



# ANONÁCEAS

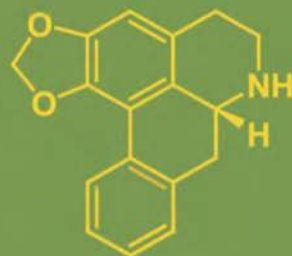
## Plantas antiguas, estudios recientes

Alma Rosa González-Esquinca • Lorena Mercedes Luna-Cazáres  
Javier Gutiérrez-Jiménez • María Adelina Schlie-Guzmán  
Dolores Guadalupe Vidal-López  
(Coordinadores)

Colección  
Jaguar



UNICACH



# Anonáceas

Plantas antiguas, estudios recientes

Alma Rosa González-Esquinca  
Lorena Mercedes Luna-Cazáres  
Javier Gutiérrez-Jiménez  
María Adelina Schlie-Guzmán  
Dolores Guadalupe Vidal-López  
(Coordinadores)



UNIVERSIDAD DE CIENCIAS  
Y ARTES DE CHIAPAS  
2011



**Colección  
Jaguar**



**UNICACH**

El jaguar es uno de las especies más representativas de la fauna chiapaneca y el símbolo por antonomasia de la biodiversidad en nuestro estado. Bajo su nombre están contenidos todos los títulos pertenecientes al ámbito de las ciencias naturales producidos en la universidad.

Primera edición: 2011

D. R. ©2011. Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas  
1ª Avenida Sur Poniente número 1460  
C. P. 29000, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México.  
[www.unicach.mx](http://www.unicach.mx)  
[editorial@unicach.mx](mailto:editorial@unicach.mx)

ISBN: 978-607-7510-91-8

Portada: *Annona diversifolia* Saff. y *Annona purpurea* Moc. & Sessé ex Dunal (Iván de la Cruz Chacón)

El contenido de los textos es responsabilidad de los autores.

Diseño de la colección: Manuel Cunjamá

Impreso en México

# Anonáceas

Plantas antiguas, estudios recientes

Alma Rosa González-Esquinca  
Lorena Mercedes Luna-Cazás  
Javier Gutiérrez-Jiménez  
María Adelina Schlie-Guzmán  
Dolores Guadalupe Vidal-López  
(Coordinadores)

**Colección  
Jaguar**



**UNICACH**



# Índice

Introducción .....	15
Presentación .....	17
I. Annonaceae Juss. ....	19
Panorama de las anonas cultivadas en Brasil: saramuyo, guanábana y atemoya .....	21
<i>Lemos, Eurico Eduardo Pinto de</i>	
Las anonáceas: fuente de inspiración para la obtención de nuevos medicamentos .....	37
<i>Cabedo, Nuria</i>	
<i>Moreno, Laura</i>	
<i>López, Sonia</i>	
<i>Marín, Paloma</i>	
<i>Párraga, Javier</i>	
<i>Cortes, Diego</i>	
Metabolitos secundarios aislados de algunas especies del género <i>Annona</i> como fuente de potenciales fármacos .....	61
<i>Estrada-Reyes, Rosa</i>	
<i>Parra-Delgado, Hortensia</i>	
<i>Martínez-Vázquez, Mariano</i>	
Diversidad de géneros y especies de Annonaceae en México .....	79
<i>Andrés-Agustín, Jorge</i>	
Metodología para estudios palinológicos en Annonaceae y su aplicación en especies del estado de Tabasco, México .....	93
<i>Barragán-Cupido, Helen</i>	
<i>Burelo-Ramos, Carlos Manuel</i>	
<i>Salvador-Esparza, Rosa María</i>	

Catálogo de las Annonaceae de Tabasco.....	101
<i>Salvador Esparza, Rosa María</i>	
<i>Guadarrama Olivera, María de los Ángeles</i>	
Las anonáceas de Chiapas en el herbario CHIP .....	109
<i>Hernández Najarro, Francisco</i>	
<i>Díaz Montesinos, Ma. Guadalupe</i>	
<i>Jonapá Solís, José M.</i>	
Aspectos etnobotánicos de anonáceas en Chiapas, México .....	121
<i>Farrera Sarmiento, Oscar</i>	
II. <i>Annona cherimola</i> Mill.....	129
Experiencia de campo en polinización manual del chirimoyo ( <i>Annona cherimola</i> Mill) en Chile .....	131
<i>Montiel Moreno, Marcela</i>	
Acetogeninas de anonáceas estimulantes de la producción de au- toinductores y biofilms de bacterias degradadoras de HAPs .....	143
<i>Parellada, Eduardo Alberto</i>	
<i>Ramos, Alberto</i>	
<i>Valdez, Juan Carlos</i>	
<i>Cartagena, Elena</i>	
<i>Bardón, Alicia</i>	
<i>Neske, Adriana</i>	
Modificación del entorno de los grupos funcionales de membranas lipídicas artificiales por interacción con acetogeninas de anonáceas....	155
<i>Di Toto Blessing, Lilian</i>	
<i>Álvarez Colom, Olga</i>	
<i>Díaz, Sonia</i>	
<i>Ben Altabef, Aída</i>	
<i>Bardón, Alicia</i>	
<i>Neske, Adriana</i>	

Identificación del hongo agente causal de la necrosis foliar en chirimoyo ( <i>Annona cherimola</i> Mill.) a través de técnicas moleculares .....	163
Vidal Martínez, Nayelli Ayatzol	
Noa Carrazana, Juan Carlos	
Chiquito Contreras, Roberto G.	
Castillo Rocha, Doris G.	
Ruiz Bello, Romeo	
Vidal Hernández, Librado	
III. <i>Annona cherimola</i> x <i>Annona squamosa</i> .....	187
Condicionamiento osmótico en semillas de <i>Annona cherimola</i> Mill. x <i>A. squamosa</i> L. ....	189
Ferreira, Gisela	
Gimenez, Juliana Iassia	
Corsato, Jaqueline Malagutti	
Bueno, Silvana Sales Catarina	
IV. <i>Annona diversifolia</i> Saff. ....	199
Composición química y actividad antirradical de tres variedades de frutos de <i>Annona diversifolia</i> Safford .....	201
Santos-Sánchez, Norma Francenia	
Julián-Loeza, Adriana Paola	
Valadez-Blanco, Rogelio	
Sánchez-Guzmán, Balbina Seniorina	
Salas-Coronado, Raúl	
Rolliniastatina-2 sobre bacterias Grampositivas .....	211
Luna-Cazáres, Lorena Mercedes	
González-Esquinca, Alma Rosa	
Guevara Fefer, Patricia	
Brechu Franco, Alicia Enriqueta	



Administración <i>in vivo</i> de acetogeninas guiada por la concentración inhibitoria media <i>in vitro</i> .....	231
Schlie-Guzmán, María Adelina	
García-Carrancá, Alejandro	
Gutiérrez-Jiménez, Javier	
Vidal-López, Dolores	
Posible actividad estimulante y ansiógena de un extracto de alcaloides quinolínicos de <i>A. diversifolia</i> en ratonas. ....	249
Aguilar, Efraín	
González-Esquinca, Alma Rosa	
de la Cruz, Iván	
Riley, Christian	
Vidal, Dolores	
Actividad insecticida de <i>Annona diversifolia</i> frente a <i>Atta mexicana</i> .....	259
Acuña Castro, Walter	
De la Cruz Chacón, Iván	
González Esquinca, Alma Rosa	
Manejo fitosanitario para el control de la antracnosis en anona ( <i>Annona diversifolia</i> Saff.).....	275
Cruz Pineda, Eduardo	
Guerrero Berrios, Mauricio	
V. <i>Annona emarginata</i> (Schldtl.) H. Rainer .....	283
Perfil de azúcares solubles de semillas de <i>Annona emarginata</i> (Schldtl.) H. Rainer sometidas a secado .....	285
Corsato, Jaqueline Malagutti	
Ferreira, Gisela	
Gimenez, Juliana Iassia	
Barbedo, Claudio Jose	

Curva de adquisición del agua en semillas de *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer sometidas al condicionamiento osmótico ..... 297

Gimenez, Juliana Iassia

Ferreira, Gisela

Corsato, Jaqueline Malagutti

Pinho, Sheila Zambello de

Bueno, Silvana Sales Catarina

La germinación de semillas de *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer después de diferentes tiempos de reposo de frutos ..... 305

Corsato, Jaqueline Malagutti

Ferreira, Gisela

Gimenez, Juliana Iassia

Barbedo, Claudio Jose

Bueno, Silvana Sales Catarina

Condicionamiento osmótico y GA<sub>3</sub> en las semillas de *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer ..... 325

Gimenez, Juliana Iassia

Ferreira, Gisela

Corsato, Jaqueline Malagutti

Fotosíntesis, índices fisiológicos y acumulación de Ca, Mg y S en plantas jóvenes de araticum de tierra fría (*Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer) ..... 337

Baron, Daniel

Ferreira, Gisela

Boaro, Carmen Sílvia Fernandes

Rodrigues, João Domingos

Macedo, Ana Cláudia

Niveles de micronutrientes, fósforo y cambios gaseosos en plantas de *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer cultivadas con variaciones en solución nutritiva ..... 359

Baron, Daniel

Ferreira, Gisela  
Boaro Carmen Sílvia Fernandes  
Rodrigues, João Domingos  
Mischan, Martha Maria

Potasa y cambios gaseosos en plantas jóvenes de *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer cultivadas en diferentes fuerzas iónicas ..... 377

Baron, Daniel  
Ferreira, Gisela  
Boaro, Carmen Sílvia Fernandes  
Rodrigues, João Domingos  
Mischan, Martha Maria

Eficiencia instantánea de la carboxilación y acumulación de nitrógeno en plantas jóvenes de araticum de tierra fría (*Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer ) cultivadas en solución nutritiva ..... 393

Baron, Daniel  
Ferreira, Gisela  
Boaro, Carmen Sílvia Fernandes  
Rodrigues, João Domingos  
Amaro, Amanda Cristina Esteves

VI. *Annona muricata* L. .... 411

Incidencia de enfermedades en el cultivo de guanábana (*Annona muricata* L.) en Tabasco ..... 413

González-Arias, Lucía  
Castelán-Estrada, M.

Incidencia por estrato arbóreo de *Bephratelloides cubensis* A. y *Cerconota anonella* S. en frutos de *Annona muricata* L. con diferente manejo en Veracruz, México ..... 429

Ruiz-Montiel, Cesar  
Flores-Peredo, Rafael

Nuevo reporte de incidencia de *Acantocephala femorata* F. (Hemíptera: coreidae) y *Euphoria leucographa* G. & P. (Coleóptera: melolonthidae) en frutos de *Annona muricata* L. en Veracruz, México. .... 449

Ruiz-Montiel, Cesar

Illescas-Riquelme, Carlos Patricio

Flores-Peredo, Rafael

Vidal-Hernández, Librado

Domínguez-Espinosa, Paola Ivett

No-preferencia de *Anastrepha ludens* y *A. obliqua* (díptera: tephritidae) a frutos de guanábana (*Annona muricata* L.): parte I..... 457

Hernández Fuentes, Luis Martín

Urías López, Mario Alfonso

Castañeda Vildozola, Alvaro

Ramos Barreto, Carlos

Las acetogeninas, ¿más que inhibidores del transporte electrónico? ...475

Domínguez-Martínez, Verónica

Andrade Domínguez, Andrés

Trejo Hernández, Abigail

Coria Gil, Norma

Martínez Vázquez, Mariano

Formación de la unión del injerto en guanábano (*Annona muricata* L.).....497

Vidal Hernández, Librado

Ruiz Bello, Romeo

López Moctezuma, Héctor

Ruiz Montiel, César

Vidal Martínez, Nayelli Ayatzol

VII. *Annona purpurea* Moc. & Sessé ex Dunal..... 517

*Annona purpurea* Moc. & Sessé ex Dunal y su actividad ansiolítica ....519

Rejón-Orantes, José del Carmen

González-Esquinca, Alma Rosa  
Roldan Roldan, Gabriel  
Pérez de la Mora, Miguel

VIII. *Duguetia colombiana* Maas..... 539

Actividad leishmanicida y antioxidante de compuestos hemisin-  
téticos de *Duguetia colombiana* Maas (Annonaceae). .....541

Sáez, Alex

Robledo, Sara

Rojano, Benjamin

Cortés, Diego

Sáez, Jairo

## Introducción

La familia de las anonáceas pertenece al grupo de plantas más primitivas de todas las angiospermas; todas ellas de origen tropical y subtropical, cuya distribución abarca ambos hemisferios. La diversidad mundial de la familia se calcula en 135 géneros y 2,500 especies, sólo en América tropical existen 40 géneros y 900 especies, en México 14 géneros y 62 especies. Entre las especies cultivadas por sus frutos comestibles se encuentran la guanábana (*A. muricata*), la chirimoya (*A. cherimola*), el saramuyo (*A. reticulata*) y otras más de importancia local. De especies como el Ilang Ilang (*Cananga odorata*) se obtienen aceites comestibles, jabones y aceites aromáticos que se utilizan en la perfumería europea. También se han usado como condimentos. En los últimos años se ha destacado su potencial biotecnológico dado que poseen compuestos con actividad antitumoral, antihelmíntica, antimalaria, antiprotozoaria, insecticida, antimicrobiana, antifúngica e inmunodepresiva, asociadas a compuestos de interés entre los que destacan los alcaloides benzilisoquinolínicos y las acetogeninas. En estas áreas se encuentran grupos de investigación españoles, franceses, americanos, japoneses, brasileños, argentinos, colombianos y mexicanos, por mencionar algunos.

Son 17 países los que destacan como productores de especies frutícolas, encontrándose entre ellos México, Brasil y Chile, así como España, Portugal y Nambour en Australia y cuyos principales mercados de consumo son Argentina, Estados Unidos de Norteamérica, Francia, Alemania y Japón. La principal fruta comercializada es la guanábana, por ejemplo, en México se cultivan aproximadamente 7,290 hectáreas de guanábana distribuidas en los estados de Naya-

rit, Colima, Sinaloa, Campeche, Chiapas, Tabasco, Yucatán, Puebla, Jalisco, Michoacán, Guerrero, Oaxaca y Veracruz; los frutos son una importante fuente de divisas ya que 32,000 toneladas anuales son exportadas a Estados Unidos de América.

## Presentación

Este volumen, compilado por el Cuerpo Académico Recursos Fitogenéticos y Sustentabilidad en Chiapas de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas ha logrado reunir una serie de trabajos de investigación dedicados al estudio de las anonáceas.

Compendia aportaciones que son motivo y objeto de estudio de investigadores y estudiantes de diferentes países, instituciones y universidades que analizan desde varias disciplinas entre ellos, los aspectos relacionados con la cosecha, conservación, taxonomía, bioquímica, fisiología, genética y farmacología de las anonáceas.

Esta publicación está organizada por varios capítulos, primero aquel que agrupa varios géneros de la familia y los siguientes ordenados por especie siguiendo un orden alfabético.





# I. Annonaceae Juss.



# Panorama de las anonas cultivadas en Brasil: saramuyo, guanábana y atemoya

Lemos, Eurico Eduardo Pinto de

Universidade Federal de Alagoas, Centro de Ciências Agrárias, Av. Lourival Mota, s/n,  
Tabuleiro, Maceió, AL. CEP 57080-900. eurico@ceca.ufal.br.

## Resumen

El escenario de la producción de frutas brasileñas ha cambiado significativamente en las tres últimas décadas. La mejora en la calidad y el aumento en volumen son reflejos de un esfuerzo conjunto de instituciones públicas y privadas en la búsqueda de nuevas tecnologías de producción de frutas para el mercado interno y para la exportación. Además de las frutas tradicionales, otras menos conocidas como el saramuyo (*Annona squamosa*), la guanábana (*A. muricata*) y la atemoya (*A. squamosa* x *A. cherimola*) han incrementado su cultivo y se han desarrollado sistemas de producción adecuados para diversas regiones del país. En la actualidad cerca de 15 mil hectáreas son cultivadas con estas tres anonas en Brasil, la mayoría son cultivos hasta de 5 hectáreas y con bajo nivel tecnológico. En el futuro muchos productores adoptarán las tecnologías propuestas por la investigación científica y empezarán una nueva historia para las anonas en Brasil. El objetivo de este trabajo es presentar un panorama actual de

la situación de tres anonas cultivadas en el país: saramuyo, guanábana y atemoya.

