

**UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES
DE CHIAPAS**

INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

TESIS

**INTERACCIONES QUÍMICAS DE *Annona purpurea* Moc. &
Sessé ex Dunal CON HONGOS FITOPATÓGENOS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

**Doctora en Ciencias en Biodiversidad y
Conservación de Ecosistema Tropicales**

PRESENTA

KARINA ANTONIA TOLEDO GONZÁLEZ



Tuxtla Gutiérrez, Chiapas

Noviembre, 2024

**UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES
DE CHIAPAS**

INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

TESIS

**INTERACCIONES QUÍMICAS DE *Annona purpurea* Moc. &
Sessé ex Dunal CON HONGOS FITOPATÓGENOS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

**Doctora en Ciencias en Biodiversidad y
Conservación de Ecosistema Tropicales**

PRESENTA

KARINA ANTONIA TOLEDO GONZÁLEZ

DIRECTORA

DRA. ALMA ROSA GONZALEZ ESQUINCA

Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas

ASESORES

DRA. CHRISTIAN ANABI RILEY SALDAÑA
UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES DE CHIAPAS

DR. RODOLFO SALAS LIZANA
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Tuxtla Gutiérrez, Chiapas.

Noviembre de 2024





UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES DE CHIAPAS

AUTÓNOMA

Tuxtla Gutiérrez, Chiapas a 17 de octubre de 2024

Oficio No. SA/DIP/0721/2024


Asunto: Autorización de Impresión de Tesis

C. Karina Antonia Toledo González
CVU: 580453
Candidata al Grado de Doctora en Ciencias en Biodiversidad y
Conservación de Ecosistemas Tropicales
Instituto de Ciencias Biológicas
UNICACH
Presente

Con fundamento en la opinión favorable emitida por escrito por la Comisión Revisora que analizó el trabajo terminal presentado por usted, denominado *Interacciones químicas de Annona purpurea Moc. & Sessé ex Dunal con hongos fitopatógenos* cuya Directora de tesis es la Dra. Alma Rosa González Esquinca (CVU: 209974) quien avala el cumplimiento de los criterios metodológicos y de contenido; esta Dirección a mi cargo autoriza la impresión del documento en cita, para la defensa oral del mismo, en el examen que habrá de sustentar para obtener el Grado de Doctora en Ciencias en Biodiversidad y Conservación de Ecosistemas Tropicales.

Es imprescindible observar las características normativas que debe guardar el documento impreso, así como realizar la entrega en esta Dirección de un ejemplar empastado.

Atentamente
"Por la Cultura de mi Raza"


Dra. Carolina Orantes García
Directora



C.c.p. Dra. Alma Gabriela Verdugo Valdez, Directora del Instituto de Ciencias Biológicas, UNICACH. Para su conocimiento.
Dr. Miguel Ángel Peralta Meixueiro, Coordinador del Posgrado, Instituto de Ciencias Biológicas, UNICACH. Para su conocimiento
Archivo/minutario.

RJAG/COG/hvb/igp/gtr

2024 Año de Felipe Carrillo Puerto
BENEMÉRITO DEL PROLETARIADO,
REVOLUCIONARIO Y DEFENSOR DEL MAYAB.



Secretaría Académica
Dirección de Investigación y Posgrado
Libramiento Norte Poniente No. 1150
Colonia Lajas Maciel C.P. 29039
Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México
Tel:(961)6170440 EXT.4360
investigacionyposgrado@unicach.mx

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Al Posgrado de Ciencias en Biodiversidad y Conservación de Ecosistemas Tropicales (UNICACH) y al Laboratorio de Fisiología y Química Vegetal de la UNICACH por permitirme realizar este posgrado.

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT-México) por la beca otorgada durante el periodo 2018-2022.

Al Instituto de Ciencia, Tecnología e Innovación (ICTI), por otorgarme la beca para los gastos de titulación.

A la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas que me ha visto crecer profesionalmente.

A mi Comité Tutorial: la Dra. Alma Rosa González Esquinca, la Dra. Christian Anabí Riley Saldaña y el Dr. Rodolfo Salas Lizana, que me apoyaron en todo momento, con un trato humano y solidario, compartiendome sus conocimientos y transmitiendo ese amor por la investigación y docencia, muchas gracias.

A mis sinodales: la Dra. María del Rocio Cruz Ortega, la Dra. Alicia Enriqueta Brechú Franco, la Dra. Alma Gabriela Verdugo Valdez, la Dra. Marisol Castro Moreno y el Dr. Rodolfo Salas Lizana por enriquecer aún más la tesis con sus comentarios y observaciones.

AGRADECIMIENTOS A TITULO PERSONAL

Agradezo a la Dra. Alma Rosa González Esquinca por la paciencia, cariño, comprensión y tiempo, he aprendido mucho de usted en todo este tiempo, muchas gracias.

A la Dra. Christian Anabí Riley Saldaña por transmitirme sus conocimientos, sus revisiones y el tiempo dedicado durante mi estancia, muchas gracias.

Al Dr. Rodolfo Salas Lizana por la dedicación, comprensión y apoyo, por impulsarme a ser mejor profesionista y por sus valiosos consejos desde el inicio de este camino, muchas gracias.

Al Dr. Iván de la Cruz Chacón porque a pesar de las muchas ocupaciones y sin ser parte de mi Comité se tomo el tiempo para transmitirme sus conocimientos, muchas gracias por su paciencia y cariño.

A la Dra. María del Rocio Cruz Ortega y la Dra. Alicia Enriqueta Brechú Franco que con sus comentarios y observaciones en mi Candidatura fortalecieron mi amor por la investigación, muchas gracias.

A la Dra. Claudia Azucena Durán Ruiz y la Mtra. Cecilia Guadalupe Hernández Tondopó por apoyarme y explicarme cosas que fueron nuevas para mí desde mi primer día en el laboratorio, muchas gracias.

A la Dra. Marisol Castro Moreno y el Dr. Wilfredo A. Matamoros Ortega porque a pesar de las muchas ocupaciones y sin ser parte de mi Comité se tomo el tiempo para compartirme sus conocimientos en sus respectivos campos de estudios, muchas gracias.

A la Dra. Lorena Mercedes Luna Cazáres por sus consejos y compartir experiencias con calidez y cariño.

Al Dr. Rodolfo Cabrera Hernández por sus consejos y apoyo en el Programa R, revisiones y asesorías, gracias por su paciencia.

Al Lic. Moisés Ismael Toledo González e Iván Hernández González que fueron mi apoyo técnico en proceso de esterilizaciones y algunas actividades en la Cámara Bioclimática.

A Maricela González Gómez y Vanesa Hernández González que me apoyaron con actividades logísticas del proceso de esterilización y limpieza de semillas.

A mis compañeros del Laboratorio de Fisiología y Química Vegetal, que en tiempo de pandemia nos animamos a llegar a avanzar, así como los que durante mi estancia en el Laboratorio estaban, llegaban y los que se iban, fueron momentos bonitos de risas, conversaciones, experiencias y turnos para utilizar el equipo y material de laboratorio.

A los amigos que he hecho antes, durante y después de mi estancia en el Laboratorio que me han compartido cariño y experiencias para crecer como persona y profesionalmente. Especialmente a María Yulet Bustamante Rodríguez (†) que además de ser una amiga fue como una hermana en mi vida, gracias por tu amor y consejos, estarás en mi corazón siempre y seguiré preparandome por las dos.

A mi familia, mamá, papá, hermanos, algunos tíos y suegros, que decía para que estudiar más, pero a pesar de no entender respetaban mis decisiones.

A mi mamá, mi hermana y mis suegros que en situaciones extraordinarias han cuidado desde pequeño a mi Gael, algunas horas de cuidado marcan la diferencia para avanzar poco a poco, muchas gracias.

A mis sobrinos, Paola, Vanesa e Iván, que están orgullosos de hasta donde he llegado y me han dado ánimos para concluir esta etapa.

A mi esposo que ha soportado mis momentos de estrés, al inicio, durante y al finalizar este proyecto, por sus consejos y regaños que me han permitido continuar y concluir cuando creí no lograrlo. Gracias por no dejarme desistir de este sueño hecho realidad y gracias por tu apoyo como investigador Dr. Rodolfo Cabrera Hernández.

A mi hijo, Gael Itzaé Cabrera Toledo, mi niño hermoso que desde que estaba en mi vientre estaba con la adrenalina de la Candidatura, por soportar de mi ausencia, por su cariño infinito y por permitirme ser la mujer y profesionista que ahora soy. Muchas gracias por todo y sobretodo acompañarme en los experimentos en la pandemia COVID-19 y ser discreto.

DEDICATORIAS

A Gael Itzaé Cabrera Toledo

por permitirme ser la mujer y
profesionista que ahora soy e
impulsarme a mejorar día a día

A Rodolfo Cabrera Hernández

por su amor, paciencia y consejos
en estos años

A Maria Elena González Gómez e

Ismael Toledo Esquipula

por inculcarme valores y brindarme
su cariño y amor

A Moises Ismael Toledo González

y Maricela González Gómez

por brindarme su cariño y amor

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
I. INTRODUCCION.....	3
II. ANTECEDENTES.....	6
2.1 Metabolitos constitutivos.....	6
2.2 Metabolitos inducidos.....	6
2.3 Biosíntesis de alcaloides, las rutas de las Anonáceas	8
III. ESPECIES ESTUDIADAS.....	14
3.1 <i>Annona purpurea</i>	14
3.2 <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	18
3.3 <i>Curvularia lunata</i>	22
3.4 <i>Rhizopus stolonifer</i>	25
IV. HIPOTESIS Y OBJETIVOS.....	30
4.1 Hipótesis.....	30
4.2 Objetivo general.....	30
4.3 Objetivos particulares.....	30
V. METODOS	31
5.1 Obtención de plántulas.....	31
5.2 Inducción fúngica	33
5.3 Perfiles de alcaloides	34
5.4 Análisis estadísticos	36
VI. RESULTADOS.....	37
6.1 Perfil de alcaloides en plántulas de <i>Annona purpurea</i>	37
6.2 Alcaloides inducidos por <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> en plántulas de <i>Annona purpurea</i>	46
6.3 Alcaloides inducidos por <i>Curvularia lunata</i> en plántulas de <i>Annona purpurea</i>	49
6.4 Alcaloides inducidos por <i>Rhizopus stolonifer</i> en plántulas de <i>Annona purpurea</i>	52
6.5 Artículo publicado: Alcaloides inducidos por <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> en plántulas de <i>Annona purpurea</i>	55
VII. DISCUSIÓN.....	63
VIII. CONCLUSION.....	71
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	72

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Alcaloides de anonáceas en <i>Annona purpurea</i>	16
Cuadro 2. Riqueza de alcaloides en tallos, hojas y raíces de plántulas sanas de <i>Annona purpurea</i>	38
Cuadro 3. Comparación entre los índices de diversidad para alcaloides totales detectados en raíces, tallos y hojas de plántulas sanas de <i>Annona purpurea</i>	43
Cuadro 4. Presencia órgano-específica de alcaloides constitutivos-en raíces, tallos y hojas en dos etapas de desarrollo de <i>Annona purpurea</i>	43
Cuadro 5. Índices de diversidad de alcaloides constitutivos en raíces, tallos y hojas de plántulas sanas de <i>Annona purpurea</i>	44
Cuadro 6. Presencia de alcaloides constitutivos en las raíces, tallos y hojas de plántulas de <i>Annona purpurea</i> testigo con los diferentes experimentos.....	44
Cuadro 7. Alcaloides inducidos por <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> en plántulas de <i>Annona purpurea</i>	46
Cuadro 8. Comparación entre índices de diversidad de alcaloides inducidos en raíces, tallos y hojas de plántulas de <i>Annona purpurea</i> infectadas con <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	47
Cuadro 9. Valores de similitud entre los grupos obtenidos en el PERMANOVA pareado.....	48
Cuadro 10. Alcaloides inducidos por <i>Curvularia lunata</i> en plántulas de <i>Annona purpurea</i>	49
Cuadro 11. Comparación entre índices de diversidad de alcaloides inducidos en raíces, tallos y hojas de plántulas de <i>Annona purpurea</i> infectadas con <i>Curvularia lunata</i>	50
Cuadro 12. Valores de similitud entre los grupos obtenidos en el PERMANOVA pareado.....	51
Cuadro 13. Alcaloides inducidos por <i>Rhizopus stolonifer</i> en plántulas de <i>Annona purpurea</i>	52

Cuadro 14. Comparación entre índices de diversidad de alcaloides inducidos en raíces, tallos y hojas de plántulas de <i>Annona purpurea</i> infectadas con <i>Rhizopus stolonifer</i>	53
Cuadro 15. Valores de similitud entre los grupos obtenidos en el PERMANOVA pareado.....	54

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Modelo esquemático de la síntesis y tráfico celular de alcaloides en plantas.....	11
Figura 2. Compartimentalización celular de la ruta de biosíntesis de la vinblastina en <i>Catharanthus roseus</i>	12
Figura 3. <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	18
Figura 4. Ciclo de vida de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	20
Figura 5. <i>Curvularia lunata</i>	22
Figura 6. <i>Rhizopus stolonifer</i>	26
Figura 7. Procesamiento de las semillas de <i>Annona purpurea</i>	33
Figura 8. Análisis de Componentes Principales de los alcaloides presentes en los órganos de plántulas no inoculadas e infectadas con <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> ..	48
Figura 9. Análisis de Componentes Principales de los alcaloides presentes en los órganos de plántulas no inoculadas e infectadas con <i>Curvularia lunata</i>	51
Figura 10. Análisis de Componentes Principales de los alcaloides presentes en los órganos de plántulas no inoculadas e infectadas con <i>Rhizopus stolonifer</i>	54
Figura 11. Respuesta de inducción en raíces, tallos y hojas de <i>Annona purpurea</i>	54

RESUMEN

Annona purpurea es una especie de la familia Annonaceae que biosintetiza más de 50 alcaloides. Algunos alcaloides realizan funciones de defensa y pueden agruparse desde una perspectiva ecológica como metabolitos constitutivos e inducidos. Estos últimos se expresan en respuesta a cambios en las condiciones abióticas o bióticas que desencadenan estrés en una planta. Sin embargo, se han realizado pocos estudios sistemáticos sobre los perfiles de metabolitos constitutivos y sus respuestas al estrés biótico. En esta tesis se analizó la respuesta de plántulas de *A. purpurea* a la infección con tres hongos fitopatógenos: *Colletotrichum gloeosporioides*, *Curvularia lunata* y *Rhizopus stolonifer*. Para este estudio, se analizaron los alcaloides de extractos metanólicos de hojas, tallos y raíces de plántulas testigo e inoculadas por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas. Con la finalidad de conocer la riqueza y abundancia de los alcaloides entre los tratamientos y entre los órganos, se utilizaron los índices ecológicos de Margalef, Shannon y Simpson. También se realizó un Análisis de Componentes Principales (PCA), PERMANOVA y PERMANOVA pareada. En este documento se encuentra información sobre: I) Obtención de plántulas, II) Perfiles de alcaloides, III) Alcaloides inducidos por *Colletotrichum gloeosporioides* (Alkaloidal variation in seedlings of *Annona purpurea* Moc. & Sesse ex Dunal infected with *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. and Sacc., IV) Alcaloides inducidos por *Curvularia lunata*, V) Alcaloides inducidos por *Rhizopus stolonifer* y VI) Especificidad de la respuesta a la infección fúngica. Los índices de diversidad permitieron observar las diferencias entre los tratamientos y las especies. Se encontraron respuestas inducidas con todos los hongos, siendo *A. purpurea* más sensible a *R. stolonifer*. En todos los casos la mayor diversidad de alcaloides se encontró en las raíces.

Palabras claves: Alcaloides, metabolitos secundarios inducidos, *Annona purpurea*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Curvularia lunata*, *Rhizopus stolonifer*.

ABSTRACT

Annona purpurea is a species of the Annonaceae family that biosynthesizes more than 50 alkaloids. Some alkaloids perform defense functions and can be grouped from an ecological perspective as constitutive and induced metabolites. The latter are expressed in response to changes in abiotic or biotic conditions that trigger stress in a plant. However, few systematic studies have been conducted on constitutive metabolite profiles and their responses to biotic stress. In this thesis, the response of *A. purpurea* seedlings to infection with three fungal phytopathogens was analyzed: *Colletotrichum gloeosporioides*, *Curvularia lunata* and *Rhizopus stolonifer*. For this study, the alkaloids of methanolic extracts of leaves, stems and roots of control and inoculated seedlings were analyzed by Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry. To know the richness and abundance of alkaloids between treatments and between organs, the ecological indices Margalef, Shannon and Simpson were used. Principal Component Analysis (PCA), PERMANOVA and paired PERMANOVA were also performed. This dissertation contains the following information: I) Obtaining seedlings, II) Alkaloid profiles, III) Alkaloids induced by *Colletotrichum gloeosporioides* (Alkaloidal variation in seedlings of *Annona purpurea* Moc. & Sesse ex Dunal infected with *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc., IV) Alkaloids induced by *Curvularia lunata*, V) Alkaloids induced by *Rhizopus stolonifer* and VI) Specificity of the response to fungal infection. The diversity indices allowed us to observe the differences between the treatments and the species. Induced responses were found with all fungi, with *A. purpurea* being more sensitive to *R. stolonifer*. In all cases the greatest diversity of alkaloids was found in the roots.

Keywords: Alkaloids, induced secondary metabolites, *Annona purpurea*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Curvularia lunata*, *Rhizopus stolonifer*.

I. INTRODUCCION

La familia Annonaceae es una integrante de las Angiospermas antiguas, de distribución pantropical. La familia se subdivide en cuatro subfamilias: Ambavioideae, Anaxagoreideae, Annonoideae y Malmeoideae. Se encuentra constituida por 128 géneros y 2,106 especies (Chatrou et al. 2012). Los cuatro géneros más estudiados de esta familia, debido a su importancia económica, por su calidad frutícola y potencial farmacéutico, son *Annona*, *Rollinia*, *Uvaria* y *Asimina* (Vidal-Hernández et al. 2014).

Una característica importante de la familia Annonaceae es la presencia de numerosos Metabolitos Secundarios (MS) que le confieren propiedades farmacológicas, como las citotóxicas (Sonnet y Jacobson, 1971; Chávez y Mata, 1998, 1999; Chang et al. 1998, 1998b; Schlie-Guzmán et al. 2009; Hernández-Fuentes et al. 2019; Neske et al. 2020), insecticidas, antimicrobianas y antifúngicas (De-Q-Paulo et al. 1992; Cepleanu et al. 1993; Cavé et al. 1997), dopaminérgicas (Rejón-Orantes et al. 2011) y antimaláricas (Cortes et al. 2014), entre otras. El género *Annona* es rico en MS que se encuentran en raíces, tallos, hojas y semillas. Entre los MS más abundantes están las “acetogeninas de anonáceas” (ACG), los alcaloides, los terpenos y los flavonoides.

Una de las especies de interés de esta familia desde el punto de vista químico es *Annona purpurea* Moc. & Sessé ex Dunal, ya que presenta acetogeninas, como la escuamocina, aislada de semillas con actividades citotóxicas e insecticidas (Chávez & Mata, 1998) y alcaloides bencilisoquinolínicos, como la reticulina aislada de tallos y raíces (Chang et al. 2000; De-la-Cruz-Chacón et al. 2019), o indólicos como la annomontina de tallos y raíces (Rejón-Orantes et al. 2011; De-la-Cruz-Chacón et al. 2019). De este último alcaloide han sido evaluadas sus propiedades ansiolíticas (Rejón-Orantes et al. 2011) y antifúngicas (De-la-Cruz-Chacón et al. 2019). Hasta el momento se conocen 49 alcaloides de *A. purpurea* (Sonnet y Jacobson, 1971; Chang et al. 1998; Chang et al. 1998b; Chang et al. 2000; Rejón-Orantes et al. 2011; De-la-Cruz-Chacón et al. 2019; Díaz-Godínez et al. 2020).

La distribución espacial y temporal de los MS, puede estar relacionada con el desarrollo fenológico y/o con la interacción con el ambiente (Castro et al. 2013; De-la-Cruz-Chacón et al. 2019). Los alcaloides, al igual que otros MS, pueden clasificarse como Constitutivos (MSC) o Inducidos (MSI) (Bennett y Wallsgrove, 1994; Bostock et al., 2001; Anaya, 2004). Los primeros se refieren a su presencia *per se*, ya sea que puedan actuar o no

como defensas, que se biosintetizan normalmente sin que su presencia se deba a estímulos bióticos o abióticos. Los MSI son los que se producen o incrementan después de algún tipo de cambio ambiental (por ejemplo, estrés biótico o abiótico) (Freeman y Beattie, 2008; Granados-Sánchez et al. 2008, Montes-Belmont, 2009; Laredo-Alcalá et al. 2017). Por lo que, la inducción de los metabolitos secundarios por estrés puede dar origen a nuevos metabolitos o el incremento en la abundancia de los ya existentes, en su caso, metabolitos constitutivos.

La inducción de defensas químicas en las plantas provocadas por el ataque de fitopatógenos está documentada en varias especies (Riley Saldaña et al. 2022; Toledo-González et al. 2023; Zeiss et al. 2019; Hu et al. 2018). En *Annona muricata* Riley-Saldaña (2019) demostró la inducción de los alcaloides anonaina, reticulina, nornuciferina, asimilobina y coreximina por los hongos fitopatógenos *Colletotrichum gloeosporioides* y *Rhizopus stolonifer* en etapas del desarrollo temprano.

En *Annona purpurea* se ha reportado la presencia de alcaloides derivados a partir de tres precursores: 1) triptófano (Indol, 2-metilamino-3 fenil), 2) tirosina (90% de su perfil de metabolitos) y 3) de la unión del indol con 2-aminopirimidina (anomontina) (De la Cruz-Chacón et al. 2019). Por otra parte, es escaso el conocimiento sobre el mecanismo químico de defensa constitutivo de las plantas o si éste se puede inducir o modular bajo el estrés provocado por el ataque de hongos fitopatógenos en etapas del desarrollo temprano. Además, las respuestas de esta planta a la interacción con fitopatógenos pueden ser metabólicamente variable y asociarse preferentemente a alguna ruta biosintética. Es decir, la respuesta puede ser diferencialmente selectiva, tal como se observa en la inducción de alcaloides con *C. gloeosporioides* y *R. stolonifer* en *A. muricata* (Riley-Saldaña, 2019). Para *A. purpurea* no está documentada esta interacción. Por ello, se cuestionó **¿Cómo responde el metabolismo alcaloidal de *Annona purpurea* ante el estrés producido por diferentes hongos fitopatógenos?** Para responder y considerar que las plantas responden al estrés biótico alterando su metabolismo secundario se plantearon las siguientes hipótesis: 1) La infección de plántulas de *Annona purpurea* con los hongos *Colletotrichum gloeosporioides*, *Curvularia lunata* y *Rhizopus stolonifer* induce cambios en el perfil de alcaloides; 2) La modulación del perfil de alcaloides es sensible a la especie de hongo fitopatógeno y 3) Las

hojas y las raíces son los órganos con mayor diversidad de alcaloides, debido a la importancia que tienen estas estructuras para la supervivencia de la planta.

Este estudio documenta que la infección de plántulas de *Annona purpurea* con los hongos *Colletotrichum gloeosporioides*, *Curvularia lunata* y *Rhizopus stolonifer* produjo cambios en el perfil constitutivo de alcaloides, sin inducción de nuevos alcaloides, los cuales pueden indicar diferencias entre las especies de fitopatógenos, posiblemente al grado de virulencia de cada una, siendo *R. stolonifer* el que produjo mayores cambios en el perfil alcaloidal. Las raíces fueron los órganos con mayor riqueza y diversidad de alcaloides, seguidas de las hojas.

II. ANTECEDENTES

Ante el ataque de hongos fitopatógenos, las plantas inducen mecanismos de defensa químicos, que detienen, aminoran o contrarrestan la infección (Madriz, 2002). Los mecanismos de defensa se clasifican como de resistencia constitutiva o inducida (Freeman & Beattie, 2008; Granados-Sánchez et al. 2008, Montes-Belmont, 2009; Laredo-Alcalá et al. 2017).

2.1. Metabolitos constitutivos

Los compuestos constitutivos, fitoanticipinas o inhibitinas son preformados en plantas antes del ataque de un patógeno o una infección; es decir, se forman en plantas sanas (Tiku, 2020), incluso pueden estar como precursores inactivos, en forma de glucósidos, almacenados en tejidos sanos y se activan sólo en respuesta al daño tisular. Aun así, se consideran metabolitos constitutivos (Morrissey y Osbourn, 1999; Tiku, 2020).

Los alcaloides presentes en las plantas son uno de los metabolitos secundarios importantes que desempeñan un papel crucial en la defensa (Jogaiah et al. 2019). Los alcaloides de bencilisoquinolina y pirrolizidina son un enorme grupo producidos en grandes cantidades en plantas como en otros seres vivos. Su estructura química se deriva de diversos precursores como aminoácidos (triptófano, lisina, tirosina, ácidos antranílicos y ácido nicotínico). Pocos grupos alcaloides también se derivan de la reacción de aminación de policétidos, shikimatos e isoprenoides. Los alcaloides bencilisoquinolina, queleritrina, y sanguinarina son importantes por sus propiedades antibacterianas y antifúngicas. Además, estos tres alcaloides tienen naturaleza constitutiva y, por lo tanto, se consideran fitoanticipinas (Tiku, 2020).

2.2 Metabolitos inducidos

Los compuestos inducidos, también llamados fitoalexinas, son los metabolitos secundarios que se biosintetizan de *novo* o cuando se incrementa la abundancia de los preexistentes, activándose como respuesta al ataque de patógenos. Para ello, la planta debe llevar a cabo un reconocimiento específico del patógeno, basado en los sistemas gen por gen (Madriz, 2002). Los sistemas gen-gen explican que por cada gen de resistencia en el hospedero existe un gen de virulencia en el patógeno (Glazebrook, 2005; Montes-Belmont, 2009). Después del

reconocimiento específico se produce una reacción hipersensible, la cual consiste en la acumulación de compuestos dañinos, que simultáneamente matan al patógeno y a las células hospedantes (Gómez y Reis, 2011; Thakur y Sohal, 2013). En esta respuesta pueden intervenir las especies reactivas de oxígeno (ERO) formando una “explosión oxidativa”, donde participan el superóxido (O_2^-), el radical hidróxilo (OH) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Esta “explosión” tiene una función tóxica sobre los patógenos o sobre las células donde se producen (Benezer-Benezer et al., 2008). Dicho de otra manera, la identificación del patógeno generalmente ocurre cuando el producto del gen de avirulencia (Avr), secretado por el patógeno, interactúa directa o indirectamente con el producto del gen de resistencia vegetal (R). Cuando ambos genes están presentes (Avr-R), se produce el reconocimiento que conducirá a una resistencia activa de la planta y avirulencia del patógeno. Por el contrario, si alguno de los dos genes se encuentra ausente, no hay reconocimiento y el resultado será una reacción incompatible y desarrollo de la enfermedad (Madriz, 2002; Thakur y Sohal, 2013). La presencia de fitoalexinas se ha documentado en algunas especies. En *Medicago truncatula*, se han estudiado los cambios en el perfil de acumulación de flavonoides en las hojas durante la infección con el hongo patógeno *Phoma medicaginis*, identificando cuatro nuevos glucósidos de flavona acilados y un aumento en la concentración de medicarpina cinco días después de la infección (Jasiński et al. 2009). De igual manera, en el altramuz de hoja estrecha (*Lupinus angustifolius*) se estudió la respuesta metabólica diferencial en las hojas a la infección por *Colletotrichum lupini* (Muth et al. 2009), donde se detectaron niveles más altos de isoflavonas preniladas, especialmente las fitoalexinas luteona (7000 %) y wighteona, y sus diversos glicoconjugados. Asimismo, en *Annona muricata* se estudió la respuesta a dos hongos fitopatógenos: *Colletotrichum gloeosporioides* y *Rhizopus stolonifer*, encontrando que *C. gloeosporioides* provocó aumentos variables en la producción de anonaína, reticulina y nornuciferina (10-1200%); mientras que *R. stolonifer* sólo estimuló el aumento de nornuciferina y anonaína (10%) en los tallos y hojas (Riley-Saldaña et al. 2022). Finalmente, en *Annona purpurea* la infección con el hongo *Colletotrichum gloeosporioides* modificó el perfil constitutivo de los alcaloides al inducir un aumento de lirinidina (61%) y papaverina (403%) en las raíces y de N, N-dimetil, 2-(metilamino)3-fenilindol (143%) en las hojas (Toledo-González et al. 2023).

