albura, corte radial, (40X), rojo ponceau. B. albura, corte radial, (100X), rojo ponceau. C. Duramen, corte tangencial, (40X) azul de coomassie. D. Duramen, corte radial, (100X), azul de coomassie.

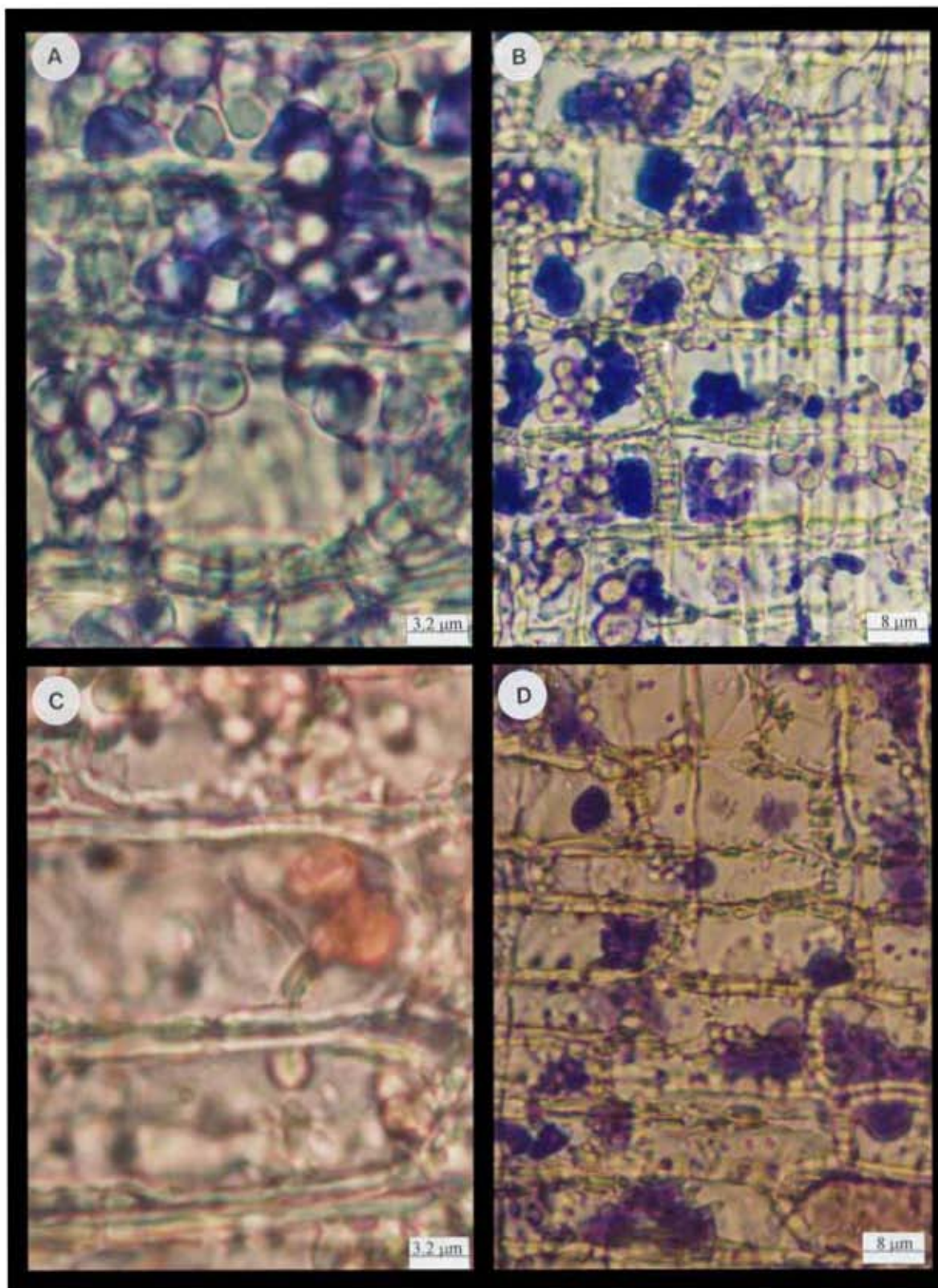


Figura 26. Tinción directa en época de lluvia. A. Ramita, corte radial, (100X), azul de coomassie. B. Ramita, corte radial, (40X), azul de coomassie. C. Rama mediana, corte radial, (100X), rojo ponceau. D. Rama mediana, corte radial, (40X), azul de coomassie.