Palabras clave: *Annona squamosa*, *Annona muricata*, *graviola*, *pinha*

## Introducción

Al trazar el panorama de las anonas cultivadas en Brasil tenemos que hacer una pequeña revisión histórica de cómo estas sorprendentes frutas empezaran su camino en el país. El saramuyo (*Annona squamosa*) tiene la historia más interesante pues ha llegado a Brasil por las manos del distinguido Conde de Miranda, quien en 1626 trajo de Centroamérica algunas semillas y las introdujo en el estado de Bahía (Popenoe, 1974). Así, se cree que los saramuyos brasileños se originan de ahí y consecuentemente conservan una baja variabilidad genética en relación a su centro de origen en Centroamérica y el Caribe.

La guanábana (*A. muricata*) ha trillado un camino distinto pues es considerada una especie nativa de la región amazónica de la que forman parte Brasil, Colombia, Venezuela, Perú y las Guayanas. Apreciada por los nativos y colonizadores, desde muy temprano sus árboles podían ser encontrados en huertos domésticos y sus semillas fueron supuestamente dispersadas a otras regiones del mundo, no obstante su cultivo comercial empezó en Brasil solamente a partir de 1980 (Pinto *et al.*, 2005).

La atemoya es una fruta mucho más reciente ya que es un híbrido producido artificialmente por el cruzamiento entre el saramuyo (*A. squamosa*) y el chirimoyo (*A. cherimola*) en varias partes del mundo. Fue introducida en Brasil en las décadas de 1950 y 1960 en el estado de São Paulo de donde se dispersó a otras regiones (Bonaventure, 1999).

Aunque tengan orígenes distintos, las tres anonas han sido exploradas cada vez más por un amplio número de productores interesados por alternativas más rentables que las especies de frutas tradicionales. En este momento toda la producción brasileña de anonas está enfocada al consumo interno de frutas frescas (saramuyo y atemoya) y procesadas (guanábana). Para obtener la cualidad de exportador de anonas frescas

es necesario ampliar la producción e investigar los aspectos tecnológicos para que las frutas lleguen frescas y sabrosas a los consumidores. Para la guanábana parece ser más simple una vez que el procesamiento industrial de la pulpa puede garantizar la calidad de los productos por más tiempo. La baja oferta de la producción brasileña aún es un gran problema para la exportación.

El objetivo de este trabajo es presentar un panorama actual de la situación de tres anonas cultivadas en el país: saramuyo, guanábana y atemoya.

## Método

Este trabajo es el resultado de un levantamiento personal realizado entre los años 2007 y 2010 en diversas zonas de producción de anonáceas en Brasil y en una consulta bibliográfica sobre las técnicas utilizadas en el país para producir el saramuyo, la guanábana y la atemoya.

En las visitas a los estados productores de las anonas (Alagoas, Bahía, Ceará, Pernambuco, Paraná, Minas Gerais y São Paulo) fueron establecidos contactos con técnicos regionales de la extensión rural, investigadores, productores y comerciantes para obtenerse datos referentes a las áreas estimadas de producción, manejo, productividad y comercialización de las anonas. Los datos fueron confrontados con los disponibles en el Instituto Brasileño de Geografía y Estadística (IBGE, 2005) y se establecieron aproximaciones basadas en las opiniones de los productores y autoridades gubernamentales.

## Resultados y discusión

Las principales zonas de producción de anonas (saramuyo, guanábana y atemoya) en Brasil están señaladas en la figura 1. Los resultados referentes a cada una de las especies son presentados a continuación en tres estudios de casos.



Figura 1. Principales zonas de producción del saramuyo, guanábana y atemoya en Brasil. Saramuyo (O), guanábana (⊖), atemoya (Δ). Siglas de estados productores: Alagoas (AL), Bahía (BA), Ceará (CE), Minas Gerais (MG), Pará (PA), Paraná (PR), Pernambuco (PE), São Paulo (SP)

### El caso del saramuyo (*Annona squamosa*)

El saramuyo está diseminado principalmente por los estados de Bahía, Pernambuco, Alagoas, Ceará, São Paulo y Minas Gerais que son hoy los principales productores de esta fruta en Brasil con cerca de 10 mil hectáreas cultivadas y una producción total estimada desde 20 hasta 40 mil toneladas por año (IBGE, 2005).

La productividad media de los pomares (huertos frutales) es desde 2 hasta 4 ton/ha/año la que se considera muy baja. La mayoría de los productores cultiva el saramuyo en pequeñas áreas, entre 1 y 5 hectáreas y pocos hacen uso de las nuevas tecnologías, lo que podría aumentar la productividad y la ganancia. La baja calidad de los frutos es otro pro-

blema por la falta del uso de tecnologías como poda, riego, fertilización, polinización manual y cosecha adecuada (Oliveira, 2005). Las observaciones muestran que el uso de estas tecnologías pueden producir en promedio 12 kilos de fruta por planta y cuando usan una alta densidad de plantío (2 x 4 metros) pueden obtener hasta 15 ton/ha/año de frutas de óptima calidad (media de 300 gramos) para los mercados. Frutas con esta calidad son bien aceptadas en los mejores mercados brasileños con precio medio desde 2 hasta 3 US dólares por kilo.

La región semiárida del Nordeste es la principal área de producción del saramuyo en Brasil con 70% del total, destacándose el estado de Bahía en las zonas de Presidente Prudente y Juazeiro, el estado de Alagoas en la zona de Palmeira dos Índios, el estado de São Paulo en la zona de Jales, el estado de Pernambuco en la zona de Petrolina y en el norte del estado de Minas Gerais. En su gran mayoría, son áreas de clima tropical semiárido y de altitudes inferiores a mil metros (Nietsche *et al.*, 2008).

La variedad criolla típica de cáscara verde clara es la única cultivada comercialmente y se mantiene desde su introducción en Brasil. En la actualidad, nuevas variedades de diferentes colores y textura de cáscara están surgiendo en los programas de mejoramiento de las anonáceas en las instituciones de investigación como la Universidad Federal de Alagoas y Embrapa Semi-árido. Tipos sin cera, de color verde oscuro, amarillo, rojo o violeta, de cáscara tuberculada, lisa o puntuda son algunas variaciones obtenidas entre los accesos de saramuyo. A partir de estos genotipos pueden ser creadas nuevas variedades y contribuir para el crecimiento de los mercados en Brasil y en el mundo.

La propagación del saramuyo ha sido principalmente por vía seminal por la facilidad del método, precocidad y la aparente homogeneidad de las plantas, otros métodos vegetativos como el injerto, el enraizamiento de estacas y el cultivo de tejidos han sido propuestos para el clonaje de las nuevas variedades y mantenimiento de sus caracteres genéticos.

Un interesante sistema de propagación del saramuyo por injertía precoz fue propuesto por Lemos *et al.* (2010) que establecieron el método de injerto por hendidura de topo como lo más eficaz en portainjertos a partir de 3 meses de edad (cuadro 1).



Cuadro 1. Porcentaje del pegamiento de los injertos en función de la edad del portainjerto y del tipo de injerto en saramuyo (*Annona squamosa* L.)

Tipo de injertía			
Edad del portainjerto	Yema en escudo	Hendidura de topo	Hendidura lateral
3 meses	26,67 cC	96,67 aA	60,0 bB
5 meses	50,0 bcB	73,33 aA	80,0 aA
7 meses	90,0 aA	90,0 aA	83,33 aA
9 meses	73,33 abA	86,67 aA	86,67 aA
Medias	60 b	86 a	77 a
CV%	24,31	19,98	19,97

Medias en la columna seguidas de misma letra minúscula y en la línea por letra mayúscula no difieren entre sí por el test de Tukey hasta 5% de probabilidad (Lemos *et al.*, 2010)

Estudios no publicados aún y llevados a cabo por nosotros en 2010 en la Universidad Federal de Alagoas establecen a la estaquia como una posibilidad eficiente y de bajo costo para el clonaje del saramuyo. Se demostró que las auxinas utilizadas en el experimento no interfirieron en el proceso de enraizamiento de las estacas y que ramas jóvenes y vigorosas pueden enraizar en porcentajes de hasta 70% en cerca de 60 días en cámara con nebulización intermitente. Los árboles originados por este método tienen producción temprana y satisfactoria.

La micropropagación del saramuyo fue intentada por diversos autores con relativo éxito, mas hasta el momento no hay un protocolo estándar para su uso comercial (Lemos y Blake, 1996).

El saramuyo y las otras anonas cultivadas producen centenas de flores dicogámicas, o sea sus flores bisexuales tiene receptivos los órganos masculinos y femeninos en tiempos diferentes para evitar la autopolinización. En cada estación de crecimiento nuevas flores se producen en las ramas nuevas, pero por falta de polinización natural ellas caen y no forman frutos o, cuando son polinizadas por insectos, producen frutos mal formados, siendo necesaria la polinización manual. En Brasil los polinizadores naturales son los escarabajos *Carpophilus hemipterus*, *Carpophilus sp.* y *Haptoncus ochraceus* de la familia Nitidulidae que en la ma-

yoría de los casos no son suficientes para garantizar un número grande de flores polinizadas y frutos bien formados (Kiill y Costa, 2003).

La tecnología de la polinización manual es hoy una práctica bien establecida y necesaria en Brasil, mas su uso está condicionado a la educación y el conocimiento de los pequeños productores. Esta práctica eleva significativamente la productividad de las plantas y la calidad de los frutos y por consiguiente los precios obtenidos en los mercados (Oliveira *et al.*, 2005).

En la polinización manual, las flores hembras son cosechadas el día anterior a la polinización. Los estambres liberan el polen que es utilizado puro o en mezcla con hasta 50% almidón de maíz sobre los estigmas fértiles de las flores hembras del día siguiente. La transferencia del polen se hace con pinceles o insufladores manuales y en general se polinizan desde 80 hasta 100 flores en un periodo desde 20 hasta 45 días teniendo en mente dejar cerca de 40 a 60 frutos bien formados por árbol para la producción de 12 a 15 kilos de frutos.

La poda de formación y mantenimiento del saramuyo es necesaria para mantener a los árboles hasta 2.5 metros de altura, lo que facilita el control de plagas y la cosecha. Es fundamental la poda de fructificación que garantizará floraciones uniformes y productivas. En cultivos con riego se puede dar un estrés hídrico a las plantas antes de podar las ramas de la estación anterior y remover las hojas restantes. Enseguida se vuelve al riego para inducir el surgimiento de nuevos brotes, ramas y flores. Cerca de 60 días después de la poda de fructificación las flores están maduras para la polinización.

El riego del saramuyo es fundamental para la obtención de frutos fuera de época, cuando hay mejores precios en el mercado. El método más utilizado en Brasil es la microaspersión que se considera más barata y más eficiente que otros métodos probados. Los productores de Alagoas y Bahía consideran necesaria una lámina de agua diaria desde 40 hasta 60 litros/árbol durante el ciclo para responder a la necesidad productiva de las plantas.

En cultivos bien conducidos, la cosecha empieza entre los 90 y 130 días después de la polinización, dependiendo de la temperatura ambiental. El periodo de fructificación tiende a ser menor en el verano

cuando las temperaturas son más elevadas y mayor en el invierno cuando las temperaturas son más bajas.

La cáscara de los frutos está cubierta de cera y es muy sensible a golpes, arañazos y contusiones necesitando de una cosecha cuidadosa con tijeras de podar y un manejo esmerado. Pequeños daños a la cáscara la tornan ennegrecida y aceleran la maduración de los frutos. Las temperaturas elevadas ( $> 25^{\circ}\text{C}$ ) en ambientes cerrados son también factores que aceleran la maduración. Por otro lado, el enfriamiento y la conservación de las frutas en ambientes con temperatura bajas (desde  $8$  hasta  $15^{\circ}\text{C}$ ) y elevada humedad relativa ( $> 90\%$ ) aumenta de dos a tres veces el periodo útil de mercadeo de los frutos que puede llegar a 21 días sin perder la calidad (Torres, 2008). El acondicionamiento de las frutas en red de espuma de polietileno y transporte en cajas de cartón con camada única con capacidad para cerca de 3 kilos es un óptimo diferencial para determinar la calidad y obtener mejores precios.

Muchas plagas atacan la planta y frutos del saramuyo. En Brasil las principales son los barrenadores de los frutos (*Cerconota annonella*) y semillas (*Bephrateloides pomorum*). La protección de los frutos y semillas limita la producción en algunas regiones, aunque el empleo de insecticidas y bolsas de papel sobre los frutitos disminuyen las pérdidas. Otros métodos de control biológico como el uso de trampas luminosas y trampas con hembras vírgenes de los insectos han sido usados pero sin éxito práctico.

Fuera de la fertilización del saramuyo, que aún no es comprendida en su totalidad, y del control de plagas, las otras tecnologías para su producción están basadas en resultados de investigaciones científicas y pueden ser utilizadas para multiplicar la producción brasileña del saramuyo.

### El caso de la guanábana (*Annona muricata*)

En Brasil existen cerca de 4,000 hectáreas cultivadas con guanábana, principalmente en las regiones Nordeste y Norte con cerca de 90% del total. La mayoría de los cultivos son de muy baja productividad (4 ton/ha/año) por falta del uso de tecnologías con variedades superiores, propagación asexual, poda, riego, fertilización y polinización manual.

Por ser una especie amazónica, la guanábana ha sido cultivada en clima húmedo con pluviosidad anual superior a 1,200 mm/año. El cultivo en estas condiciones propicia el ataque de plagas en las plantas y frutos. La zona semiárida con pluviosidades inferiores a 800 mm/año, es muy propicia para el cultivo de saramuyo y la atemoya, no ha sido la más indicada para la guanábana. En el estado de Alagoas, zonas intermedias con precipitaciones anuales entre 800 y 1,200 mm/año son las que presentan mejores resultados.

Algunos tipos distintos de guanábana como: criolla, morada, lisa, blanca, FAO y otras selecciones son conocidas entre los técnicos y productores, mas solamente los dos primeros tipos son efectivamente cultivados. En el año 2000 fue presentada por la Sociedad Brasileira de Fruticultura la primera variedad comercial brasileña de guanábana denominada “Gigante das Alagoas” originada de una selección masiva de plantas de tipo Morada en el estado de Alagoas (Lemos, 2000). Esta variedad produce frutos de peso medio superior a 5 kg y muy frecuentemente son observados frutos con más de 10 kg siendo recomendada para la industria de pulpa congelada. Son plantas muy productivas que pueden producir individualmente más de 100 kg de frutos/año o 28 ton/ha/año en densidades desde 285 hasta 400 plantas/ha (desde 5 x 7 m hasta 5 x 5 m).

La guanábana es habitualmente propagada por vía seminal, mas la práctica de injertía es cada vez más popular entre los productores por conferir precocidad y el mantenimiento de los caracteres genéticos de las plantas seleccionadas. Las técnicas de injertía precoz y enraizamiento de estacas han sido desarrolladas para la guanábana con éxito y deben tornarse más comunes en el futuro (Kitamura y Lemos, 2004). La micropropagación, técnicamente establecida por Lemos y Baker (1998), no presenta aún ventajas comerciales con relación a otros métodos de clonaje que justifiquen su uso.

Igualmente, siendo cultivada en áreas de mayor humedad, la guanábana requiere riego complementario especialmente en los meses de sequía cuando las plantas necesitan de más agua para el florecimiento y crecimiento de los frutos. En los cultivos comerciales más desarrollados, se han hecho riegos por microaspersión abajo del dosel de los árboles con láminas de agua variando desde 40 hasta 80 litros/árbol/día.

La poda de manutención de altura de las plantas hasta 2.5 metros es fundamental para que otras prácticas culturales como la polinización manual, control de plagas y enfermedades y cosecha adecuada puedan ser realizadas. La poda de formación de las plantas para mantener la copa baja y abierta debe ser iniciada aun cuando las plantas son pequeñas. En esta especie no se sigue la poda de fructificación común al saramuyo y atemoya. Las hojas de la guanábana son siempre verdes y perennes y las plantas producen yemas florales múltiples en almohadillas leñosas viejas o yemas florales simples en ramas terminales de la estación, por eso no se recomienda la poda de fructificación.