2.3 Biosíntesis de alcaloides, las rutas en las Anonáceas

La biosíntesis de metabolitos secundarios particulares o de grupos metabólicos completos está frecuentemente restringida taxonómicamente (Wink, 2004). Por esta razón, ciertas clases de metabolitos secundarios se han utilizado como caracteres distintivos para la investigación bioquímica de familias de plantas específicas. Por ejemplo, alcaloides de quinolizidina en Fabaceae (Wink, 1994); alcaloides de tropano y esteroides en Solanaceae (Itkin et al. 2011); alcaloides iridoides en Lamiaceae (vonPoser et al. 1995); y “acetogeninas de anonáceas” en Annonaceae. La gran variedad de metabolitos secundarios es consecuencia de la biodiversidad y rápida evolución de vías metabólicas especializadas (Moghe y Last, 2015). Los estudios realizados durante las últimas dos décadas revelaron que diversas vías metabólicas especializadas han resultado de la incorporación de enzimas metabólicas primarias (Moghe y Last, 2015); por lo que una misma enzima puede catalizar múltiples reacciones y biosintetizar múltiples productos (Weng et al. 2012). El complejo enzimático del citocromo P450 involucra una amplia familia de genes con una diversidad de funciones en la planta, ya que participan en diversos procesos metabólicos (González-Mendoza, 2007; Li et al. 2016). Este citocromo P450s y las UDP- glicosiltransferasas en genomas vegetales pueden producir modificaciones estructurales y químicas casi sin límites (Li et al. 2016). Dentro de las ventajas evolutivas que presentan los metabolitos secundarios, se sabe que pueden ayudar en las fluctuaciones provocadas por cambios abióticos y bióticos que experimentan las plantas (Li et al. 2016).

Las vías biosintéticas fundamentales de los metabolitos se conservan en la mayoría de las plantas (Jan et al. 2021). Frecuentemente se producen en concentraciones bajas y pueden estar restringidos a una especie vegetal o distribuidos en grupos taxonómicos más amplios o específicos (Gani et al. 2021). Teniendo en cuenta sus funciones ecológicas y valores económicos, los especialistas en plantas llevan mucho tiempo interesados en explicar las rutas biosintéticas en cuanto a las enzimas, los genes estructurales y los reguladores asociados a ellos (Gani et al. 2021). La maquinaria biosintética de los metabolitos a menudo está compartimentada dentro de la célula o en diferentes células, lo que implica la participación del tráfico inter o intracelular (Verma et al. 2012; Yu y De Luca 2013). Es decir, los metabolitos pueden producirse en órganos-específicos y almacenarse en otros diferentes de donde son biosintetizados (Sepúlveda-Jímenez et al. 2003). Por ejemplo, Brechú-Franco

et al. (2016) encontraron que la localización *in situ* de alcaloides y acetogeninas de *Annona macrophyllata* Donn. Sm. durante la germinación de las semillas ocurre en las células conocidas como idioblastos, donde se almacenan tanto acetogeninas, como alcaloides.

Los alcaloides son compuestos nitrogenados que generalmente se biosintetizan a partir de aminoácidos, tales como triptófano, tirosina, fenilalanina, lisina, arginina y ornitina; solos o combinados con terpenoides (Facchini, 2001). También pueden derivar de purinas y del acetato de los policétidos (Facchini, 2001). Los alcaloides, según el aminoácido precursor, se pueden dividir en los siguientes grupos: alcaloides isoquinolínicos, alcaloides quinolizidinicos, alcaloides pirrolizidinicos, alcaloides tropánicos y alcaloides indólicos (Facchini, 2001).

En plantas de la familia Annonaceae se ha documentado la presencia de alcaloides bencilisoquinolínicos e indólicos, cuyas rutas no están del todo dilucidadas, por ello se describirán estas rutas hasta el alcaloide precursor de la diversificación.

La biosíntesis de alcaloides **isoquinolínicos** (IQA) (Figura 1) se produce mediante la descarboxilación de tirosina o DOPA para producir dopamina, que junto con el 4-hidroxifenilacetaldehído, un aldehído derivado de la tirosina, se convierte en reticulina, un precursor importante de varios alcaloides bencilisoquinolínicos (Diamond y Desgagné-Penix, 2016). Se ha documentado que en *Dactylicapnos scandens*, la biosíntesis comienza con la conversión de L-tirosina en dopamina y 4- hidroxifenilacetaldehído, que luego se condensan en (S)-norcoclaurina por (S)-norcoclaurina sintasa (NCS) 5-7 metiltransferasas [(S)-norcoclaurina 6-O-metiltransferasa (6OMT), (S)-coclaurina-N-metiltransferasa (CNMT) y (S)-3'-hidroxi-N-metilcoclaurina-4'-O-metiltransferasa (4'OMT)] y una hidroxilasa [(S)-N-metilcoclaurina 3'-hidroxilasa (NMCH)] participan en la catalización de la conversión de (S)-norcoclaurina a (S)-reticulina, que ha sido considerada como un intermediario común de muchos IQA. En la diversificación de IQA, muchos pasos involucran una reacción de oxidación, catalizada por el citocromo P450s, y una O-metilación catalizada por la familia OMT, que participa en la síntesis de productos intermedios (S)-reticulina, y transformaciones posteriores de múltiples pasos para formar diferentes productos finales. El P450 juega un papel clave en las reacciones oxidativas, incluida la formación de puentes metilendioxi, el acoplamiento de fenol C - C intramolecular y las reacciones de acoplamiento de fenol C - O intermolecular 15-17. El gen CYP719B1, que codifica para la salutaridina

sintasa en *Papaver somniferum*, cataliza la reacción de acoplamiento de fenol C-C en la biosíntesis de morfina (De-la-Cruz-Chacón et al. (2012); He et al. 2017). Aunque la biosíntesis de IQA como la morfina, sanguinarina y berberina ha sido bien estudiada, la biosíntesis de otros IQA, como isocoridina y sinomenina, aún no se conoce completamente (He et al. 2017).

La complejidad y compartimentalización de las rutas de los alcaloides IQA se señala en la Figura 1, cuyo plano bioquímico fue construido por De-la-Cruz et al. (2012) se fundamenta en estudios de biosíntesis en plantas y/o cultivos celulares de *Argemone mexicana*, *Berberis stolonifera*, *B. beaniana*, *B. canadiensis*, *Coptis japonica*, *Corydalis vaginans*, *Eschscholzia californica*, *Papaver somniferum*, *P. bracteatum*, *Thalictrum flavum*, *T. Tuberosum*, *T. Bulgaricum*, *Tinospora caffra*, *T. Cordifolia* y *Sanguinaria canadiense*.

SaIR = Salutaridina reductasa; SaIAT = Salutaridinol 7-O-acetiltransferasa; COR = codeinona reductasa. RE = Retículo endoplásmico; VSA = Vesícula biosintetizadora de alcaloides. Imagen obtenida de De-la-Cruz-Chacón et al. (2012).

La biosíntesis de alcaloides **indólicos** es sumamente compleja y todavía no se conocen todas las enzimas involucradas, ni los mecanismos que regulan su biosíntesis. Uno de los estudios más completos, por su importancia medicinal, es el correspondiente a la biosíntesis del alcaloide bisindólico vinblastina en *Catharanthus roseus* (Figura 2) (El-Sayed y Verpoorte, 2007). Las enzimas triptófano descarboxilasa (TDC) y estrictosidina sintasa (STR) se localizan en las células epidérmicas de tallos, hojas y botones florales; así como en el protodermo y células corticales que rodean el meristemo apical de la punta de las raíces. Por su parte, las enzimas desacetoxivindolina-4-hidroxilasa (D4H) y acetilvindolina 4-O-acetiltransferasa (DAT) están restringidas a células especializadas, conocidas como laticíferas e idioblastos de hojas, tallos y botones florales (Trejo-Tapia y Rodríguez-Monroy, 2007).

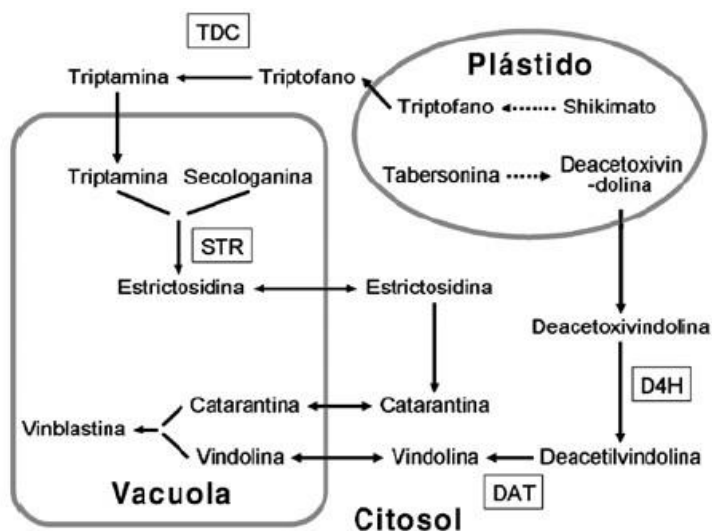


Figura 2. Compartimentalización celular de la ruta de biosíntesis de la vinblastina en *Catharanthus roseus*. TDC: triptófano descarboxilasa, STR: estrictosidina sintasa, D4H deacetoxi-vindolina-4-dioxigenasa, DAT: 4-O-deacetilvindolina-4-O-acetiltransferasa. Imagen de Trejo-Tapia y Rodríguez-Monroy (2007).

La biosíntesis de los alcaloides **monoterpen-indólicos** (AMI) se ha documentado en *C. roseus*. Es extremadamente compleja y requiere de la conjunción de dos vías metabólicas: la vía indólica y la vía terpénica (Meijer et al. 1993, 1993b; De-Luca, 1993). La enzima L-

aminoácido-aromático carboxilasa (EC 4.1.1.28) 1 (nombre común = triptófano descarboxilasa) cataliza la conversión de L-triptofano a L-triptamina, el derivado indólico de los AMIs, y de esta manera deriva triptofano hacia el metabolismo secundario. La triptamina y la secologanina, el precursor monoterpén-glucoiridoide, son condensados para formar estrictosidina, un glucoalcaloide precursor de todos los alcaloides aislados de *C. roseus* (Loyola-Vargas et al. 2004). La enzima que cataliza la condensación de la triptamina y de la secologanina es la 3- α (S)-estricosidina triptaminaliasa (EC 4.3.3.2) (nc = estrictosidina sintasa). Los precursores inmediatos de los AMIs, triptamina y secologanina, requieren a su vez precursores provenientes del metabolismo primario (Loyola-Vargas et al. 2004).

Los alcaloides de *A. purpurea* derivan de dos rutas: la isoquinolinica, en donde se encuentran los bencilisoquinolinicos (ABI), y la indólica. De 23 alcaloides identificados en esta especie sólo uno es indólico y los demás corresponden a los ABI, lo que señala la mayor expresión de esta ruta. La L-tirosina es precursor de los ABI, su biosíntesis puede agruparse en tres intervalos a) la producción del precursor central de todos los ABI, la S-norcoclaurina, desde dos moléculas de L-tirosina, b) la transformación de S-norcoclaurina a S-reticulina, el intermediario principal de diversificación de la ruta y c) las rutas de diversificación que dan origen a los 13 diferentes tipos de ABI (De-la-Cruz- Chacón et al. 2012).

III. ESPECIES ESTUDIADAS

3.1 *Annona purpurea*

Ubicación taxonómica

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliidae

Orden: Magnoliales

Familia: Annonaceae

Género: *Annona*

Especie: *Annona purpurea* Moc. & Sessé ex Dunal

Descripción botánica.

Árbol de 10 m o más, con copas anchas y extendidas, las ramas jóvenes densamente ferrugineas-tomentosas. Hojas deciduas, membranosas, con pedicelos de 3–5 mm de largo, de ovadas a elíptico ovadas, en su mayor parte de 12–30 cm de largo y de 6–14 cm de ancho, ápice acuminado, redondeadas en la base, verdes y glabras por el haz y pálidas a moreno velludo por el envés. Flores extraaxilares, solitarias, subsésiles; sépalos triangular-ovados, acuminados, 1–2 cm de largo, pétalos exteriores valvados, gruesos y rígidos, ovado-lanceolados, cuando mucho de 5 cm de largo y 2 cm de ancho, ferrugíneos-sericeos en el exterior, los pétalos internos imbricados, delgados, elíptico-oblongos, redondeados en el ápice, 2.5 cm de largo, 1.5 cm de ancho. Fruto subgloboso, 10–12 cm de diámetro o de largo, cubierto con un tomento semejante a fieltro y con pelos piramidales puntiagudos muy numerosos. Semillas ovoides, castañas, 3 cm longitud (Standley y Steyermark, 1946).

Distribución

Su distribución es tropical, comprendiendo los países de Belice, Colombia, Costa Rica, Ecuador, El Salvador, Guatemala, Honduras, México, Panamá y Venezuela (Tropicos, 2020). En México se encuentra en los estados de Chiapas, Colima, Jalisco, Michoacán, Oaxaca, Puebla, Quintana Roo, Tabasco, Yucatán y Veracruz (Tropicos, 2020).

Generalidades.

Es una especie nativa de Mesoamérica, se encuentra silvestre o cultivada en huertos familiares, de frutos comestibles, potencial farmacológico (Hernández et al. 2014) y propiedades medicinales de extractos crudos (Luna-Cázares y González-Esquinca, 2015). Las semillas son numerosas, de 2.8 a 3.0 de longitud por 1.4 a 1.8 cm de grosor (Zamora et al. 2000). Presentan latencia (Gómez-Castañeda et al. 2003; Ferreira, 2011), tienen embriones rudimentarios, laminares; la mayoría de la semilla está ocupada por el endospermo y el embrión corresponde aproximadamente a un 1% del volumen de la unidad de propagación sexual (Nikolaeva, 1977). Los embriones están diferenciados en radícula y cotiledones y simplemente necesitan tiempo para crecer y germinar (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006). La latencia es característica de diversos géneros y especies de la familia Annonaceae, donde se ha reportado la presencia de latencia morfológica y morfofisiológica (Baskin y Baskin, 2001). Es comúnmente conocida como sincuya, chincuya, sencuya, sincuyo, cabeza de muerto, soncoya, suncuyo, matacuy (Orellana et al. 2014). En Yucatán se reporta con los nombres mayas “Pox”, “Chacoop” y “Polbox” (Orellana et al. 2014; Stanley y Steyermark, 1946; Morton, 1987). Sinonimias: *Annona involucrata* Baill, *A. manirote* Kunth y *A. prestoei* Hemsli (Tropicos, 2020).

La especie habita en bosques y matorrales húmedos o secos, a menudo en crecimiento secundario (Standley y Steyermark, 1946; Chízmar et al. 2009). Desde los 0 hasta los 1200 msnm; muy rara en altitudes superiores (Standley y Steyermark, 1946; Orellana y Martínez, 2002; Chízmar et al. 2009).

Desde el punto de vista químico, *Annona purpurea* Moc. & Sessé ex Dunal, tiene una gran diversidad de metabolitos secundarios, dentro de los cuales se encuentran fenoles, terpenos, compuestos nitrogenados y acetogeninas de anonáceas. Este trabajo documenta únicamente lo referido a sus alcaloides. Hasta el momento se han aislado 49 alcaloides (Cuadro 1) de *A. purpurea*, registrándose más los alcaloides isoquinolínicos.

Cuadro 1. Alcaloides reportados en *Annona purpurea*.

Tipo	Compuesto	Estructuras			Ref.	
		H	T	R		
6a, 7-deshidroaporfinas	7-hidroxi-dehidroglaucina	x	x	-	2, 3, 7	
	Dehidrolirinidina	x	-	-	2, 3	
Aporfina sensu stricto	N-formil-purpureina	x	-	-	2, 3	
Aporfinas	(+)-predicentrina	x	-	-	2, 3	
	7-formil-dehidrotalicsimidina	x	x	-	2, 3, 7	
	Apoglaziovina		x	-	4	
	Glaucina	x	x	x	2, 7	
	Isocoridina	-	x	x	4, 7	
	Lirinidina	x	x	-	2, 4, 7	
	Norglaucina	-	x	-	4	
	Norpurpureina	x	x	-	2, 3, 6, 8	
	Nortalbaicalina	-	x	-	4	
	Talbaicalidina	x		-	2, 3, 7	
	Talicsimidina	x	x	-	2, 3, 4, 6, 7, 8	
Benzilisoquinolina	Reticulina	-	x	x	4, 7	
Fenantreno	Talicipureina	x	-	-	2, 3	
Isoquinolina	Talifolina	-	x	x	4, 7	
Lactamica	Escuamolona	-	x	-	4	
Morfinandienonas	Norpallidina	-	x	-	4	
	O-Metilflavinantina	-	x	-	4	
	Pallidina	-	x	-	4	
Oxoaporfinas	Liriodenina	-	x	x	4, 7	
	Lisicamina	x	x	-	4	
	Oxoglaucina	x	x	-	4	
		Oxopurpureina	x	x	-	2, 4, 7, 8

Tipo	Compuesto	Estructuras			Ref.
		H	T	R	
Proaporfina	Estefarina	-	x	-	1, 4
	Glaziovina	x	-	-	2, 3, 8
7-deshidroaporfina	3-hidroxi-glaucina	x	-	-	8
	7-hidroxi-dehidrotalicsimidina	x	-	-	2, 3
Indólico	Annomontina	-	x	x	5, 7
	Anonaina	-	x	x	7
	Cassamedina	-	-	-	-
	Indol, 2-metilamino-3 fenil	x	-	x	7
	Isoquinolina, 6,7,8-trimetoxi	-	-	x	7
	Magnoflorina	x	x	-	7
	N-Methylaurotetanina	-	-	x	7
	Nuciferina	-	-	x	7
	O-Dimetilpurpureina	-	-	-	1
	O-Metilcasifilina	-	-	-	-
	O-Nornuciferina	x	-	-	2
	Papaverina	-	x	x	7
	Promucosina	-	x	-	4
	Puterina	-	-	x	7
	Romucosina F	-	x	-	4
	Romucosina G	-	x	-	4
	Thalimicrinona	-	-	x	7
	Talicmina	-	-	-	1
	Tetrahidroisoquinolina	-	x	x	7
	Xylopina	-	-	x	7

1)Sonnet y Jacobson, 1971; 2) Chang et al. 1998; 3)Chang et al. 1998b; 4)Chang et al. 2000; 5)Rejón-Orantes et al. 2011; 6)Sánchez et al. 2018; 7)De-la-Cruz-Chacón et al. 2019; 8)Díaz-Godínez et al. 2020. H= hojas, T = Tallos y R= Raíces.

3.2 *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc.

Ubicación taxonómica (estado asexual)

Filo: Ascomycota

Clase: Sordariomycetes

Orden: Glomerellales

Familia: Glomerellaceae

Género: *Colletotrichum*

Especie: *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz.
& Sacc.

En cuanto a su ubicación taxonómica de acuerdo a su estado sexual la especie es *Glomerella cingulata* (Stoneman) Spaulding & v. Schrenk y el género *Glomerella*.

Características generales

Presentan conidios ovoides de $13.56\text{--}14.24 \times 4\text{--}4.02 \mu\text{m}$ y sus colonias muestran crecimiento micelial en forma radial, con margen entero u ondulado, generalmente de color blanco con masas conidiales de color anaranjado en el centro de la colonia (Rojo-Báez et al. 2017). Es frecuente que las características no sean confiables porque *Colletotrichum* spp. frecuentemente produce conidios secundarios de diferentes formas y tamaños (Figura 3).



Figura 3. *Colletotrichum gloeosporioides*, fotografía del crecimiento en las cajas Petri con PDA (A y B) y los conidios observados en el microscopio óptico 400X (C). Fotografías de Toledo-González K. A.

La temperatura óptima para el crecimiento de este patógeno es 25–28 °C y pH 5.8–6.5. Suele estar inactivo en la estación seca, pero en condiciones favorables causa antracnosis en un gran número de cultivos (Sharma y Kulshrestha, 2015).

En el proceso de colonización de la planta, se presenta la fase hemibiotrófica, donde las fases biotróficas y necrotróficas ocurren secuencialmente (Sharma y Kulshrestha, 2015): 1) la fase biotrófica, donde el patógeno obtiene los alimentos de las células vivas de la planta hospedera y 2) la fase necrotrófica, donde obtiene sus alimentos de las células muertas del hospedero que han sufrido el ataque del patógeno (Bailey et al. 1992 en Cobo, 2017).

Forma de propagación y de infección en la planta

C. gloeosporioides causa la enfermedad de la antracnosis en una variedad de cultivos en todo el mundo. Es una enfermedad del follaje, tallos y frutos que causa pérdidas antes y después de la cosecha en diversas especies de interés comercial (mango, papaya, guayaba, chirimoya, granada y otros cultivos de frutas subtropicales). Se ha reportado que *C. gloeosporioides* infecta *A. muricata* y *A. cherimola* (Rojo-Báez et al. 2017). La antracnosis es favorecida por condiciones húmedas y cálidas y se propaga por semillas infectadas, salpicaduras de lluvia y vientos húmedos. Dentro de los síntomas están la caída y la pudrición de la fruta (Sharma y Kulshrestha, 2015).

Las especies de *Colletotrichum* utilizan dos estrategias principales de infección: colonización hemibiotrófica intracelular o colonización intramural subcuticular. El estado inicial de infección es muy similar en ambas: el conidio se adhiere, germina sobre la superficie de la planta, produce el tubo germinativo y luego forma el apresorio melanizado con el cual penetra directamente la cutícula; sin embargo, el proceso de colonización es diferente en ambas estrategias (Perfect et al. 1999 en Rojo-Báez et al. 2017; Figura 4). Durante la colonización hemibiotrófica intracelular, al penetrar las células epidérmicas del hospedante, las hifas aumentan de tamaño, formando vesículas de infección y una hifa primaria amplia, alrededor de la cual se invagina la membrana plasmática. La vesícula de infección y la hifa primaria están rodeadas por una matriz en la interfase, por lo que el protoplasto del hospedante se mantiene vivo durante esta etapa de la interacción; posteriormente, la hifa primaria coloniza progresivamente nuevas células epidérmicas y mesófilas, a partir de las hifas primarias se forman hifas necrotróficas secundarias delgadas,

las cuales se expanden rápidamente y degradan las paredes celulares mediante enzimas, lo que ocasiona lesiones necróticas (Perfect et al. 1999 en Rojo-Báez et al. 2017).

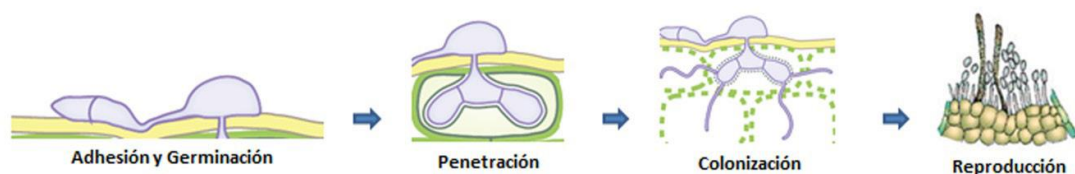


Figura 4. Ciclo de vida de *Colletotrichum gloeosporioides*. Imagen de Rojo-Báez et al. 2017

En contraste, durante la estrategia de infección intramural subcuticular, después de la penetración, el patógeno se desarrolla debajo de la cutícula formando una red de hifas intramurales. Durante las etapas posteriores de infección, las hifas inter e intracelulares penetran células epidérmicas y mesófilas, lo que puede ocasionar la muerte del hospedante (Perfect et al. 1999 en Rojo-Báez et al. 2017).

Mecanismos de toxicidad una vez dentro de la planta

Durante la colonización en el tejido del hospedero, *C. gloeosporioides* crea un entorno alcalinizante. El factor de transcripción pacC, es un regulador de genes con control de pH y es esencial para una colonización exitosa. PacC regula 478 genes positivamente y 483 negativamente. En conjunto, éstos comprenden el 5% del genoma fúngico e incluye genes con funciones como transportadores, antioxidantes y enzimas que degradan la pared celular del hospedero (Alkan et al., 2013). Algunos de estos genes son: *Pel-B*, *CgRac1*, *CgOPT1*, *GDH2*, *GSI*, *GLT* y *MEP* (Nesher et al. 2011; Sharma y Kulshrestha, 2015). Algunas proteínas son Bcl-2, Bax y bcl-2 antiapoptótica (Nesher et al. 2011; Sharma y Kulshrestha, 2015).

Los siguientes son ejemplos de algunas de las funciones de estos genes. El gen *Pel-B* codifica la pectato liasa, la cual degrada la pared celular vegetal y su expresión puede verse fácilmente en la fase necrotrófica de la infección (Sharma y Kulshrestha, 2015). Por su parte, el gen *CgRac1* es un importante regulador del desarrollo asimétrico de *C. gloeosporioides* y codifica la proteína CgRac1, que participa en la regulación de la morfogénesis, la división nuclear y la germinación patógena. La proteína CgRac1 es abundante en conidios y las puntas de las hifas (Nesher et al. 2011). El gen *CgOPT1* es necesario para la virulencia total y su

expresión puede potenciarse mediante la adición de IAA (auxina) (Sharma y Kulshrestha, 2015).

3.3 *Curvularia lunata* (Wakker) Boedijn

Ubicación taxonómica (estado asexual)

Filo: Ascomycota

Clase: Dothideomycetes

Orden: Pleosporales

Familia: Pleosporaceae

Género: *Curvularia*

Especie: *Curvularia lunata* (Wakker) Boedijn

En cuanto a su ubicación taxonómica de acuerdo a su estado sexual la especie es *Cochliobolus lunatus* R.R.Nelson & F.A.Haasis y el género *Curvularia* Boedijn.

Características generales

La mayoría de conidios tienen forma de media luna, con cuatro células separadas por tres septos. Las dos células medias agrandadas y las dos de los extremos más pequeñas. (Hou et al. 2013). Puede existir variación morfológica de los conidios con relación al número de septos y tamaño de los conidios (Rocha et al. 2018; Figura 5).