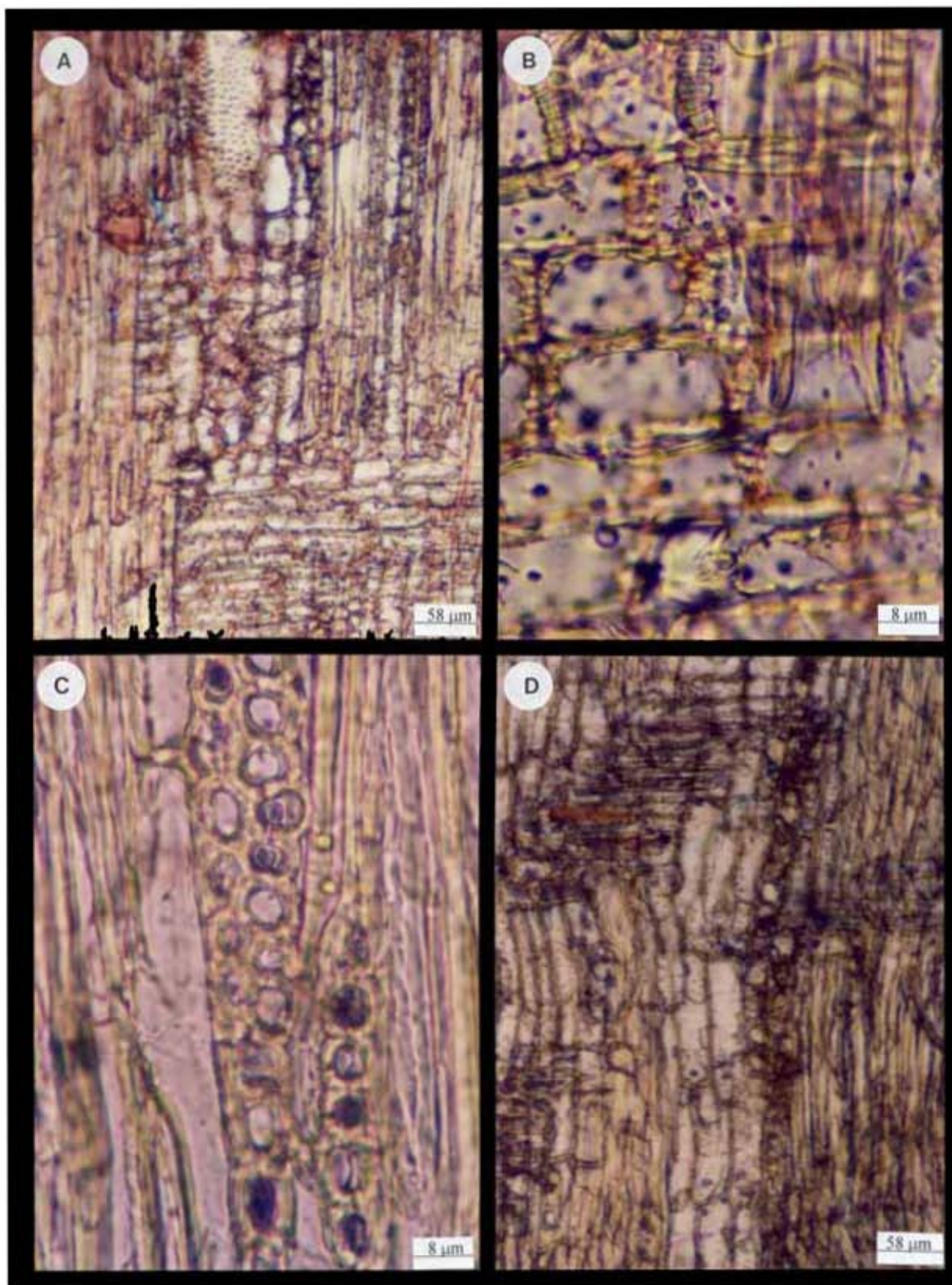


Figura 27. Tinción directa en época de lluvia. A. Albura, corte radial, (10X), rojo ponceau. B. Albura, corte radial, (40X), azul de coomassie. C. Duramen, corte tangencial (40X), azul de coomassie. D. Duramen, corte radial, (10X), azul de coomassie.