La guanábana, así como las otras anonas cultivadas poseen flores dicogámicas, es decir, flores hermafroditas que tienen las partes femeninas y masculinas con maduración desencontrada. La polinización natural es hecha principalmente por escarabajos del género *Cyclocephala* que llevan granos de polen de flores en fase masculina a flores en fase femenina. Pero, la mayoría de los cultivos necesitan de polinización manual para producir adecuadamente.

Para promover la polinización manual se cosechan flores en la fase hembra el día anterior al día que se quiera polinizar. Las flores hembras cosechadas, maduran sus estambres desde 12 hasta 24 horas, aproximadamente, y el polen que queda disponible puede ser puesto en recipientes y transferido con pincel o insufladores a los carpelos de nuevas flores hembras de día. Esa práctica se hace por la mañana del día siguiente a la cosecha de las flores. Una flor puede producir bastante polen para polinizar cerca de diez flores hembras, el polen se mezcla con 40% de almidón de maíz.

Muchas plagas atacan la planta y frutos de la guanábana. En Brasil las principales son los barrenadores de los frutos (*Cerconota annonella*), semillas (*Bephrateloidea pomorum*) y tallo (*Cratosomus bombina*). La protección de los frutos y semillas se realiza con bolsas plásticas perforadas y colocadas sobre los frutillos.

Los principales mercados para la guanábana en Brasil son las industrias procesadoras de la pulpa. El equilibrio existente entre el azúcar y la acidez de la pulpa le confieren características adecuadas para el uso en diversos productos industriales como jugos, néctares, helados y pa-

letas, yogures, bebidas de leche, entre otros. Los productores venden la *pasta* (pulpa + semillas) congelada de guanábana en un precio cercano a 1.75 US dólares/kilo para las industrias procesadoras. Las industrias procesan la *pasta* y venden la pulpa pura congelada en saquillos de 100 gramos al precio de 10 US dólares/kilo.

La fruta fresca tiene un mercado limitado en volumen por las dificultades de transporte, manejo y conservación en la postcosecha, mas se pueden conseguir precios aún mejores para los productores (2 US dólares/kilo). Solamente frutos con hasta 2 kilos y bien formados poseen condiciones de entrar en este mercado. Selecciones de genotipos de guanábana con frutos menores y más dulces para el mercado de frutas frescas están en curso en instituciones de investigación brasileñas.

Los mayores problemas del cultivo de la guanábana en Brasil son: ajustes en la fertilización de las plantas, el control más eficiente de los insectos plagas y la selección de variedades más dulces y más resistentes postcosecha para el mercado *in natura*.

### El caso de la atemoya (*Annona cherimola* x *Annona squamosa*)

Las principales variedades de atemoya producidas en Brasil son Gefner, Pink's Mammoth, African Pride y Thompson. La variedad Gefner es la más cultivada con cerca de 1,000 hectáreas probablemente por producir frutos grandes y soportar bien las temperaturas más elevadas del clima tropical brasileño. Además, todas las variedades de atemoya tienen amplitud térmica mayor que el saramuyo y pueden también ser producidas en zonas de altitudes superiores a mil metros (Nietzsche *et al.*, 2008).

La producción de atemoya en Brasil está casi siempre asociada a la del saramuyo. El comportamiento fisiológico de ambas especies es semejante en el sentido de que pierden sus hojas para generar nuevas yemas vegetativas y flores. Además, para producir atemoya con éxito, los productores muchas veces polinizan sus flores con polen del saramuyo creyendo obtener mejor amarre de los frutillos.

La productividad de atemoya Gefner de algunos huertos brasileños en Bahía es estimada en cerca de 12 hasta 15 ton/ha/año. Estos valores

son más grandes que el promedio de los obtenidos con otras anonas porque los árboles son clones de variedades definidas que fueron propagadas por métodos vegetativos y la mayoría de los productores utilizan las mejores técnicas de producción como fertilización, riego por microaspersión, poda y polinización manual.

Los estados de São Paulo, Minas Gerais, Bahía, Pernambuco y Alagoas son las principales áreas de producción de atemoya en Brasil. Las temperaturas en São Paulo y Minas Gerais son más amenas (10-32°C) lo que admite el cultivo de variedades de atemoya que se producen mejor a temperatura más baja como la African Pride y Pink's Mammoth. Mientras que en la zona semiárida de los estados de Bahía, Pernambuco y Alagoas, donde la temperatura varía entre 18° y 35°C, se produce la variedad Gefner (Nietsche *et al.*, 2008).

La densidad de plantío adoptada para la atemoya ha variado bastante. Se pueden encontrar cultivos comerciales con cerca de 285 árboles/hectárea en São Paulo y cultivos muy densos con 1,250 árboles/hectárea en la zona semiárida de Bahía.

Naturalmente muy vigorosa, la atemoya debe ser conducida con poda de formación y fructificación como el saramuyo. Mayores densidades de plantío exigen podas más bajas de las plantas, que se efectúan después de la cosecha y antes de un nuevo ciclo de producción como en el saramuyo.

El mercado brasileño para la atemoya está aún poco desarrollado. La oferta de la fruta es baja y los precios son atractivos a los productores (media > 3,00 US dólares/kilo), pero la demanda también es baja porque no se conoce muy bien. La producción de atemoya es destinada básicamente para el mercado de frutas frescas siendo necesario producir frutas bien formadas, sin daños y con un peso entre 350 y 800 gramos.

La popularización de la atemoya en el mercado brasileño dependerá del aumento de la oferta y realización de campañas de degustación con el público consumidor potencial. La posibilidad de utilizar la pulpa de la atemoya para la industria de jugos, helados, yogures entre otros productos puede ser un atractivo extra para ampliar su cultivo en Brasil y de esta manera darle uso a las frutas de menor valor.

## Conclusión

Los avances en el cultivo del saramuyo, guanábana y atemoya son visibles en Brasil y señalan un escenario optimista. La producción de las anonas en Brasil tiende a crecer ocupando su propio nicho en la medida que las nuevas tecnologías van siendo desarrolladas y adoptadas por los productores. También el esfuerzo de divulgación de las nuevas tecnologías deben ser tan urgentes así como los esfuerzos para desarrollarlas.

## Agradecimientos

El autor agradece a UFAL, SEAGRI-AL, FAPEAL y FINEP por el soporte financiero de la investigación.





## Referencias

- Bonaventure, L. 1999. A cultura da cherimóia e de seu híbrido, a atemóia. Editora Nobel. Brasil. 182 pp.
- IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). 2008. Levantamento sistemático da produção agrícola. Disponível: [HTTP://www.ibge.gov.br](http://www.ibge.gov.br). Acesso em Julio de 2008.
- Kiill, L.H.P. y Costa, J.G. 2003. Biologia floral e sistema de reprodução de *Annona squamosa* L. (Annonaceae) na região de Petrolina-PE. *Cienc. Rural*. 33 (5): 851-856.
- Kitamura, M.C. y Lemos, E.E.P. 2004. Enxertia precoce da gravioleira (*Annona muricata* L.). *Rev. Bras. Frutic.* 26 (1): 186-188.
- Lemos, E.E.P. 2000. Graviola. En: Novas variedades brasileiras de frutas. Donadio, L.C. Ed. Sociedade Brasileira de Fruticultura. Brasil. pp. 95-98.
- Lemos, E.E.P. y Baker, D.A. 1998. Shoot regeneration in response to carbon source on internodal explants of *Annona muricata* L. *Plant Gr. Reg.* 25 (1): 105-112.
- Lemos, E.E.P. y Blake, J. 1996. Micropropagation of mature *Annona squamosa* L. *Plant Cel. Tis. Org. Cult.* 46 (1): 77-79.

- Lemos, E.E.P., Salvador, T.L., Santos, M.Q.C., Rezende, L.P., Lima Salvador, T. y Lima, H.M.A. 2010. Produção de porta-enxertos em tubetes e enxertia precoce da pinheira (*Annona squamosa* L.). *Rev. Bras. Frut.* 32 (3): 865-873.
- Oliveira, Z.P.O., Queiroz, F.M., Barros, P.G., Campos, R.S., Lemos, E.E.P. y Neto, J.P.S. 2005. Recomendações técnicas para a cultura da pinheira. Boletim no. 1. SEAGRI-AL, Brasil. 56 pp.
- Pinto, A.C.Q., Cordeiro, M.C.R., Andrade, S.R.M, Ferreira, F.H., Filgueiras, H.A.C., Alves, R.E. y Kimpara, D.J. 2005. *Annona* species. Fruits for the future, 5. International Centre for Underutilised Crops. University of Southampton. UK. 263 pp.
- Popenoe, W. 1974. The Anonaceous Fruits; The Cherimoya. In: Manual of tropical and subtropical fruits, Facsimile of the 1920 ed. Hafner Press, a Division of Macmillan Publishing Co, Inc., New York, Collier-Macmillan Publishers. UK. 5: 161-189.
- Nietsche, S., Ferreira, M.C.T., Mizobutsi, E.H. y Xavier, A.A. 2008. Injúria por frio (chilling): um alerta aos produtores de pinha do norte de Minas Gerais. Boletim Técnico. Editora Unimontes. Montes Claros, Brasil. 1 (1): 5-12.
- Torres, L.M.A.R. 2008. Conservação pós-colheita de atemóia cv. "Thompson". (Tesis de Maestría). Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Araraquara, Brasil. 124 pp.

# Las anonáceas: fuente de inspiración para la obtención de nuevos medicamentos

Cabedo, Nuria, Moreno, Laura  
López, Sonia, Marín, Paloma  
Párraga, Javier, Cortes, Diego

Departamento de Farmacología, Laboratorio de Farmacoquímica, Facultad de Farmacia,  
Universidad de Valencia, 46100 Burjassot, Valencia, España  
[www.farmacoquimicavalencia.es](http://www.farmacoquimicavalencia.es)

La Farmacoquímica Natural estudia los principios activos obtenidos a partir de materias primas de origen natural, ya sean vegetales, animales o microorganismos. Estos principios activos son moléculas, también denominadas metabolitos secundarios activos (MSA), que la naturaleza biosintetiza y que pueden llegar a utilizarse directamente como fármacos, o constituir la fuente de inspiración en la preparación de nuevos medicamentos de síntesis (Cortes, 2007). La Farmacoquímica Natural aborda por tanto el estudio de estos MSA desde diferentes puntos de vista: 1) origen biológico (vegetal, animal y microorganismo); 2) origen biogenético; 3) propiedades fisicoquímicas (solubilidad, polaridad, métodos de extracción y purificación); 4) determinación estructural (Resonancia Magnética Nuclear, Espectrometría de Masas y Rayos X); 5) propiedades farmacológicas (actividad, meca-

nismo de acción, REA); y 6) aplicaciones terapéuticas (enfermedades para las cuales estos compuestos podrán ser utilizados) (Cortes, 2007).

Un ejemplo representativo de fármaco de origen natural lo constituye la penicilina G. Este MSA se aísla del hongo *Penicillium chrysogenum* y se biosintetiza a partir de la condensación de aminoácidos. Su estructura, presenta un grupo ácido carboxílico que permite la extracción de la penicilina G en forma de sal, y se caracteriza por poseer como farmacóforo un anillo  $\beta$ -lactama, además de contar con agrupamientos fundamentales como son el anillo tiazolidina y un enlace amídico. Su capacidad de inhibir la síntesis de la pared bacteriana, permiten su uso como antibiótico en diversas enfermedades infecciosas, tales como ciertas amigdalitis, meningitis o enfermedades venéreas.

Otro ejemplo de fármaco de origen natural sería la morfina, obtenida de las cápsulas de adormidera (*Papaver somniferum*). Su alta afinidad por los receptores opioides dota a esta molécula de una potente actividad analgésica. Ambos MSA y sus análogos estructurales, son algunos de los muchos ejemplos de fármacos de origen natural ampliamente utilizados hoy día en terapéutica (figura 1).

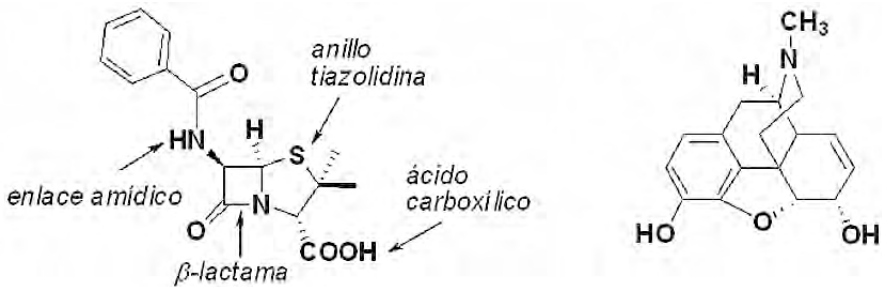


Figura 1. Penicilina G y Morfina

Estos productos naturales o MSA, y muchos otros, ocupan un papel fundamental en la industria farmacéutica, ya que en la actualidad la mitad de los medicamentos prescritos tienen un origen natural, directamente o mediante transformaciones químicas (Silverman, 2004). Concretamente, en el área del cáncer y enfermedades infecciosas se encuentran más del 60% y 75%, respectivamente, de fármacos de ori-

gen natural. Hoy en día, se está dando especial relevancia a los microorganismos de origen marino, éstos ocupan una parte extensa de la naturaleza todavía por explorar (> 70% de la superficie del planeta) dotada de gran biodiversidad. Aunque pocos metabolitos procedentes del mar se encuentran actualmente en el mercado o en ensayos clínicos, los organismos marinos representan la principal fuente de nuevos productos bioactivos con potencial farmacéutico, y con una diversidad inusual en sus estructuras químicas. La investigación de metabolitos de origen marino se inició en la década de 1950 por Werner Bergman y John Faulkner, y alcanzó mayor interés en las últimas décadas. Cabe destacar de los estudios realizados por el Instituto Nacional del Cáncer (EU), que alrededor de un 1.8% de los extractos de especies marinas presentan algún tipo de actividad antitumoral, mientras que en organismos terrestres sólo un 0.4% de los extractos presentan actividad. En el mar habitan numerosos organismos invertebrados de cuerpo blando y/o sésiles capaces de sintetizar u obtener (a partir de otros microorganismos) metabolitos secundarios tóxicos para defenderse de los depredadores. Hasta el momento, se han encontrado más de 15,000 productos naturales de origen marino, incluyendo numerosos compuestos con potencial farmacéutico. Algunos de estos compuestos ya se encuentran en el mercado, por ejemplo: el potente analgésico del SNC Prialt® (ziconotida, un derivado sintético del péptido  $\omega$ -conotoxina aislado del molusco *Conus magus*) y el agente antineoplásico Yondelis® (trabectedina o ET-743, una ecteinascidina aislada de un tunicado caribeño, *Ecteinascidia turbinata*); otros compuestos antineoplásicos se encuentran en fase clínica, por ejemplo dentro del grupo de los ciclo-depsipéptidos destacan: Aplidin® (obtenido inicialmente mediante semisíntesis a partir de didemnina A, un metabolito aislado a partir del tunicado *Aplidium albicans*), Kahalalida F (aislado de un molusco marino sin caparazón *Elysia rufescens* y del alga *Bryopsis pennata* que forma parte de la dieta del molusco) (figura 2) y las dolastatínas (pentapéptidos lineales que se obtienen del molusco *Dolabella auricularia*); en el grupo de los alcaloides tipo pirroloquinolina encontramos las isobatzellinas A-D (aislados de esponjas pertenecientes a distintos géneros, destacando *Zyzya* y *Batzella* sp.).