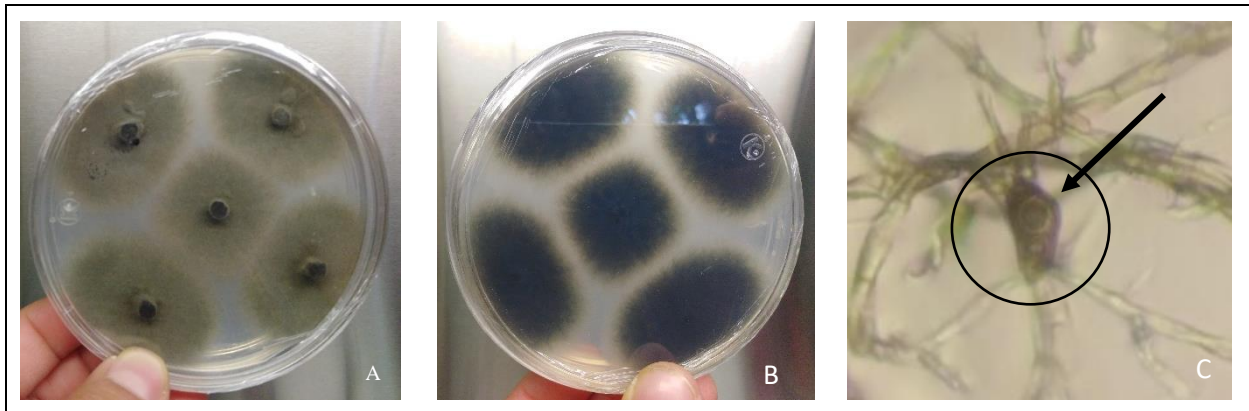


Figura 5. *Curvularia lunata*, fotografías del crecimiento del micelio en las cajas Petri con PDA (A y B). Conidio observado en el microscopio óptico 400x (C). Fotografías de Toledo-González K. A.

Los rangos óptimos de temperatura y pH para el crecimiento micelial, esporulación y germinación conidial del patógeno oscila entre 25–30 °C y el pH entre 5–9, respectivamente

(Sang et al. 2008). La humedad relativa oscila entre 81%–98 % (Sang et al. 2008). Son hongos necrotróficos, que obtiene sus alimentos de las células muertas del hospedero que han sufrido el ataque de este patógeno (Bailey et al. 1992 en Cobo, 2017).

Forma de propagación y de infección en la planta

La principal forma de propagación es la asexual a través de los conidios. Para que ocurra la infección, la superficie de las plantas debe tener cierta humedad, especialmente en climas cálidos y húmedos. Posteriormente, el hongo produce una toxina de tipo furanoide que conduce a las lesiones en las hojas (Pechanova y Pechan, 2015). Las estructuras ramificadas del patógeno (llamadas haustorios), anclan el hongo en el sustrato, liberando enzimas digestivas y absorbiendo nutrientes para el hongo. Cuando las condiciones son favorables, los conidioforos liberan al aire circundante numerosos conidios, que pueden alcanzar nuevas plantas hospederas.

Este hongo es causante de la enfermedad de la mancha foliar o tizón. *Curvularia lunata* infecta principalmente las hojas, vainas y cáscaras de las plantas de maíz. Las primeras manchas amarillas empapadas de agua progresan a formas redondas, fusiformes u ovaladas en las etapas posteriores de la infección. Durante el proceso de infección, los conidios de este patógeno llegan a la planta hospedera y se adhieren a la superficie de la hoja. Al recibir los estímulos apropiados durante el reconocimiento inicial de la superficie del hospedero, se transmiten las señales para la extensión del tubo germinal y la producción de estructuras de infección, que luego germinan para producir hifas. El hongo también secreta enzimas líticas, que ayudan a penetrar en la pared celular de la planta. El tubo también puede diferenciarse en un apresorio después de recibir señales físicas o químicas apropiadas de las superficies de las hojas de las plantas, como la hidrofobicidad, la topografía o la dureza de la superficie, y luego utiliza fuerza de turgencia, combinada con enzimas líticas, para penetrar en la planta hospedera (Liu et al. 2016).

Mecanismos de toxicidad una vez dentro de la planta

El gen *Clg2p* interviene en la formación de apresorios y morfología conidial (Liu et al. 2016). El gen *PKAr* participa en funciones de crecimiento, virulencia y formación de melanina, entre otras (Liu et al. 2013). Las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK), conocidas

por su papel en la transducción de mensajes intracelulares, están implicadas en la regulación de una serie de funciones en el hongo, que van desde el desarrollo de crecimiento de hifas, formación de apresorios, maduración, crecimiento invasivo y conidiación (Liu et al. 2016). Todas las proteínas antes mencionadas participan en la patogenicidad. Además, una de las toxinas identificadas que provoca los síntomas de mancha foliar se conoce como 5-(hidroximetil) furan-2-carboxilato de metilo (Liu et al. 2009).

3.4 *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.) Vuill.

Ubicación taxonómica (estado asexual)

Filo: Mucoromycota

Clase: Mucoromycetes

Orden: Mucorales

Familia: Rhizopodaceae

Género: *Rhizopus*

Especie: *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.) Vuill.

Características generales

Esta especie se caracteriza por la formación de micelio aéreo carente de septos y la producción de esporangióforos (1–3 mm de largo y hasta 20–25 μm de diámetro) que presentan en sus puntas esporangios esféricos donde se forman miles de esporangiosporas (Figura 6). Los esporangióforos nacen de unas estructuras llamadas estolones, de los cuales, también crecen los rizoides que se desarrollan en todas direcciones (De la Garza, 1996; Martínez-Hernández, 2017). Las dimensiones de las esporangiosporas pueden alcanzar hasta 13 μm de longitud y 100 a 275 μm de diámetro. Las esporangiosporas pueden presentar formas globosas, elipsoidales y angulares con superficies lisas o estrías distintivas (Bautista-Baños et al. 2014; Hernández-Lauzardo et al. 2006). Las esporangiosporas de *R. stolonifer* pueden sobrevivir largos períodos sin agua y soportar temperaturas elevadas, germinando sobre tejidos vegetales dañados y generando rápidamente la degradación de los tejidos y la pudrición de los frutos (Velázquez-del Valle et al. 2008; Figura 6).

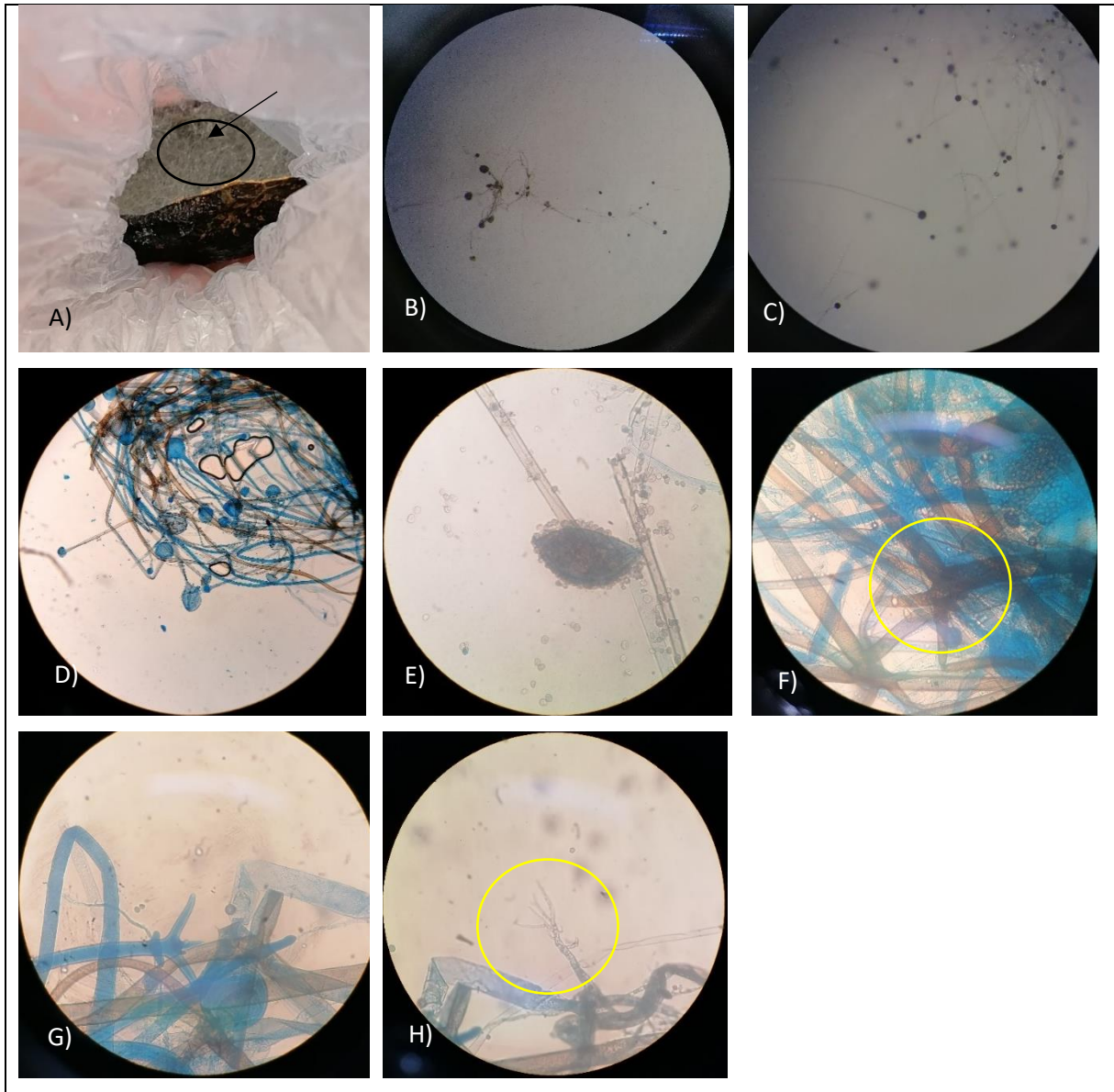


Figura 6. *Rhizopus stolonifer*. A) Crecimiento de *R. stolonifer* en cáscara de aguacate, B) Micelio aéreo y esporangios vistos en el microscopio estereoscopio (20x) , C) Esporangios y esporangióforos en el estereoscopio en 32x, D) y E) Esporangióforos, esporangios, columela y esporangiosporas teñidas con azul de algodón (10 y 400x), F) Estolones y rizoides (400x), G) y H) Rizoides (400 y 10x). Fotografías de Toledo-González K. A.

Clasificación del patógeno dependiendo de su nutrición

Son hongos saprobios con habilidades de necrotróficos oportunistas. Estos pueden infectar fácilmente la fruta madura, lo que conduce a un rápido establecimiento de síntomas de enfermedad. Sin embargo, estos patógenos generalmente no infectan la fruta inmadura y

pueden permanecer inactivos hasta que las condiciones del hospedero estimulen una infección exitosa (Petrasch et al. 2018).

Ciclo de vida

Rhizopus stolonifer presenta tanto reproducción sexual como asexual. En la reproducción sexual, se forman cigosporas dentro de cigosporangios esféricos con pared gruesa, ornamentada y melanizada, que los hace altamente resistentes a las dificultades ambientales. Las cigosporas están sostenidas por dos células suspensoras, que se desarrollan a partir de los restos de los gametangios. La reproducción sexual comienza cuando dos gametangios haploides de tipos de apareamiento opuestos que se tocan y fusionan, atraídos por la producción de prohormonas. Como resultado de la plasmogamia, los núcleos de ambos padres se fusionan para producir un estado diploide que rápidamente pasa por meiosis, recuperando núcleos haploides y recombinantes. El cigosporangio puede permanecer inactivo durante varios meses antes de germinar y producir un esporangio, que ayuda a la dispersión de esporangiosporas con núcleos recombinantes (Moore et al. 2020).

En la reproducción asexual, las hifas especiales no móviles llamadas esporangióforos producen esporangios que se forman en posición vertical. Los esporangios en las puntas de las hifas verticales se desarrollan como porciones negras bulbosas. Las estructuras ramificadas, llamadas rizoides, anclan el hongo en el sustrato, liberando enzimas digestivas y absorbiendo nutrientes para el hongo. Cuando las condiciones son buenas, los esporangios, que contienen numerosas esporangiosporas haploides que se producen a través de la mitosis, liberan las esporangiosporas a la atmósfera circundante. Estas esporangiosporas luego pueden aterrizar en una superficie húmeda y el ciclo de vida se repite (Estrada y Ramírez, 2019).

Forma de propagación y de infección en la planta

Este hongo causa la enfermedad conocida como podredumbre suave, moho negro y podredumbre por *Rhizopus* (Bautista-Baños et al. 2014). Es un patógeno poscosecha importante que provoca un considerable deterioro de una gran variedad de frutas y verduras. Se adquiere durante los primeros pasos de la cadena de poscosecha; durante la cosecha y manipulación en la planta de empaque, aunque también pueden infectarse antes de la cosecha

(Bautista-Baños et al. 2014). Se sabe que el inóculo de *R. stolonifer* puede estar presente en los órganos de las plantas, como hojas y frutos, pero existen pocos estudios al respecto. Los géneros de plantas susceptibles a este hongo incluyen *Allium*, *Annona*, *Brassica*, *Cucumis*, *Cucurbita*, *Fragaria*, *Lycopersicum*, *Phaseolus*, *Pisum* y *Solanum*, entre otros (Bautista-Baños et al. 2014). *Rhizopus stolonifer* puede sobrevivir durante meses en los suelos, sus esporangiosporas se diseminan en el aire, y al encontrar las condiciones favorables germinan y se desarrollan (Velázquez-del Valle et al. 2008). También se ha dado dispersión de esporangiosporas por el agua de lluvia y por insectos (Rondón y Rondón, 2009). Los frutos maduros y dañados son más susceptibles a la infección; asimismo, presenta una alta correlación entre el número de esporangiosporas y la incidencia de la enfermedad (Velázquez-del Valle et al. 2008).

Generalmente la infección por *R. stolonifer* en frutos y vegetales ocurre primordialmente durante la fase postcosecha, dado que en esa fase los productos sufren lesiones que permiten la entrada del hongo (Bautista-Baños et al. 2014; Velázquez-del Valle et al. 2008). Es importante que las heridas sean recientes para que las esporas germinen. Una vez germinadas las esporas, se producen hifas, éstas secretan enzimas pectinolíticas que degradan y disuelven las sustancias pécticas de la lámina media en las células vegetales, dando lugar a la pérdida de cohesión entre ellas y provocando que las rodee una sustancia líquida, lo que da como resultado la pudrición blanda. Posteriormente, el hongo secreta enzimas celulolíticas que provocan la completa desintegración de las células de los tejidos vegetales (Bautista-Baños et al. 2014).

Mecanismos de toxicidad una vez dentro de la planta

La infección por *R. stolonifer* está estrechamente relacionada con actividades enzimáticas que juegan un papel importante en la colonización de frutos. La poligalacturonasa (PG; EC 3.2.1.15, CAS 9032-75-1) se considera la hidrolasa primaria involucrada en el proceso de ablandamiento de tomates, melones en malla y dátiles durante la infección (Al-Hindi et al. 2011). Adicionalmente, se han detectado otras enzimas en la degradación de la pared en dátiles infectados, como xilanasa, celulasa y amilasa (Al-Hindi et al. 2011). Este hongo ha sido muy utilizado en el campo de la microbiología industrial. Se ha utilizado en la

producción de muchas enzimas hidrolíticas y extracelulares entre las que se encuentra la α -amilasa (Atolagbe et al. 2016).

IV. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

4.1 Hipótesis

Considerando que las plantas responden al estrés biótico alterando su metabolismo secundario, se plantearon las siguientes hipótesis:

- 1) La infección de plántulas de *Annona purpurea* con los hongos *Colletotrichum gloeosporioides*, *Curvularia lunata* y *Rhizopus stolonifer* inducirá cambios en el perfil de alcaloides de hojas, tallos y raíces de plántulas.
- 2) La modulación del perfil de alcaloides será sensible al grado de virulencia de cada especie de hongo.
- 3) Las hojas y las raíces serán los órganos con mayor diversidad de alcaloides, debido a la importancia que tienen éstas estructuras para la planta en su función fotosintética y en la absorción de agua y nutrientes, respectivamente.

4.2 Objetivo general

Evaluar la respuesta de alcaloides inducida ante el estrés por hongos patógenos durante el desarrollo temprano de *Annona purpurea*.

4.3 Objetivos particulares

En raíces, tallos y hojas de plántulas de *Annona purpurea*:

1. Caracterizar el perfil constitutivo de alcaloides.
2. Caracterizar los perfiles de alcaloides inducidos por *Colletotrichum gloeosporioides*, *Curvularia lunata* y *Rhizopus stolonifer*.
3. Determinar si el perfil de alcaloides inducidos es sensible a las diferentes especies de hongos fitopatógenos y está en proporción directa al riesgo del órgano infectado.

V. MÉTODOS GENERALES

5.1 Obtención de plántulas

La obtención de semillas se realizó durante cuatro años consecutivos 2018–2021. Se compraron frutos de *A. purpurea* en dos mercados conocidos de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, “5 de mayo” y “Los Ancianos”. La procedencia de los frutos fue la localidad de San Lucas, municipio de Acala, Chiapas. El procesamiento de los frutos, manejo de las semillas y obtención de las plántulas se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Fisiología y Química Vegetal del Instituto de Ciencias Biológicas de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas (UNICACH).

Procesamiento de los frutos. Se trabajaron un total de 100 frutos, la separación y limpieza de las semillas fue manual; debido a que la pulpa es muy fibrosa, fue retirada por completo con cuidado con una tela y después limpiada con agua y secada a sombra. El tiempo aproximado de limpieza de cada fruto fue de tres a cuatro horas dependiendo de la cantidad de semillas del fruto. Una vez limpias, las semillas fueron colocadas en charolas de plástico durante tres días para su secado a la sombra. Se contabilizó el número de semillas por fruto y se almacenaron en bolsas de papel estraza a temperatura ambiente (Figura 7).

Desinfección de las semillas. Las semillas se desinfectaron por inmersión en una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 1 % por 5 minutos. Posteriormente, se enjuagaron 3 veces con agua destilada estéril.

Prueba de germinación. Debido a que se reporta un bajo porcentaje de germinación por la latencia en las semillas (19–29 %; Gómez-Castañeda et al. 2003), las semillas desinfectadas y secas se colocaron en un vaso de precipitados de 4 L por 96 horas para la imbibición con 2 litros de ácido giberélico (AG₃) a una concentración de 500 mg/L⁻¹. Adicionalmente, se acondicionó una bomba de agua para facilitar la oxigenación, buena circulación y homogeneidad de la solución.

Para germinar las semillas se utilizó la técnica “entre papel” (FAO y África Seeds, 2019), la cual consiste en colocar las semillas entre papel y formar un rollo. Se utilizó un atomizador para humedecer uno de los papeles de papel estraza, después se colocaron 25 semillas separadas entre sí, se coloca otro papel encima y se humedece. Posteriormente, se dobló 1 cm de los lados izquierdo e inferior, enrollando de izquierda a derecha y se colocaron

cuatro de estos rollos entre dos botes de plástico de 1 L con agua destilada que fue esterilizada con luz ultravioleta (UV) por 30 minutos. Se cambió el papel tres veces por semana y se eliminó el exceso de agua para evitar la proliferación de hongos. Se contabilizaron las semillas germinadas.

Trasplante. Las semillas germinadas que tenían las primeras hojas embrionarias y una radícula de 5 cm fueron trasplantadas a recipientes de 1 L con suelo estéril y se regaron con agua estéril. Las condiciones en las que se mantuvieron las plántulas fueron 25 ± 1 °C, humedad relativa de entre 65–75 % y fotoperiodo con 12h de luz y 12h de oscuridad, a una intensidad de $500 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Las plántulas se mantuvieron bajo las mismas condiciones durante cuatro meses hasta que presentaron seis hojas.

Para trasplantar las semillas se utilizó suelo estéril de Tuxtla Gutiérrez similar al encontrado en la localidad San Lucas, sitio donde se encuentran las plantas madre. El suelo fue tamizado y colocado en cajas de tetra pack para esterilizarse en autoclave por un periodo de 15 minutos y 15 libras de presión. Para cada diseño experimental se colocaron 150 recipientes de un litro con orificios en la parte inferior y 800 g de sustrato. Por último, antes de trasplantar se humedeció el sustrato con agua destilada estéril y una vez sembradas todas las plántulas se regaron. El riego fue realizado dos veces por semana, al momento de trasplantar se adicionaron a cada recipiente 250 mL de agua destilada estéril y semanalmente se administraron 100 mL de ésta por planta.



Figura 7. Procesamiento de las semillas de *Annona purpurea*, A) frutos; B) pulpa y recipientes de 1 litro; C) semillas con pulpa; D) semillas limpias; E) almacenamiento de semillas en bolsas de papel estraza.

5.2 Inducción fúngica

Siembra y resiembra de hongos. Se realizaron resiembras constantes para mantener en buenas condiciones las cepas de *C. gloeosporioides*, *C. lunata* y *R. stolonifer*. El medio que se utilizó fue agar dextrosa y papa (PDA).

Obtención de solución conidial 1×10^6 conidios/esporangiosporas. Las cepas fueron sembradas en cajas Petri de 90×15 mm con medio agar dextrosa y papa BD BIOXON. Una

vez que el crecimiento micelial del hongo ocupó el 90% de la caja Petri, se procedió a la obtención de la solución de esporas. Para ello, se vertió agua destilada estéril (2 mL) por cada caja Petri y se removieron las esporas del micelio con un asa bacteriológica para obtener 20 mL de solución de esporas. La solución fue diluida con agua destilada estéril hasta obtener 250 mL. Para determinar la concentración correcta se utilizó la cámara de Neubauer para la contabilización de esporas y el espectrofotómetro a 650 nm. La solución fue utilizada una vez se obtuvo la concentración 1×10^6 conidios (*C. gloeosporoides* y *C. lunata*) o esporangiosporas (*R. stolonifer*) (Modificado de Hanson (2010)).

Infección de plántulas. Una vez que se tuvieron plántulas con seis hojas y la solución de esporas del hongo respectivo, se utilizaron plántulas sin inocular (T1) y plantas inoculadas (T2). Se asperjaron 5 mL de agua destilada estéril a cada plántula de T1 y 5 mL de solución de esporas a las T2. Los tratamientos fueron colocados en las mismas condiciones: cámara de humedad, bolsa de plástico de 30×40 cm y regadas con 50 mL de agua destilada estéril dos veces por semana. Una vez que se presentaron los síntomas de infección se realizaron cuadros de 2×2 cm de hojas de ambos tratamientos para confirmar la presencia del hongo fitopatógeno (HF). Los cuadros cortados se colocaron en una cámara de humedad y una bolsa de plástico con aire por un periodo de 48 horas. La finalidad de la cámara de humedad fue brindar las condiciones óptimas al hongo para su desarrollo y, transcurridas 48 horas, los cuadros se sembraron en cajas Petri con agar dextrosa y papa (PDA). Una vez verificada la presencia del HF inoculado se procedió a la cosecha del material vegetal.

La inoculación de las plántulas con hongos fue inducida en las estructuras vegetales donde la sintomatología de infección por el hongo es más evidente. Para *C. gloeosporoides* y *C. lunata* se inoculó en hojas y tallos. Para el caso de *R. stolonifer* se infectaron las raíces. Para ello, se removió un poco de sustrato de la superficie alrededor del tallo para colocar los 5 mL de solución de esporangiosporas a cada plántula (Modificado de Hanson, 2010).

5.3 Perfil de alcaloides

Cosecha de material vegetal. La cosecha de hojas, tallos y raíces se realizó en la cámara bioclimática, cuando las plántulas inoculadas presentaron síntomas de infección. Esta se realizó tanto para plántulas testigo como inducidas. Donde se encontraban las condiciones de 12h de luz y 12h de oscuridad (intensidad de $500 \mu\text{M} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), temperatura (25 ± 1 °C) y

humedad (65–75 %). La cosecha fue colocada en bolsas de papel estraza para que se secase y se pesara seca. Con la finalidad de tener la cantidad requerida según el diseño experimental, se realizaron mezclas compuestas (MC); por ejemplo, en cada una bolsa se agregaron hojas de cuatro plántulas. Se obtuvo el peso seco de cada MC. Se hicieron siete repeticiones de cada estructura vegetal (tallos, raíces y hojas). Todas las MC se trituraron por separado hasta obtener un polvo fino.

Obtención de extractos. Cada muestra se desengrasó tres veces con 10 mL de hexano en baño María a 55 °C durante 8 h, utilizando 0.5 g de cada muestra en tubos de ensayo de 30 mL. El material vegetal desengrasado se extrajo con metanol (MeOH) usando la misma técnica. Los extractos se filtraron con papel filtro Whatman #1 y se concentraron en un rotaevaporador 2000 a 150 rpm, a 55 °C. Cuando el solvente se evaporó totalmente, el extracto se pesó en una balanza analítica.

Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC/MS). Los extractos metanólicos de raíces, tallos y hojas se analizaron en un Cromatógrafo de Gases acoplado a Espectrometría de Masas (GC-MS; Perkin-Elmer Mass Spectrometer Clarus SQ 8T-Gas Chromatograph Clarus 680), usando una solución de 20 µg de extracto en 1 mL de MeOH. En el caso de las hojas, la clorofila se eliminó previamente filtrando dos veces el peso de la muestra con carbón activado y diluyendo con MeOH (20 µL·mL). La calibración del GC-MS fue realizada bajo las condiciones establecidas por De-la-Cruz-Chacón et al. (2019), que consistieron en analizar 1 mL de la muestra en MeOH, según las siguientes condiciones: tasa de separación 1:30; columna capilar Perkin-Elmer Elite (32 mm, 0.32 mm, 0.25 mm) como fase estacionaria; Helio (He) 1.2 mL·min⁻¹, como fase móvil; rampeo de temperatura 150 °C, 1 min (tasa de 10 °C·min⁻¹, hasta los 280 °C, 16 min; temperatura del inyector, 300 °C. Se consideraron MS a 70 eV con 2.89 escaneos y detector de fragmentos de 50~ 500 Da; temperatura de fuente de 250 °C, temperatura cuádruple 100 °C.

Identificación de alcaloides. A partir de los cromatogramas obtenidos del GC/MS, fue posible analizar y cuantificar compuestos trazas en mezclas complejas con un alto grado de efectividad. Se identificaron y cuantificaron los compuestos encontrados mediante el software TurboMass (Perkin Elmer, Versión 6.1.0) y la biblioteca NIST MASS (National Institute of Standards and Technology), reportando aquellos compuestos cuya coincidencia-confiabilidad fuese > 75% y, en los casos en los que no se alcanzó este nivel, se compararon

los patrones de fragmentación y tiempos de retención con lo reportado en la bibliografía especializada sobre MS reportados para *A. purpurea*, como Hernández-Morales (2017) y De-la-Cruz-Chacón et al. (2019), así como con información de PubChem. En los casos en los que no fue posible alcanzar la determinación del compuesto, se asignó un número consecutivo por medio del TurboMass y la biblioteca NIST MASS. La cuantificación se realizó por medio del método de integración de áreas de los picos con el software del equipo. La abundancia o cantidad relativa de cada alcaloide se determinó mediante la siguiente fórmula:

(Área del compuesto obtenido en el CG-MS \times volumen del extracto) / peso del material vegetal utilizado para obtener el extracto metanólico.

Término operacional constitutivo e inducido. Se consideraron metabolitos secundarios constitutivos a los que se encontraron presentes en el estado fenológico de plántulas y que se conservan en adultos. Para el caso de los metabolitos secundarios inducidos, se consideró cuando se presentó un incremento en la abundancia de determinado alcaloide, comparando la abundancia entre el tratamiento testigo y el tratamiento inoculado, siempre y cuando la diferencia entre ellos fuera significativa ($P \leq 0.5$).