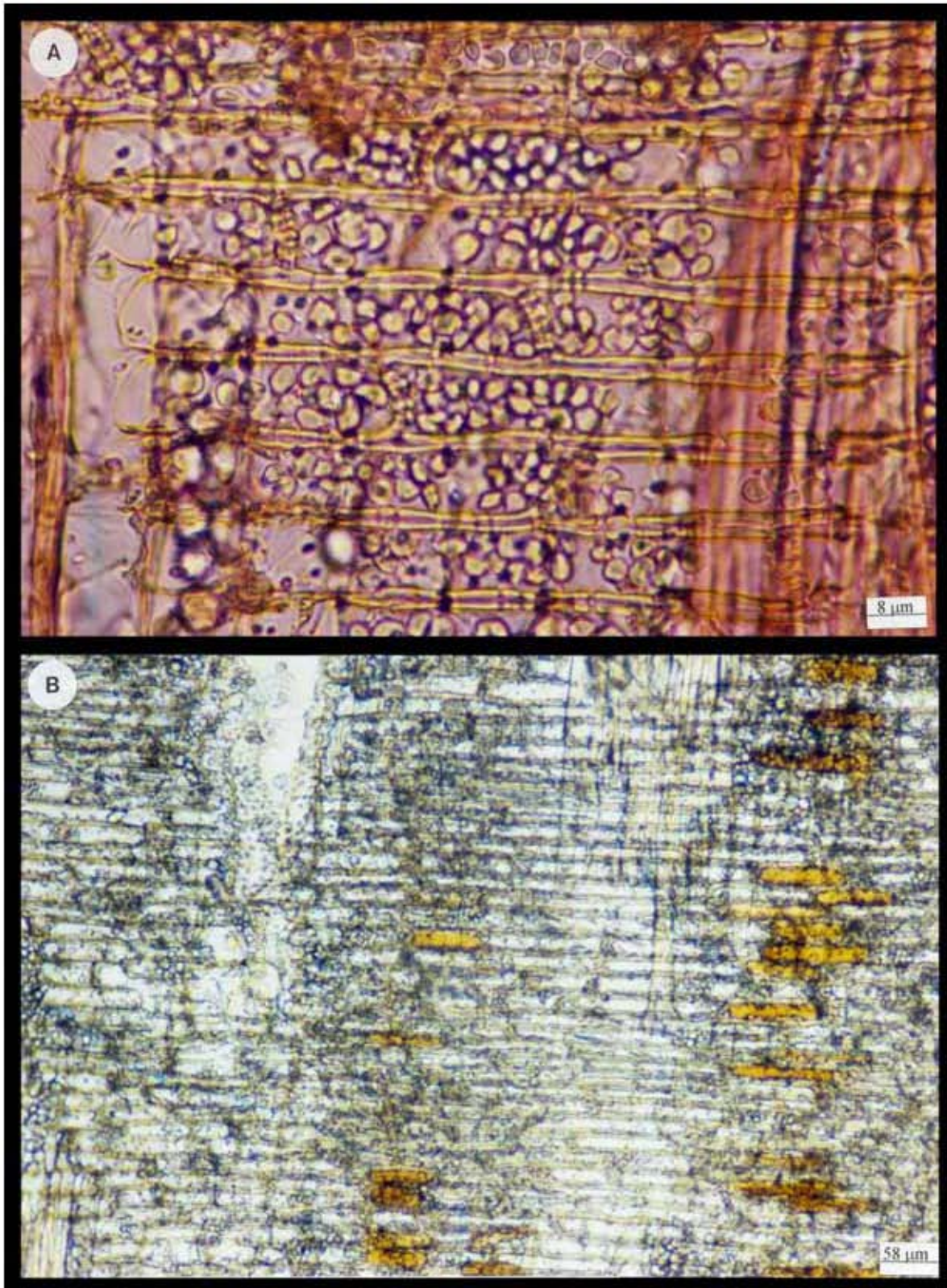


Figura 28. Muestras tratadas con pepsina en época de sequía. A. Ramita, corte radial, (40X), rojo ponceau. B. Duramen, corte radial, (10X), azul de coomassie.