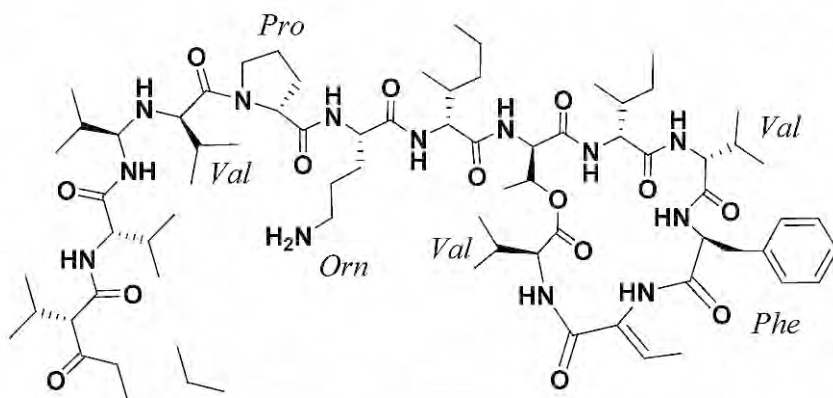


Figura 2. Kahalalida F

Algunos metabolitos de origen marino con propiedades antitumorales, son además inhibidores de la cadena respiratoria mitocondrial (CRM), y por tanto de la síntesis de ATP, pudiendo ser éste un posible mecanismo de su acción citotóxica. Un ejemplo son los diterpenos aislados de la esponja *Dysidea sp.*, puupehenona y heterumadienona, que mostraron unas  $CI_{50}$  de 1.28  $\mu\text{M}$  y 4.71  $\mu\text{M}$ , respectivamente (figura 3) (Ciavatta *et al.*, 2007).

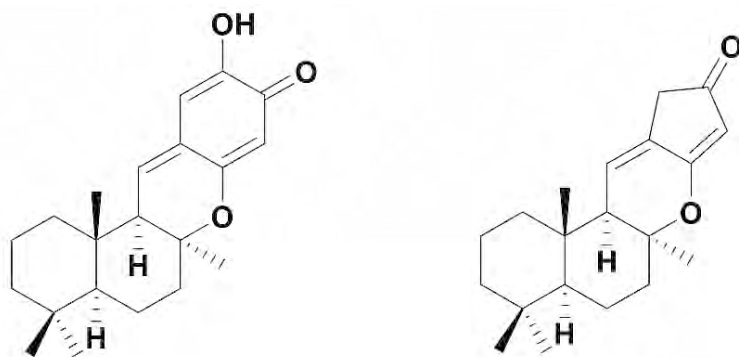
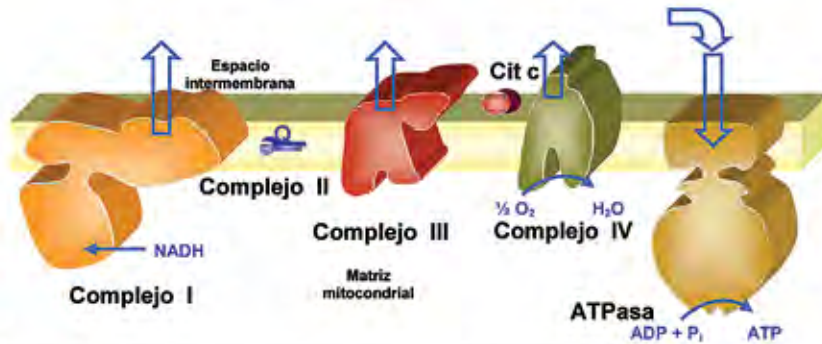


Figura 3. Puupehenona y Heterumadienona

El Complejo I de la CRM es el mayor y más complejo de los sistemas enzimáticos implicados en los procesos bioenergéticos de la membrana mitocondrial interna. Su función es la oxidación del NADH formado en la matriz mitocondrial por las vías catabólicas oxidativas, canalizando los equivalentes de reducción hacia el espacio intermembranal. Los electrones siguen su vía hacia la reducción del oxígeno molecular a través de los complejos III y IV, incrementando así el gradiente de protones en el espacio intermembrana. Finalmente, el gradiente electroquímico generado es utilizado para la generación de ATP por la ATPasa mitocondrial, proceso conocido como fosforilación oxidativa.



<p><b>Complejo I = NADH: ubiquinona oxidoreductasa</b>  <b>Complejo II = Succinato: ubiquinona oxidoreductasa</b>  <b>Complejo III = Ubiquinol: citocromo c oxidoreductasa</b>  <b>Complejo IV = Citocromo c oxidasa</b></p>
--

En el presente trabajo, abordamos la obtención y el estudio de diversos tipos de MSA aislados en especies de la familia Annonaceae. Las plantas pertenecientes a esta familia se caracterizan por su gran contenido en diferentes esqueletos químicos con múltiples propiedades farmacológicas. Los MSA descritos serán aquellos de carácter “neutro” como las acetogeninas, estiril-lactonas, benzopiranos prenilados, y algunas isoquinoleínas (amídicas); así como los MSA de carácter “iónico” de los que forman parte las azafluorenonas y aquellas isoquinoleínas que contienen un nitrógeno secundario o terciario, capaz de protonarse en condiciones ácidas.



## 1. Acetogeninas

Las plantas pertenecientes a la familia Annonaceae son conocidas desde hace tiempo tanto por su interés económico (proporcionan frutos comestibles y aceites esenciales) como por su utilización en medicina tradicional y popular (pesticidas y antiparasitarias). Los MSA en gran parte responsables de estas propiedades, son las acetogeninas (ACG), moléculas presentes exclusivamente en especies de la familia Annonaceae y que se caracterizan tanto por su original estructura química, como por las actividades biológicas y farmacológicas que son capaces de desarrollar. Entre ellas destacan las propiedades citotóxicas, antitumorales, antiparasitarias e insecticidas (Londerhausen *et al.*, 1991). La actividad citotóxica de las ACG se debe fundamentalmente a la inhibición selectiva, de rango nanomolar, que ejercen sobre el Complejo I de la CRM (Bermejo *et al.*, 2005). Estructuralmente se caracterizan por presentar una cadena de 32 o 34 átomos de C con varias funciones oxigenadas y una  $\gamma$ -lactona terminal. Su origen biogenético es similar al de los ácidos grasos. En los últimos años, se ha llevado a cabo una serie de estudios que han permitido postular la forma en que las ACG interactúan con el Complejo I. Para conocer mejor que parte de la molécula interactúa con dicho complejo, la estructura de las ACG se ha dividido en cuatro zonas: a) dominio lactónico terminal, b) dominio espaciador (cadena hidrocarbonada entre la lactona y los anillos THF), c) dominio polioxygenado (sistema THF), y d) dominio hidrofóbico terminal (figura 4).

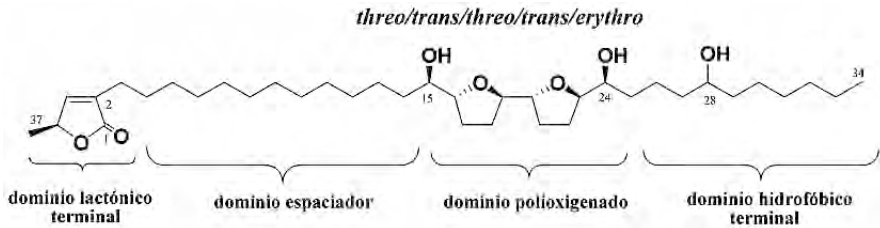


Figura 4. Estructura de scuamocina

Nuestro grupo de investigación ha centrado su interés en el aislamiento, evaluación de las propiedades biológicas y transformación química de las ACG aisladas en diversas especies tropicales de la familia Annonaceae. Algunos de los datos recientes sobre REA de las ACG, corresponden al efecto producido por la sustitución de la  $\gamma$ -lactona terminal en scuamocina (una potente ACG bis-THF, con una  $CI_{50}$  de 0.9 nM) (Duval *et al.*, 2006), así como la influencia de la acetilación de los hidroxilos presentes en el dominio polioxigenado de guanaconetinas (un grupo homogéneo de ACG bis-THF aisladas en semillas de *Annona spraguei*) (Chahboune *et al.*, 2006; Barrachina *et al.*, 2007). Los resultados obtenidos, apoyaron la idea de la importancia del dominio lactónico terminal para la actividad inhibidora del Complejo I, ya que su sustitución por otros grupos, dando lugar a derivados  $\gamma$ -cetoamidas y  $\gamma$ -cetoácidos, disminuye drásticamente esta actividad; si bien la  $\gamma$ -lactona puede ser sustituida por algún bioisómero sin que la actividad se vea notoriamente afectada. En cuanto al dominio polioxigenado, los datos obtenidos en las ACG guanaconetinas nos muestran que los grupos acetilo, especialmente en las monoacetiladas, modulan la actividad tanto frente a líneas celulares tumorales como en la inhibición de los complejos de la CRM, destacando la actividad en ensayos *in vitro* de guanaconetina-3, con una  $CI_{50}$  de 2.4 nM y 17  $\mu$ M para el Complejo I de la CRM y frente a la línea celular tumoral HepG2, respectivamente (figura 5).

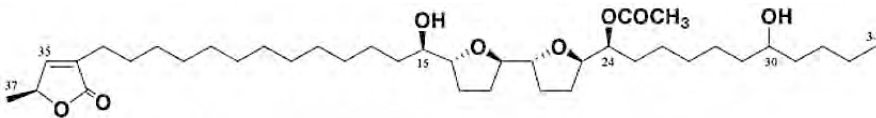


Figura 5. Estructura de guanaconetina-3

## 2. Estiril-lactonas

Por otra parte, en el curso de nuestra investigación sobre MSA citotóxicos presentes en especies de la familia Annonaceae, aislamos compuestos con esqueleto estiril-lactonas, descritos en la literatura por su

actividad citotóxica y antitumoral frente a varias líneas celulares tumorales humanas. Estos compuestos se caracterizan por poseer un esqueleto básico de 13 átomos de carbono con una estructura formada por un grupo estiril o pseudoestiril unido a un anillo  $\gamma$ - o  $\delta$ -lactona. Biogénicamente tienen un origen mixto: derivan de la vía del ácido shikímico y del acetil-CoA, para dar lugar a una molécula de ácido cinámico ( $C_6$ - $C_3$ ) y dos unidades de acetato/malonato ( $C_4$ ), respectivamente. Las estiril-lactonas se distribuyen especialmente en especies del género *Goniothalamus*, ampliamente utilizadas en medicina popular. Recientemente, se han aislado nuevas estiril-lactonas citotóxicas, las crassalactonas A-D, a partir de un extracto de hojas y ramas de *Polyalthia crassa*. En los ensayos *in vitro*, en líneas celulares tumorales humanas realizados sobre estos compuestos, destacó la actividad antitumoral de crassalactona B, que fue capaz de inhibir el crecimiento de la línea celular T de leucemia (Jurkat) con una  $CI_{50}$  de  $0.45 \mu M$  (Popsavin *et al.*, 2010).

En nuestro grupo, aislamos en el extracto metanólico de las cortezas del tronco de *Goniothalamus arvensis*, (+)-altholactona, como producto mayoritario, además de las furanopironas (+)-isoaltholactona, (+)-O-acetilaltholactona y (-)-etharvensin, así como otras estiril-lactonas con diferentes esqueletos (figura 6) (Bermejo *et al.*, 1995; Bermejo *et al.*, 1997; Bermejo *et al.*, 1998; Bermejo *et al.*, 1999). Altholactona, 5-acetoxigoniothalamina óxido y O-acetilaltholactona, fueron evaluados a nivel de su capacidad para inhibir la CRM en mitocondrias de corazón de ternera. Los resultados mostraron que estas estiril-lactonas naturales eran potentes inhibidores de la cadena transportadora de electrones (Peris *et al.*, 2000).

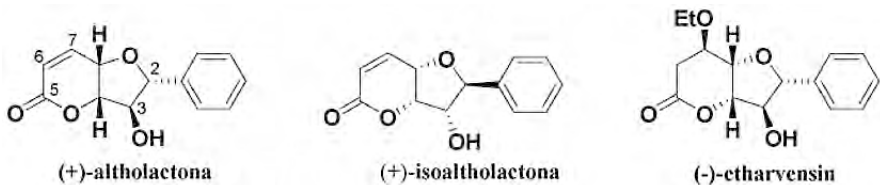


Figura 6. Furanopironas de *Goniothalamus arvensis*

Debido al interés biológico de las estiril-lactonas y con la finalidad de establecer criterios de REA, se sintetizaron una serie de nuevos análogos de altholactona (derivados 1-9), así como del producto natural goniotaldesiol (derivados 10-11) (figura 7). Estudios *in vitro* de la actividad citotóxica de las estiril-lactonas naturales y sintéticas, frente a líneas celulares tumorales de leucemia L-1210, mostraron que altholactona y algunos de sus derivados (compuestos 4-6), eran capaces de inhibir la proliferación celular, actuando a nivel de la fase  $G_2+M$  del ciclo celular (estudios realizados en colaboración con la empresa farmacéutica Laboratoires Servier) (Bermejo *et al.*, 1999). Además, todos los derivados mostraron capacidad para inhibir el Complejo I de la CRM, destacando O-acetilaltholactona con una  $CI_{50}$  de 4.7  $\mu M$  (Peris *et al.*, 2002).

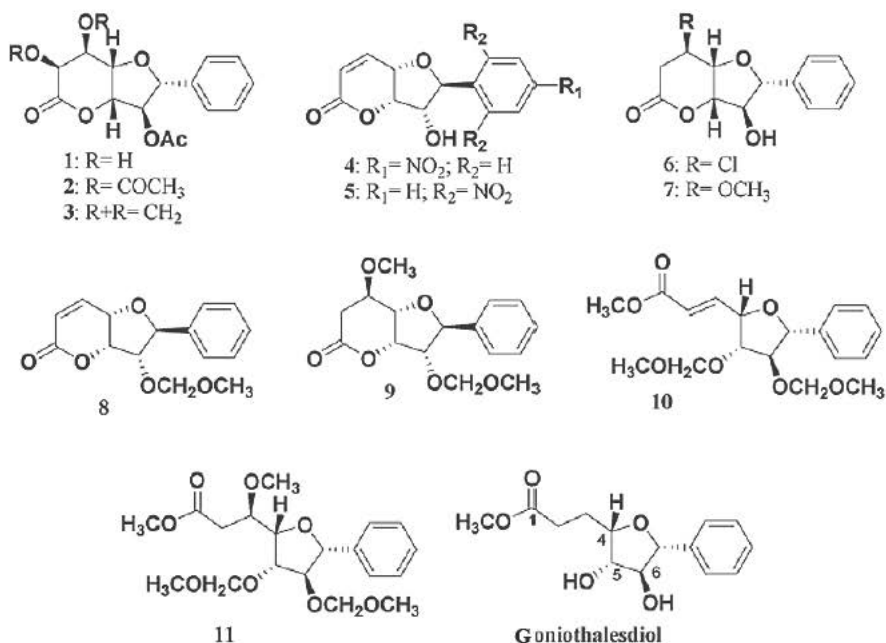


Figura 7. Estiril-lactonas semisintéticas (1-11)

### 3. Benzopiranos prenilados

Los benzopiranos prenilados, son otro grupo de MSA presentes en especies de la familia anonácea, concretamente en las del género *Polyalthia*. Estos compuestos bioactivos pueden encontrarse además en plantas superiores de otras familias y en numerosos organismos marinos (corales, esponjas marinas, tunicados, etcétera). Biogénicamente, son metabolitos secundarios de origen mixto, ya que proceden del ácido shikímico y del acetil-CoA. El género *Polyalthia* incluye más de 150 especies siendo todas ellas típicas de zonas tropicales de África, Asia y Oceanía. Nuestro estudio se llevó a cabo sobre el extracto metanólico de la corteza del tronco de dos especies: *P. cerasoides* y *P. sclerophylla*. En dichas especies se aislaron nuevos benzopiranos prenilados: polycerasoidina, polycerasoidol, (6E, 10E)-isopolycerasoidol, polycerasoidina metil éster y polyalthidina (figura 8) (González *et al.*, 1995; González *et al.*, 1996). Debido a la similitud estructural de los benzopiranos prenilados con el ubicromanol (derivado de la coenzima Q, complejo de la CRM) se realizaron sobre polycerasoidina, polycerasoidol y polyalthidina ensayos de actividad inhibitora del Complejo I de la CRM, pudiendo concluir que polyalthidina era el inhibidor más potente de los tres benzopiranos ensayados, con una  $CI_{50}$  de 4.4  $\mu$ M frente a 11  $\mu$ M y 37  $\mu$ M para polycerasoidina y polycerasoidol, respectivamente (Zafra-Polo *et al.*, 1996). Esta actividad inhibitora de la cadena transportadora de electrones de los benzopiranos prenilados, podría explicar las propiedades citotóxicas y antitumorales que presentan estas especies vegetales.