5.4 Análisis estadísticos

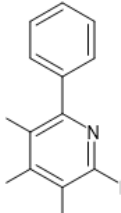
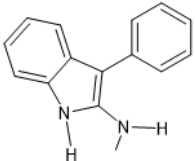
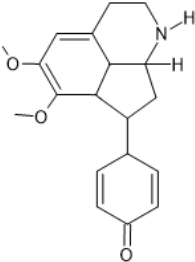
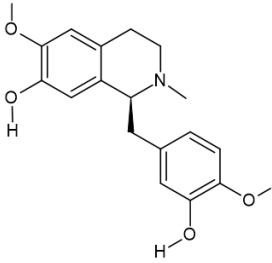
Para conocer las diferencias en el perfil de alcaloides provocados por los HF se utilizaron los valores de riqueza (número de alcaloides) y abundancia (concentración relativa). Para calcular los índices de quimiodiversidad mediante las fórmulas de índices de diversidad ecológica de Margalef, Shannon-Wiener y Simpson. Con el fin de explorar las relaciones químicas de los órganos de las plántulas infectadas y del control se realizó un Análisis de Componentes Principales (PCA, por sus siglas en inglés). Para asegurar una distribución normal de los datos, éstos fueron transformados a logaritmo natural (\ln), $\ln(x+1)$. La matriz de similitud entre tratamientos y órganos se obtuvo con el índice de Bray-Curtis. Las diferencias significativas entre los grupos formados por los órganos entre los tratamientos se obtuvieron mediante una PERMANOVA pareada. Para probar las diferencias de los órganos de plántulas control (PC) e infectadas (PI) en la abundancia de cada alcaloide, se realizaron pruebas de Kruskal-Wallis. Todos los análisis fueron realizados en el programa estadístico Past Version 4.10 (Natural History Museum, University of Oslo, Oslo, Norway).

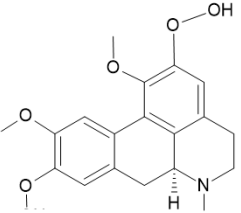
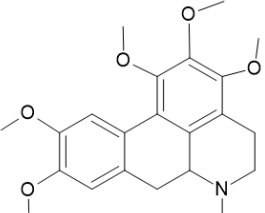
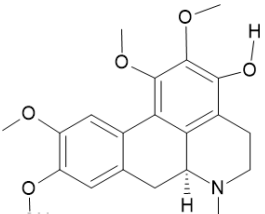
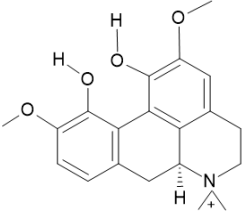
VI. RESULTADOS

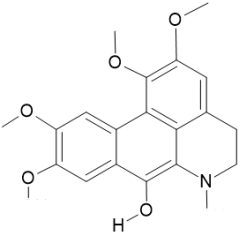
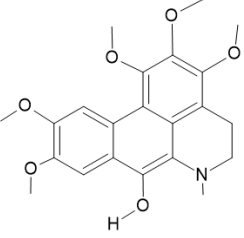
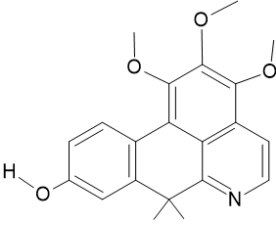
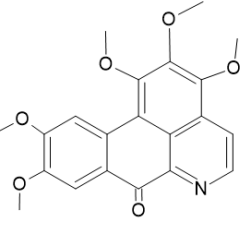
6.1 Perfil de alcaloides en plántulas de *Annona purpurea*

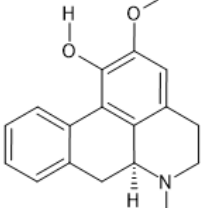
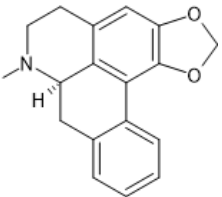
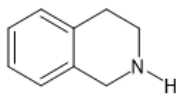
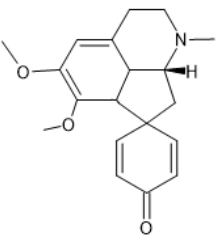
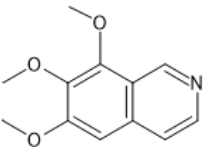
Se detectaron 21 alcaloides de distribución variable (Cuadro 2) en las plántulas sanas. La mayor riqueza de alcaloides se encontró en las raíces (20 compuestos), seguida de tallos (16) y hojas (13). Los órganos mostraron diferencias en diversidad con los tres índices calculados (Cuadro 3). Los índices muestran que las raíces poseen la quimiodiversidad más alta y que las hojas son menos diversas. Doce alcaloides son comunes a los tres tejidos, tres a raíces y tallos, uno a tallos y hojas; y cinco alcaloides son exclusivos de las raíces. El índice de Simpson muestra que en las raíces hay alcaloides que dominan el perfil por su alta abundancia (talicsimidina, 7-hidroxidehidrotalicsimidina y 7-hidroxidehidroglaucina).

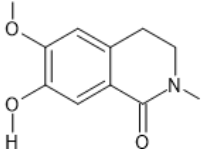
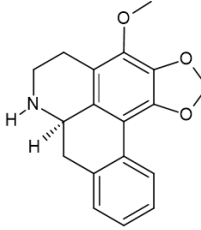
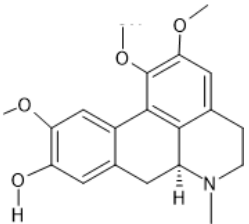
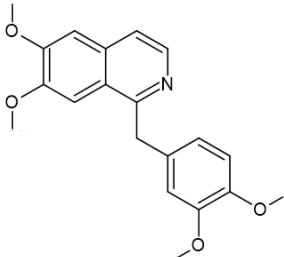
Cuadro 2. Riqueza de Alcaloides en raíces, tallos y hojas de plántulas sanas de *Annona purpurea*.

CAS	TR (min)	Alcaloide	Estructura	Fragmentación en GC MS	Distribución	Referencia MS m/z
-	9.67	2 fenil-3,4,5,6 tetrametilpiridina		211(M ⁺ , 16.55), 210(100), 209(7.91), 167(11.10), 92(12.32), 91(12.05)	R, T, H	1
900262-27-7	12.71	Indol, 2-(Metilamino)-3-fenilindol		223(M ⁺ , 13.43), 222(100), 206(15.89), 161(12.40), 207(12.38),	R, T, H	8
2810-21-1	13.21	Estefarina		297(M ⁺ , 88.26), 268(100), 254(67.69), 296(62.11)	R, T, H	1, 7
485-19-8	13.46	Reticulina		193(M ⁺ , 14.46), 192(100), 177(25.40), 149(23.98)	R, T, H	1, 7, 8

CAS	TR (min)	Alcaloide	Estructura	Fragmentación en GC MS	Distribución	Referencia MS m/z
475-81-0	14.26	Glaucina		355(M+, 76.33), 354(100), 281(87.77), 340(64.05), 324(42.28)	R, T, H	1, 3, 4, 5, 7, 8
19775-47-4	14.56	Talicsimidina		385(M+, 97.12), 384(100), 354(67.77), 370(66.24), 342(20.44)	R, T, H	1, 3, 5, 8
-	15.01	Talbaicalidina		371(M+, 99.40), 370(100), 356(68.32), 340(35.27), 354(31.08)	R, T, H	1, 2, 5, 8
2141-09-5	16.1	Magnoflorina		342 (M+, 1), 58(100), 207(98.02), 73(48.97), 281(42.39), 341(7.43)	R, T, H	1, 8

CAS	TR (min)	Alcaloide	Estructura	Fragmentación en GC MS	Distribución	Referencia MS m/z
-	17.95	7-Hidroxi-dehidroglaucina		354(M+, 23.49), 353(100), 338(99.80), 280(58.41), 339(22.53), 281(21.17)	R, T, H	1, 8
-	18.54	7-Hidroxi-dehidrotalicimidina		399(M+, 1), 383(100), 368(77.31), 192(48.17), 384(22.98), 369(18.78)	R, T, H	1, 8
-	20.94	Melosmidina		351(M+, 41.17), 336(100), 176(51.96), 337(41.17), 293(16.26)	R, T, H	1, 2
32845-27-5	21.14	Oxopurpureina		381(M+, 50.57), 366(100), 308(35.07), 191(33.80), 367(21.49)	R, T, H	1, 6, 8

CAS	TR (min)	Alcaloide	Estructura	Fragmentación en GC MS	Distribución	Referencia MS m/z
54383-28-7	10.92	Lirinidina		281(M+, 54.34), 280(100), 266(55.95), 265(37.31), 250(55.36)	R, T	1, 3, 7, 8
2030-53-7	11.87	(+)-Roemerina		279(M+, 48.46), 278(100), 236(42.76), 178(34.32), 125(17.98)	R, T	1, 2, 3, 4, 7
91-21-4	12.22	Tetrahidroisoquinolina		237(M+, 14.49), 236(100), 220(12.90), 206(10.25)	R, T	1, 2, 7, 8
-	12.26	Pronuciferina		311(M+, 100), 282(92.25), 310(67.78), 268(65.40)	T, H	1, 7
54879-45-7	6.38	6,7,8-Trimethoxyisoquinolina		219(M+, 100), 161(24.84), 257(23.71), 191(22.03), 207(20.27)	R	1, 7, 8

CAS	TR (min)	Alcaloide	Estructura	Fragmentación en GC MS	Distribución	Referencia MS m/z
21796-15-6	8.13	Talifolina		207(M ⁺ , 24.48), 196(76.26), 164(24.11), 136 (100)	R	1, 7, 8
80151-82-2	11.17	Nor-estefalagina		295(M ⁺ , 66.78), 294(100), 280(63.39), 264(46.49), 221(40.13)	R	4, 7
2169-44-0	12.91	N-Metil-laurotetanina		341(M ⁺ , 11.16), 340(100)	R	1, 2, 4, 5, 6, 7, 8
58-74-2	13.41	Papaverina		339(M ⁺ , 54.58), 338(100), 324(89.89), 308(26.24), 325(18.55)	R	1, 7, 8

R, raíces; T, tallos; H, hojas; CAS, número registrado para los compuestos químicos según la Sociedad Química Americana; TR, tiempo de retención. Referencias: 1) NIST, 2021; 2-6) Guinadeau et al. 1975 (I, II, III, IV, V); 7) PubChem; 8) De-la-Cruz-Chacón et al. 2019.

Cuadro 3. Comparación entre los índices de diversidad para alcaloides totales detectados en raíces, tallos y hojas sanas de plántulas de *Annona purpurea*.

Índice	Raíces	Tallos	Hojas	Valor de <i>p</i>
Margalef	6.86 ± 0.21 (A)	5.46 ± 0.92 (B)	4.13 ± 0.36 (C)	≤ 0.05
Shannon-Wiener	2.177 ± 0.08 (A)	1.82 ± 0.09 (B)	1.57 ± 0.13 (C)	≤ 0.05
Simpson	0.86 ± 0.01 (A)	0.78 ± 0.01 (B)	0.73 ± 0.03 (C)	≤ 0.05

A, B y C representan diferencias estadísticamente significativas entre los órganos de las plántulas.

Para determinarse los alcaloides detectados son constitutivos, se compararon los 21 alcaloides encontrados en plántulas con los 23 de los ejemplares adultos reportados por De la Cruz Chacón et al. 2019, de ellos 15 fueron considerados constitutivos dado que están presentes en ambas etapas (Cuadro 4).

Cuadro 4. Presencia órgano-específica de alcaloides constitutivos en raíces, tallos y hojas en dos etapas de desarrollo de *Annona purpurea*.

Alcaloides	Plántulas			Adultos		
	R	T	H	R	T	H
Indol, 2-(Metilamino)-						
3-fenilindol	×	×	×	×	×	-
Reticulina	×	×	×	×	-	-
Glaucina	×	×	×	-	-	×
Talicimidina	×	×	×	-	×	×
Talbaicalidina	×	×	×	-	-	×
Magnoflorina	×	×	×	-	×	×
7-Hidroxi-						
dehidroglaucina	×	×	×	-	×	×
7-Hidroxi-						
dehidrotalicimidina	×	×	×	-	×	×
Oxopurpureina	×	×	×	-	×	×
Lirinidina	×	×	-	×	-	×
Tetrahidroisoquinolina	×	×	-	×	×	×
6,7,8-Trimethoxi-						
isoquinolina	×	-	-	×	-	-
N-Metil-laurotetanina	×	-	-	×	-	-
Talifolina	×	-	-	×	×	-
Papaverina	×	-	-	×	×	-

R, raíces; T, tallos; H, hojas. Referencias de los alcaloides en individuos adultos (De-la-Cruz-Chacón et al. 2019). “×” presencia del alcaloide y “-” ausencia.

La mayor riqueza de alcaloides constitutivos en plántulas se encontró también en las raíces (15 compuestos), seguida de los tallos (11) y hojas (9). Los índices de diversidad también mostraron diferencias significativas entre los órganos (Cuadro 5).

Cuadro 5. Índices de diversidad de alcaloides constitutivos en raíces, tallos y hojas de plántulas sanas de *Annona purpurea*.

Índice	Raíces	Tallos	Hojas	Valor de p
Margalef	1.4186 ± 0.0783 (A)	1.0217 ± 0.0906 (B)	0.7552 ± 0.1180 (C)	8.356E-10
Shannon-Wiener	1.9870 ± 0.0538 (A)	1.6378 ± 0.0597 (B)	1.3741 ± 0.0802 (C)	4.771E-12
Simpson	0.8364 ± 0.0090 (A)	0.7540 ± 0.0190 (B)	0.6954 ± 0.0206 (C)	3.572E-11

A, B y C representan diferencias estadísticamente significativas entre los órganos de las plántulas.

Con la finalidad de analizar la inducción de alcaloides en respuesta a la infección con *C. gloeosporioides*, *C. lunata* y *R. stolonifer*, se compararon con tres tratamientos testigos, un tratamiento testigo para cada hongo. En el Cuadro 6 se representan los alcaloides de raíces, tallos y hojas.

Cuadro 6. Presencia de alcaloides en las raíces, tallos y hojas de plántulas de *Annona purpurea* testigo con los diferentes experimentos.

Alcaloides	Hongos fitopatógenos		
	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>Curvularia lunata</i>	<i>Rhizopus stolonifer</i>
Indol, 2-(Metilamino)-3-fenilindol	R, T, H	R, T, H	R, T, H
Reticulina	R, T, H	R, T, H	R, T, H
Glaucina	R, T, H	R, T, H	R, T, H
Talicsimidina	R, T, H	R, T, H	R, T, H
Talbaicalidina	R, T, H	T, H	T, H
Magnoflorina	R, T, H	R, T, H	R, T, H
7-Hidroxi-dehidroglaucaína	R, T, H	R, T, H	R, T, H
7-Hidroxi-dehidrotalicsimidina	R, T, H	R, T, H	R, T, H
Oxopurpleína	R, T, H	R, T, H	R, T

Alcaloides	Hongos fitopatógenos		
	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>Curvularia lunata</i>	<i>Rhizopus stolonifer</i>
Tetrahidroisoquinolina	R, T	R, T	R, T, H
Lirinidina	R, T	-	R
N-Metil-laurotetanina	R	-	-
Papaverina	R	R	R
6,7,8-Trimethoxi-isoquinolina	R	R	-
Talifolina	R	-	-

R = raíces, T = tallos, H = hojas.

La mayor riqueza de alcaloides se encontró casi siempre en las raíces (1.4186 ± 0.0783), independientemente del HF con el que fueron inoculadas, seguida de tallos y hojas. Se detectaron diferencias intraespecíficas, que fueron la ausencia de lirinidina, en los testigos de *C. lunata*, de N-Metil-laurotetanina en testigos de *C. lunata* y *R. stolonifer* y de 6,7,8-Trimethoxi-isoquinolina en los testigos de *R. stolonifer*, alcaloides que se esperaban encontrar en las raíces.

6.2 Alcaloides inducidos por *Colletotrichum gloeosporioides* en plántulas de *Annona purpurea*

Con este fitopatógeno se indujeron tres alcaloides lirinidina y papaverina en raíces y Indol, 2-(Metilamino)-3-fenilindol en hojas (Cuadro 7).

Cuadro 7. Alcaloides inducidos por *Colletotrichum gloeosporioides* en plántulas de *Annona purpurea*.

Alcaloides	Porcentaje de inducción		
	Raíces	Tallos	Hojas
Indol, 2-(Metilamino)-3-fenilindol	-	33.81	142.94*
Reticulina	-	-	-
Glaucina*	-	-	-
Talicsimidina	-	-	-
Talbaicalidina	13.88	-	-
Magnoflorina	-	68.11	73.36
7-Hidroxi-dehidroglaucina	-	-	-
7-Hidroxi-dehidrotalicsimidina	87.07	-	-
Oxopurpureina*	-	-	-
Lirinidina	61.14*	-	-
Tetrahidroisoquinolina	-	21.14	-
N-Metil-laurotetanina	-	-	-
Papaverina	403.48*	-	-
6,7,8-Trimethoxi-isoquinolina	-	-	-
Talifolina	-	-	-

* Diferencias significativas.

Los resultados obtenidos de acuerdo a los índices de diversidad no mostraron diferencias entre el tratamiento control e inducido en los tres órganos. El índice de Margalef presentó una riqueza baja. En cuanto a la diversidad con el índice de Shannon-Wiener una diversidad baja. El índice de Simpson mostró la probabilidad que un alcaloide se encuentre en raíces fue mayor (Cuadro 8).

Cuadro 8. Índices de diversidad de alcaloides inducidos en plántulas de *Annona purpurea* infectadas con *Colletotrichum gloeosporioides*.

Índice	Raíces	Raíces I	Valor de P	Tallos	Tallos I	Valor de P	Hojas	Hojas I	Valor de P
Margalef	1.4186 ± 0.0783 (A)	1.3613 ± 0.0546 (A)	0.3067	1.0217 ± 0.0906 (A)	1.0699 ± 0.0159 (A)	0.1231	0.7552 ± 0.1180 (A)	0.7511 ± 0.0435 (A)	0.4431
Shannon- Wiener	1.9870 ± 0.0538 (A)	1.9174 ± 0.2934 (A)	0.6093	1.6379 ± 0.0597 (A)	1.6251 ± 0.1014 (A)	0.8983	1.3741 ± 0.0802 (A)	1.4131 ± 0.0374 (A)	0.3067
Simpson	0.8364 ± 0.0090 (A)	0.7967 ± 0.1178 (A)	0.8983	0.7540 ± 0.0190 (A)	0.7480 ± 0.0338 (A)	0.7981	0.6954 ± 0.0206 (A)	0.7050 ± 0.0084 (A)	0.2502

Los índices de diversidad fueron comparados por separado con Mann-Whitney entre cada órgano testigo e inoculado. A y B representan diferencias estadísticamente significativas entre los órganos en cada índice (valor de $P \leq 0.05$).

En el PCA se observa agrupaciones, se separaron los tres órganos, aunque sean tratamientos inoculados y el grupo control. Las raíces estuvieron representadas por los tres alcaloides exclusivos; en los tallos predominaron las abundancias de algunos alcaloides, como la glaucina, y en las hojas estuvieron representados por la oxopurpureína (Figura 8). El PERMANOVA permitió observar las diferencias entre órganos y tratamientos ($P < 0.05$), y con el PERMANOVA pareado se encontraron diferencias específicas de órgano en los tallos y hojas independientemente de la infección; además, en las raíces hubo diferencias en la quimiodiversidad de las plántulas causadas por la infección ($P < 0.05$) (Cuadro 9).

Destacan los incrementos en tres alcaloides constitutivos: lirinidina (61%) y papaverina (403%) en las raíces y 2-(metilamino)-3-fenilindol (143%) en las hojas. No se detectaron nuevos alcaloides en ningún órgano.

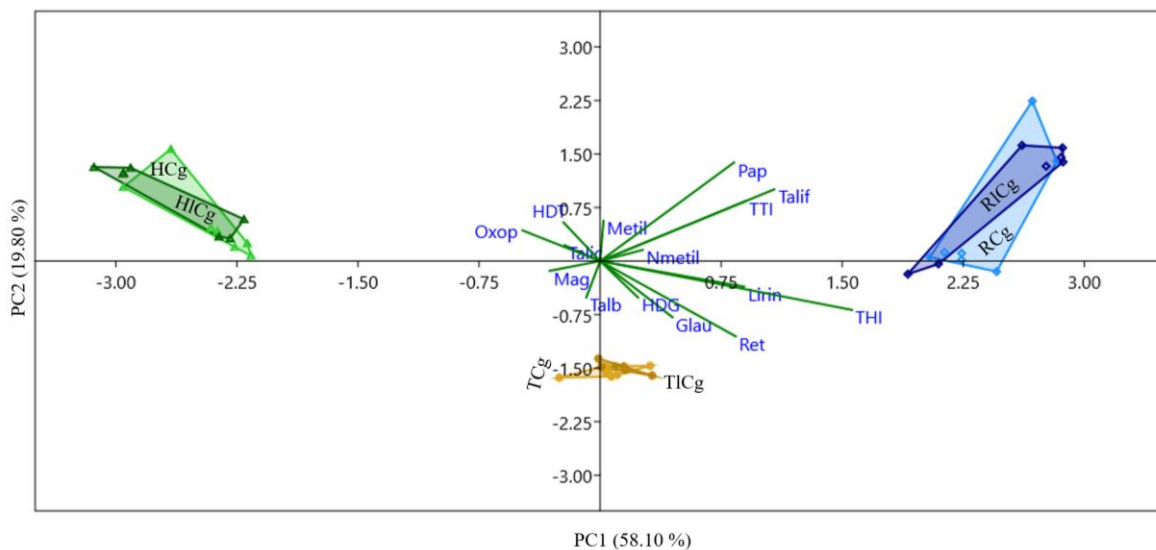


Figura 8. Análisis de Componentes Principales de los alcaloides presentes en los órganos de plántulas no inoculadas e infectadas con *Colletotrichum gloeosporioides*. Las flechas son los vectores que indica la correlación entre los alcaloides con los órganos en los dos tratamientos. THI (Tetrahidroisoquinolina); Metil (indol, 2-(Metilamino)-3-fenilindol); Pap (papaverina); Ret (reticulina); Glau (glaucina); Talic (talicsimidina); Talb (talbaicalidina); Mag (magnoflorina); HDG (7-hidroxi-dehidroglauca); HDT (7-hidroxi-dehidro-talicsimidina); Oxop (oxopurpureina). Plántulas testigo: RCg (Raíces), TCg (Tallos) y HCg (Hojas). Plántulas inoculadas: RICg (Raíces), TICg (Tallos) y HICg (Hojas).

Cuadro 9. Valores de similitud entre los grupos obtenidos en el PERMANOVA pareado.

Grupos	Raíces PC	Raíces PI	Tallos PC	Tallos PI	Hojas PC
Raíces PI	0.0260 *				
Tallos PC	0.0009 ***	0.0004 ***			
Tallos PI	0.0002 ***	0.0005 ***	0.2354		
Hojas PC	0.0009 ***	0.0007 ***	0.0007 ***	0.0006 ***	
Hojas PI	0.0003 ***	0.0008 ***	0.0009 ***	0.0005 ***	0.2541

PC = Plántulas control; PI = Plántulas infectadas. * $P = 0.01$; ** $P = 0.001$; *** $P = 0.0001$

6.3. Alcaloides inducidos por *Curvularia lunata* en plántulas de *Annona purpurea*

Solamente dos alcaloides respondieron a la inducción por *C. lunata* la glaucina en raíces y la oxopurpureina en tallos y hojas (Cuadro 10).

Cuadro 10. Alcaloides inducidos por *Curvularia lunata* en plántulas de *Annona purpurea*.

Alcaloides	Porcentaje de inducción		
	Raíces	Tallos	Hojas
Indol, 2-(Metilamino)-3-fenilindol	-	-	29.25
Reticulina	64.42	-	-
Glaucina*	44.66*	-	8.26
Talicsimidina	42.4	-	17.5
Talbaicalidina	-	96.08	81.11
Magnoflorina	35.05	-	31.79
7-Hidroxi-dehidroglaucina	19.13	-	27.56
7-Hidroxi-dehidrotalicsimidina	-	-	25.85
Oxopurpureina*	-	31.21*	46.94*
Tetrahidroisoquinolina	0.56	-	-
Lirinidina	-	-	-
N-Metil-laurotetanina	-	-	-
Papaverina	-	-	-
6,7,8-Trimethoxi-isoquinolina	-	-	-
Talifolina	-	-	-

* Diferencias significativas.

Los índices de diversidad no presentaron diferencias entre los tratamientos control e inoculados, con excepción del índice de Simpson en hojas. El índice de Margalef presentó una riqueza baja. El índice de Shannon-Wiener, muestra una diversidad baja, es decir la abundancia de los alcaloides en los órganos es diferente. El índice de Simpson mostró la probabilidad de que un alcaloide se encuentre en raíces fue mayor (Cuadro 11).

Cuadro 11. Índices de diversidad de alcaloides inducidos en plántulas de *Annona purpurea* infectadas con *Curvularia lunata*.

Índice	Raíces	Raíces I	Valor de <i>P</i>	Tallos	Tallos I	Valor de <i>P</i>	Hojas	Hojas I	Valor de <i>P</i>
Margalef	1.1801 ± 0.2162 (A)	1.2769 ± 0.1290 (A)	0.5229	0.9514 ± 0.1405 (A)	0.8213 ± 0.0951 (A)	0.0967	0.9012 ± 0.0678 (A)	0.8839 ± 0.0731 (A)	0.3711
Shannon- Wiener	1.7831 ± 0.2299 (A)	1.8884 ± 0.0468 (A)	0.4433	1.5716 ± 0.0355 (A)	1.5839 ± 0.0759 (A)	0.7983	1.4089 ± 0.0177 (A)	1.427 ± 0.0422 (A)	0.1395
Simpson	0.7972 ± 0.0607 (A)	0.8252 ± 0.0078 (A)	0.3067	0.7536 ± 0.0137 (A)	0.7561 ± 0.0193 (A)	0.8983	0.6965 ± 0.0044 (A)	0.7045 ± 0.01117 (B)	0.0409

Los índices de diversidad fueron comparados por separado con Mann-Whitney entre cada órgano testigo e inoculado. A y B representan diferencias estadísticamente significativas entre los órganos en cada índice (valor de $P \leq 0.05$).

El análisis de componentes principales (PCA) nos muestra la respuesta de las plántulas a la infección (Figura 9), donde el 75.29 % de la varianza es explicada por los dos primeros componentes principales. Se observa que hay algunos alcaloides se relacionan con determinados órganos en los dos tratamientos. El PC1 separa a los tres órganos y distingue entre órganos, pero no entre testigo e inoculado en cada órgano y el PC2 separa por su quimiodiversidad a raíces y hojas de tallos (Figura 9). El PERMANOVA y el PERMANOVA pareado permitió ver las diferencias entre órganos y tratamientos, siendo diferentes entre órganos, pero no entre tratamientos (Cuadro 12).