## 8. Discusión

El cálculo del contenido de proteínas totales en el xilema secundario, representa un indicador indirecto de la presencia de proteínas de reserva. En *Haematoxylon brasiletto* este cálculo se representó con los valores promedio de dicho parámetro durante seis meses y en los cuales se encontraron diferencias importantes entre los árboles que se muestrearon y en las cuatro regiones de cada árbol estudiadas (Figuras 5 a 8).

Los datos muestran que las ramas pequeñas, medianas y la albura tienen un contenido mayor de proteínas que el duramen; estos datos son congruentes con el hecho de que el duramen tiene una tasa metabólica más baja y, en buena parte, se trata de un tejido casi inactivo cuya función es acumular extractivos (Kozlowski, 1997).

A pesar de la gran variación entre individuos, se observa una tendencia a la disminución del contenido de proteínas hacia septiembre en las ramas pequeñas y medianas, situación que está directamente relacionada con el desarrollo vegetal y el cambio en el contenido de proteína durante este periodo (Vierstra, 1993).

En la albura y el duramen, en cambio, esta tendencia es menos clara, aunque, en el caso de la albura esto podría ser un efecto de las variaciones individuales más acentuadas en esta región.

Los datos fenológicos registrados durante el curso de esta investigación mostraron que los fenómenos de floración y fructificación ocurren en los meses de febrero y marzo, respectivamente, y por lo tanto quedan fuera del período de muestreo de esta tesis. El desarrollo completo del dosel, en cambio, ocurre principalmente durante los meses de la temporada de lluvias, esto es, de junio a septiembre. Los datos que muestran una disminución en el contenido de proteínas hacia septiembre podrían relacionarse con la movilización de reservas de nitrógeno para la intensa síntesis de proteínas que requiere la formación del dosel; esta propuesta es congruente con la fenología de *H. brasiletto* y con el hecho de que este fenómeno es más claro en las ramas pequeñas y medianas

Las proteínas solubilizadas se analizaron, mensualmente, por medio de geles de poliacrilamida para determinar los tamaños moleculares en las cuatro regiones mencionadas. La Figura 23 muestra que el número total de bandas por región y mes disminuyen. Con estos datos se observa que la ramita es la región con mayor número de



bandas y el duramen es la zona con menor número, esto es consistente con la cuantificación, al ser la región con menos cantidad de proteína.

Las Figuras 17 a 22 muestran que las proteínas más prominentes son aquellas cuyos tamaños moleculares oscilan entre 13-19 y 35-38 kDa. En trabajos anteriores (Harms y Sauter, 1992; Langheinrich y Tischner, 1991) por medio de inmunolocalización, se ha mostrado que proteínas dentro de este último rango de tamaño están presentes en los cuerpos proteicos, por lo que se consideran de reserva. El examen de los geles muestra claramente que en los primeros meses de muestreo hubo mayor presencia de estos tamaños moleculares que en los últimos. Estos datos son congruentes con los obtenidos de la cuantificación de proteínas totales y refuerzan la hipótesis de que las proteínas de reserva se utilizan para el desarrollo completo del dosel.

En *H. brasiletto* las regiones con mayor presencia de proteínas consideradas de reserva son la ramita y la albura. Estos resultados pueden indicar que el árbol almacena más proteínas de reserva en aquellos lugares con mayor demanda, como es el caso de la ramita que presenta mayor número de meristemos apicales, además de mantener el desarrollo de las primeras hojas. Sauter y van Cleve (1992) encontraron que los aminoácidos presentes en la savia del xilema están relacionados con la hidrólisis de los cuerpos proteicos. Cuando comienza la temporada de lluvia los cuerpos proteicos se fusionan y forman una vacuola, posteriormente ocurre la hidrólisis de las proteínas por proteinasas (Heldt, 1999). El modelo de Kang y Titus (1980) señala que durante la época de senescencia de las hojas el nitrógeno que contienen se moviliza a sitios de almacén y posteriormente se utiliza en el crecimiento de las nuevas hojas.