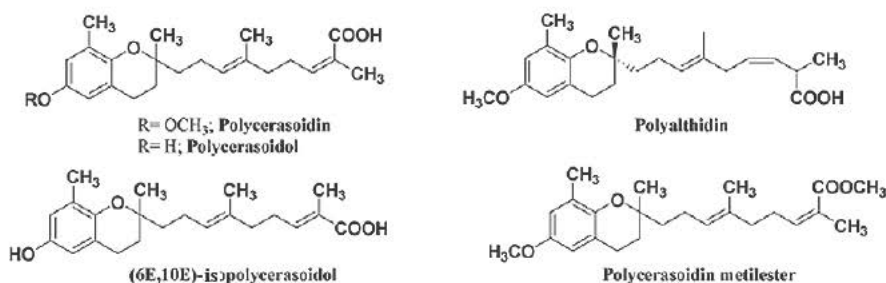


Figura 8. Benzopiranos prenilados de especies de *Polyalthia*

## 4. Isoquinoleínas

Los alcaloides isoquinoleínicos abarcan un amplio grupo de estructuras incluidas las benciltetrahydroisoquinoleínas (BTHIQ), aporfinas (AP) y protoberberinas (PB), que pueden encontrarse en especies de un gran número de familias botánicas dentro del orden de las Magnoliales, entre las que se encuentra la familia de las anonáceas. Biogénicamente, al igual que otros esqueletos isoquinoleínicos, las AP y PB se forman a partir de los alcaloides BTHIQ que a su vez proceden de la tirosina, junto con los correspondientes productos de descarboxilación. La dopamina (obtenida a partir de la tirosina) se condensa con el *p*-hidroxifenilacetaldehído para dar lugar a la primera BTHIQ, norcoclaurina. Estos metabolitos destacan por presentar afinidad por los receptores de la dopamina, que son receptores de membrana acoplados a una proteína G, la aplicación de métodos de clonación usando técnicas de biología molecular ha permitido clasificarlos en dos subfamilias, D<sub>1</sub>-like (D<sub>1</sub> y D<sub>5</sub>) y D<sub>2</sub>-like (D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> y D<sub>4</sub>), con secuencias de aminoácidos y propiedades farmacológicas comunes. Los receptores D<sub>1</sub>-like poseen alta afinidad por ligandos benzacepínicos, SCH 23390 y SKF 83566 (figura 9) y una moderada afinidad por agonistas clásicos de dopamina (apomorfina) y por agonistas selectivos como SKF 38393.

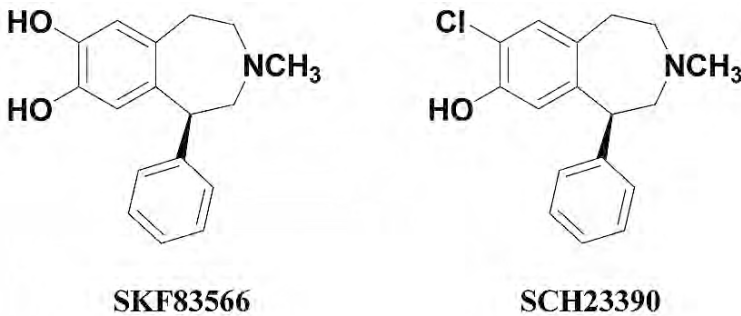


Figura 9. Ligandos específicos de receptores D<sub>1</sub>

Los receptores  $D_2$ -like se localizan tanto a nivel presináptico (autorreceptores, regulan la liberación de dopamina) como postsináptico. Las butirferonas (haloperidol) y las benzamidas sustituidas (sulpirida y racloprida, antagonistas  $D_2$ ) (figura 10), poseen alta afinidad por dichos receptores, al igual que las fenotiazinas y los tioxantenos. Dado que los receptores  $D_3$  y  $D_4$  se expresan fundamentalmente en las regiones corticales y límbicas, implicadas en el control del conocimiento y de las emociones, son el objetivo del estudio de una nueva generación de fármacos que permitan paliar algunos trastornos neurológicos y psiquiátricos con baja incidencia de efectos colaterales extrapiramidales.

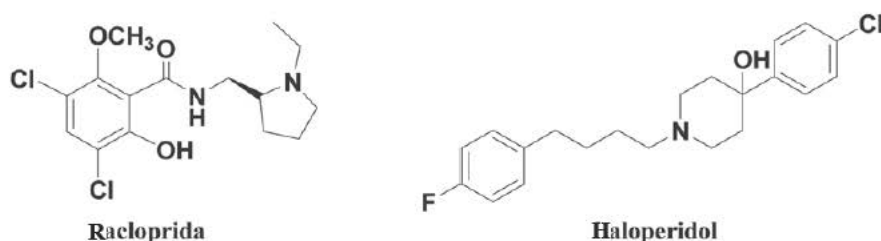


Figura 10. Antagonistas de receptores  $D_2$

Farmacológicamente, los antagonistas dopaminérgicos son agentes que pueden ser utilizados en el tratamiento clínico de la esquizofrenia, manía, delirios y la enfermedad de Huntington, mientras que los agonistas dopaminérgicos se utilizan en desórdenes neuroendocrinos y en la enfermedad de Parkinson. Muchos de los inhibidores del transportador de dopamina inactivan el proceso de recaptación, actuando como anti-depresivos puesto que aumentan la concentración de dopamina en la hendidura sináptica y por tanto activan la neurotransmisión dopaminérgica. Actualmente, los inhibidores del transportador de dopamina han sido prescritos para el tratamiento del déficit de atención en los casos de hiperactividad (ADHD) y propuestos como fármacos potenciales en los tratamientos de adicción a la cocaína. Entre ellos destacan compuestos naturales y sintéticos, con esqueletos variados como tropánicos (tipo cocaína), núcleos isoquinoleínicos (tipo nomifensina), estructuras tricíclicas (tipo amineptina) o estructuras aril-piperacínicas (tipo GBR-12783).

Los estudios de afinidad por los receptores D<sub>1</sub>-like y D<sub>2</sub>-like se llevan a cabo mediante ensayos *in vitro* utilizando técnicas de fijación con radioligandos específicos, denominadas técnicas de binding, en cuerpo estriado de rata. Son experimentos de competición donde se evalúa la capacidad de los compuestos ensayados para desplazar los radioligandos <sup>3</sup>H-SCH 23390 (ligando selectivo de receptores D<sub>1</sub>-like) y <sup>3</sup>H-racloprida (ligando selectivo de receptores D<sub>2</sub>-like) de sus lugares de unión al receptor. En el caso de la recaptación de dopamina, los estudios *in vitro* de inhibición se realizan en los sinaptosomas de cuerpo estriado de rata, utilizando <sup>3</sup>H-dopamina como sustrato de los transportadores dopaminérgicos.

Estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación, determinaron la importancia de algunos grupos funcionales en el esqueleto de las isoquinoleínas para mejorar su afinidad por los receptores dopaminérgicos.

#### **4.1. Bencilisoquinoleínas**

Se han llevado a cabo numerosos estudios de REA sobre BTHIQ, lo que ha permitido conocer algunas características estructurales que modulan la afinidad de dichas moléculas por los receptores dopaminérgicos: a) la presencia de un átomo de cloro en posición 7 y de un hidroxilo en posición 6, b) la configuración (S) del centro estereogénico, y c) la naturaleza del sustituyente en posición 1; habiendo podido determinarse, en las series 1-butil-, 1-fenil- y 1-bencil-THIQ, que la afinidad por los receptores D<sub>2</sub> es mayor cuando en posición 1 existe un sustituyente butil o bencil, mientras que la afinidad por D<sub>1</sub> aumenta cuando en dicha posición el sustituyente es un fenil, probablemente debido a la flexibilidad del grupo butil o bencil para adoptar una configuración espacial determinada que favorezca la unión a D<sub>2</sub>.

Además, una de las moléculas sintetizadas de tipo 1-butil-BTHIQ y con OH en C-6 y Cl en C-7, mostró una elevada afinidad y selectividad por los receptores D<sub>2</sub> (CI<sub>50</sub> 66 nM), así como una actividad antidepresiva, deducida mediante ensayos de comportamiento realizados en experimentos *in vivo* con ratones (figura 11) (Cabedo *et al.*, 2001; El Aouad *et al.*, 2009; Berenguer *et al.*, 2009).





Figura 11. Isoquinoleínas 1-sustituidas dopaminérgicas

Por otra parte y dentro de este tipo de estructuras, sintetizamos una serie de 1-benzoil-3,4-dihidroisoquinoleínas (1-benzoil-DHIQ), mediante oxidación controlada del carbono bencílico de la imina precursora (resultados patentados con Laboratoires Servier) (Andreu *et al.*, 2002; Bermejo *et al.*, 2002). Estos derivados  $\alpha$ -cetoimina (con nitrógeno no alcalino y por tanto sin capacidad para fijarse a los receptores dopaminérgicos), fueron capaces de inhibir el crecimiento de líneas celulares tumorales de leucemia (L1210) e interferir en la fase  $G_1$  del ciclo celular (figura 12).

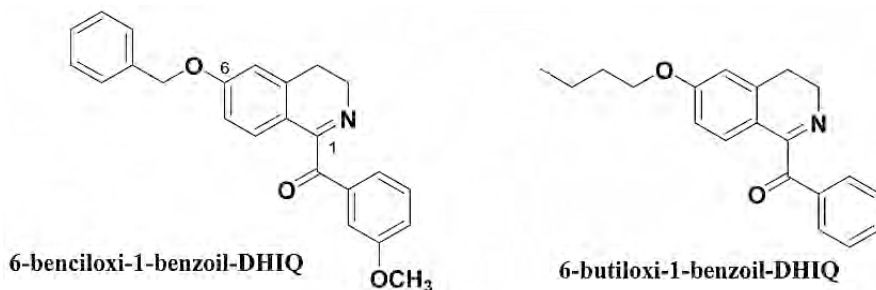


Figura 12. Benzoildihidroisoquinoleínas citotóxicas

#### 4.2. Aporfinas

La aporfinas (AP) han mostrado interesantes propiedades farmacológicas: antitumoral, anticonvulsivante, antipalúdica y antibacteriana, en-

tre otras. Una de las más utilizadas en terapéutica es la (*R*)-apomorfina, se trata de una AP semisintética, agonista de los receptores dopaminérgicos y utilizada clínicamente en la enfermedad de Parkinson. Algunas de las características químicas fundamentales de las AP, necesarias para aumentar la afinidad por estos receptores son: a) la presencia de un grupo OH en posición 11, b) la configuración (*R*) en posición 6a, c) el tamaño del sustituyente sobre el átomo de nitrógeno, y d) la presencia de halógenos en posición 3 (figura 13) (Cabedo *et al.*, 2009). A nivel de la recaptación de dopamina, se considera importante la presencia de un grupo metilendioxi sobre el motivo  $\beta$ -feniletilamina de las AP, como en el caso de anonaina. Esta AP se ha encontrado frecuentemente en especies de anonáceas, habiendo sido aislada por nosotros en *Xylopia papuana* (Protais *et al.*, 1995).

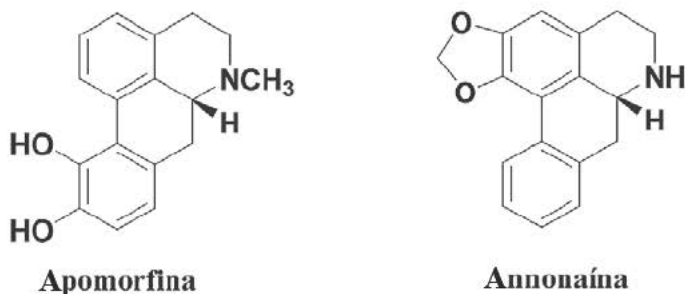


Figura 13. Aporfinas dopaminérgicas

### 4.3. Protoberberinas

Dentro de los alcaloides protoberberínicos (PB), la berberina ha sido uno de los compuestos más estudiados por sus propiedades bactericida, fungicida y antitumoral. A partir de especies del género *Guatteria*: *G. ouregou* y *G. schomburgkiana*, aislamos PB con alta afinidad por los receptores dopaminérgicos  $D_2$ : (*R*)-corypalmine, (*R*)-tetrahydropalmatine, (*R*)-10-demetildiscretine y principalmente (*R*)-coreximine (Cortes *et al.*, 1993). Las características más importantes en su estructura son: a) la posición de los grupos metoxi e hidroxilo (*meta* y *para* respectivamente,

al motivo  $\beta$ -feniletilamina), y b) la configuración (*R*) en posición 13a. Recientemente, otros grupos se han interesado en la obtención de este tipo de isoquinoleínas, con objeto de avanzar en la terapia del Parkinson y del Alzheimer. Así, las PB monooxigenadas en posición *meta* al motivo  $\beta$ -feniletilamina, parecen mostrar elevada afinidad por los receptores dopaminérgicos (figura 14) (Schulze *et al.*, 2009).

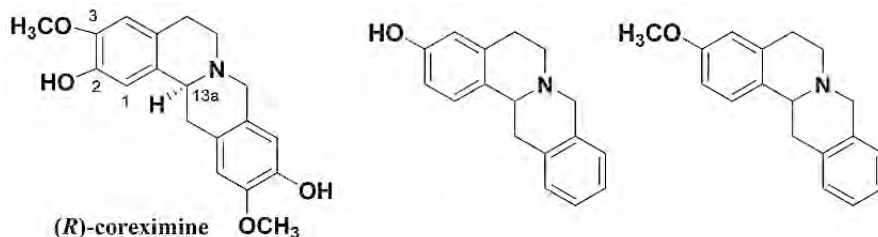


Figura 14. Protoberberinas naturales y sintéticas

## 5. Azafluorenonas

Las azafluorenonas, son un grupo de alcaloides que se han aislado únicamente en especies de la familia Annonaceae. Macondina, darienina y ursulina, fueron algunas de las azafluorenonas que encontramos en las cortezas del tronco de *Oxandra major* (Arango *et al.*, 1987). Recientemente se han aislado la 5,8-dihidroxi-6-metoxi-oniquina y la 5-hidroxi-6-metoxi-oniquina (esta última isómero de macondina), a partir de *Mitrephora diversifolia* (figura 15) (Mueller *et al.*, 2009). Estas moléculas presentaron propiedades antimaláricas, sin ser tóxicas frente a células embrionarias de riñón, con un actividad frente a *P. falciparum* de rango micromolar (Mueller *et al.*, 2009). Además, algunos de estos compuestos mostraron actividad antibacteriana, siendo capaces de dañar la estructura del ADN (Kraus *et al.*, 2010).

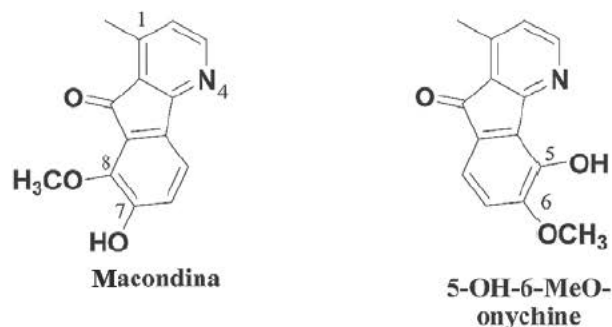


Figura 15. Azafluorenonas naturales

## 6. $\beta$ -Carbolinas-pirimidinas: "annomontina"

Las anonáceas por tanto pueden considerarse una familia de gran diversidad y riqueza en MSA, muchos de los cuales presentan propiedades farmacológicas de gran interés como ha podido observarse. Finalmente, cabe destacar, como fruto de las investigaciones realizadas entre las Universidades de Ciencias y Artes de Chiapas en México y de Valencia en España, el aislamiento (a partir de las raíces de *Annona purpurea*), determinación estructural y actividad ansiolítica de "annomontina", una molécula con esqueleto  $\beta$ -carbolina-pirimidina, muy poco frecuente en anonáceas, sin duda con interesantes perspectivas de futuro desarrollo farmacológico (figura 16) (Rejón-Orantes *et al.*, 2011).