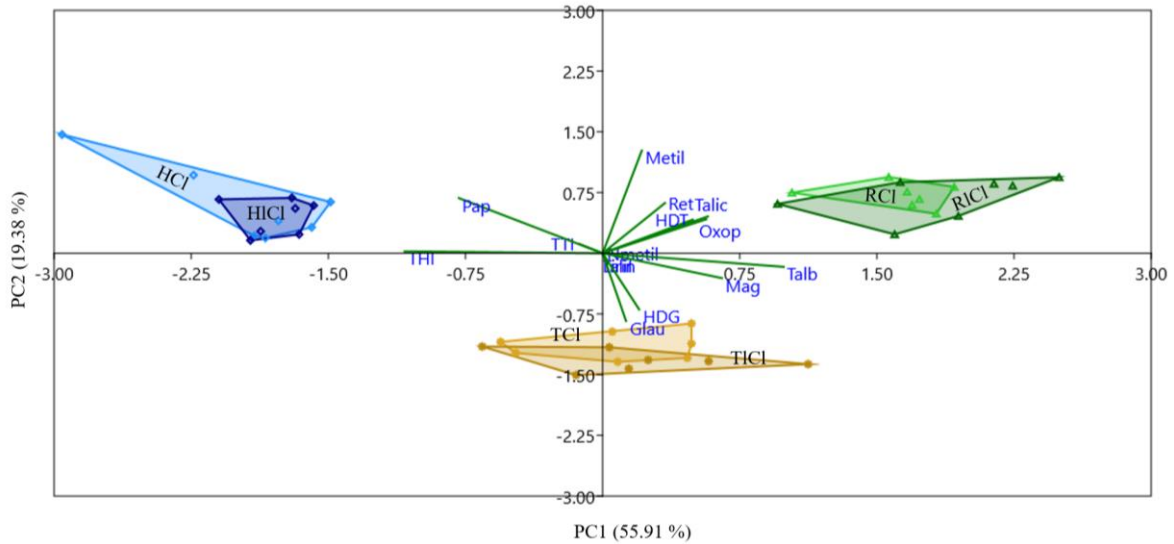


Figura 9. Análisis de Componentes Principales de los alcaloides presentes en los órganos de plántulas no inoculadas e infectadas con *Curvularia lunata*. Las flechas son los vectores que indican la correlación entre los alcaloides con los órganos en los dos tratamientos. THI (Tetrahidroisoquinolina); Metil (indol, 2-(Metilamino)-3-fenilindol); Pap (papaverina); Ret (reticulina); Glau (glaucina); Talic (talicsimidina); Talb (talbaicalidina); Mag (magnoflorina); HDG (7-hidroxi-dehidroglaucaína); HDT (7-hidroxi-dehidro-talicsimidina); Oxop (oxopurpureína). Plántulas testigo: RCl (Raíces), TCl (Tallos) y HCl (Hojas). Plántulas inoculadas: RICl (Raíces), TICl (Tallos) y HICl (Hojas).

Cuadro 12. Valores de similitud entre los grupos obtenidos en el PERMANOVA pareado.

Grupos	Raíces PC	Raíces PI	Tallos PC	Tallos PI	Hojas PC
Raíces PI	0.6042				
Tallos PC	0.0009 ***	0.0008 ***			
Tallos PI	0.0001 ***	0.0007 ***	0.1069		
Hojas PC	0.0001 ***	0.0008 ***	0.0009 ***	0.0006 ***	
Hojas PI	0.0002 ***	0.0008 ***	0.0007 ***	0.001 **	0.4248

PC = Plántulas control; PI = Plántulas infectadas. * $P = 0.01$; ** $P = 0.001$; *** $P = 0.0001$

Las plántulas infectadas mostraron diferencias en la abundancia de alcaloides entre los órganos (Cuadro 10). Destaca el incremento de glaucina en raíces y oxopurpureína en tallos y hojas.

Se produjo inducción de glaucina y oxopurpureína, aunque no se encontró ningún alcaloide nuevo.

6.4. Alcaloides inducidos por *Rhizopus stolonifer* en plántulas de *Annona purpurea*

Se indujeron seis alcaloides en respuesta a la infección por *R. stolonifer*. En raíces reticulina, glaucina, talicsimidina; en tallos glaucina, talicsimidina y magnoflorina; en hojas talicsimidina, magnoflorina 7-hidroxi-dehidro-talicsimidina y oxopurpureina (Cuadro 13)

Cuadro 13. Alcaloides inducidos por *Rhizopus stolonifer* en plántulas de *Annona purpurea*

Alcaloides	Porcentaje de inducción (%)		
	Raíces	Tallos	Hojas
Indol, 2-(Metilamino)-3-fenilindol	2.79	-	-
Papaverina	46.22	-	-
Reticulina*	116.45*	131.26	-
Glaucina*	75.74*	91.10*	-
Talicsimidina*	33.20*	82.91*	23.03*
Talbaicalidina	-	176.58	-
Magnoflorina*	-	52.06*	53.93*
7-Hidroxi-dehidroglaucina	23.26	12.96	4.74
7-Hidroxi-dehidrotalicsimidina*	-	7.82	45.50*
Oxopurpureina*	-	21.19	69.86*
Tetrahydroisoquinolina	5.12	-	-
Lirinidina	-	-	-
N-Metil-laurotetanina	-	-	-
Papaverina	-	-	-
6,7,8-Trimethoxy-isoquinolina	-	-	-
Talifolina	-	-	-

* Diferencias significativas.

En el perfil de alcaloides de plántulas infectadas con *Rhizopus stolonifer* los índices de Margaleff y Simpson muestran sólo diferencias en los tratamientos control e inducido en las raíces. El índice de Margalef presentó una riqueza baja. En cuanto a la diversidad, con el índice de Shannon-Wiener una diversidad baja, es decir la abundancia entre las especies es diferente. El índice de Simpson mostró la probabilidad de que un alcaloide se encuentre en raíces fue mayor (Cuadro 14).

Cuadro 14. Índices de diversidad de alcaloides inducidos en plántulas de *Annona purpurea* infectadas con *Rhizopus stolonifer*.

Índice	Raíces	Raíces I	Valor de <i>P</i>	Tallos	Tallos I	Valor de <i>P</i>	Hojas	Hojas I	Valor de <i>P</i>
Margalef	1.0395 ± 0.0767 (A)	0.9845 ± 0.0876 (A)	0.0409	0.8642 ± 0.1408 (A)	0.8563 ± 0.1001 (A)	0.7015	0.8765 ± 0.1081 (A)	0.7734 ± 0.0998 (A)	0.0967
Shannon- Wiener	1.7677 ± 0.0679 (A)	1.7159 ± 0.0391 (A)	0.0736	1.4156 ± 0.0874 (A)	1.4239 ± 0.0620 (A)	0.8477	1.2409 ± 0.0511 (A)	1.2206 ± 0.0320 (A)	0.4433
Simpson	0.8020 ± 0.0124 (A)	0.7889 ± 0.0667 (B)	0.0409	0.6938 ± 0.0332 (A)	0.7102 ± 0.0238 (A)	0.2502	0.6412 ± 0.0150 (A)	0.6427 ± 0.0104 (A)	0.8983

Los índices de diversidad fueron comparados por separado con Mann-Whitney entre cada órgano testigo e inoculado. A y B representan diferencias estadísticamente significativas entre los órganos en cada índice (valor de $P \leq 0.05$).

La respuesta de las plántulas en la producción de alcaloides constitutivos a la infección se representa en el PCA, que muestra que el 79.2 % de la varianza se explica por los dos primeros componentes principales, lo que indica que algunos alcaloides se relacionan con determinados órganos. El PC1 separa a los tres órganos, pero no entre testigos y plantas inoculadas, con excepción de las hojas. El PC2 separa por su quimiodiversidad a raíces de hojas y tallos (Figura 10). El PERMANOVA y el PERMANOVA pareada permitió ver las diferencias entre órganos y tratamientos, se encontró diferencias entre órganos ($P < 0.05$), pero no entre tratamientos con excepción de las hojas (Cuadro 15).

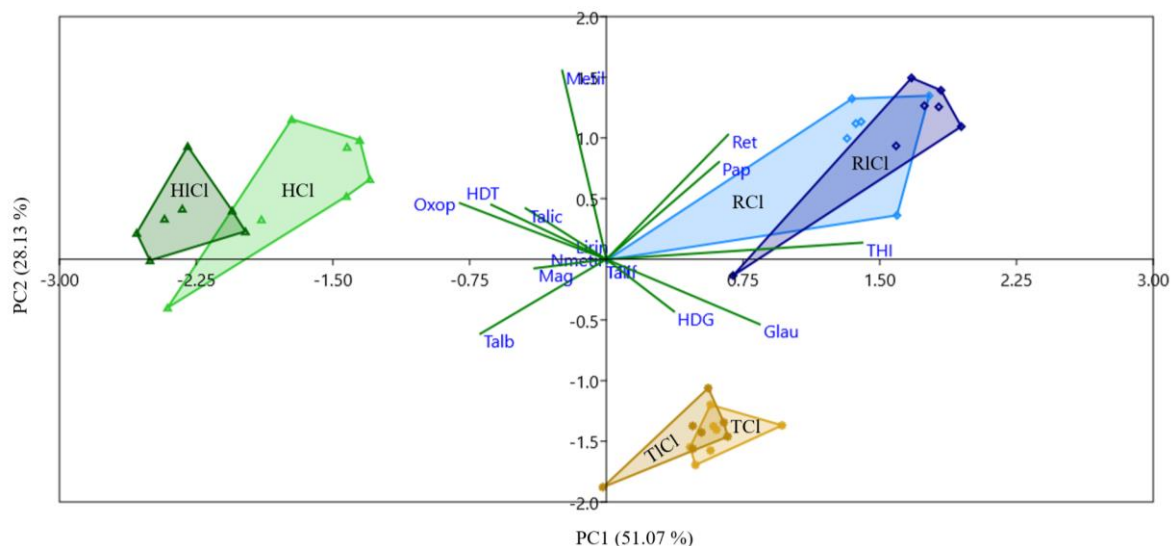


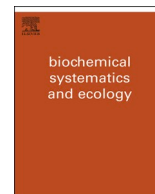
Figura 10. Análisis de Componentes Principales de los alcaloides presentes en los órganos de plántulas no inoculadas e infectadas con *Rhizopus stolonifer*. Las flechas son los vectores que indica la correlación entre los alcaloides con los órganos en los dos tratamientos. THI (tetrahydroisoquinolina); Metil (indol, 2-(Metilamino)-3-fenilindol); Pap (papaverina); Ret (reticulina); Glau (glaucina); Talic (talicsimidina); Talb (talbaicalidina); Mag (magnoflorina); HDG (7-hidroxi-dehidroglaucina); HDT (7-hidroxi-dehidro-talicsimidina); Oxop (oxopurpureina). Plántulas testigo: RRs (Raíces), TRs (Tallos) y HRs (Hojas). Plántulas inoculadas: RIRs (Raíces), TIRs (Tallos) y HIRs (Hojas).

Cuadro 15. Valores de similitud entre los grupos obtenidos en el PERMANOVA pareado.

Grupos	Raíces PC	Raíces PI	Tallos PC	Tallos PI	Hojas PC
Raíces PI	0.3979				
Tallos PC	0.0007 ***	0.0005 ***			
Tallos PI	0.0009 ***	0.0006 ***	0.1154		
Hojas PC	0.0009 ***	0.0009 ***	0.0004 ***	0.0007 ***	
Hojas PI	0.0003 ***	0.0005 ***	0.0008 ***	0.0009 ***	0.0392*

PC = Plántulas control; PI = Plántulas infectadas. * $P = 0.01$; ** $P = 0.001$; *** $P = 0.0001$.

Las plántulas inoculadas mostraron cambios en la abundancia de alcaloides entre los órganos (Cuadro 14). Destaca el incremento de seis alcaloides, talicsimidina en toda la plántula, glaucina en raíces y tallos, magnoflorina en tallos y hojas, 7-hidroxi-dehidrotalicsimidina y oxopurpureina en las hojas y reticulina en las raíces. No se encontraron alcaloides diferentes debido a la infección en ningún órgano.



Alkaloidal variation in seedlings of *Annona purpurea* Moc. & Sessé ex Dunal infected with *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. and Sacc.

K.A. Toledo-González^{a,b}, C.A. Riley-Saldaña^b, R. Salas-Lizana^c, I. De-la-Cruz-Chacón^b, A.R. González-Esquinca^{b,*}

^a Programa de Doctorado en Ciencias en Biodiversidad y Conservación de Ecosistemas Tropicales, Instituto de Ciencias Biológicas, Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas, Libramiento Norte Poniente 1150, C.P. 29039, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, Mexico

^b Laboratorio de Fisiología y Química Vegetal, Instituto de Ciencias Biológicas, Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas, Libramiento norte-poniente No. 1150, Colonia Lajas Maciel, C.P. 29039, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, Mexico

^c Departamento de Biología Comparada, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, C.P. 04510, Ciudad de México, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:

Phytoalexin
Annonaceae
Phytopathogens
Defense
Secondary metabolites

ABSTRACT

Annona purpurea is a species of the Annonaceae family that more than 50 alkaloids. Some alkaloids carry out defense functions and can be grouped from an ecological perspective as constitutive and induced metabolites. The latter are expressed in response to changes in abiotic or biotic conditions that trigger stress in a plant. However, there are few systematic studies of constitutive metabolite profiles and their responses to biotic stress, despite the relevance of this concept. This work analyzed the differences in constitutive and induced alkaloids in *A. purpurea* seedlings infected with the phytopathogen *Colletotrichum gloeosporioides*. For this study, methanolic extracts of seedling leaves, stems, and roots inoculated with the fungus and not inoculated with the fungus were obtained and analyzed by gas chromatography coupled to mass spectrometry. The richness and abundance of alkaloids between the treatments and between organs were represented using the Margalef, Shannon, and Simpson ecological indices and the analysis of principal components, PERMANOVA, and paired PERMANOVA. Twenty-one alkaloids were detected from two biosynthetic pathways distributed in the seedling organs, and 15 of these alkaloids were considered constitutive because they are also found in adults. Most of the constitutive alkaloids in the seedlings were observed in the roots (15 compounds), followed by the stems (11 chemicals) and leaves (9 chemicals). The diversity indices also showed differences between the organs. Infection with the fungus modified the constitutive profile of the alkaloids by inducing an increase in lirinidine (61%) and papaverine (403%) in the roots and N,N-dimethyl, 2-(methylamino) 3-phenylindole (143%) in the leaves. Due to the infection, no new alkaloids were detected in any organ.

1. Introduction

Interactions among plants, herbivores, and pathogens have been affected the evolution of chemical defense systems that counteract the adverse biotic conditions of their environment (Mediavilla et al., 2022). Chemical defense, attributed to a greater extent to secondary metabolites, includes the biosynthesis of alkaloids as forms of deterrence and defense against herbivores or pathogens (Bostock et al., 2001; Anaya et al., 2006; Freeman and Beattie, 2008).

Plants of the Annonaceae family are characterized by the presence of secondary metabolites with biological activity that include cytotoxic (Vikas et al., 2019), antimicrobial (Rahman et al., 2005), and antifungal

(Chávez and Mata, 1998) properties. However, the spatiotemporal dynamics of these compounds against phytopathogenic infection are unknown.

Annona purpurea is an arboreal fruit species that is valued in Mexico and Central America for its medicinal properties (Luna-Cazárez and González-Esquinca, 2015). Forty-nine alkaloids have been identified from adult trees (Sonnet and Jacobson, 1971; Chang et al., 1998; Chang et al. 1998b; Chang et al. 2000; Rejón-Orantes et al., 2011; De-la-Cruz-Chacón et al., 2019; Díaz-Godínez et al., 2020). Some of these alkaloids are also found in young plants of *Annona lutescens* (Castro-Moreno et al., 2013), *A. macrophyllata* (De-la-Cruz-Chacón and González-Esquinca, 2012) and *Annona muricata* (Riley-Saldaña

* Corresponding author.

E-mail address: aesquinca@unicach.mx (A.R. González-Esquinca).

<https://doi.org/10.1016/j.bse.2023.104611>

Received 13 October 2022; Received in revised form 9 January 2023; Accepted 30 January 2023

Available online 6 February 2023

0305-1978/© 2023 Published by Elsevier Ltd.

et al., 2017), so the presence of alkaloids or other secondary metabolites during the various stages of early development allows the study of characteristics described in adult plants, such as responses induced by biotic or abiotic factors, and can lead to the discovery of new metabolites with biological potential.

There are few studies that document the biotic induction of alkaloids in the Annonaceae family when infected with phytopathogens. Riley-Saldaña (2019) showed the organ-specific induction in *A. muricata* seedlings infected by the phytopathogenic fungi *Colletotrichum gloeosporioides* and *Rhizopus stolonifer*. Infection with *C. gloeosporioides* increased the concentration of the alkaloids asimilobine (in roots, 8%; stems, 10%), anonaine (roots, 10%; leaves, 8%), nornuciferine (stems, 1200%), and reticuline (stems and leaves, 10%), while infection with *R. stolonifer* only increased the production of nornuciferine (stems, 10%). This alteration in alkaloid metabolism in *A. muricata* implies plant-microorganism interactions and the possibility that they could be expressed in other species, such as *A. purpurea*. Therefore, this research had as objectives to determine the composition of alkaloids in *A. purpurea* seedlings, which ones and how many are constitutive (common with adult specimens) and if there is induction by infection of *C. gloeosporioides*.

Thus, in this study, it was hypothesized that the secondary metabolism of *A. purpurea* could induce the expression of organ-specific alkaloids when infected with the phytopathogenic fungus *C. gloeosporioides*.

2. Materials and methods

2.1. Obtaining seedlings

Annona purpurea seeds were obtained from fruits collected in the municipality of San Lucas, Chiapas, Mexico. The seedlings were obtained from the germination of seeds under conditions of 25 ± 1 °C, relative humidity of between 65 and 75%, and a photoperiod with 12 h of light and 12 h of darkness at an intensity of $500 \mu\text{Mm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. The seedlings were maintained under the same conditions for four months until they presented six leaves.

A total of 56 seedlings with six leaves that developed under the controlled conditions; half of the seedlings were infected with conidia of *C. gloeosporioides* to form the infected group, and the remainder constituted the control group. For each group, seven replicates were conducted with the roots, stems, and leaves of 4 individuals.

2.2. Obtaining conidia

C. gloeosporioides was seeded on dextrose and potato agar (PDA). Once the mycelial growth of the fungus covered 90% of the agar, the conidia were removed from the mycelium with a bacteriological loop, and with the help of a micropipette, the conidia suspension was extracted. This solution was diluted with sterile distilled water until a volume of 250 mL was obtained. The conidia were adjusted to 1×10^6 conidia.mL⁻¹ using a Neubauer chamber and a spectrophotometer at a wavelength of 650 nm.

2.3. Infecting seedlings

Seedlings were inoculated with *C. gloeosporioides* by spraying 5 mL of the conidia solution on the leaves and stems. Control seedlings were sprayed with the same volume of sterile water. They were covered with sealed plastic bags that were 30 × 40 cm to provide a humidity chamber around the organs to favor infection.

2.4. Collecting plant material

The inoculated plants showed symptoms of infection at 10 days, and the symptoms were compared with the morphological manifestations

reported by Juárez-Becerra et al. (2010), Rivero et al. (2012), Rodríguez-López et al. (2013) and Cambero-Ayón et al. (2019); then, we proceeded to harvest the roots, stems, and leaves of the control and inoculated seedlings. The tissues were ground into a fine powder.

2.5. Obtaining extracts

Each sample was degreased with 10 mL of hexane in a water bath at 55 °C for 8 h 3 times using 0.5 g of each sample in 30 mL test tubes. The degreased plant material was extracted with methanol (MeOH) using the modified technique (De-la-Cruz-Chacón et al., 2019). The extracts were filtered with Whatman #1 filter paper and concentrated in a 2000 rotary evaporator at 150 rpm at 55 °C. When the solvent was completely evaporated, the extract was weighed on an analytical balance.

2.6. Gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS)

The methanolic extracts of the roots, stems, and leaves were analyzed through gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) (PerkinElmer Mass Spectrometer Clarus SQ 8T - Gas Chromatograph Clarus 680) using a solution of 20 mg of extract in 1 mL of MeOH. For the leaves, chlorophyll was removed by filtering twice the weight of the sample with activated carbon and diluting with MeOH. The GC–MS calibration was performed under the conditions established by De-la-Cruz-Chacón et al. (2019), which consisted of analyzing 1 mL of the sample in MeOH; a separation rate of 1:30; a PerkinElmer Elite capillary column (32 mm, 0.32 mm, 0.25 mm) as the stationary phase; helium (He) at $1.2 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ was the carrier gas; temperature increasing from 150 °C, 1 min (rate of $10 \text{ }^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$, up to 280 °C, 16 min; injector temperature, 300 °C). The MS was at 70 eV with 2.89 scans, and a fragment detector of 50 500 Da was considered; the source temperature was 250 °C, with a quadrupole temperature of 100 °C. The relative abundance was determined by the following formula:

$$\left(\text{Area of the compound obtained in the GC-MS} \times \text{volume of the extract} \right) / \text{weight of the plant material used to obtain the methanolic extracts.}$$

To establish whether an alkaloid was constitutive, the alkaloids found in the seedlings were compared with those found in the adult specimens reported by De-la-Cruz-Chacón et al. (2019). Those that occurred at the vegetative and reproductive stages of the plant were considered constitutive alkaloids because the method used for the chemical analysis was the same as that used in this work.

2.7. Statistical analysis

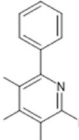
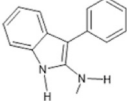
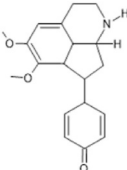
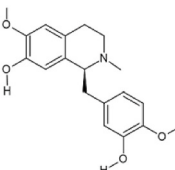
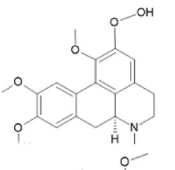
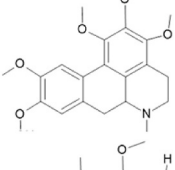
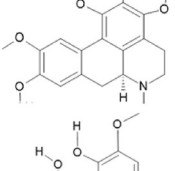
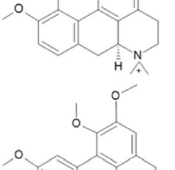
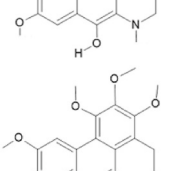
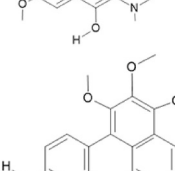
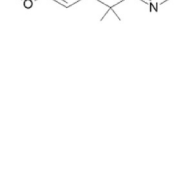
To determine the difference in richness (number of alkaloids) and abundance (relative concentration) of the alkaloids between treatments, the Margalef, Shannon–Wiener, and Simpson indices were used. To analyze the abundance between the organs and the two treatments, principal component analysis (PCA) was performed. To ensure a normal distribution of the data, these were transformed to natural logarithm (\ln), $\ln(x + 1)$. The similarity matrix was obtained with the Bray–Curtis index. The difference between the groups formed by the organs in the two treatments was obtained using a paired PERMANOVA, and for the differences in the abundance of each alkaloid in the control (PC) and infected (PI) seedlings, ANOVA tests were performed. All analyses were performed in the statistical program Past Version 4.10 (Natural History Museum, University of Oslo, Oslo, Norway).

3. Results

3.1. *Annona purpurea* alkaloids

Twenty-one alkaloids were detected in the *A. purpurea* seedlings (Table 1). The greatest richness of alkaloids was found in the roots (20 compounds), followed by the stems (16) and leaves (13). The organs

Table 1
Alkaloid richness in *Annona purpurea* seedlings.

CAS	RT (min)	Alkaloid	Structure	Fragmentation in GC MS	Distribution	Reference MS m/z
–	9.67	2-phenyl-3,4,5,6-tetramethylpyridine		211(M ⁺ , 16.55), 210(100), 209(7.91), 167(11.10), 92(12.32), 91(12.05)	R, S, L	1
900262-27-7	12.71	Indole, 2-(Methylamino)-3-phenyl		223(M ⁺ , 13.43), 222(100), 206(15.89), 161(12.40), 207(12.38),	R, S, L	8
2810-21-1	13.21	Stepharine		297(M ⁺ , 88.26), 268(100), 254(67.69), 296(62.11)	R, S, L	1, 7
485-19-8	13.46	Reticuline		193(M ⁺ , 14.46), 192(100), 177(25.40), 149(23.98)	R, S, L	1, 7, 8
475-81-0	14.26	Glaucine		355(M ⁺ , 76.33), 354(100), 281(87.77), 340(64.05), 324(42.28)	R, S, L	1, 3, 4, 5, 7, 8
19775-47-4	14.56	Thalicsimidine		385(M ⁺ , 97.12), 384(100), 354(67.77), 370(66.24), 342(20.44)	R, S, L	1, 3, 5, 8
–	15.01	Thalbaicalidine		371(M ⁺ , 99.40), 370(100), 356(68.32), 340(35.27), 354(31.08)	R, S, L	1, 2, 5, 8
2141-09-5	16.1	Magnoflorine		342 (M ⁺ , 1), 58(100), 207(98.02), 73(48.97), 281(42.39), 341(7.43)	R, S, L	1, 8
–	17.95	7-Hydroxy-dehydroglaucine		354(M ⁺ , 23.49), 353(100), 338(99.80), 280(58.41), 339(22.53), 281(21.17)	R, S, L	1, 8
–	18.54	7-Hydroxy-dehydrothalicsimidine		399(M ⁺ , 1), 383(100), 368(77.31), 192(48.17), 384(22.98), 369(18.78)	R, S, L	1, 8
–	20.94	Melosmidine		351(M ⁺ , 41.17), 336(100), 176(51.96), 337(41.17), 293(16.26)	R, S, L	1, 2

(continued on next page)

Table 1 (continued)

CAS	RT (min)	Alkaloid	Structure	Fragmentation in GC MS	Distribution	Reference MS m/z
32845-27-5	21.14	Oxopurpureine		381(M+, 50.57), 366(100), 308(35.07), 191(33.80), 367(21.49)	R, S, L	1, 6, 8
54383-28-7	10.92	Lirinidine		281(M+, 54.34), 280(100), 266(55.95), 265(37.31), 250(55.36)	R, S	1, 3, 7, 8
2030-53-7	11.87	(+)-Roemerine		279(M+, 48.46), 278(100), 236(42.76), 178(34.32), 125(17.98)	R, S	1, 2, 3, 4, 7
91-21-4	12.22	Tetrahydroisoquinoline		237(M+, 14.49), 236(100), 220(12.90), 206(10.25)	R, S	1, 2, 7, 8
–	12.26	Pronuciferine		311(M+, 100), 282(92.25), 310(67.78), 268(65.40)	S, L	1, 7
54879-45-7	6.38	Isoquinoline, 6,7,8-trimethoxy		219(M+, 100), 161(24.84), 257(23.71), 191(22.03), 207(20.27)	R	1, 7, 8
21796-15-6	8.13	Thalifoline		207(M+, 24.48), 196(76.26), 164(24.11), 136(100)	R	1, 7, 8
80151-82-2	11.17	Nor-stephalagine		295(M+, 66.78), 294(100), 280(63.39), 264(46.49), 221(40.13)	R	4, 7
2169-44-0	12.91	N-methylaurotitanine		341(M+, 11.16), 340(100)	R	1, 2, 4, 5, 6, 7, 8
58-74-2	13.41	Papaverine		339(M+, 54.58), 338(100), 324(89.89), 308(26.24), 325(18.55)	R	1, 7, 8

R, roots; S, stems; L, leaves; CAS, registered number for chemical compounds according to the American Chemical Society; RT, retention time. References: 1) National Institute of Standards and Technology, 2021; 2–6) Guinaudeau et al., 1975, 1979, 1983, 1988, 1994; 7) PubChem; 8) De-la-Cruz-Chacón et al., 2019.

showed differences in diversity based on the three indices calculated (Table 2), specifically indicating that the roots had the highest chemodiversity and that the leaves were less diverse. Twelve alkaloids were common among the three tissues, three were common between the roots and stems, and one was common between the stems and leaves; there were five alkaloids detected only in the roots. The Simpson index showed that in the roots, there were alkaloids that dominated the profile due to their abundance (thalicsimidine, 7-hydroxy-dehydrothalicsimidine, and 7-hydroxy-dehydroglauanine, supplementary material).