La citoquímica se realizó en las cuatro regiones de un mismo árbol en época de sequía y de lluvia. La tinción que se observa en las células del xilema secundario nos indica la presencia de cuerpos proteicos, cuya función es almacenar nitrógeno para el siguiente ciclo del árbol. Los resultados muestran que estos corpúsculos se localizan, en su mayor parte, en las células de parénquima radial y en menor proporción en las células de parénquima axial (Figuras 24 a 28). Esto es consistente con Sauter *et al.* (1988), Sauter y Wellenkamp (1988), Sauter y van Cleve (1989), Wetzal *et al.* (1989), Sauter y van Cleve (1990), Harms y Sauter (1992), van Cleve y Apel (1993), Hao y Wu (1993) y Razo (2003), quienes proponen que el parénquima radial es una importante zona de almacenamiento de compuestos de reserva. En este estudio observamos que las células de parénquima radial tienen un papel

importante para el almacenamiento de proteínas. La estructura del xilema secundario muestra que el sistema vertical está compuesto de fibras, vasos y en menor proporción de parénquima axial, en cambio, el sistema horizontal está ocupado por el parénquima radial, de esta manera el transporte de las sustancias de reserva es de manera directa hacia la corteza donde posteriormente se trasladan a los sitios activos. Esto es debido a que las partes vegetales en crecimiento reciben muchos de sus nutrimentos vía floema (Raven, 1999; Savidge *et al.* 2000). Se observa que las ramas pequeñas y medianas presentan mayor abundancia de cuerpos proteicos en la época de sequía que en la de lluvia. Esto es consistente con los datos de electroforesis, donde las proteínas, consideradas, de reserva disminuyen durante los meses de lluvia. Kozlowski (1997) señala que las proteínas de reserva son más abundantes en las células de parénquima en crecimiento que en las células maduras del mismo tipo celular. Por lo anterior es de esperarse que las ramas chicas deban acumular más proteína por encontrarse cerca de las hojas, esto es debido al reciclaje de las proteínas ocurrido en el periodo de su senescencia. De esta manera se asegura un aporte adecuado de nitrógeno para el siguiente ciclo del árbol.

Es importante señalar que posteriormente se continuará con el estudio para terminar de analizar un ciclo anual completo para *H. brasiletto*, donde se incluyen los fenómenos de floración y fructificación. Se espera que antes de la caída de las hojas del árbol, la cantidad de proteína aumente y se mantenga alta en la temporada de sequía. Después de los fenómenos de floración y fructificación la cantidad de proteína debe disminuir.

## **9. Conclusiones**

1. Se observa de manera general una tendencia a la disminución de la cantidad de proteínas hacia los meses de agosto y septiembre.
2. La parte con menor cantidad de proteínas es el duramen
3. La presencia de las proteínas de 35-38 kDa disminuyen hacia la temporada de lluvia.
4. La mayor presencia de los cuerpos proteicos fue en las células de parénquima radial en las ramitas, medianas, albura y duramen.
5. La mayor presencia de cuerpos proteicos ocurrió en la época de sequía.
6. Las ramitas son los sitios con mayor presencia de cuerpos proteicos con respecto al resto de las ramas estudiadas.

## 10. Bibliografía

1. Adler, K. & K. Müntz. 1983. Origin and development of protein bodies in cotyledons of *Vicia faba*. *Planta* 157:401-410
2. Aerts, R. & R.F. Chapin. 2000. The mineral nutrition of wild plants, revisited: A re-evaluation of processes and patterns. *Advances in Ecological Research* 30:1-67
3. Anónimo. 1994. Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. Instituto Nacional Indigenista. México. Vol. II 1099
4. Chispeels, M.J. 1983. The golgi apparatus mediates the transport of phytohemagglutinin to the protein bodies in bean cotyledons. *Planta* 158:140-151
5. Chispeels, M.J., T.J.V. Higgins & D.S. Csiro. 1982. Assembly of storage protein oligomers in the endoplasmic reticulum and processing of the polypeptides in the protein bodies of developing pea cotyledons. *The Journal of Cell Biology* 93:306-313
6. Chispeels, M.J., T.J.V.S. Craig & D. Spencer. 1982. Role of the endoplasmic reticulum in the synthesis of reserve proteins and the kinetics of their transport to protein bodies pea cotyledons. *The Journal of Cell Biology* 93: 5-14
7. Daves, C. J. 1971. *Biological Techniques in electron microscopy*. Barnes & Noble International Textbook Series. USA. pp 42
8. García, M. E. 1964. Modificaciones al sistema climático de Köppen para adaptarlo a las condiciones de la República Mexicana. Offset Larios. México.
9. Greenwood, J.S., H.M. Stinissen, W.J. Peumans & M.J.Chispeels. 1986. Sambucus nigra agglutinin is located in protein bodies in the phloem parenchyma of the bark. *Planta* 167: 275-278