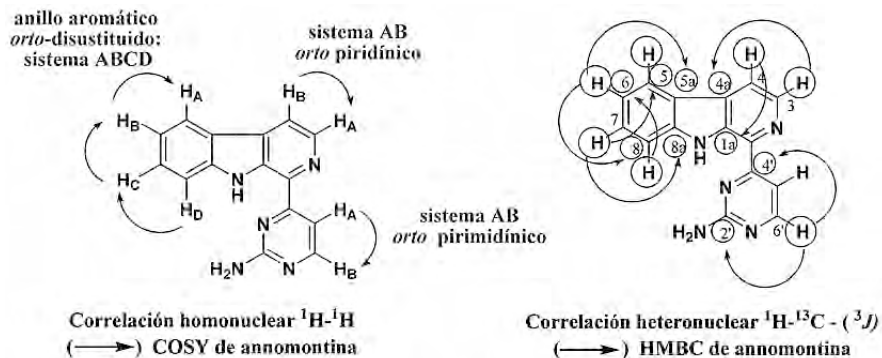


Figura 16. Determinación estructural por RMN de annomontina

## Referencias

- Andreu, I., Cabedo, N., Atassi, G., Pierre, A., Caignard, D.H., Renard, P., Cortes, D. and Bermejo, A. 2002. An efficient method for the preparation of antitumoral  $\alpha$ -keto-imines benzyldihydroisoquinolines by selective benzylic oxidation with C/Pd in acetonitrile. *Tetrahedron Letters*. 43: 757-759.
- Arango, G., Cortes, D., Cassels, B.K., Cavé, A. and Mérienne, C. 1987. Azafluorenones from *Oxandra cf. major* and biogenetic considerations. *Phytochemistry*. 27: 2093-2098.
- Barrachina, I., Royo, I., Baldón, H.A., Chahboune, N., Suvire, F., De Pedro, N., Zafra-Polo, M.C., Bermejo, A., El Aouad, N., Cabedo, N., Saez, J., Tormo, J.R., Enriz, R.D. and Cortes, D. 2007. New antitumoral acetogenin 'Guanacone type' derivatives: Isolation and bioactivity. Molecular dynamics simulation. *Bioorg. Med. Chem.* 15: 4369-4381.
- Berenguer, I., El Aouad, N., Andujar, S., Romero, V., Suvire, F., Freret, T., Bermejo, A., Ivorra, M.D., Enriz, R.D., Boulouard, M., Cabedo, N. and Cortes, D. 2009. Tetrahydroisoquinolines as dopaminergic ligands: 1-Butyl-7-chloro-6-hydroxy-tetrahydroisoquinoline, a new compound with antidepressant-like activity in mice. *Bioorg. Med. Chem.* 17: 4968-4980.

- Bermejo, A., Andreu, I., Suvire, F., Léonce, S., Caignard, D.H., Renard, P., Pierré, A., Enriz, R.D., Cortes, D. and Cabedo, N. 2002. Syntheses and antitumor targeting G1 phase of the cell cycle of benzoyl-dihydroisoquinoline and related 1-substituted isoquinolines. *J. Med. Chem.* 45: 5058-5068.
- Bermejo, A., Blázquez, M.A., Rao, K.S. and Cortes, D. 1998. Styryl-pyrones from *Goniothalamus arvensis*. *Phytochemistry*. 47: 1375-1380.
- Bermejo, A., Blázquez, M.A., Rao, K.S. and Cortes, D. 1999. Styryl-lactones from *Goniothalamus* species-a review. *Phytochem. Anal.* 10: 127-131.
- Bermejo, A., Blázquez, M.A., Serrano, A., Zafra-Polo, M.C. and Cortes, D. 1997. Preparation of 7-alkoxylated furanopyrones: Semisynthesis of (-)-Etarvensin, a new styryl-lactone from *Goniothalamus arvensis*. *J. Nat. Prod.* 60: 1338-1340.
- Bermejo, A., Figadère, B., Zafra-Polo, M.C., Barrachina, I., Estornell, E. and Cortes, D. 2005. Acetogenins from Annonaceae: Recent progress in isolation, synthesis and mechanisms of action. *Nat. Prod. Rep.* 22: 269-303.
- Bermejo, A., Léonce, S., Cabedo, N., Andreu, I., Caignard, D.H., Atassi, G. and Cortes, D. 1999. Semisynthesis and cytotoxicity of styryl-lactone derivatives. *J. Nat. Prod.* 62: 1106-1109.
- Bermejo, A., Lora, M.J., Blázquez, M.A., Rao, K.S., Cortes, D. and Zafra-Polo, M.C. 1995. (+)-Goniotharvensin, a novel styryl-lactone from the stem bark of *Goniothalamus arvensis*. *Nat. Prod. Lett.* 7: 117-122.
- Cabedo, N., Andreu, I., Ramírez de Arellano, M.C., Chagraoui, A., Serrano, A., Bermejo, A., Protais, P. and Cortes, D. 2001. Enantioselective syntheses of dopaminergic (R)- and (S)- benzyltetrahydroisoquinolines. *J. Med. Chem.* 61: 1794-1801.

- Cabedo, N., Berenguer, I., Figadère, B. and Cortes, D. 2009. An overview on benzyloisoquinoline derivatives with dopaminergic and serotonergic activities. *Curr. Med. Chem.* 16: 2441-2467.
- Chahboune, N., Barrachina, I., Royo, I., Romero, V., Saez, J., Tormo, J.R., De Pedro, N., Estornell, E., Zafra-Polo, M.C., Peláez, D. and Cortes, D. 2006. Guanaconetins, new antitumoral acetogenins, mitochondrial Complex I and tumor cell growth inhibitors diacetylguanacone. *Bioorg. Med. Chem.* 14: 1089-1094.
- Ciavatta, M.L., López-Gresa, M.P., Gavagnin, M.; Romero, V., Melck, D., Manzo, E., Guo, Y.W., Van Soest, R. and Cimino, G. 2007. Studies on puupehenone-metabolites of a *Dysidea* sp.: Structure and biological activity. *Tetrahedron.* 67: 1380-1384.
- Cortes, D. 2007. Farmacoquímica natural. Editorial Moliner. Valencia, España.
- Cortes, D., Arbaoui, J. and Protais, P. 1993. High affinity and selectivity of some tetrahydroprotoberberine alkaloids for rat striatal <sup>3</sup>H-raclopride binding sites. *Nat. Prod. Letters.* 3: 233-238.
- Duval, R.A., Lewin, G., Peris, E., Chahboune, N., Garofano, A., Dröse, S., Cortes, D., Brandt, U. and Hocquemiller, R. 2006. Heterocyclic analogues of Scuamocina as inhibitors of mitochondrial complex I. On the role of the terminal lactone of annonaceous acetogenins *Biochemistry.* 45: 2721-2728.
- El Aouad, N., Berenguer, I., Romero, V., Marín, P., Serrano, A., Andujar, S., Suvire, F., Bermejo, A., Ivorra, M.D., Enriz, R.D., Cabedo, N. and Cortes, D. 2009. Structure-activity relationship of dopaminergic halogenated 1-benzyl-tetrahydroisoquinoline derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* 44: 4616-4621.



- González, M.C., Sentandreu, M.A., Rao, K.S., Zafra-Polo, M.C. and Cortes, D. 1996. Prenylated benzopyran derivatives from two *Polyalthia* species. *Phytochemistry*. 43: 1361-1364.
- González, M.C., Serrano, A., Zafra-Polo, M.C., Cortes, D. and Rao, K.S. 1995. Polycerasoidin and polycerasoidol, two new prenylated benzopyran derivatives from *Polyalthia cerasoides*. *J. Nat. Prod.* 58: 1278-1284.
- Kraus, G.A. and Kempema, A. 2010. Synthesis of azafluorenone antimicrobial agents. *J. Nat. Prod.* 73: 1967-1968.
- Londerhausen, M., Leicht, W., Lieb, F., Moeschler, H. and Weiss, H. 1991. Molecular mode of action of annonins. *Pestic. Sci.* 33: 427-438.
- Mueller, D., Davis, R.A., Duffy, S., Avery, V.M., Camp, D. and Quinn, R.J. 2009. Antimalarial activity of azafluorenone alkaloids from the Australian tree *Mitrephora diversifolia*. *J. Nat. Prod.* 72: 1538-1540.
- Peris, E., Cavé, A., Estornell, E., Zafra-Polo, M.C., Figadère, B., Cortes, D. and Bermejo, A. 2002. Semisynthesis of new tetrahydrofuranic alkyl ester and furano-pyrone derivatives as inhibitors of the mitochondrial complex I. *Tetrahedron*. 58: 1335-1342.
- Peris, E., Estornell, E., Cabedo, N., Cortes, D. and Bermejo, A. 2000. 3-Acetylaltholactone and related styryl-lactones, mitochondrial respiratory chain inhibitors. *Phytochemistry*. 54: 311-315.
- Popsavin, V., Benedeković, G., Popsavin, M., Kojić, V. and Bogdanović, G. 2010. Divergent synthesis of cytotoxic styryl lactones isolated from *Polyalthia crassa*. The first total synthesis of crassalactone B. *Tetrahedron Letters*. 51: 3426-3429.
- Protais, P., Arbaoui, J., Bakkali, E.H., Bermejo, A. and Cortes, D. 1995. Effects of various isoquinoline alkaloids on in vitro <sup>3</sup>H-dopamine uptake by rat striatal synaptosomes. *J. Nat. Prod.* 58: 1475-1484.

- Rejón-Orantes, J.C., González-Esquinca, A.R., Pérez de la Mora, M., Roldan R., G. and Cortes, D. 2011. Annomontine, an alkaloid isolated from *Annona purpurea* has anxiolytic-like effects in the elevated plus-maze. *Planta Medica*. 77 (4):322-327.
- Schulze, M., Müller, F.K.U., Mason, J.M., Görls, H., Lehmann, J. and Enzensperger, Ch. 2009. Dibenzazecine scaffold rebuilding-Is the flexibility always essential for high dopamine receptor affinities? *Bioorg. Med. Chem*. 17: 6898-6907.
- Silverman, R.B. 2004. The organic chemistry of drug design and drug action. Hayhurst, J. (Editor). Elsevier Academic Press. London.
- Zafra-Polo, M.C., González, M.C., Tormo, J.R., Estornell, E. and Cortes, D. 1996. Polyalthidin: New prenylated benzopyran inhibitor of the mammalian mitochondrial respiratory chain. *J. Nat. Prod*. 59: 913-916.



# Metabolitos secundarios aislados de algunas especies del género *Annona* como fuente de potenciales fármacos

Estrada-Reyes, Rosa<sup>1</sup>  
Parra-Delgado, Hortensia<sup>2</sup>  
Martínez-Vázquez, Mariano<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Fitofarmacología  
Dirección de Investigaciones en Neurociencias, Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón  
de la Fuente Muñiz, Calzada México-Xochimilco 101, Col. San Lorenzo Huipulco  
Delegación Tlalpan, México 14370, México.

<sup>2</sup>Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior,  
Ciudad Universitaria, 04360, México D. F., México.

## Introducción

Existen documentos, como el *Código de Hammurabi*, que atestiguan que la humanidad, desde su inicio, ha utilizado diferentes especies vegetales tanto para fines alimenticios como para la procuración de la salud. Como era de esperarse, el desarrollo de una farmacopea basada en plantas medicinales estuvo sujeto a las condiciones específicas de los lugares de asentamiento de las diversas culturas. De esta forma, se desarrollaron por ejemplo, las farmacopeas herbolarias

de las antiguas culturas de China e India. Muchos de estos conocimientos, generados y perfeccionados a través del tiempo, son aplicados hoy en día (Weckerle *et al.*, 2009).

En México, se cuenta con documentos como el *Códice Florentino* y el *Códice de la Cruz Badiano* que ilustran la riqueza de las especies vegetales utilizadas principalmente por la cultura náhuatl. Sin embargo, la principal vía de conservación de la utilidad de las plantas medicinales, por la sociedad mexicana, ha sido oral. Existen varias recopilaciones que rescatan esta información (Argueta *et al.*, 1994; Osuna *et al.*, 2005).

En algunas de estas fuentes se mencionan varias especies del género *Annona* que se han utilizado, con fines medicinales, desde tiempos prehispánicos. Por ejemplo, se indica que la cáscara de *A. cherimola*, en cocimiento, se utilizaba para tratar la pulmonía; sin embargo, se advierte que las semillas son venenosas. También se menciona la *A. glabra* por sus propiedades expectorantes y como remedio en las primeras fases de la tuberculosis (Martínez, 1969). Igualmente se menciona la *A. squamosa*, *A. muricata* y la *A. lutescens* como plantas medicinales (Andrade-Cetto y Heinrich, 2005).

La tradición etnobotánica aunada al hecho que las especies del género *Annona* se caracterizan por sintetizar acetogeninas, derivados lipídicos (policétidos) con propiedades citotóxicas a células cancerosas así como alcaloides, principalmente de tipo benzilisoquinolínicos, con actividades en el Sistema Nervioso Central (SNC), hacen de estas especies objetos iniciales de estudio para la obtención de posibles fármacos.

En México se cuenta con un total de 22 especies de *Annona* distribuidas en Chiapas, Guerrero, Yucatán, Michoacán y Morelos. Cabe señalar que en Chiapas se cuenta con 12 especies, ubicándolo como el estado con mayor riqueza de abundancia y diversidad en especies de éste género (MEXU, 1991).

A pesar de que en la medicina tradicional se utiliza la *A. lutescens* como remedio para varios padecimientos, hasta el momento no se conoce la evaluación de sus posibles propiedades sobre el SNC. En este trabajo presentamos los resultados de la evaluación de las propiedades ansiolíticas e hipnóticas de un extracto de hexano de *A. lutescens*, los cuales se comparan con los publicados para los extractos de hexano de

*Annona cherimola* (chirimoya) (López-Rubalcava *et al.*, 2006) y *Rollinia mucosa* (biribia) (Estrada-Reyes *et al.*, 2010).

## Método

### *Annona lutescens*

Las hojas secas y molidas (250 g) de *A. lutescens* fueron extraídas de forma sucesiva con *n*-hexano y metanol y los disolventes fueron eliminados por destilación a presión reducida, obteniéndose 18.7 g de extracto de hexano (EHAL) y 10 g de extracto de metanol.

El extracto de hexano fue dividido en dos partes. Una de ellas (8.7 g) se utilizó para la realización de las pruebas de actividad, mientras que el resto (10 g) en el estudio fitoquímico. El EHAL fue separado por medio de una cromatografía en columna al vacío con gel de sílice (60G Merck, proporción 35:1), utilizando como eluyentes, hexano, mezclas de hexano-acetato de etilo (AcOEt) de polaridad creciente, acetato de etilo y acetona. Se reunieron aquellas fracciones que presentaron el mismo perfil en cromatografía de capa fina. De las fracciones eluidas con hexano, se obtuvieron por precipitación 12 mg de un sólido amorfo blanco con punto de fusión de 80-82°C, cuyas características físicas y espectroscópicas correspondieron a la 16-hentriacontanona ó palmitona (Komae *et al.*, 1971). A partir de las aguas madres de las fracciones 1-6, se obtuvieron 10 g de un aceite rojo, el cual mostró un perfil complejo en cromatografía en capa fina. El análisis de este aceite se realizó por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Los resultados se muestran en el cuadro 1.

Cuadro 1. Análisis de GC-MS del aceite proveniente de las fracciones 1-6

Tiempo de retención	Compuesto	% área	Tiempo de retención	Compuesto	% área
5.53	2-tujano	21.15	14.36	3-cucubeno	0.59
14.06	Desconocido	14.66	23.60	Éster metílico del ácido 14-metil pentanoico	1.46
14.66	3(5),6-cariofileno	6.78	24.78	Éster metílico del ácido 2-metil hexadecanoico	25.89
14.77	4(15)-cucubeno	0.99	26.02	Éster metílico del ácido heptadecanoico	1.21
15.23	$\alpha$ -cariofileno	2.11	26.13	Éster metílico del ácido 8,11-octadecanoico	1.67
15.74	3(15)-cucubeno	27.44	27.36	Éster etílico del ácido 9,12,15-octadecanoico	42.85
15.94	Desconocido	13.99	27.51	Éster etílico del ácido 15-metil heptanoico	6.56
16.27	3.9-cadineno	2.38	27.78	Desconocido	0.88
17.23	Espatulenol	1.0	29.25	Desconocido	1.32
21.87	Éster metílico del ácido 4 metil-pentanoico	0.88	29.68	Desconocido	1.03
22.79	Éster metílico del ácido 2-metil pentanoico	13.04	29.79	Desconocido	1.02
25.03	Éster metílico del ácido 9,12,15-octadecatrienoico	10.55	29.93	Metil-2,8 dimetil tridecanoato	1.26
25.21	Éster etílico del ácido octadecanoico	0.65	31.13	Docosano	0.71

De las fracciones eluidas con hexano-AcOEt (9:1), se aislaron 25 mg de un sólido blanco amorfo, identificado como 1-hentricontanol, por comparación de sus datos espectroscópicos (CAS 26444-39-3); mien-

tras que, de las fracciones eluidas con 20% de AcOEt en hexano se obtuvieron 55 mg de  $\beta$ -sitosterol, el cual fue identificado por comparación de sus propiedades físicas y espectroscópicas con aquellos informados en la literatura.