To establish whether an alkaloid was constitutive, the 21 alkaloids

found in the seedlings were compared with the 23 alkaloids found in the adult specimens in De-la-Cruz-Chacón et al. (2019), and of these 21, 15 were considered constitutive since they were present in both stages (Table 3).

The greatest richness of constitutive alkaloids in the seedlings was observed in the roots (15 compounds), followed by in the stems (11 compounds) and leaves (9 compounds). The diversity indices also showed differences between the organs (Table 4).

Table 2
Diversity indices for the alkaloids detected in the *Annona purpurea* seedlings.

Index	Roots	Stems	Leaves	P-value
Margalef	6.86 ± 0.21 (A)	5.46 ± 0.92 (B)	4.13 ± 0.36 (C)	≤0.05
Shannon-Wiener	2.177 ± 0.08 (A)	1.82 ± 0.09 (B)	1.57 ± 0.13 (C)	≤0.05
Simpson	0.86 ± 0.01 (A)	0.78 ± 0.01 (B)	0.73 ± 0.03 (C)	≤0.05

Results are presented as means value ± standard deviation. The values were statistically tested using ANOVA. Means followed by the different letter (A, B and C) differ by the Tukey's pairwise test at 95% reliability. For Margalef (F = 38.62; X² = 13.03); Shannon-Wiener (F = 64.47; X² = 0.66) and Simpson (F = 69.75; X² = 0.03).

3.2. Response of *Annona purpurea* seedlings to infection with *Colletotrichum gloeosporioides*

The distribution of alkaloids in the seedlings inoculated with *C. gloeosporioides* was conserved, with the exception of the alkaloid 2-phenyl-3,4,5,6-tetramethylpyridine, which was not found in the leaves, and N-methylaurotetanine, which was not detected in the roots (Table 5).

Differences were found in the diversity of the constitutive alkaloids in the infected seedlings. The Margalef index indicated differences between the three organs, while the Shannon–Wiener index showed that the roots were different and the stems and leaves were similar (low diversity). The Simpson index did not indicate differences (Table 6).

The PCA separated the three organs but did not distinguish between the inoculated treatments and the control group. The roots were represented by the three exclusive alkaloids; in the stems, the abundances of some alkaloids, such as glaucine, predominated, and in the leaves, they were represented by oxopurpureine (Fig. 1). The PERMANOVA allowed us to observe the differences between organs and treatments (P < 0.05), and with the paired PERMANOVA, organ-specific differences were found in the stems and leaves regardless of the infection; in addition, in the roots, there were differences in the chemodiversity of the seedlings caused by the infection (P < 0.05) (Table 7).

The increases in three constitutive alkaloids stand out: lirindine (61%) and papaverine (403%) in the roots and 2-(methylamino)-3-phenylindole (143%) in the leaves. Due to the infection, no new alkaloids were detected in any organ (SM 1).

Table 3
Organ-specific presence of constitutive alkaloids in two developmental stages of *Annona purpurea*.

Alkaloids	Seedlings			Adult trees		
	Roots	Stems	Leaves	Roots	Stems	Leaves
Indol, 2-(Methylamino)-3-phenyl	×	×	×	×	×	–
Reticuline	×	×	×	×	–	–
Glaucine	×	×	×	–	–	×
Thalicsimidine	×	×	×	–	×	×
Thalbaicalidine	×	×	×	–	–	×
Magnoflorine	×	×	×	–	×	×
7-Hydroxydehydroglaucine	×	×	×	–	×	×
7-Hydroxydehydrothalicsimidine	×	×	×	–	×	×
Oxopurpureine	×	×	×	–	×	×
Lirindine	×	×	×	×	–	×
Tetrahydroisoquinoline	×	×	–	×	×	×
Isoquinoline, 6,7,8-trimethoxy	×	–	–	×	–	–
N-Methylaurotetanine	×	–	–	×	–	–
Thalifoline	×	–	–	×	×	–
Papaverine	×	–	–	×	×	–

References for the alkaloids in the adult individuals (De-la-Cruz-Chacón et al., 2019).

Table 4
Diversity indices of constitutive alkaloids in the *Annona purpurea* seedlings.

Index	Roots	Stems	Leaves	P-value
Margalef	4.99 ± 0.12 (A)	4.09 ± 0.20 (B)	3.48 ± 0.32 (C)	≤0.05
Shannon-Wiener	1.99 ± 0.05 (A)	1.64 ± 0.06 (B)	1.37 ± 0.08 (C)	≤0.05
Simpson	0.84 ± 0.01 (A)	0.75 ± 0.01 (B)	0.69 ± 0.02 (C)	≤0.05

Results are presented as means value ± standard deviation. The values were statistically tested using ANOVA. Means followed by the different letter (A, B and C) differ by the Tukey's pairwise test at 95% reliability. For Margalef (F = 77.69; X² = 4.07); Shannon-Wiener (F = 154; X² = 0.66) and Simpson (F = 121.3; X² = 0.03).

Table 5
Distribution of alkaloids in the *Annona purpurea* seedlings not inoculated and inoculated with *Colletotrichum gloeosporioides*.

Alkaloids	Seedlings not inoculated	Seedlings inoculated
* Indol, 2-(Methylamino)-3-phenyl	R, S, L	R, S, L
Stepharine	R, S, L	R, S, L
* Reticuline	R, S, L	R, S, L
* Glaucine	R, S, L	R, S, L
* Thalicsimidine	R, S, L	R, S, L
* Thalbaicalidine	R, S, L	R, S, L
* Magnoflorine	R, S, L	R, S, L
* 7-Hydroxydehydroglaucine	R, S, L	R, S, L
* 7-Hydroxydehydrothalicsimidine	R, S, L	R, S, L
Melosmidine	R, S, L	R, S, L
* Oxopurpureine	R, S, L	R, S, L
2-phenyl-3,4,5,6-tetramethylpyridine	R, S, L	R, S
* Lirindine	R, S	R, S
(+)-Roemerine	R, S	R, S
* Tetrahydroisoquinoline	R, S	R, S
* Isoquinoline, 6,7,8-trimethoxy	R	R
* Thalifoline	R	R
Norstephalagine	R	R
* Papaverine	R	R
* N-Methylaurotetanine	R	–
Pronuciferine	S, L	S, L

Roots (R), stems (S), and leaves (L). Constitutive alkaloids = “*”.

Table 6

Indices of induced alkaloid diversity in the *Annona purpurea* seedlings inoculated with *Colletotrichum gloeosporioides*.

Index	Roots	Stems	Leaves	P -value
Margalef	4.85 ± 0.12 (A)	4.17 ± 0.01 (B)	3.44 ± 0.13 (C)	≤0.05
Shannon-Wiener	1.92 ± 0.29 (A)	1.62 ± 0.10 (B)	1.41 ± 0.04 (B)	≤0.05
Simpson	0.80 ± 0.12 (A)	0.75 ± 0.03 (A)	0.70 ± 0.01 (A)	≥0.05

Results are presented as means value ± standard deviation. The values were statistically tested using ANOVA. Means followed by the different letter (A, B and C) differ by the Tukey's pairwise test at 95% reliability. For Margalef ($F = 320$; $X^2 = 3.48$); Shannon-Wiener ($F = 13.77$; $X^2 = 0.045$) and Simpson ($F = 2.93$; $X^2 = 0.01$).

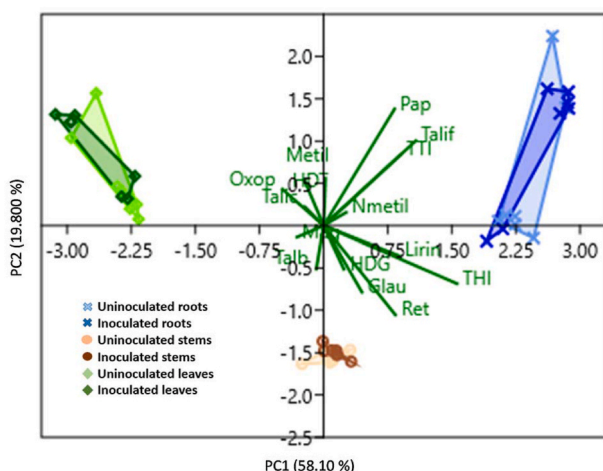


Fig. 1. Principal component analysis of the alkaloids present in the organs of uninoculated and inoculated seedlings. The arrows are the vectors that indicate the correlation between the alkaloids and the organs in the two treatments. TTI (Isoquinoline, 6,7,8-trimethoxy); Talif (Thalifoline); Lirin (Lirinidine); THI (Tetrahydroisoquinoline); Methyl (Indol, 2-(methylamino)-3-phenyl); Nmethil (N-methyl-laurotetanine); Pap (Papaverine); Ret (Reticuline); Glau (Glaucine); Talic (Thalicsimidine); Talb (Thalbaicalidine); Mag (Magnoflorine); HDG (7-hydroxy-dehydroglaucine); HDT (7-Hydroxy-dehydrothalicsimidine); Oxop (Oxopurpureine).

Table 7

Similarity values between the groups obtained in the paired PERMANOVA.

Groups	Roots PC	Roots PI	Stems PC	Stems PI	Leaves PC
Roots PI	0.0260 *				
Stems PC	0.0009 ***	0.0004 ***			
Stems PI	0.0002 ***	0.0005 ***	0.2354		
Leaves PC	0.0009 ***	0.0007 ***	0.0007 ***	0.0006 ***	
Leaves PI	0.0003 ***	0.0008 ***	0.0009 ***	0.0005 ***	0.2541

PC = Control seedlings; PI = infected seedlings. *P = 0.01; ***P = 0.0001.

4. Discussion

4.1. Differences in constitutive alkaloids between organs of *Annona purpurea* seedlings

In the adult plants, 23 alkaloids were recorded (De-la-Cruz-Chacón et al., 2019), while in the seedlings, 21 were detected; of these 21, 15 were constitutive, and six were exclusive to these stages of development (Table 1). While the alkaloids anonnaine, nuciferine, annomontine, xylopine, puterine, thalimicrinone, isocorydine, and liriodenine were

not found in seedlings, it is likely that their biosynthesis in *A. purpurea* occurs at more advanced stages of development. The 15 constitutive alkaloids are biosynthesized during the first phases of development, in which the expression of two biosynthetic pathways can also be verified, that of the benzyloisoquinolines whose precursor is tyrosine (Funayama and Cordell, 2015) and to a lesser extent that of the β -carboline derived from tryptamine (Nikam et al., 2013), pathways that are expressed simultaneously from the beginning of the vegetative state. The presence of common alkaloids and other different alkaloids with variable distributions in seedlings results in this stage of development having characteristics present in adult stages, such as specific tissue distribution, spatiotemporal regulation, and alkaloid biosynthesis regulation (De-la-Cruz-Chacón and González-Esquina, 2012).

In the seedlings, 9 of the 15 alkaloids were distributed, but this distribution changed in the adult specimens. This can be associated with exposure to variable environmental conditions, such as the annomontine and oxopurpureine content in the organs of wild *A. purpurea* trees (De-la-Cruz-Chacón et al., 2019) or to liriodenine content in organs of *Annona lutescens* (Castro-Moreno et al., 2013). On the other hand, the presence of alkaloids in all the organs of seedlings that were grown under controlled light conditions could be associated with a genetically programmed high level of constitutive defense, since defenses are assigned and distributed in direct proportion to risk of the tissue of being attacked, and the value of that tissue in terms of fitness loss (Stamp, 2003). It is known the antifungal properties of oxopurpureine against *Curvularia lunata*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopercsici*, *Colletotrichum gloeosporioides* (Sonnet and Jacobson, 1971; Chang et al., 1998; Chang et al., 1998b; De-la-Cruz-Chacón et al., 2019); reticuline against *Trichophyton rubrum* (De-Q-Paulo et al., 1992), thalifoline against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopercsici* (Patiño and Cuca, 2011) and magnoflorine against *Trichophyton rubrum* and *T. mentagrofito* (Luo et al., 2020). In the seedlings, the constituent alkaloids were distributed in the three organs. Organ-specific distribution strategies have been documented in indole alkaloids in seedlings of *Catharanthus roseus* (L.), where most of the genes that control the biosynthesis of this type of alkaloid are expressed in all tissues from the development of seedlings. On the other hand, the genes involved in the last stages of the biosynthesis of the alkaloid vindoline are only expressed in the aerial parts of the plant (De Luca et al., 1986). In addition, possibly due to the compartmentalization of enzymes, mobilization and accumulation in different organs can be an important strategy for the plant. Additionally, the family of genes involved in the biosynthesis of benzyloisoquinoline alkaloids has organ-specific expression regulated by development; for example, the enzyme tyrosine decarboxylase (TYDC), which participates at the beginning of the pathway, is associated with the vascular tissues of stems and mature roots, although it can also be expressed in the cortical and epidermal tissues of *Papaver somniferum* leaves and young plant buds (Facchini and de Luca, 1995). Other enzymes, such as norcoclaurine synthase (NCS), salutaridine synthase (SalSyn), and salutaridine reductase (SaIR), are involved in more advanced steps in the biosynthesis of morphine and are more abundant in roots and shoots than in the remainder of the plant (Gerady and Zenk, 1993; Unterlinner et al., 1999; Huang and Kutchan, 2000).

4.2. Differences in induced alkaloids between organs of *Annona purpurea* seedlings infected with *Colletotrichum gloeosporioides*

Secondary metabolism responds to interactions with phytopathogenic fungi, activating defense mechanisms, either by increasing some of the existing metabolites (phytoanticipins or constitutive metabolites) or by biosynthesizing others (phytoalexins or induced metabolites) (Freeman and Beattie, 2008).

The alkaloid profile of *A. purpurea* is minimally modified by infection with *C. gloeosporioides*. The only difference between healthy and infected seedlings is the absence of N-methyl-laurotetanine in the latter (Table 5). The greater richness and diversity of alkaloids in response to infection

with *C. gloeosporioides* was similar to that reported in healthy seedlings (Table 6). Frequently, in Annonaceae and *A. purpurea*, the most alkaloids is found in the roots (Castro-Moreno et al., 2013; Riley-Saldaña et al., 2017; De-la-Cruz-Chacón et al., 2019), as reported here in *A. purpurea* seedlings and in *A. muricata* by Riley-Saldaña et al. (2017), as well as in adults of *A. purpurea* by Rejón-Orantes et al. (2011) and De-la-Cruz-Chacón et al. (2019). To date, they had been considered storage or sink organs of alkaloids (Bais et al., 2001).

With *C. gloeosporioides* infection, three alkaloids can be considered phytoalexins by increasing their abundance; in the roots and leaves, only three constitutive alkaloids increased. These findings coincide with the increase in asimilobine (roots, 8%; stems, 10%), anonaine (roots, 10%; leaves, 8%), norruciferine (stems, 1200%), and reticuline (stems and leaves, 10%) caused by *C. gloeosporioides* in *A. muricata* (Riley-Saldaña, 2019). In *A. purpurea* seedlings, the interaction with *C. gloeosporioides* affects the abundance of some alkaloids by decreasing or increasing their concentration. Apparently, this phytopathogen induces a dynamic cycle of turnover in alkaloid metabolic pathways, in which one alkaloid decreases and another increases. For example, the possible turnover of aporphines of similar structures, such as glaucine vs. thalbaicalidine, differs by hydroxylation or 7-hydroxydehydroglaucine vs. 7-hydroxydehydrothalicsimidine by methoxylation or even repression of N-methyl-laurotetanine. However, the biosynthetic pathways that produce these compounds are not known.

In the three organs of the control and infected seedlings, reticuline was found, a molecule diverse benzyloisoquinoline alkaloid pathways (Beaudoin and Facchini, 2014), with a greater abundance in the roots. Its presence could indicate that perhaps some alkaloids are biosynthesized in this organ, and thus, it presents a greater diversity. This precursor alkaloid decreased with fungal induction, coinciding with the increase in alkaloids derived from it, such as papaverine (403%) and lirinidine (61%), in the roots (Supplementary material).

Although the leaves and stems were the sites infected with *C. gloeosporioides*, the seedlings responded with an induction of one alkaloid in the leaves and two in the roots, suggesting the possibility of a systemic response. The changes in the alkaloid profile in the infected seedlings of *A. purpurea* suggest a defense mechanism against this pathogen since the biological activities of the two induced alkaloids, lirinidine and papaverine, are known (Zhu et al., 2014; Kim et al., 2014; Yano et al., 2020; Zhou and Zhu, 2019; Jafaar et al., 2021). The latter has been tested for antibacterial activity *in vitro* against *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (180 µg mL⁻¹) and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (90 µg mL⁻¹) (Jafaar et al., 2021). Therefore, their early presence as constitutive alkaloids that can be induced with *C. gloeosporioides* suggests that they participate in the defense mechanisms of the plant in its natural environment.

5. Conclusions

The richness and diversity of alkaloids in *A. purpurea* seedlings originate from two metabolic pathways that are conserved as constitutive alkaloids in adult specimens. The greatest diversity of alkaloids is in the roots; nine alkaloids are distributed throughout the seedling, and six are exclusive to the roots. The constitutive operational term allowed us to determine the dynamics and significance of constant alkaloid biosynthesis before biotic induction. Infection with *C. gloeosporioides* does not cause changes in most of these alkaloids, although it produces an increase in three of them, and this result enabled us to assume that they participate in the defense mechanism against this phytopathogen.

Author statement

This research received additional support from an organization beyond the authors' academic institutions.

The first author thanks the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) as one of its scholarship recipients (CVU 580453).

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data availability

No data was used for the research described in the article.

Acknowledgments

The first author thanks the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) as one of its scholarship recipients (CVU 580453) and Instituto de Ciencia, Tecnología e Innovación de Chiapas (ICTI) for partial financing. This article contains part of the results from the thesis project for the Doctorado en Ciencias en Biodiversidad y Conservación de Ecosistemas Tropicales at the Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas (UNICACH). We thank Dr. Wilfredo A. Matamoros Ortega at the Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas for the data analysis support and the personnel at the Laboratorio de Fisiología y Química Vegetal, Instituto de Ciencias Biológicas, Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.bse.2023.104611>.

References

- Anaya, A.L., Cruz-Ortega, R., Waller, G.R., 2006. Metabolism and ecology of purine alkaloids. *Front. Biosci.* 11, 2354–2370. <https://doi.org/10.2741/1975>.
- Bais, H.P., Loyola-Vargas, V.M., Flores, H.E., Vivanco, J.M., 2001. Root-specific metabolism: the biology and biochemistry of underground organs. *Vitro Cell Dev. Biol. Plant* 37, 730–741. <https://doi.org/10.1007/s11627-001-0122-y>.
- Beaudoin, G.A., Facchini, P.J., 2014. Benzyloisoquinoline alkaloid biosynthesis in opium poppy. *Planta* 240, 19–32. <https://doi.org/10.1007/s00425-014-2056-8>.
- Bostock, R.M., Karban, R., Thaler, J.S., Weyman, P.D., Gilchrist, D., 2001. Signal interactions in induced resistance to pathogens and insect herbivores. *Eur. J. Plant Pathol.* 107, 103–111. <https://doi.org/10.1023/A:1008703904253>.
- Cambero-Ayón, C.B., Luna-Esquivel, G., Rios-Velasco, C., Díaz-Heredia, M., Rodríguez-Palomera, M., Betancourt-Aranguré, A., Cambero-Campos, O.J., 2019. Causal agents of rot in Sourpomp fruit (*Annona muricata* L.) in Nayari, Mexico. *Rev. Biociencias* 6, e538. <https://doi.org/10.15741/revbio.06.e538>.
- Castro-Moreno, M., Tinoco-Ojangurén, C.L., Cruz-Ortega, M.R., González-Esquinca, A.R., 2013. Influence of seasonal variation on the phenology and lirinidine content of *Annona lutescens* (Annonaceae). *J. Plant Res.* 126, 529–537. <https://doi.org/10.1007/s10265-013-0550-x>.
- Chang, F.R., Wei, J.L., Teng, C.M., Wu, Y.C., 1998. Two new 7-dehydroaporphine alkaloids and antiplatelet action aporphines from the leaves of *Annona purpurea*. *Phytochemistry* 49, 2015–2018. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(98\)00376-8](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(98)00376-8).
- Chang, F.R., Wei, J.L., Teng, C.M., Wu, Y.C., 1998b. Antiplatelet aggregation constituents from *Annona purpurea*. *J. Nat. Prod.* 61, 1457–1461. <https://doi.org/10.1021/np9800046>.
- Chang, F.R., Chen, C.Y., Wu, P.H., Kuo, R.Y., Chang, Y.C., Wu, Y.C., 2000. New alkaloids from *Annona purpurea*. *J. Nat. Prod.* 63, 746–748. <https://doi.org/10.1021/np990548n>.
- Chávez, D., Mata, R., 1998. Purpurediolin and purpurenin, two new cytotoxic adjacent bis-tetrahydrofuran Annonaceae acetogenins from the seeds of *Annona purpurea*. *J. Nat. Prod.* 61, 580–584. <https://doi.org/10.1021/np970410->.
- De-la-Cruz-Chacón, I., González-Esquinca, A.R., 2012. Lirinidine alkaloid in *Annona diversifolia* during early development. *Nat. Prod. Res.* 26, 42–49. <https://doi.org/10.1080/14786419.2010.533373>.
- De-la-Cruz-Chacón, I., Riley-Saldaña, C.A., Arrollo-Gómez, S., Sancristóbal-Domínguez, T.J., Castro-Moreno, M., González-Esquinca, A.R., 2019. Spatio-temporal variation of alkaloids in *Annona purpurea* and the associated influence on their antifungal activity. *Chem. Biodivers.* 16, 1–14. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201800284>.
- De-Luca, V., Balsevich, J., Tyler, R.T., Eilert, U., Panchuk, B.D., Kurz, W.G., 1986. Biosynthesis of indole alkaloids: developmental regulation of the biosynthetic pathway from tabersonine to vindoline in *Catharanthus roseus*. *J. Plant Physiol.* 125, 147–156. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(86\)80252-8](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(86)80252-8).
- De-Q-Paulo, M., Barbosa-Filho, J.M., Lima, E.O., Maia, R.F., Barbosa, R. de C., Kaplan, M. A., 1992. Antimicrobial activity of benzyloisoquinoline alkaloids from *Annona salzmanii* D.C. *J. Ethnopharmacol.* 36 (1), 39–41. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(92\)90058-Y](https://doi.org/10.1016/0378-8741(92)90058-Y).

- Díaz-Godínez, C., Ontiveros-Rodríguez, J.C., Ríos-Valencia, D.G., Herbert-Pucheta, J.E., Zepeda-Vallejo, L.G., Carrero, J.C., 2020. Anti-amoebic activity of leaf extracts and aporphine alkaloids obtained from *Annona purpurea*. *Planta Med.* 86, 425–433. <https://doi.org/10.1055/a-1111-9566>.
- Facchini, P., De-Luca, V., 1995. Expression in *Escherichia coli* and partial characterization of the two tyrosine/DOPA decarboxylases from Opium poppy. *Phytochemistry* 38, 1119–1126. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(94\)00814-A](https://doi.org/10.1016/0031-9422(94)00814-A).
- Freeman, B.C., Beattie, G.A., 2008. On Overview of plant defenses against pathogens and herbivores. *Plant Health Instr.* 1–14 <https://doi.org/10.1094/PHI-I-2008-0226-01>.
- Funayama, S., Cordell, G.A., 2015. Alkaloids derived from phenylalanine and tyrosine. In: *Alkaloids a Treasury of Poisons and Medicines*. Elsevier, London. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417302-6.00001-5>.
- Gerady, R., Zenk, M.H., 1993. Formation of salutaridine from (R)-reticuline by a membrane-bound cytochrome P-450 enzyme from *Papaver somniferum*. *Phytochemistry* 32, 79–86. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(92\)80111-Q](https://doi.org/10.1016/0031-9422(92)80111-Q).
- Guinaudeau, H., Lebeuf, M., Cavé, A., 1975. Aporphine alkaloids. *Lloydia* 38, 275–338.
- Guinaudeau, H., Lebeuf, M., Cavé, A., 1979. Aporphine alkaloids II. *J. Nat. Prod.* 42, 325–360. <https://doi.org/10.1021/np50004a001>.
- Guinaudeau, H., Lebeuf, M., Cavé, A., 1983. Aporphine alkaloids III. *J. Nat. Prod.* 46, 761–835. <https://doi.org/10.1021/np50030a001>.
- Guinaudeau, H., Lebeuf, M., Cavé, A., 1994. Aporphinoid alkaloids V. *J. Nat. Prod.* 57, 1033–1135. <https://doi.org/10.1021/np50110a001>.
- Guinaudeau, H., Lebeuf, M., Cavé, A., 1998. Aporphinoid alkaloids IV. *J. Nat. Prod.* 51, 389–474. <https://doi.org/10.1021/np50057a001>.
- Huang, F.C., Kutchan, T.M., 2000. Distribution of morphinan and benzo[c]phenanthridine alkaloid gene transcript accumulation in *Papaver somniferum*. *Phytochemistry* 53, 555–564. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(99\)00600-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(99)00600-7).
- Jafaar, H.J., Isbilen, O., Volkan, E., Sariyar, G., 2021. Alkaloid profiling and antimicrobial activities of *Papaver glaucum* and *P. decaisnei*. *BMC Res. Notes* 14, 348. <https://doi.org/10.1186/s13104-021-05762-x>.
- Juárez-Becerra, G.P., Sosa-Morales, M.E., López-Malo, A., 2010. Hongos fitopatógenos de alta importancia económica: descripción y métodos de control. *Ingeniería de Alimentos*. 4, 14–23.
- Kim, J.H., Ryu, Y.B., Lee, W.S., Kim, Y.H., 2014. Neuraminidase inhibitory activities of quaternary isoquinoline alkaloids from *Corydalis turtschaninovii* rhizome. *Bioorg. Med. Chem.* 22, 6047–6052. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2014.09.004>.
- Luna-Cazares, L.M., González-Esquina, A.R., 2015. La chincuya (*Annona purpurea* Moc. & Sessé ex Dunal): una planta Mesoamericana. Recursos fitogenéticos de las anonáceas en el estado de Veracruz. In: Vidal-Lezama, E., Vidal-Martínez, N.A., Vidal-Hernández, L. (Eds.), *Anonáceas Plantas Antiguas Estudios Recientes*. Chapingo. Texcoco. Parte 2.
- Luo, N., Jin, L., Yang, C., Zhu, Y., Ye, X., Li, X., Zhang, B., 2020. Antifungal activity and potential mechanism of magnoflorine against *Trichophyton rubrum*. *J. Antibiot.* 74 (3), 206–214. <https://doi.org/10.1038/s41429-020-00380-4>.
- Mediavilla, S., Martínez-Ortega, M., Andrés, S., et al., 2022. Premature losses of leaf area in response to drought and insect herbivory through a leaf lifespan gradient. *J. For. Res.* 33, 39–50. <https://doi.org/10.1007/s11676-021-01351-7>.
- National Institute of Standards and Technology, 2021. The NIST Mass Spectral Search Program For the NIST/EPA/NIH Mass Spectra Library version 2.2 (accessed 10 Jun 2021).
- Nikam, T.D., Nitnaware, K.M., Ahire, M.L., 2013. Alkaloids derived from tryptophan: harmine and related alkaloids. In: Ramawat, K., Mérillon, J.M. (Eds.), *Natural Products*. Springer, Heidelberg, Berlin. https://doi.org/10.1007/978-3-642-22144-6_20.
- Patino, O.J., Cuca, L.E., 2011. Monophyllidin, a new alkaloid L-proline derivative from *Zanthoxylum monophyllum* 4 (1), 22–25. <https://doi.org/10.1016/j.phyto.2010.10.002>.
- Rahman, M.M., Parvin, S., Haque, E.M., Islam, E.M., Mosaddik, M.A., 2005. Antimicrobial and cytotoxic constituents from the seeds of *Annona squamosa*. *Fitoterapia* 484–489. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2005.04.002>.
- Rejón-Orantes, J., González-Esquina, A.R., De-la-Mora, M., Roldan-Roldan, G., Cortes, D., 2011. Annonomintine, an alkaloid isolated from *Annona purpurea*, has anxiolytic-like effects in the elevated plus-maze. *Planta Med.* 77, 322–327. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1250406>.
- Riley-Saldaña, C.A., 2019. Metabolitos constitutivos e inducidos de *Annona muricata*. PhD thesis. Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Riley-Saldaña, C.A., Cruz-Ortega, M.D.R., Martínez-Vázquez, M., De-la-Cruz-Chacón, I., Castro-Moreno, M., González-Esquina, A.R., 2017. Acetogenins and alkaloids during the initial development of *Annona muricata* L. (Annonaceae). *Z. Naturforsch., C: J. Biosci.* 72, 497–506. <https://doi.org/10.1515/znc-2017-0060>.
- Rivero, G.D., Cruz, T.A., Rodríguez, P.A.T., Echevarría, H.A., Martínez, C.B., 2012. Hongos asociados al manchado del grano en la variedad de arroz INCA LP-5 (*Oryza sativa* L.) en Cuba. *Rev. Soc. Venez. Microbiol.* 32, 131–138.
- Rodríguez-López, E.S., Cárdenas-Soriano, E., Hernández-Delgado, S., Gutiérrez-Diez, A., Mayek-Pérez, N., 2013. Análisis de la infección de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. de frutos de aguacatero. *Rev. Bras. Frutic.* 35, 898–905. <https://doi.org/10.1590/S0100-29452013000300029>.
- Sonnet, P.E., Jacobson, M., 1971. Tumor inhibitors. II. Cytotoxic alkaloids from *Annona purpurea*. *J. Pharmacol. Sci.* 60, 1254–1256. <https://doi.org/10.1002/jps.2600600835>.
- Stamp, N., 2003. Out of the quagmire of plant defense hypotheses. *Q. Rev. Biol.* 78, 23–55. <https://doi.org/10.1086/367580>.
- Unterlinner, B., Lenz, R., Kutchan, T.M., 1999. Molecular cloning and functional expression of codeinone reductase: the penultimate enzyme in morphine biosynthesis in the opium poppy *Papaver somniferum*. *Plant J.* 18, 465–475. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1999.00470.x>.
- Vikas, B., Anil, S., Remani, P., 2019. Cytotoxicity profiling of *Annona squamosa* in cancer cell lines. *Asian Pac. J. Cancer Prev. APJCP* 20, 2831–2840. <https://doi.org/10.31557/APJCP.2019.20.9.2831>.
- Yano, M., Nakashima, S., Oda, Y., Nakamura, S., Matsuda, H., 2020. BBB-permeable aporphine-type alkaloids in *Nelumbo nucifera* flowers with accelerative effects on neurite outgrowth in PC-12 cells. *J. Nat. Med.* 74, 212–218. <https://doi.org/10.1007/s11418-019-01368-7>.
- Zhou, T., Zhu, Y., 2019. Cascade signals of papaverine inhibiting LPS-induced retinal microglial activation. *J. Mol. Neurosci.* 68, 111–119. <https://doi.org/10.1007/s12031-019-01289-w>.
- Zhu, W., Liu, S., Zhao, J., Liu, S., Jiang, S., Li, B., Yang, H., Fan, C., Cui, W., 2014. Highly flexible and rapidly degradable papaverine-loaded electrospun fibrous membranes for preventing vasospasm and repairing vascular tissue. *Acta Biomater.* 10, 3018–3028. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.03.023>.