10. Hao, B. & J. Wu. 1993. Vacuole proteins in parenchyma cells of secondary phloem and xylem of *Dalbergia odorifera*. *Trees* 104-109
11. Harms U. & J.J. Sauter. 1992. Localization of a storage protein in the wood ray parenchyma cells of *Taxodium distichum* (L) L.C. Rich. by immunogold labeling. *Trees* 6: 6-37
12. Heldt, H.W. 1999. *Plant Biochemistry & Molecular Biology*. Oxford University Press. Oxford New York. Chapter 14:310-315
13. Herman, E. M. & B.A. Larkins. 1999. Protein storage bodies and vacuoles. *Plant Cell*. 11: 601-614
14. INEGI. 1981. *Síntesis Geográfica del Estado de Morelos*. Secretaría de Programación y Presupuesto, México, D.F.
15. INEGI. 1983. Cuernavaca. Edafológico. E-14 A-69. 1:250 000.
16. INEGI. 1999. Cuaderno Estadístico Municipal. Tlaquiltenango Estado de Morelos.
17. Kang, S-M. & J.S. Titus. 1980a. Qualitative and quantitative in nitrogenous compounds in senescing leaf and bark tissues of the apple. *Physiologia Plantarum* 50: 285-290
18. Kang, S-M. & J.S. Titus. 1980b. Activity profiles of enzymes involved in glutamine and glutamate metabolism in the apple during autumnal senescence. *Physiologia Plantarum* 50: 291-297
19. Kozlowski, T. & S. Pallardy, 1997. *Physiology of woody plants*. 2a. Edition, Academic Press, USA. pp 189-208

20. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature* 277: 680-685
21. Langheinrich, U & Tischner, R. 1991. Vegetative storage proteins in Poplar induction and characterization of a 32 and a 36 kilodalton polypeptide. *Plant Physiol.* 97: 1017-1025
22. Martínez, L., E. 2001. Compuestos antimicrobianos aislados de las especies *Iostephane heterophylla* (Cav) Benth. (Asteraceae) y *Haematoxylon brasiletto* Karst. (Leguminosae). Tesis de Maestría en Ciencias Químicas. Facultad de Química. UNAM. México.
23. Martínez, M. 1979. Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas. Fondo de Cultura Económica. México. pp 1127
24. Marty, F. 1999. Plant Vacuoles. *The Plant Cell.* 11:587-599.
25. Quintanar, 1999. Características anatómicas y acústicas de la madera de algunas especies de angiospermas. Tesis de Maestría en Ciencias (Biología). Facultad de Ciencias. UNAM. México.
26. Ramírez, R.J.R. 1990. Las Dioscoreas (Dioscoreaceae) del Estado de Morelos. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Biológicas. UAEM. Cuernavaca, Morelos.
27. Raven, P.H., R. F. Evert & S.E. Eichhorn. 1999. *Biology of Plants*. Sixth Edition, Freeman and Company Worth Publishers. New York.

28. Razo, B.D. 2003. Caracterización histoquímica de la albura y el duramen de dos especies de angiospermas: *Haematoxylon brasiletto* Karst y *Lysiloma tergemina* Benth. Tesis de Maestría en Ciencias. Facultad de Ciencias. UNAM. México.
29. Rzendowski, J. 1978. Vegetación de México. Limusa. México. pp 189-203
30. Sauter, J.J. & B. van Cleve. 1989. Micromorphometric determination of organelles and of storage material in wood ray cells –A usefull method for detecting differentiation within a tissue. IAWA bulletin s. n. 10(4):395-403
31. Sauter, J.J. & B. van Cleve. 1990. Biochemical, immunological, and ultrastructural studies of protein storage in poplar (*Populus x canadensis* 'robusta') wood. Planta 183: 92-100
32. Sauter, J.J. & B. van Cleve. 1992. Seasonal variation of amino acids in the xylem sap of "Populus x canadensis" and its relation to protein body mobilization. Trees 7:26-72
33. Sauter, J.J. & S. Wellenkamp. 1988. Protein storing vacuoles in ray cells of willow wood (*Salix caprea* L.) IAWA bulletin s. n. 9(1): 59-65
34. Sauter, J.J. 2000. Photosyntate allocation to the vascular cambium: facts and problems. In: Cell and Molecular Biology of Wood Formation. (Savidge, R.A., Barnett, J.R. & Napier, R) BIOS Scientific Publishers Limited. United Kingdom. pp 71-81
35. Sauter, J.J., B. van Cleve & K. Apel. 1988. Protein bodies in ray cells of *Populus x canadensis* Moench 'robusta'. Planta 173: 31-34
36. Secretaría de Gobernación y del Gobierno del Estado de Morelos. 1988. "Los Municipios de Morelos" Colección: Enciclopedia de los Municipios de México. México, D.F.