## Evaluación Farmacológica

### *Animales y fármacos*

Se utilizaron ratones adultos (6-8 semanas) machos de la cepa Swiss Webster de 20-30g de peso. Se alojaron en cajas de polipropileno de 44 x 21 x 21 cm, en grupos de ocho, bajo ciclo invertido de luz-oscuridad (12 h/12 h) de manera artificial en un cuarto con temperatura controlada. Todos los animales tuvieron libre acceso a agua y alimento (purina) durante el experimento. Tanto los fármacos como el EHAL se prepararon antes de cada experimento y fueron administrados vía intraperitoneal, en una relación de volumen de 10 mL por kilogramo de peso.

El manejo de animales se realizó conforme a la norma para el manejo y cuidado de animales (NIH pub.85-23, 1985) y la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999). Además, se contó con la aprobación del comité de ética del INPRFM.

Los grupos control recibieron el mismo tratamiento, excepto que no se les administró EHAL sino que se les administró el vehículo (Tween 80 al 1% en solución salina), tanto para pentilentetrazol (PTZ) como para pentobarbital sódico (PB), mientras que para el diazepam se utilizó polipropilenglicol (Pg) al 1% en solución salina como vehículo. Los controles positivos recibieron, para la evaluación de crisis convulsiva una dosis de 90 mg /kg de PTZ mientras que para la evaluación de la actividad hipnótica 30 o 42 mg/kg de PB. En ambas evaluaciones se utilizaron 0.5 o 1.0 mg/kg de diazepam.

Todos los experimentos se realizaron con una latencia de administración de 60 min, excepto para el diazepam, el cual se realizó con una latencia de 30 min. Los animales fueron utilizados una sola vez.



## Estadística

Todos los experimentos se realizaron con poblaciones desde 8 hasta 10 ratones, por duplicado y los resultados se expresan como la media  $\pm$  el error estándar medio. En el caso de la prueba de ansiedad y PB, se realizó la comparación estadística entre los grupos controles y los grupos experimentales, mediante el análisis de varianza de Kruskal-Wallis (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ), seguido de la prueba de Mann-Whitney. La comparación estadística entre el porcentaje de muerte inducido por PTZ y los grupos control se realizó mediante la prueba de Fisher. Todos los análisis estadísticos y gráficos se realizaron en el programa Sigmaplot 2.0 y Sigmastat 2.0, respectivamente.

## Resultados

### *Evaluación de la actividad ansiolítica de EHAL*

La evaluación de la actividad ansiolítica se realizó en el modelo de la conducta exploratoria ante un ambiente aversivo. Los animales fueron administrados vía intraperitoneal, con diferentes dosis del extracto 60 min antes de iniciar la prueba. El modelo consistió en una cámara de acrílico de 44 x 21 x 21 cm. Un tercio de la cámara se encontraba completamente oscura, mientras que los otros dos tercios fueron iluminados con una lámpara de luz fluorescente. Las dos zonas estaban divididas por una pared de madera con una abertura de 13 x 15 cm, para permitir el libre paso del sujeto experimental. La prueba duró 10 min y al inicio de la misma se colocó al sujeto experimental en la zona iluminada y se registró el número de transiciones que realizó de un compartimiento a otro y se registró el número de transiciones realizadas por cada animal (Estrada-Reyes *et al.*, 2010). Los resultados se muestran en el cuadro 2.

Cuadro 2. Efecto ansiolítico del extracto de hexano de hojas de *A. lutescens* en la prueba de conducta exploratoria

Tratamiento	Dosis (mg/kg) i.p.	Media de número de transiciones
Control	0.0	17.33 ± 1.915
Diazepam	0.5	24.333 ± 1.464**
	1.0	34.750 ± 3.797***
<i>A. lutescens</i>	0.0	17.867 ± 1.195
	6.25	17.800 ± 5.200
	12.5	23.750 ± 2.403
	25.0	18.000 ± 2.535
	50.0	19.250 ± 1.461
	75.0	22.250 ± 2.576
	100.0	21.250 ± 3.442

### *Evaluación de los efectos de EHAL sobre la actividad locomotriz*

La evaluación de la actividad locomotriz se realizó en una caja de 43 x 36 x 19 cm, dividida en seis cuadrantes simétricos, colocada sobre una placa sensitiva (48 x 40 cm; Stoelting Co., Chicago, USA) conectada a un contador (Stoelting Co., Chicago, USA). El sujeto experimental se colocó en la caja y el número de cruces que realizó el animal fue registrado durante un periodo de 10 min. Este registro se realizó 60 min después de la administración de los extractos o 30 min después de la administración de diazepam. Después de cada prueba la caja se limpió cuidadosamente. Los resultados se expresan como cuentas/10 minutos (Estrada-Reyes *et al.*, 2010). Los resultados se muestran en el cuadro 3.

Cuadro 3. Efecto del extracto de hexano de las hojas de *A. lutescens* sobre la actividad locomotriz

Tratamiento	Dosis (mg/kg), i.p.	Actividad motriz (cuentas/10 min)
Control	0.0	82.00 ± 9.422
Diazepam	0.5	103.00 ± 13.260
	1.0	74.125 ± 6.489
<i>A. lutescens</i>	0.0	82.66 ± 9.459
	6.25	73.00 ± 8.405
	12.5	90.37 ± 14.014
	25	72.875 ± 9.078
	50	80.00 ± 5.516
	75	74.25 ± 6.241*
	100	60.25 ± 5.338**

*Evaluación de los efectos sedantes de EHAL en la prueba de aumento en el tiempo de sueño inducido por pentobarbital sódico*

En un primer experimento los animales fueron administrados con EHAL a diferentes dosis y 60 min después se les administró una dosis de 30 mg/kg de pentobarbital sódico (PB). Inmediatamente fueron colocados de forma individual en una caja de acrílico de 30 x 21 x 21 cm que contenían una cama de aserrín fino y fueron observados cuidadosamente hasta su recuperación total.

Los controles fueron administrados con el vehículo y después de 60 min fueron tratados con 30 mg/kg de PB. Los controles positivos recibieron dosis de 0.5 y 1.0 mg/kg de diazepam y 30 min después fueron tratados con una dosis de 30 mg/kg pentobarbital sódico. Se realizó

un segundo experimento con una dosis de 42 mg/kg de pentobarbital sódico, siguiendo exactamente el mismo procedimiento descrito para la dosis de 30 mg/kg. En ambos experimentos se registró la latencia de sedación (min), definida como el tiempo que transcurre entre la administración de PB y la pérdida de la coordinación motriz; y el tiempo de sueño (min), como el tiempo que transcurre entre la pérdida del reflejo de enderezamiento y su recuperación. Los resultados se muestran en los cuadros 4 y 5.

Cuadro 4. Actividad del extracto de hexano de las hojas de *A. lutescens* en el efecto hipnótico inducido por PB 42 mg/kg

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Latencia de sedación	Tiempo de sueño
PB	42	1.160 ± 0.0860	17.866 ± 2.002
Diazepam	1.0	0.975 ± 0.136	52.04 ± 4.003***
<i>Annona lutescens</i>	25	1.76 ± 0.140	10.926 ± 1.749
	50	1.50 ± 0.150	19.73 ± 2.20
	100	1.39 ± 0.154	23.99 ± 3.209*
	310	1.25 ± 0.083	77.73 ± 5.1996**

Cuadro 5. Actividad del extracto de hexano de las hojas de *A. lutescens* sobre el efecto hipnótico inducido por 30 mg/kg de PB

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Latencia de sedación	Tiempo de sueño
PB	30.0	2.779 ± 0.22	0.0
Diazepam	1.0	1.75 ± 0.089	9.06 ± 1.095*
<i>A. lutescens</i>	100	1.333 ± 0.333	-----
	310	2.00 ± 0.253	-----

### *Efecto de EHAL sobre la actividad epiléptica inducida por pentilentetrazol (PTZ)*

Los animales fueron administrados vía intraperitoneal, con EHAL a diferentes dosis y 60 min después se les administró, por la misma vía, 90 mg/kg de PTZ. Inmediatamente después, los animales se colocaron de manera individual dentro de una caja de acrílico de 44 x 22 x 21 cm, sobre cama de aserrín fino y se observaron hasta su total recuperación o muerte. Se registró la latencia de crisis (como el tiempo que transcurre entre la administración del PTZ y la aparición de la primera crisis), la latencia de crisis clónicas-tónicas generalizadas (como el tiempo que transcurre entre la administración de PTZ y la aparición de crisis severas, en las cuales se pueden observar clonias y extensión tanto de las patas delanteras como traseras). Ambas conductas fueron registradas en minutos. También, se registró el porcentaje de muerte. Los animales control fueron tratados de la misma forma, sólo que en lugar de PTZ fueron administrados con el vehículo (1% de Tween en solución salina), los controles positivos fueron administrados con diazepam a la dosis de 1.0 mg/kg, 30 min antes de la administración del PTZ.

Cuadro 6. Actividad del extracto de hexano de *A. lutescens* sobre el efecto epiléptico inducido por 90 mg/kg de PTZ

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Latencia de crisis (min)	Latencia de crisis tónicas (min)	Mortalidad (%)
Control	0.0	0.799 ± 0.0963	1.735 ± 0.478	87.50
Diazepam	1.0	0.975 ± 0.136	ns	ns
<i>A. lutescens</i>	25	0.657 ± 0.077	4.417 ± 0.684*	100
	50	1.2595 ± 0.464	5.178 ± 0.694*	72.72
	100	0.831 ± 0.136	4.56 ± 0.700*	100

Los resultados son expresados como la media ± el error estándar medio. Las comparaciones estadísticas fueron realizadas entre los grupos tratados y el grupo control tratado con solución salina, con la ayuda de

un análisis de varianza de Kruskal-Wallis una sola vía, seguida por la prueba de Mann-Whitney  $\sum p^* < 0.05$ , el porcentaje de muerte fue analizado estadísticamente mediante la prueba de Fisher.

### *A. cherimola* y *R. mucosa*

Los resultados de los análisis químicos y evaluación farmacológica de *A. cherimola* (López-Rubalcava *et al.*, 2006) y *R. mucosa* han sido previamente publicados (Estrada-Reyes *et al.*, 2010).

## Discusión

Como parte de nuestra búsqueda sistemática de metabolitos secundarios de origen vegetal con actividades sobre el sistema nervioso central hemos publicado los efectos de los extractos de hexano de la *Annona cherimola* (EHAC) y *Rollinia mucosa* (EHRM) ambas especies pertenecientes a la familia Annonacea.

Nuestros resultados muestran que ambos extractos producen efectos ansiolíticos similares a los producidos por el diazepam, un ansiolítico clásico. Adicionalmente, estos resultados sugieren que los efectos producidos por los extractos pueden ser mediados por el complejo receptor ácido  $\gamma$ -aminobutírico-benzodiazepinas (GABA/BDZ). Sin embargo, otros mecanismos pueden estar mediando los efectos depresivos (López-Rubalcava *et al.*, 2006; Estrada-Reyes *et al.*, 2010).

Por el contrario, los resultados en este trabajo muestran que el extracto de hexano de *Annona lutescens* no mostró propiedades ansiolíticas a ninguna de las dosis evaluadas. Es posible que la diferencia de actividad de los extractos se deba a la diferencia en su composición química. En el cuadro 7 se muestran los principales componentes de los diferentes extractos así como la actividad mostrada.

Cuadro 7. Principales componentes aislados de los extractos de hexano de *A. cherimola*, *A. lutescens* y *R. mucosa*, así como la actividad mostrada

Extracto de hexano	Palmitona	Otros MS	Actividad
<i>A. cherimola</i>	3.3 %	$\beta$ -sitosterol	Ansiolítica, no sedante
<i>R. mucosa</i>	1.0 %	Lignanos	Ansiolítica y sedante
<i>A. lutescens</i>	0.1 %	$\beta$ -sitosterol	No ansiolítica, no sedante

De acuerdo con nuestros resultados tal parece que la concentración de la palmitona, una cetona alifática de amplia distribución es especies del género *Annona*, está relacionada con la propiedad ansiolítica mostrada por los extractos. Así, por ejemplo, el extracto de *A. cherimola*, que presentó la mayor concentración de palmitona mostró una mayor actividad ansiolítica, mientras que el extracto de *A. lutescens* con una concentración de 0.1 % fue inactivo.

Esta propuesta se ve apoyada por el hecho que se han publicado varios artículos acerca de las propiedades sobre el SNC de la palmitona. Así, se ha publicado que esta cetona previene el daño neuronal causado por el pentilentetrazol en la región CA3 del hipocampo de ratas pre-pubescentes (Cano-Europa *et al.*, 2010), también se ha informado del efecto de administraciones repetidas de la palmitona en la amígdala de la rata (González-Trujano *et al.*, 2009) y los efectos anticonvulsivos de esta cetona en la actividad convulsivante inducida por penicilina (González-Trujano *et al.*, 2006).

Aunque la presencia de palmitona en los extractos de *A. cherimola* y *R. mucosa* puede explicar las actividad ansiolítica mostradas por ambos extractos, existen algunas diferencias, por ejemplo las dosis activas fueron menores en el extracto de *R. mucosa* que las mostradas por el extracto de *A. cherimola*. Esta diferencia, posiblemente se deba a la presencia de lignanos en el extracto de *R. mucosa* (Estrada-Reyes *et al.*, 2002), hipótesis apoyada por el hecho que a partir del extracto con actividad sedante de *Valeriana officinalis* se han aislado varios lignanos (Schumacher *et al.*, 2002).

## Conclusión

Los extractos de hexano de *Annona cherimola* y *Rollinia mucosa* mostraron actividad ansiolítica; sin embargo, el extracto de *A. lutescens* fue inactivo. Los resultados obtenidos sugieren que una mayor concentración en los extractos activos de la cetona lineal palmitona es la responsable de la actividad ansiolítica.





## Referencias

- Andrade-Cetto, A. and Heinrich, M. 2005. Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *Journal of Ethnopharmacology*. 99: 325–348.
- Argueta, V.A., Cano, A.L. y Rodarte, M.E. (Coord). 1994. Atlas plantas medicinales. Instituto Nacional Indigenista (Edit). México.
- Cano-Europa, E., González-Trujano, M.E., Reyes-Ramírez, A., Hernández-García, A., Blas-Valdivia, V. and Ortiz-Butrón, R. 2010. Palmitone prevents pentylene-tetrazole-caused neuronal damage in the CA3 hippocampal region of prepubertal rats. *Neuroscience Letters*. 470: 111-114.
- Estrada-Reyes, R., Álvarez, A.L., López-Rubalcaba, C., Rocha, L., Heinze, G., Moreno, J. and Martínez-Vázquez, M. 2002. Lignans from leaves of *Rollinia mucosa*. *Zeitschrift für Naturforschung*. 57c: 29-32.
- Estrada-Reyes, R., López-Rubalcaba, C., Rocha, L., Heinze, G., González-Esquinca, A.R. and Martínez-Vázquez, M. 2010. Anxiolytic-like and sedative actions of *Rollinia mucosa*; possible involvement of the GABA/benzodiazepine receptor complex. *Pharmaceutical Biology*. 48: 70-75.