VII. DISCUSIÓN

Delimitación de los términos constitutivo e inducido en *Annona purpurea*

Los metabolitos secundarios, como señalan Hower y Schaler (2008) son rasgos que pueden expresarse constitutivamente como una resistencia preformada o pueden ser inducidos después del ataque de insectos herbívoros, de manera que estos términos se asocian a la teoría de la defensa (Kaplan et al. 2008), incluso en estas interacciones planta-herbívoro la frontera entre defensas constitutivas e inducidas son nebulosas, aún faltan por investigar y comprender (Dicke et al. 1999 en Bruinsma y Dicke, 2008), es decir generalmente se expresan de manera constitutiva en un cierto nivel que, bajo la presión de los herbívoros, puede aumentarse mediante síntesis inducida o producir “nuevas” moléculas. En tanto que la defensa frente a patógenos, los reportes (Jasiński et al. 2009) señalan la inducción de la biosíntesis de nuevas moléculas con actividad antimicrobiana (fitoalexinas). En este trabajo se asociaron los términos de la defensa de la herbivoría a la defensa frente a patógenos, analizando tanto las moléculas preformadas (constitutivas) como aquellas que incrementaron su abundancia (inducidas) como respuesta a la infección fúngica.

También es necesario comentar que los perfiles químicos por lo general están asociados a las etapas fenológicas de las plantas (Riley-Saldaña et al. 2017 y Toledo-González et al. 2023), cuando estos se conservan desde etapas de desarrollo temprano hasta la etapa reproductiva se puede especular que estas son moléculas constitutivas de su metabolismo secundario y que éstos podrían responder al ataque no sólo de herbívoros sino también de organismos patógenos (Riley-Saldaña et al. 2022 y Toledo-González et al. 2023). Aunque son escasos los reportes de metabolitos secundarios comparativos entre árboles y plántulas (Riley-Saldaña et al. 2017 y Toledo-González et al. 2023), en el presente estudio se contrastó el perfil alcaloidal de árboles y plántulas de *Annona purpurea*, para caracterizar a los alcaloides constitutivos y posteriormente conocer la respuesta de inducción por los hongos fitopatógenos.

Variación órgano-específica

Los alcaloides, al igual que muchos otros tipos de metabolitos, pueden distribuirse en toda la planta, como la glaucina en plantas adultas de *A. purpurea* (De-la-Cruz-Chacón et al. 2019), la reticulina en *A. muricata* (Riley-Saldaña et al. 2017), la liriodenina en *A. lutescens*

(Castro-Moreno et al. 2013). Es posible también que estén restringidos a algún órgano, como la papaverina (De-la-Cruz-Chacón et al. 2019; Toledo-González et al. 2023) y la puterina en las raíces de *A. purpurea* (De-la-Cruz-Chacón et al. 2019). En este trabajo, de 23 alcaloides, reportados en árboles de *A. purpurea* (De-la-Cruz-Chacón et al. 2019), 15 se encontraron en plántulas (Cuadro 4); de los cuales nueve se encuentran distribuidos en toda la plántula: indol, 2-(Metilamino)-3-fenilindol, reticulina, glaucina, talicsimidina, talbaicalidina, magnoflorina, 7-hidroxidehidroglaucina, 7-hidroxidehidrotalicsimidina y Oxopurpureina (Cuadro 4). En tanto que los alcaloides N- metil-lauratetantina, lirinidina, 6,7,8-trimetoxi- isoquinolina y talifolina no fueron perceptibles en todas las plántulas testigo (Cuadro 6). Sin embargo, la papaverina sólo estuvo en las raíces.

Llama la atención que en las plántulas de *A. purpurea* la mayoría de los alcaloides se distribuyen en toda la planta, mientras que en el caso de los árboles de esta especie, únicamente un alcaloide (tetraisoquinolina) tiene una distribución generalizada (De-la-Cruz-Chacón et al. 2019) esto podría deberse a que las plántulas son más vulnerables a la herbivoría o al establecimiento de microorganismos y necesitan una mayor defensa. Estos datos coinciden con lo esperado por la teoría de la defensa de la herbivoría en donde la planta destinará parte de sus recursos a la protección de órganos importantes o vulnerables (Kaplan et al. 2008).

Por otro lado, la producción de alcaloides en todos los tejidos de la planta en condiciones controladas de luz, temperatura y humedad y sin la presencia de herbívoros o patógenos refuerza la inferencia de que se trata de alcaloides constitutivos, y realza su importancia en el desarrollo de las plántulas en condiciones naturales. Uno de los pocos ejemplos de distribución generalizada está documentado en los alcaloides quinolizidínicos de especies del género *Lupinus*, los cuales se encuentran en proporciones distintas en toda la planta, con mayor abundancia en los órganos con funciones más relevantes para la sobrevivencia y reproducción, tales como las flores y las semillas (Cely-Veloza et al. 2023). En nuestro caso, el hecho de que muchos de los alcaloides se presenten en toda la plántula puede constituir una estrategia de defensa de *A. purpurea* en este estado de desarrollo temprano, y/o también que estas moléculas se encuentren en tránsito desde sus sitios de biosíntesis hacia órganos sumidero como las raíces. (Bais et al. 2001). La papaverina N-

metil-laurotetanina y la 6,7,8-trimethoxi-isoquinolina están solamente en las raíces, presentando una distribución órgano-específica.

La importancia de la distribución de alcaloides entre los órganos está sustentada en trabajos de la familia Annonaceae. De-la-Cruz-Chacón y González-Esquinca (2012) reportaron en *Annona diversifolia* la variación del alcaloide liriodenina asociada con el grado de desarrollo y diferenciación de tejidos. Este alcaloide fue detectado en el endospermo durante la imbibición de las semillas, más tarde en la radícula y en el hipocótilo, alcanzando su máxima concentración en plántulas de seis hojas. Además, este estudio permitió inferir y probar que el alcaloide liriodenina forma parte de la defensa antifúngica contra los hongos *R. stolonifer* y *Aspergillus glaucus* L. aislados de las mismas semillas y que desaparecen justo con la presencia e incremento de liriodenina, cuando emerge la radícula (De-la-Cruz-Chacón et al. 2011). Por su parte, Riley-Saldaña et al. (2017) determinaron que la biosíntesis de alcaloides y acetogeninas se produce simultáneamente durante las etapas iniciales de desarrollo en *A. muricata*, detectaron cuatro acetogeninas mono tetrahidrofurano (THF) en las primeras etapas: cis-uvarimicina IV, mosinona, muricina B y cis-anononacin-10-ona. Las primeras dos acetogeninas aparecen en las raíces cuando el crecimiento aún depende del material de reserva (reportadas también en raíces de individuos adultos); mientras que las demás sólo están presentes cuando la planta es fotosintéticamente activa (reportadas también en hojas y semillas de individuos adultos). La presencia de estas acetogeninas en la fase fotosintética de la planta indica que cumplen una función importante, aunque no siempre conocida, en esta etapa de desarrollo. Por ejemplo, las acetogeninas laherradurina y rolliniastatin-2, presentes en plántulas de *A. muricata* cumplen una función larvicida *in vitro* (GonzálezColoma et al. 2002). De manera similar, los alcaloides que se detectaron en las etapas de desarrollo temprano de *A. muricata* (reticulina, coreximina, anonaína, asimilobina y nornuciferina) se comparten con las plantas adultas (Riley-Saldaña et al. 2017) y muestran una distribución espacio-temporal y órgano-específica. Por ejemplo, la reticulina se ha detectado cuando la radícula emerge; lo que indica una biosíntesis temprana que depende del material de reserva del endospermo. Este compuesto es el precursor para la diversificación de otros alcaloides isoquinolínicos, entre ellos los bencilisoquinolínicos (De-la-Cruz-Chacón et al. 2012).

La distribución espacio-temporal y órgano-específica de metabolitos secundarios se ha reportado en otras familias. Por ejemplo, la biosíntesis de cafeína exclusivamente en las hojas de *Camellia sinensis* (Theaceae; Wang et al. 2016) y *Nicotiana tabacum* cv Xanthi (Solanaceae; Uefuji et al. 2005). También existen ejemplos de metabolitos que se inducen por estímulos ambientales, como el incremento en la concentración de cafeína en las hojas de *Coffea arabica* (Rutaceae) por la infección de la roya *Hemileia vastatrix* (Lujan-Hidalgo, 2020). Al parecer, las plantas destinan mayor protección a los tejidos de más valía para la sobrevivencia, como las raíces y las hojas (Kaplan et al. 2008).

Respuesta a la infección

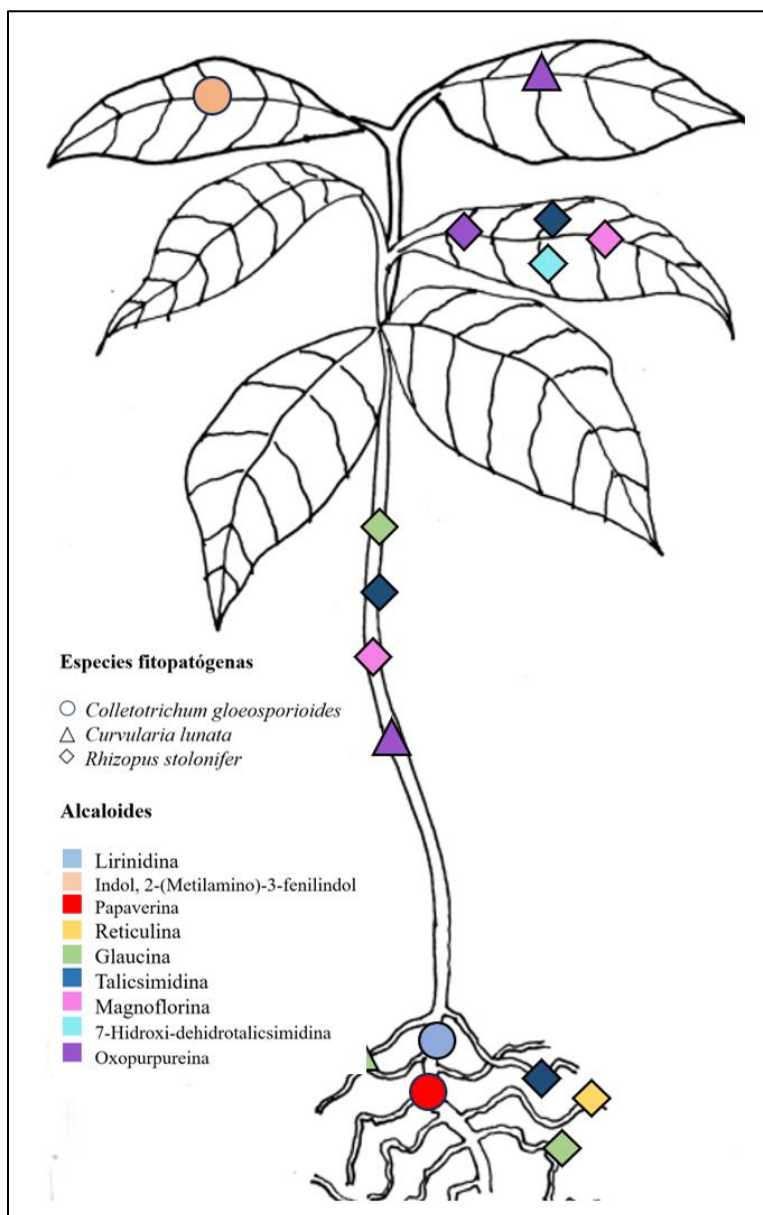


Figura 11. Esquema que señala la inducción alcaloidal en raíces, tallos y hojas de *Annona purpurea* por tres hongos fitopatógenos.

La base fisiológica y bioquímica de la resistencia de plantas al ataque de patógenos, hongos y bacterias, se encuentra relacionada con la biosíntesis de metabolitos secundarios implicados en los procesos infecciosos (García-Mateos & Pérez-Leal, 2003). Están documentados los cambios anatómicos y fisiológicos de plantas producidos por la infección fúngica (Riley-Saldaña et al. 2017, 2019; Murría et al. 2022; Toledo-González et al. 2023).

En este trabajo se documentan los cambios en el perfil de alcaloides ocurridos en plántulas de *A. purpurea* y al aparecer síntomas visibles de infección fúngica con *C. gloeosporioides*, *C. lunata* y *R. stolonifer*. Este tipo de modulación alcaloidal también se ha observado en *A. muricata* (Riley-Saldaña et al. 2019).

Al infectar a plántulas sanas de *A. purpurea* con tres diferentes tipos de hongos, se pudo observar que la distribución de alcaloides se mantiene igual que en las plantas sanas (Artículo: Table 5; Página 58); pero no hay inducción de nuevos alcaloides y la modulación del perfil de alcaloides, suplementada en la abundancia, varía en función de la especie de hongo inoculado y que las respuestas o modulaciones alcaloidales significativas pueden ser locales, estar ausentes o ser de tipo generalizado (Figura 11). Riley-Saldaña et al. (2022) señalan que la infección de plántulas de *Annona muricata* por fitopatógenos indujo cambio en el perfil alcaloidal hasta de 1200% asociado a la especie fúngica. En tanto que Toledo-González et al. (2023) mostraron que la interacción de plántulas de *Annona purpurea* con *C. gloeosporioides* modificó el perfil constitutivo de los alcaloides incrementando en papaverina 403% en las raíces, y en contraparte, provocó la disminución del alcaloide oxoporpureína. Al comparar la inducción alcaloidal producida por cada una de las especies, se pueden ver diferentes modulaciones a) individuales que sólo son inducidas por un fitopatógeno en específico como liridinina, papaverina e indol, 2- (Metilamino)-3-fenilindol (*C. gloeosporioides*), magnoflorina, 7-hidroxi-dehidro-talicsimidina, talicsimidina y reticulina (*R. stolonifer*) (Figura 11) y b) compartidas que son inducidos por dos hongos como glaucina y oxoporpureína. (*C. lunata* y *R. stolonifer*). Por otra parte, talicsimidina fue el único alcaloide que se indujo en toda la plántula por *R. stolonifer*. Esto significaría que la maquinaria biosintética está regulada por el tipo de hongo, pero que hay partes de esas rutas de alcaloides bencilioquinolínicos que se expresan de forma sistemática. Además, la ruta de biosíntesis de alcaloides indólicos posiblemente fue “reprimida” o “silenciada” con *C. lunata*, ¿Qué es lo que está desencadenado estas respuestas particulares? Esta respuesta posiblemente sea parte de la defensa química de *A. purpurea* ante sus enemigos naturales, en este caso a hongos fitopatógenos.

Más aún, la repuesta observada no estaría asociada al tipo de nutrición, como sí, al grado de virulencia del fitopatógeno, ya que *C. gloeosporioides* es un hongo hemibiotrofo,

mientras que *R. stolonifer* y *C. lunata* son necrótrofos y su respuesta fue distinta en cada caso.

El posible papel de defensa química de los alcaloides identificados, están fundamentados en la actividad antifúngica de algunos de ellos, cinco de los nueve alcaloides de *A. purpurea* que presentaron un incremento en su abundancia ante la infección de hongos fitopatógenos tienen actividad biológica y han sido reportados, en algunos casos, en otras especies. MCE (2024) menciona que la lirinidina ((+)-lirinidina) tiene actividades antioxidantes y anticancerígenas, particularmente exhibe una actividad de poder reductor férrico medio y una actividad eliminadora de radicales menor *in vitro*; pero no se ha documentado alguna actividad antifúngica. Sin embargo, en este trabajo se observó que la lirinidina está sólo presente en tallos y raíces ante la infección de *C. gloeosporioides*.

De-la-Cruz-Chacón et al. (2019) probaron que la annomontina y la oxopurpureina, obtenidas de raíces de adultos de *A. purpurea*, poseen un potencial antifúngico contra *C. lunata*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* y *C. gloeosporioides*. En este trabajo la oxopurpureina aumentó su abundancia en tallos y hojas infectados con *C. lunata* y en hojas infectadas con *R. stolonifer*.

Por su parte, Morteza-Semnani et al. (2003) realizaron un experimento para conocer la actividad antifúngica con extractos metanólicos y alcaloides de partes aéreas de *Glaucium oxylobum*, donde identificaron cuatro alcaloides (dicentrina, glaucina, protopina y alfa-alocriptopina) como los compuestos responsables de la actividad antifúngica de esta planta. Glaucina sobre tres hongos: *Microsporium gypseum*, *Microsporium canis*, *Trichophyton mentagrophytes*. En nuestro trabajo con plántulas de *A. purpurea* la modulación de la glaucina fue evidente en el tratamiento con *C. lunata* (en raíces) y con *R. stolonifer* (en raíces y tallos).

Adicionalmente, Luo et al. (2021) reportaron que la magnoflorina tuvo actividad fungicida contra los hongos *Trichophyton rubrum* y *T. mentagrophyte*. La magnoflorina inhibió la germinación de los conidios y el crecimiento de las hifas; cambió la morfología del micelio, y ocasionó la contracción citoplasmática en *T. rubrum*. La magnoflorina no tuvo ningún efecto significativo sobre la integridad de la pared celular. Sin embargo, la magnoflorina destruyó la membrana celular fúngica de *T. rubrum* al aumentar la pérdida de ácido nucleico, reducir las actividades del escualeno epoxidasa y la enzima CYP51 y

disminuir el contenido de ergosterol en las hifas. Por lo que, lo anterior permite considerar a la magnoflorina como agente antifúngico contra *T. rubrum*, en el caso de *A. purpurea* se indujo en tallos y hojas con *R. stolonifer*.

Riley-Saldaña et al. (2022) documentaron alcaloides bencilisoquinolinicos de *Annona muricata* para explorar si están involucrados en la defensa contra fitopatógenos, observaron que *C. gloeosporioides* provocó aumentos variables en la producción de anonaína, reticulina y nornuciferina (10–1200%), mientras que *R. stolonifer* sólo estimuló el aumento de nornuciferina y anonaína (10%) en los tallos y hojas. La respuesta del alcaloide reticulina con *R. stolonifer* en raíces de *A. purpurea* tal vez corresponda a la defensa antifúngica al ser susceptible a *C. gloeosporioides* y *R. stolonifer*.

La inducción alcaloidal de plántulas de *A. purpurea* fue diferente con cada uno de los hongos fitopatógenos, destacando la inducción de los alcaloides con *R. stolonifer*, que también han sido documentados con potencial antifúngico.

VIII. CONCLUSIÓN

La riqueza y diversidad de alcaloides en plántulas de *A. purpurea* proviene de dos rutas metabólicas, bencilisoquinolínicas e indólicas, que también se expresan en ejemplares adultos. A diferencia de los árboles adultos en las plántulas de *A. purpurea*, la mayoría de los alcaloides se distribuyen en toda la plántula con una distribución espacio-temporal y órgano-específica que se conserva aún después de la infección.

La infección de las plántulas con estos hongos no induce la biosíntesis de nuevos alcaloides, solo cambios considerables en la abundancia de algunos y esta respuesta parece depender del grado de virulencia de la especie de hongo. Las respuestas o modulaciones del perfil alcaloidal pueden ser locales, estar ausentes o ser de tipo generalizado y los cambios en la modulación del perfil alcaloidal pueden ser individuales o compartidos. Estos datos confirman las hipótesis planteadas en el presente trabajo.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Al-Hindi RR, Al-Najada AR, Mohamed SA. Isolation and identification of some fruit spoilage fungi: Screening of plant cell wall degrading enzymes. *Afr. J. Microbiol. Res.* 2011; 5, 443–448.
- Alkan N, Meng X, Friedlander G, Reuveni E, Sukno S, Sherman A, Thon M, Fluhr R, Prusky D. Global aspects of pacC regulation of pathogenicity genes in *Colletotrichum gloeosporioides* as revealed by transcriptome analysis. *Mol Plant Microbe Interact.* 2013; 26(11), 1345-58.
- Anaya AL, Cruz-Ortega R, Waller GR. Metabolism and ecology of purine alkaloids. *Frontiers in Bioscience.* 2006; 11, 2354-2370. doi: 10.2741/1975.
- Atolagbe OM, Ajayi AA, Edegbo O. Characterization of α -Amylase from Soursop (*Annona muricata* Linn.) Fruits Degraded by *Rhizopus stolonifer*. *Pak J Biol Sci.* 2016; 19(2), 77-81. doi: 10.3923/pjbs.2016.77.81.
- Bais, HP, Loyola-Vargas VM, Flores HE, Vivanco JM. Root-specific metabolism: the biology and biochemistry of underground organs. *Vitro Cell Dev. Biol. Plant.* 2001; 37, 730–741. <https://doi.org/10.1007/s11627-001-0122-y>.
- Baskin CC, Baskin JM. Seeds. Ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination. Academic Press, San Diego, California. 2001; 666 p.
- Bautista-Baños S, Bosquez-Molina E, Barrera-Necha LL. Chapter 1: *Rhizopus stolonifer* (Soft Rot). *Postharvest Decay.* 2014; 1–44. doi:10.1016/b978-0-12-411552-1.00001-6
- Benezzer-Benezzer M, Castro-Mercado E, García-Pineda E. La producción de especies reactivas de oxígeno durante la expresión de la resistencia a enfermedades en Plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología.* 2008; 26(1), 56-61. Sociedad Mexicana de Fitopatología, A.C. Texcoco, México-
- Bennett RN, Wallsgrove RM. Secondary metabolites in plant defence mechanisms. *New Phytol.* 1994; 127(4), 617-633. doi: 10.1111/j.1469-8137.1994.tb02968.x
- Bermejo A, Figadere B, Zafra-Polo MC, Barrachina I, Estornell E, Cortes D. Acetogenins from Annonaceae: recent progress in isolation, synthesis and mechanisms of action. *Natural Products Report.* 2005; 22, 2005, pp. 269–303.
- Bostock RM, Karban R, Thaler JS, Weyman PD, Gilchrist D. Signal interactions in induced resistance to pathogens and insect herbivores. 2001; 107(1), 103–111. doi:10.1023/a:1008703904253
- Brechú-Franco AE, Laguna-Hernández G, De la Cruz-Chacón I, González-Esquinca AR. In situ histochemical localisation of alkaloids and acetogenins in the endosperm and embryonic axis of *Annona macrophyllata* Donn. Sm. seeds during germination. *Eur J Histochem.* 2016; 60(1), 2568. doi: 10.4081/ejh.2016.2568.
- Castro-Moreno M, Tinoco-Ojangurén CL, Cruz-Ortega MR, González-Esquinca AR. Influence of seasonal variation on the phenology and lirioidenine content of *Annona lutescens* (Annonaceae). *J Plant Res.* 2013; 126(4), 529–537. doi:10.1007/s10265-013-0550x
- Cavé A, Figadère B, Laurens A, Cortes D. Acetogenins from Annonaceae. *Fortschr Chem Org Naturst.* 1997; 70, 81-288. doi: 10.1007/978-3-7091-6551-5_2
- Cely-Veloza W, Kato MJ, Coy-Barrera E. Quinolizidine-Type Alkaloids: Chemodiversity, Occurrence, and Bioactivity. *ACS Omega.* 2023; 8(31), 27862-27893. doi: 10.1021/acsomega.3c02179.