37. Stepien, V. & J.J. Sauter. 1994. Ringing induces the accumulation of vegetative storage proteins in poplar bark. *Trees* 9: 88-92
38. Tagliavini, M., P. Millar, M. Quartieri, & B. Marangoni. 1999. Timing of nitrogen uptake affects winter storage and spring remobilization of nitrogen in nectarine (*Prunus persica* var. nectarina) *Trees* 21: 149-153
39. van Cleve, B. & K. Apel. 1993. Induction by nitrogen and low temperature of storage-protein synthesis in poplar trees exposed to long days. *Planta* 189:157-160
40. Viestra, R.D. 1993. Protein Degradation in plants. *Annual Review Plant Physiology. Plant Molecular Biology* 44:385-410
41. Wetzels, S., C. Demmers & J.S. Greenwood. 1989a. Seasonally fluctuating bark proteins are a potential form of nitrogen storage in three temperate hardwoods. *Planta* 178: 275-281
42. Wetzels, S. & J.S. Greenwood. 1989b. Spherical organelles, analogous to seed protein bodies, fructuate seasonally in parenchymatous cells of hardwoods. *Canadian Journal Botany* 67: 3439-3445
43. Wetzels, S. & J.S. Greenwood. 1991. A survey of seasonal bark proteins in eight temperate hardwoods. *Trees* 5: 153-157
44. Wu, J. & B. Hao. 1991. Vacuole proteins in the secondary phloem parenchyma cells of three Meliaceae species. *IAWA bulletin n. s.* 12(1): 51-56



# 11. Anexo

## 1. Colorantes

Rojo Ponceau.

Disolver 0.17g de ácido periódico en 37 mL de DDI H<sub>2</sub>O y ajustar el pH a 1.5. Añadir 0.5 g de Ponceau 2R.

Azul de Coomassie.

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

## 2. Pepsina

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

## 3. Gel de poliacrilamida.

Se prepara un gel al 12% (gel resolutivo) y otro al 4% (gel concentrador).

Preparación de la solución monomérica.

Porcentaje del gel	DDI H <sub>2</sub> O (mL)	Acrilamida/Bis 30% (mL)	*Buffer del gel (mL)	10% p/v SDS (mL)
4 %	6.1	1.3	2.5	0.1
12 %	3.4	4.0	2.5	0.1

\*Buffer del gel resolutivo 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8

\*Buffer del gel concentrador 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8

Por cada 10 mL de solución monomérica se agregó:

Gel resolutivo: 50 µL 10% APS y 5 µL de TEMED

Gel concentrador: 50 µL 10% APS y 10 µL TEMED

Para preparar los geles se mezclan las soluciones como lo indica el cuadro anterior. Primero se hace el gel resolutive y se deja hasta que polimerice, posteriormente se hace el gel concentrador y se coloca el peine para la formación de los pozos para las muestras.

#### 4. Abreviaturas

APS	.....	persulfato de sodio
BSA	.....	albúmina sérica bovina
d.a.p	.....	diámetro al pecho
DDI	.....	agua desionizada
DOC	.....	Deoxicolato de sodio
<i>g</i>	.....	gravedad
<i>g</i>	.....	gramos
kDa	.....	kilodaltones
nm	.....	nanómetros
PMSF	.....	fluoruro de fenilmetilsulfonil
PVPP	.....	polivinilpolipirrolidona
SDS	.....	dodecil sulfato de sodio
TCA	.....	ácido tricloroacético
TEMED	.....	N,N',N',-tetrametilendiamina
$\beta$ -ME	.....	$\beta$ -mercaptoetanol
$\mu$ g	.....	microgramos
$\mu$ L	.....	microlitros
$\mu$ m	.....	micrómetros