- Cepleanu F, Ohtani K, Hamburger M, Gupta MP, Solis P, Hostettmann K. Novel Acetogenins from the Leaves of *Annona purpurea*. *Helvetica*. 1993; 76(3), 1379–1388.
- Cobo NGM. Identificación y caracterización de especies de *Colletotrichum* spp., causantes de antracnosis en frutos de aguacate *Persea americana* var. *Hass*. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Departamento de Ciencias Agrícolas Sede Palmira, Colombia. [Tesis de Maestría]. 2017; 195 pp.
- Chatrou LW, Pirie MD, Erkens HJ, Couvreur LP, Neubig KM, Abbott JR, Mols JB, Maas JW, Saunders RMK, & Chase MW. A New Subfamilial and Tribal Classification of the Pantropical Flowering Plant Family Annonaceae Informed by Molecular Phylogenetics. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 2012; 169(1), 5–40. doi:10.1111/j.1095-8339.2012.01235.x.
- Chang FR, Chen CY, Wu PH, Kuo RY, Chang YC, Wu YC. New alkaloids from *Annona purpurea*. *J Nat Prod*. 2000; 63(6), 746-8. doi: 10.1021/np990548n.
- Chang FR, Wei JL, Teng CM, Wu YC. Two new 7-dehydroaporphine alkaloids and antiplatelet action aporphines from the leaves of *Annona purpurea*. *Phytochemistry*. 1998; 49 (7), 2015-2018. doi: 10.1016/s0031-9422(98)00376-8.
- Chang FR, Wei JL, Teng CM, Wu YC. Antiplatelet aggregation constituents from *Annona purpurea*. *J Nat Prod*. 1998b; 61 (12), 1457-1461. doi: 10.1021/np9800046.
- Chávez D, Mata R. Purpurediolin and Purpurenin, Two New Cytotoxic Adjacent Bis-tetrahydrofuran Annonaceous Acetogenins from the Seeds of *Annona purpurea*. *J. Nat. Prod*. 1998; 61 (5), 580–584. doi: 10.1021/np970410
- Chávez D, Mata R. Purpuracenin: a new cytotoxic adjacent bis-tetrahydrofuran annonaceous acetogenin from the seeds of *Annona purpurea*. *Phytochemistry*. 1999; 50 (5), 823-8. doi: 10.1016/s0031-9422(98)00553-6. PMID: 10232884.
- Chízar Fernández, C.V., Chang Vargas, G., Lobo Cabezas, S., Quezada Hernández, A., Cerén López, J.G., Lara, L.R., Menjívar Cruz, J.E., Ruiz Valladares, I., House, P.R., Mejía Ordoñez, T., González, I.C., Correa Arroyo, M. (2009). Plantas Comestibles de Centroamérica, 1ª ed., Instituto Nacional de Biodiversidad, INBio.
- Cortes, D., Moreno, L., Párraga, J., Galán, A. & Cabedo, N. (2014). Nuevos fármacos inspirados en Annonáceas. *Revista Brasileira de Fruticultura*. 1: 22-31.
- De-la-Cruz-Chacón, I. Alcaloides Bencilisoquinolínicos y su relación órgano-específica en las primeras fases de desarrollo de *Annona diversifolia* Safford. Tesis de doctorado. Doctor en Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. 2012; 164 pp.
- De-la-Cruz-Chacón I, González-Esquinca AR, Guevara Fefer P, Jiménez Garcia LF. Liriodenine, early antimicrobial defence in *Annona diversifolia*. *Z Naturforsch C J Biosci*. 2011; 66(7-8), 377-84. doi: 10.1515/znc-2011-7-809.
- De la Cruz-Chacón, I., González-Esquinca, A. R. & Riley-Saldaña, C. A. Biosíntesis de alcaloides bencilisoquinolínicos. *Universitas Scientiarum*. 2012; 17 (2): 189-202.
- De-la-Cruz-Chacón I, González-Esquinca AR. Liriodenine alkaloid in *Annona diversifolia* during early development. *Natural Product Research*. 2012; 26(1), 42-49. doi: 10.1080/14786419.2010.533373
- De-la-Cruz-Chacón I, Riley-Saldaña CA, Arrollo-Gómez S, Sancristóbal-Domínguez TJ, Castro-Moreno M, González-Esquinca AR. Spatio-temporal variation of alkaloids in *Annona purpurea* and the associated influence on their antifungal activity. *Chemistry & Biodiversity*. 2019; 1-14. doi:10.1002/cbdv.201800284

- De Luca, V. En: *Methods in Plant Biochemistry* Vol. 9; Lea, P.J., Ed.; Academic Press Limited: London, 1993; pp 345-368.
- De-Q-Paulo M, Barbosa-Filho JM, Lima EO, Maia RF, Barbosa RC, Kaplan MA. Antimicrobial activity of benzyloisoquinoline alkaloids from *Annona salzmanii* D.C. *J. Ethnopharmacol.* 1992; 36 (1), 39–41. doi: 10.1016/0378- 8741(92)90058-Y.
- Diamond A, Desgagné-Penix I. Metabolic engineering for the production of plant isoquinoline alkaloids. *Plant Biotechnol J.* 2016 Jun;14(6):1319-28. doi: 10.1111/pbi.12494.
- Díaz-Godínez C, Ontiveros-Rodríguez JC, Ríos-Valencia DG, Herbert-Pucheta JE, Zepeda-Vallejo LG, Carrero JC. Anti-amoebic Activity of Leaf Extracts and Aporphine Alkaloids Obtained from *Annona purpurea*. *Planta Medica.* 2020; a-1111-9566–. doi:10.1055/a-1111-9566
- Eisenreich W, Rohdich F, Bacher A. Deoxyxylulose phosphate pathway to terpenoids. *Trends Plant Sci.* 2001; 6(2), 78-84. doi: 10.1016/s1360-1385(00)01812-4.
- FAO y AfricaSeeds. 2019. Materiales para capacitación en semillas - Módulo 3: Control de calidad y certificación de semillas. Roma.
- Facchini PJ. Alkaloid biosynthesis in plants: Biochemistry, Cell Biology, Molecular Regulation, and Metabolic Engineering Applications. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 2001; 52, 29-66. doi: 10.1146/annurev.arplant.52.1.29.
- Ferreira G. Reguladores vegetais na superação da dormência, balanço hormonal e degradação de reservas em sementes de *Annona diversifolia* Saff. e *A. purpurea* Moc. & Sessé ex Dunal (Annonaceae). Tese de Livre-Docencia apresentada ao Instituto de Biociências da UNESP – Campus de Botucatu, Departamento de Botânica, disciplina de Fisiologia da Germinação e Dormência de Sementes, para obtenção do título de Livre-Docente em Fisiologia Vegetal. Brasil. 2011.
- Finch-Savage WE, Leubner-Metzger G. Seed dormancy and the control of germination. *New Phytologist.* 2006; 171, 501-523.
- Freeman BC, Beattie GA. On Overview of Plant Defenses against Pathogens and Herbivores. *The Plant Health Instructor.* 2008; 1-14. doi: 10.1094/PHI-I-2008-0226-01
- Gani U, Vishwakarma RA, Misra P. Membrane transporters: the key drivers of transport of secondary metabolites in plants. *Plant Cell Rep.* 2021; 40(1), 1-18. doi: 10.1007/s00299-020-02599-9
- García-Mateos R, Pérez-Leal R. Fitoalexinas: mecanismo de defensa de las plantas. *Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente.* 2003; 9(1), 5-10.
- Glazebrook J. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 2005; 43, 205–227. doi: 10.1146/annurev.phyto.43.040204.135923
- Gómez-Castañeda JA, Ramírez H, Benavides-Mendoza A, Encina-Rodríguez LI. Germinación y crecimiento de plántula en chincuya (*Annona purpurea* Moc y Sessé) y su relación con los niveles de giberelinas y ácido abscísico. *Revista Chapingo Serie Horticultura.* 2003; 9(2), 243-253
- Gómez DE, Reis EM. Inductores abióticos de resistencia contra fitopatógenos. *Química Viva.* 2011; 10(1), 6-17.
- Granados-Sánchez D, Ruíz-Puga P, Barrera-Escorcia H. Ecología de la herbivoría. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente.* 2008; 14(1), 51-63.
- Hanson LE. Interaction of *Rhizoctonia solani* and *Rhizopus stolonifer* causing root rot of sugar beet. *Plant Dis.* 2010; 94, 504-509.

- Hernández-Fuentes GA, García-Argáez AN, Peraza Campos AL, Delgado-Enciso I, Muñiz-Valencia R, Martínez-Martínez FJ, Toninello A, Gómez-Sandoval Z, Mojica-Sánchez JP, Dalla-Via L, Parra-Delgado H. Cytotoxic Acetogenins from the Roots of *Annona purpurea*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019; 20(8), 1870. doi:10.3390/ijms20081870
- Hernández-Lauzardo AN, Bautista-Baños S, Velázquez-del Valle MG, Trejo-Espino JL. Identification of *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.: Fr.) Vuill. causal agent of *Rhizopus* rot disease of fruits and vegetables. *Mexican J. Phytopathol.* 2006; 24, 65–69.
- Hernández-Morales, J. F. 2017. Factores ambientales y fisiológicos que afectan el perfil alcaloidal de *Annona purpurea* Mociño & Sesse ex Dunal, durante el estiaje. Tesis de Maestría. Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. Chiapas. México.
- He SM, Song WL, Cong K, Wang X, Dong Y, Cai J, Zhang JJ, Zhang GH, Yang JL, Yang SC, Fan W. Identification of candidate genes involved in isoquinoline alkaloids biosynthesis in *Dactyloctenium aegyptium* by transcriptome analysis. *Sci Rep.* 2017; 22, 7(1), 9119. doi: 10.1038/s41598-017-08672-w.
- Hou JM, Ma BC, Zuo YH, Guo LL, Gao SG, Wang YY, Liu T. Rapid and sensitive detection of *Curvularia lunata* associated with maize leaf spot based on its Clg2p gene using semi-nested PCR. *Letters in Applied Microbiology.* 2013; 56(4), 245–250.
- Hu B, Sakakibara H, Kojima M, Takebayashi Y, Bußkamp J, Langer GJ, Peters FS, Schumacher J, Eiblmeier M, Kreuzwieser J, Rennenberg H. Consequences of *Sphaeropsis* tip blight disease for the phytohormone profile and antioxidative metabolism of its pine host. *Plant Cell Environ.* 2018; 41(4), 737-754. doi: 10.1111/pce.13118.
- Itkin M, Rogachev I, Alkan N, Rosenberg T, Malitsky S, Masini L, Meir S, Iijima Y, Aoki K, de Vos R, Prusky D, Burdman S, Beekwilder J, Aharoni A. Glycoalkaloid metabolism1 is required for steroidal alkaloid glycosylation and prevention of phytotoxicity in tomato. *Plant Cell.* 2011; 23(12), 4507-25. doi: 10.1105/tpc.111.088732.
- Jan, R.; Asaf, S.; Numan, M.; Lubna; Kim, K.-M. Plant secondary metabolite biosynthesis and transcriptional regulation in response to biotic and abiotic stress conditions. *Agronomy.* 2021; 11, 968. <https://doi.org/10.3390/agronomy11050968>.
- Jasiński M, Kachlicki P, Rodziewicz P, Figlerowicz M, Stobiecki M. Changes in the profile of flavonoid accumulation in *Medicago truncatula* leaves during infection with fungal pathogen *Phoma medicaginis*. *Plant Physiol Biochem.* 2009; 47(9), 847-53. doi: 10.1016/j.plaphy.2009.05.004.
- Jogaiah S, Kurjogi M, Govind SR, Huntrike SS, Basappa VA, Tran LS. Isolation and evaluation of proteolytic actinomycete isolates as novel inducers of pearl millet downy mildew disease protection. *Sci Rep.* 2016; 6, 30789. doi: 10.1038/srep30789.
- Kaplan I, Halitschke R, Kessler A, Sardanelli S, Denno RF. Constitutive and induced defenses to herbivory in above and belowground plant tissues. *Ecology.* 2008; 89(2), 392-406. doi: 10.1890/07-0471.1
- Laredo-Alcalá, E. I., Martínez-Hernández, J. L., Iliná, A., Guillen-Cisnero, L., & Hernández-Castillo, F. D. 2017. Aplicación de ácido jasmónico como inductor de resistencia vegetal frente a patógenos. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas.* 8(3), 673-683.
- Li D, Heiling S, Baldwin IT, Gaquerel E. Illuminating a plant's tissue-specific metabolic diversity using computational metabolomics and information theory. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016; 22, 113(47): E7610-E7618. doi: 10.1073/pnas.1610218113.

- Liu T, Wang Y, Ma B, Hou J, Jin Y, Zhang Y, Ke X, Tai L, Zuo Y, Dey K. Clg2p interacts with Clf and ClUrase to regulate appressorium formation, pathogenicity and conidial morphology in *Curvularia lunata*. *Scientific Reports*. 2016; 6, 24047. doi: 10.1038/srep24047
- Liu T, Liu L, Jiang X, Huang X, Chen J. A new furanoid toxin produced by *Curvularia lunata*, the causal agent of maize *Curvularia* leaf spot. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 2009; 31(1), 22-27. doi: [10.1080/07060660909507568](https://doi.org/10.1080/07060660909507568)
- Loyola-Vargas VM, Sánchez-Iturbe P, Canto-Canché B, Gutiérrez-Pacheco LC, Galaz-Ávalos RM, Moreno-Valenzuela O. Biosíntesis de los alcaloides indólicos: Una revisión crítica. *Revista de la Sociedad Química de México*. 2004; 48(1), 67-94.
- Lujan-Hidalgo, M., Jiménez-Aguilar, L., Ruiz-Lau, N., Reyes-Zambrano, S., & Gutiérrez-Miceli, F. Cambios bioquímicos en respuesta al ataque de roya en plantaciones de café. *Polibotánica*. 2020; 49. Recuperado a partir de <https://polibotanica.mx/index.php/polibotanica/article/view/552>
- Luna-Cázares LM, González-Esquinca AR. 2015 La chincuya (*Annona purpurea* Moc. & Sessé ex Dunal): una planta Mesoamericana. Recursos fitogenéticos de las anonáceas en el estado de Veracruz. En E.Vidal-Lezama NA, Vidal-Martínez L, Vidal-Hernández (Eds.), Anonáceas. Plantas antiguas. Estudios recientes. Parte 2, pp.229-245. Chapingo, Texcoco, México: Universidad Autónoma Chapingo.
- Luo N, Jin L, Yang C, Zhu Y, Ye X, Li X, Zhang B. Antifungal activity and potential mechanism of magnoflorine against *Trichophyton rubrum*. *J Antibiot (Tokyo)*. 2021; 74(3), 206-214. doi: 10.1038/s41429-020-00380-4
- Madriz OK. Mecanismos de defensa en las interacciones planta-patógeno. *Manejo Integrado de Plagas*. 2002; 63, 22-32.
- Martín-Gordo, D. A. Los compuestos fenólicos, Un acercamiento a su biosíntesis, síntesis y actividad biológica. *Revista De Investigación Agraria Y Ambiental*. 2018; 9(1), 81-104. <https://doi.org/10.22490/21456453.1968>
- Meijer AH, Lopes Cardoso MI, Voskuilen JT, de Waal A, Verpoorte R, Hoge JH. Isolation and characterization of a cDNA clone from *Catharanthus roseus* encoding NADPH:cytochrome P-450 reductase, an enzyme essential for reactions catalysed by cytochrome P-450 mono-oxygenases in plants. *Plant J*. 1993; 4(1), 47-60. doi: 10.1046/j.1365-313x.1993.04010047.x.
- Meijer AH, Souer E, Verpoorte R, Hoge JH. Isolation of cytochrome P-450 cDNA clones from the higher plant *Catharanthus roseus* by a PCR strategy. *Plant Mol Biol*. 1993; 22(2), 379-83. doi: 10.1007/BF00014944.
- Moghe GD, Last RL. Something Old, Something New: Conserved Enzymes and the Evolution of Novelty in Plant Specialized Metabolism. *Plant Physiol*. 2015; 169(3), 1512-23. doi: 10.1104/pp.15.00994
- Montes-Belmont R. Diversidad de compuestos químicos producidos por las plantas contra hongos fitopatógenos. *Revista mexicana de micología*. 2009; 29, 73-82.
- Moore D, Robson GD, Trinci, APJ (2020). 21st Century Guidebook to Fungi (2nd ed.). Cambridge: Cambridge University Press.
- Morrissey JP, Osbourn AE. Fungal resistance to plant antibiotics as a mechanism of pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1999; 63(3), 708-24. doi: 10.1128/MMBR.63.3.708-724.1999.

- Morteza-Semnani K, Amin G, Shidfar MR, Hadizadeh H, Shafiee A. Antifungal activity of the methanolic extract and alkaloids of *Glaucium oxylobum*. *Fitoterapia*. 2003; 74(5), 493-6. doi: 10.1016/s0367-326x(03)00113-8
- Morton JS. 1987; p. 85. In: Fruits of warm climates. Julia F. Morton, Miami, FL. (en línea). Consultado 1 de junio de 2020. <http://www.hort.purdue.edu/newcrop/morton/soncoya.html>.
- Muth D, Kachlicki P, Krajewski P, Przystalski M, Stobiecki M. Differential metabolic response of narrow leafed lupine (*Lupinus angustifolius*) leaves to infection with *Colletotrichum lupini*. *Metabolomics*. 2009; 5, 354-362. doi: 10.1007/s11738-015-1896-6
- National Institute of Standards and Technology, The NIST Mass Spectral Search Program For the NIST/EPA/NIH Mass Spectra Library version 2.2. 2021. (accessed 10 Jun 2021).
- Nesher I, Kokkelink AML, Tudzynski P, Sharon A. Regulation of Pathogenic Spore Germination by CgRac1 in the Fungal Plant Pathogen *Colletotrichum gloeosporioides*. *Eukaryotic Cell*. 2011; 10, 1122-1130.
- Neske A, Ruiz Hidalgo J, Cabedo N, Cortes D. Acetogenins from Annonaceae family. Their potential biological applications. *Phytochemistry*. 2020; 174, 112332. doi: 10.1016/j.phytochem.2020.112332.
- Nikolaeva MG. Factors controlling the seed dormancy pattern in the physiology and biochemistry of seed dormancy and germination. Nort Holland, Amsterdam. 1977; pp. 51-74.
- Olivoto T, Nardino M, Carvalho IR, Follmann DN, Szareski VJ, Ferrari M, de Pelegrin AJ, de Souza VQ. Plant secondary metabolites and its dynamical systems of induction in response to environmental factors: A review. *African Journal of Agricultural Research*. 2017; 12(2), 1. doi:10.5897/AJAR2016.1167
- Orellana PAD, Tello DFLG, Rodas CAO, Morales MMA (Eds). Catálogo de frutales nativos de Guatemala. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación. Guatemala. 2014; 11-14 pp.
- Orellana, A.D. & E. Martínez. 2002. Distribución geográfica de anonaceas en Guatemala. Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos (FAUSAC) & Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas (ICTA). ICTA, Villanueva, Guatemala. 23 p. (también disponible en línea: <http://www.icta.gob.gt/fpdf>).
- Pechanova O, Pechan T. Maize-Pathogen Interactions: An Ongoing Combat from a Proteomics Perspective. *International Journal of Molecular Sciences*. 2015; 16(12), 28429–28448. doi:10.3390/ijms161226106
- Petrasch S, Silva CJ, Mesquida-Pesci SD, Gallegos K, Van_den_abeele C, Papin V, Fernandez-Acero FJ, Knapp SJ and Blanco-ulate B. Infection strategies deployed by *Botrytis cinerea*, *Fusarium acuminatum*, and *Rhizopus stolonifer* as a function of tomato fruit ripening stage. *Front. Plant Sci*. 2018; 10:223. doi:10.3389/fpls.2019.00223
- Piñol MT, Palazón J, Cusidó RM. 2008. Introducción al metabolismo secundario. (cap. 17; pp. 323-348). En: Azcón-Bieto, J. y M. Talón (eds.). *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. 2a. ed. Madrid, España: McGRAW-HILL. 651p.
- Programa estadístico Past Version 4.10. Natural History Museum, University of Oslo, Oslo, Norway. Consultado 15 de marzo de 2022.

- Rejón-Orantes J, González-Esquinca AR, De-la-Mora M, Roldan-Roldan G, Cortes D. Annonomontine, an Alkaloid Isolated from *Annona purpurea*, Has Anxiolytic-Like Effects in the Elevated Plus-Maze. *Planta Medica*. 2011; 77(4), 322–327. doi:10.1055/s-0030-1250406
- Riley-Saldaña CA, Cruz-Ortega MDR, Martínez Vázquez M, De-la-Cruz-Chacón I, Castro-Moreno M, González-Esquinca AR. Acetogenins and alkaloids during the initial development of *Annona muricata* L. (Annonaceae). *Z Naturforsch C J Biosci*. 2017; 72(11-12), 497-506. doi: 10.1515/znc-2017-0060
- Riley-Saldaña CA. 2019. Metabolitos constitutivos e inducidos de *Annona muricata*. PhD thesis. Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Riley-Saldaña CA, De-la-Cruz-Chacón I, Cruz-Ortega MDR, Castro-Moreno M, González-Esquinca AR. Do *Colletotrichum gloeosporioides* and *Rhizopus stolonifer* induce alkaloidal and antifungal responses in *Annona muricata* seedlings? *Z Naturforsch C J Biosci*. 2022; 78(1-2), 57-63. doi: 10.1515/znc-2021-0297
- Rocha SPR, Urzêdo LE, de Souza ARW, Pereira MM, Rodrigues, SG. Morphological and molecular characterization of *Curvularia lunata* pathogenic to andropogon grass. *Bragantia*. 2018; 77(2), 326–332. doi:10.1590/1678-4499.2017258
- Rojó-Báez I, Álvarez-Rodríguez B, García-Estrada RS, León-Félix J, Sañudo-Barajas A, Allende-Molar R. Current status of *Colletotrichum spp.* in Mexico: Taxonomy, characterization, pathogenesis and control. *Mexican journal of phytopathology*. 2017; 549-570 pp.
- Rondón GA, Rondón MO. Principales Enfermedades del guanábano en Venezuela. *Aspectos fitosanitarios*. 2009; 12, 23-26.
- Sánchez G, Estrada O, Acha G, Cardozo A, Peña F, Ruiz MC, Michelangeli F, Alvarado-Castillo C. The norpurpureine alkaloid from *Annona purpurea* inhibits human platelet activation in vitro. *Cellular & Molecular Biology Letters*. 2018; 23(1), 15–. doi:10.1186/s11658-018-0082-4
- Sang L, Liu A, Wu W, Sun S, Zheng F. 2008. https://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTTotal-ZWBH200802022.htm 06 de noviembre de 2020
- Sharma M, Kulshrestha S. *Colletotrichum gloeosporioides*: An anthracnose causing pathogen of fruits and vegetables. *Biosci Biotechnol Res Asia*. 2015; 12(2), 14 pp.
- Schlie-Guzmán MA, González-Esquinca AR, & Luna-Cazáres LM. Las acetogeninas de Annonaceae: efecto antiproliferativo en líneas celulares neoplásicas. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. 2009; 8(4): 245-257.
- Sepúlveda-Jiménez G, Porta-Ducoing H, Rocha-Sosa M. La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 2003; 21(3), 355-363.
- Sonnet PE, Jacobson M. Tumor inhibitors. II. Cytotoxic alkaloids from *Annona purpurea*. *J Pharm Sci*. 1971; 60(8), 1254-6. doi: 10.1002/jps.2600600835
- Standley PC, Steyermark JA. lora of Guatemala. *Fieldiana Botany*. Chicago Natural History Museum. 1946; 24 (IV).
- Taiz L, Zeiger E. Secondary metabolites and plant defense. Capítulo 13. *Plant Physiology*. Fifth Edition. 2010; 369-396.
- Thakur M, Sohal BS. Role of Elicitors in Inducing Resistance in plants against pathogen infection: A review. *ISRN Biochemistry*. 2013; 1–10. doi:10.1155/2013/762412

- Tiku, A.R. (2020). Antimicrobial compounds (phytoanticipins and phytoalexins) and their role in plant defense. En: Merillon, JM., Ramawat, K. (eds) Co-Evolution of secondary metabolites. Reference series in Phytochemistry. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-76887-8_63-1
- Toledo-González KA, Riley-Saldaña CA, Salas-Lizana R, De-la-Cruz-Chacón I, González-Esquinca AR. Alkaloidal variation in seedlings of *Annona purpurea* Moc. & Sessé ex Dunal infected with *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. and Sacc. *Biochemical Systematics and Ecology*. 2023; 107, 1-8. doi: 10.1016/j.bse.2023.104611
- Trejo-Tapia G, Rodríguez-Monroy M. La agregación celular en la producción de metabolitos secundarios en cultivos vegetales in vitro. *Interciencia*. 2007; 32(10), 669-674.
- Tropicos. Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. 2020; 15 de enero de 2020. <http://www.tropicos.org>
- Uefuji H, Tatsumi Y, Morimoto M, Kaothien-Nakayama P, Ogita S, Sano H. Caffeine production in tobacco plants by simultaneous expression of three coffee N-methyltransferases and its potential as a pest repellent. *Plant Mol Biol*. 2005 Sep; 59(2):221-7. doi: 10.1007/s11103-005-8520-x
- Velázquez-Del Valle, M. G., Bautista-Baños, S., Hernández-Lauzardo, A. N., Guerra-Sánchez, M. G., & Amora-Lazcano, E. (2008). Estrategias de control de *Rhizopus stolonifer* Ehrenb. (Ex Fr.) Lind, Agente causal de pudriciones postcosecha en productos agrícolas. *Revista mexicana de fitopatología*, 26(1), 49-55. Recuperado en 12 de mayo de 2019, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S018533092008000100008&lng=es&tlng=es.
- Vidal-Hernández L, López-Moctezuma H, Vidal-Martínez NA, Ruiz-Bello R, Castillo-Rocha DG, Chiquito-Contreras RG. La situación de las annonaceae en México: Principales plagas, enfermedades y su control. *Revista Brasileira de Fruticultura*. 2014; 1, 44-54.
- Wang W, Xin H, Wang M, Ma Q, Wang L, Kaleri NA, Wang Y, Li X. Transcriptomic analysis reveals the molecular mechanisms of drought-stress-induced decreases in *Camellia sinensis* leaf quality. *Front Plant Sci*. 2016; 7, 385. doi: 10.3389/fpls.2016.00385
- Wink, M. (2004). Phytochemical diversity of secondary metabolites. *Encyclopedia of Plant and Crop Science*. 915-919. doi 10.1081/E-EPCS 120005945
- Wink M. Introduction: Biochemistry, physiology and ecological functions of secondary metabolites. In Wink M. (Ed) Biochemistry of plant secondary metabolism, second edition *Annual Plant Reviews*. Wiley Clackwell, Oxford, UK. 2010; 40: 1-19.
- Zamora N, Ocampo M, Murillo F. Especies de Costa Rica. 2000. En línea. Disponible en <http://darnis.inbio.ac.cr/FMPro?-DB=UBIpub.fp3&-lay=WebAll&-Format=/ubi/detail.html&-Op=bw&id=1365&-Find>.
- Zeiss DR, Mhlongo MI, Tugizimana F, Steenkamp PA, Dubery IA. Metabolomic profiling of the host response of tomato (*Solanum lycopersicum*) Following Infection by *Ralstonia solanacearum*. *Int J Mol Sci*. 2019; 20(16), 3945. doi: 10.3390/ijms20163945