- González-Trujano, E., Tapia E., M., López-Meraz, L., Navarrete, A., Reyes-Ramírez, A. and Martínez, A. 2006. Anticonvulsant effect of *Annona diversifolia* Saff. and palmitone on penicillin-induced convulsive activity. A behavioral and EEG study in rats. *Epilepsia*. 47: 1810-1817.
- González-Trujano, E., López-Meraz, L., Reyes-Ramírez, A., Aguillón, M. and Martínez, A. 2009. Effect of repeated administration of *Annona diversifolia* Saff. (ilama) extracts and palmitone on rat amygdala kindling. *Epilepsy & Behavior*. 16: 590-595.
- Komae, H., Hayashi, N. and Kosela, S. 1971. Palmitone from the fruits of *Lindera citriodora*. *Phytochemistry*. 10: 3311.
- López-Rubalcava, C., Piña-Medina, B., Estrada-Reyes, R., Heinze, G. and Martínez-Vázquez, M. 2006. Anxiolytic-like actions of the hexane extract from leaves of *Annona cherimolia* in two anxiety paradigms: Possible involvement of the GABA/benzodiazepine receptor complex. *Life Sciences*. 78: 730-737.
- Martínez, M. 1969. Plantas medicinales de México. 5 Ed. Ediciones Botas. México.
- MEXU. 1991. Herbario Nacional, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. Registro de especies del género *Annona*.
- Osuna, T.L., Tapia, P.M.E. y Aguilar C., A. 2005. Plantas medicinales de la medicina tradicional Mexicana para tratar afecciones gastrointestinales: Estudio etnobotánico, fitoquímico y farmacológico. Publicacions I. Edicions de la Universitat de Barcelona.
- Schumacher, B., Scholle, S., Hölzl, J., Khudeir, N., Hess, S. and Müller, C. 2002, Lignans isolated from valerian: identification and characterization of a new olivil derivate with partial agonistic activity at an adenoside receptor. *Journal of Natural Products*. 65: 1479-1485.

Weckerle, S.C., Ineichena, R., Huberb, F.K. and Yang, Y. 2009. Mao's heritage: Medicinal plant knowledge among the Bai in Shaxi, China, at a crossroads between distinct local and common widespread practice. *Journal of Ethnopharmacology*. 123: 213–228.



# Diversidad de géneros y especies de Annonaceae en México

Andrés-Agustín, Jorge

Centro Regional Universitario Centro-Occidente. UACHA  
Av. Periférico Independencia Pte. No. 1000. Col. Lomas del Valle. Morelia, Mich.  
Tel. (443)3 16 14 89, aajorge2000@yahoo.com.mx

## Resumen

El presente trabajo se desarrolló durante los años 2009-10 y consistió en una amplia revisión bibliográfica de trabajos científicos sobre taxonomía y botánica de las Annonaceae. Posteriormente se revisaron las especies existentes en las colectas herborizadas de la REMIB. Se hicieron recorridos de campo para hacer algunas colectas de especies de Annonaceae y visitas a campos experimentales con colecciones de especies en diferentes partes de la República Mexicana. De acuerdo a la base de datos de la REMIB esta revisión nos indica la presencia de 14 géneros y 62 especies de Annonaceae registradas en México. La lista supera con un género y con 23 especies más que las que han sido aceptadas por el Sistema Integrado de Información Taxonómica-México (SIIT<sup>\*mx</sup>)-CONABIO (1996) que sólo reconoce y ha verificado 13 géneros y 37 especies. Es necesario entonces corroborar estas listas mediante exploraciones y

estudios taxonómicos en México para precisar el número de géneros y especies para fines de uso y conservación.

Palabras clave: *taxonomía, diversidad, Annonaceae, México*

## Introducción

Aún no existe acuerdo sobre el número de géneros y especies de la familia Annonaceae. Bailey (1949) afirmó que la familia Annonaceae tiene 46 géneros y entre 500 y 600 especies, en tanto que Fries (1959), señala que esta familia contiene 119 géneros y cerca de 2000 especies. Por su parte Popenoe (1974) describió a la familia Annonaceae desde 40 hasta 50 géneros y más de 500 especies, muchas de ellas como arbustos y pequeños árboles. La APG (1998) consigna que las anonáceas (Annonaceae) son una familia de Angiospermas del Orden Magnoliales. Consta de 130 géneros con unas 2,300 especies que se distribuyen por los trópicos del Nuevo y Viejo Mundo, hasta el norte de Australia y las islas del Pacífico. Forman parte del Complejo Ranaleano lo que las hace tener una historia evolutiva muy antigua.

Por su parte Chatrou (1999), señala que tanto evolutiva, ecológica como económicamente Annonaceae es una familia importante. En número de especies, Annonaceae es la más sobresaliente dentro del orden Magnoliales, las cuales se cuentan entre las angiospermas más primitivas. Generalmente están distribuidas en las áreas tropicales de América, África y Asia. La familia alberga cerca de 2,500 especies en 140 géneros. África es el continente que contiene el número más bajo de especies, aproximadamente 450. Cerca de 900 se encuentran en los Neotrópicos, casi 1,200 en las áreas tropicales de Asia y Australia. Agrega el autor que de todos los géneros solamente cuatro, que son: *Annona*, *Rollinia*, *Uvaria* y *Asimina* producen frutos comestibles. La familia se concentra en los trópicos, con pocas especies que se encuentran en las regiones templadas. Alrededor de 900 especies son Neotropicales, 450 son Afrotropicales, y las otras especies de la región Indomalaya. Sin embargo la gran familia Annonaceae está sujeta a una investigación sistemática por un grupo de científicos, quienes

están colaborando a la revisión especializada de la familia. Osche *et al.* (1974) indica que un número limitado de especies produce frutos comestibles en estado silvestre y algunos han sido domesticados. La mayoría de las especies se encuentran en los trópicos y solo pocos géneros se encuentran en zonas templadas y subtropicales.

En México tampoco existe claridad sobre el número de géneros y especies y son cinco las especies más conocidas y con mayor uso en México: *Annona cherimola*, *A. diversifolia*, *A. squamosa*, *A. reticulata* y *A. muricata*.

El objetivo de la presente investigación es presentar la lista de géneros y especies de Annonaceae presentes en México para fines de uso y conservación.

## Método

El presente trabajo se desarrolló durante los años 2009-10. Se realizó una amplia revisión bibliográfica de trabajos científicos sobre taxonomía y botánica de las Annonaceae. Posteriormente se revisaron las especies existentes en las colectas herborizadas de la Red Mundial de Información sobre Biodiversidad (REMIB). Se hicieron recorridos de campo para hacer algunas colectas de especies de Annonaceae y visitas a campos experimentales con colecciones de especies en diferentes partes de la República Mexicana.

## Resultados y discusión

### *Taxonomía*

Según el Sistema de Información Taxonómica Integrada (SIIT\*mx) en inglés, Integrated Taxonomic Information System (ITIS)-Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONA-BIO,1996), la clasificación taxonómica de las Annonaceae es la siguiente:

Reino: *Plantae*

Subreino: *Tracheobionta*

División: *Magnoliophyta*

Clase: *Magnoliopsida*



Subclase: *Magnoliidae*Orden: *Magnoliales*Familia: *Annonaceae*

## Géneros y especies en México

De acuerdo a ITIS-CONABIO se han aceptado para México 13 géneros y 37 especies de la familia *Annonacea* (cuadro 1). De los géneros anteriores, todos se encuentran con estatus de verificado, salvo *Duguetia* que se encuentra sin verificar o con estatus dudoso. Asimismo, todas las especies se encuentran verificadas, salvo *Annona hexapetala*, *Rollinia mucosa*, *Rollinia orthopetala* que también se encuentran sin verificar o dudosos. La especie *Oxandra maya* Mir. es reportada por Martínez (1979) en Chiapas.

Cuadro 1. Géneros y especies de Annonaceae aceptados en México por ITIS-CONABIO

Género	Especies
1. <i>Anaxagorea</i> A. St.-Hil.	1. <i>A. acuminata</i> (Dunal)
2. <i>Annona</i> L.	2. <i>A. cherimola</i> Miller 3. <i>A. diversifolia</i> Saff. 4. <i>A. glabra</i> L. 5. <i>A. hexapetala</i> Linnaeus 6. <i>A. montana</i> Macfad. 7. <i>A. muricata</i> L. 8. <i>A. purpurea</i> Mociño & Sesse ex Dunal 9. <i>A. reticulata</i> L. 10. <i>A. senegalensis</i> Pers. 11. <i>A. squamosa</i> L.
3. <i>Artabotrys</i> R. Br.	12. <i>A. hexapetalus</i> (L. f.) Bhandari 13. <i>A. odoratissima</i> R. Brown
4. <i>Asimina</i> Adans.	14. <i>Asimina x nashii</i> Kral 15. <i>Asimina angustifolia</i> Raf. 16. <i>Asimina incana</i> (Bartr.) Exell 17. <i>Asimina obovata</i> (Willd.) Nash 18. <i>Asimina parviflora</i> (Michx.) Dunal 19. <i>Asimina pygmea</i> (Bartr.) Dunal 20. <i>Asimina reticulata</i> Shuttlw. ex Chapman 21. <i>Asimina tetramera</i> Small 22. <i>Asimina triloba</i> (L.) Dunal

5. <i>Cananga</i> (DC.) Hook. F. & T. Thomson	23. <i>Cananga odorata</i> (Lam.) Hook. F & T. Thomson
6. <i>Deeringothamnus</i> Small	24. <i>Deeringothamnus pulchellus</i> Small 25. <i>Deeringothamnus rugelii</i> (B.L. Robins.) Small
7. <i>Duguetia</i> Saint-hilaire, 1824	26. <i>Duguetia tobagensis</i> (Urban) Fries
8. <i>Guatteria</i> Ruiz & Pavón	27. <i>Guatteria blainii</i> (Griseb.) Urban 28. <i>Guatteria caribaea</i> Urban
9. <i>Monodora</i> Dunal	29. <i>Monodora myristica</i> (Gaertner) Dunal
10. <i>Oxandra</i> A. Rich.	30. <i>Oxandra lanceolata</i> (Sw.) Baill. 31. <i>Oxandra laurifolia</i> (Sw.) A. Rich.
11. <i>Rollinia</i> St. Hil.	32. <i>Rollinia muscosa</i> (Jacquin) Baillon 33. <i>Rollinia orthopetala</i> 34. <i>Rollinia pulchrinervis</i> A. DC.
12. <i>Stelechocarpus</i> (Blume) Hook. & Thomson	35. <i>Stelechocarpus burahol</i> (Blume) Hook. f. & Thomson
13. <i>Xylopia</i> L.	36. <i>Xylopia aethiopica</i> (Dunal) A. Rich. 37. <i>Xylopia frutescens</i> Aublet

De acuerdo con la bases de datos de la Red Mundial de Información sobre Biodiversidad (REMIB) con información de las colecciones de los herbarios se definieron 14 géneros y 62 especies distribuidas en varios estados de la República Mexicana (cuadro 2).

Cuadro 2. Familia Annonaceae, géneros y especies en México, según herbarios de RE-MIB (CONABIO)

Género	Especies	Distribución (entidades federativas)
1. <i>Anaxagorea</i>	1. <i>A. guatemalensis</i>	Ver., Oax.
2. <i>Annona</i>	2. <i>A. globiflora</i> 3. <i>A. testudínea</i> 4. <i>A. cherimola</i> 5. <i>A. longiflora</i> 6. <i>A. macrophyllata</i> 7. <i>A. primigenia</i> 8. <i>A. reticulata</i> 9. <i>A. glabra</i> 10. <i>A. purpurea</i> 11. <i>A. diversifolia</i> 12. <i>A. lutescens</i> 13. <i>A. longipes</i> 14. <i>A. scleroderma</i> 15. <i>A. muricata</i> 16. <i>A. squamosa</i>	Ver., Hgo., Chis., Tamps., Gto. Chis. Ver., Mich., Chis., Oax., Mor., Pue., Qro., Jal., Gto., Méx. Jal., Ver. Ver., Camp. Camp., Q. Roo., Yuc. Yuc., Jal., Mich., Pue., Q. Roo., Nay., Tab. Ver., Q. Roo., Yuc., Camp., Tab., Jal., Oax., Nay., Gro. Ver., Mich., Chis., Yuc., Jal. Mich., Gro., Yuc., Ver., Méx. Pue. Ver. Chis. Ver., Chis., Tab., Yuc., Col., Gro., Q. Roo., Nay., Mich. Yuc., Mich., Q. Roo., Camp., Ver., Oax., Jal., Nay.
3. <i>Desmopsis</i>	17. <i>D. trunciflora</i> 18. <i>D. lanceolata</i> 19. <i>D. trunciflora</i> 20. <i>D. trunciflora</i> var. <i>glabra</i> 21. <i>D. galeottiana</i> 22. <i>D. uxpanapensis</i> 23. <i>D. mexicana</i> 24. <i>D. schippii</i> 25. <i>D. bibracteata</i>	Jal. Chis. Ver., Oax., Chis. Ver. Ver., Jal., Gro., Chis. Chis., Ver. Mich. (Aquila, Coalcoman) Tab. Ver.
4. <i>Cymbopetalum</i>	26. <i>C. hintonii</i> 27. <i>C. mayanum</i> 28. <i>C. galeottiana</i> 29. <i>C. penduliflorum</i> 30. <i>C. baillonii</i>	Mich. (Aquila) Chis. Ver., Jal., Chis. Ver., Chis. Ver.
5. <i>Guamia</i>	31. <i>G. mexicana</i>	Ver.

6. <i>Guatteria</i>	32. <i>G. anómala</i> R.F. Fr. 33. <i>G. amplifolia</i> 34. <i>G. depressa</i> 35. <i>G. dolichopoda</i> 36. <i>G. bibracteata</i> 37. <i>G. diospyroide</i> 38. <i>G. grandiflora</i> 39. <i>G. oliviformis</i> 40. <i>G. galeottiana</i> 41. <i>Guatteria</i> sp.	Chis., Ver. Chis., Ver., Tab., Jal. Ver., Chis. Ver. Ver. Ver., Oax. Chis. Chis. Ver., Oax. Ver.
7. <i>Malmea</i>	42. <i>M. depressa</i> 43. <i>M. gaumeri</i>	Chis., Ver., Camp., Mich., Tab., Oax., Q. Roo, Yuc. Ver., Chis.
8. <i>Oxandra</i>	44. <i>O. lanceolata</i> 45. <i>O. lanceolata</i> spp. <i>macrocarpa</i> 46. <i>O. laurifolia</i>	Mich., Gro., Jal., Q. Roo Gro. (José Azueta) Nulo
9. <i>Tridimeris</i>	47. <i>T. hahniana</i> 48. <i>T. tuxtensis</i> 49. <i>T. uxpanapensis</i>	Ver. Ver. Oax.
10. <i>Rollinia</i>	50. <i>R. jimenezii</i> 51. <i>R. mucosa</i> 52. <i>R. rensoniana</i>	Ver., Chis. Ver. Ver., Oax.
11. <i>Sapranthus</i>	53. <i>S. humilis</i> 54. <i>S. campechianus</i> 55. <i>S. foetidus</i> 56. <i>S. microcarpus</i> 57. <i>Sapranthus</i> sp.	Ver. Yuc., Camp., Q. Roo Jal. Ver., Chis., Jal., Oax. Nay., Oax.
12. <i>Xylopia</i>	58. <i>X. sericophylla</i> 59. <i>X. frutescens</i>	Ver. Tab., Chis., Ver., Oax.
13. <i>Mosannona</i>	60. <i>M. depressa</i> 61. <i>M. depressa</i> spp. <i>depressa</i>	Ver. Ver., Q. Roo
14. <i>Stenannona</i>	62. <i>S. humilis</i>	Tab., Ver.

Fuente: CONABIO-REMIB.

Esta revisión arroja 14 géneros y 62 especies registradas en México de acuerdo a la base de datos de la REMIB en registros de herbarios en México y algunos en Estados Unidos. La lista supera en un género y

con 23 especies más que las que han sido aceptadas por ITIIS-CONABIO. Es necesario entonces corroborar estas listas mediante exploraciones y estudios taxonómicos con el fin de aclarar la existencia real del número de géneros y especies de la familia Annonaceae en México ya que la diferencia es notoria. Es importante también, desde el punto de vista botánico y taxonómico, tener esta relación de géneros y especies en México ya que generalmente se tiene mayor conocimiento en las especies del género *Annona* y dentro de este las especies de mayor importancia económica, pero se desconoce la existencia real de las especies de la familia Annonaceae en México.

## Morfología de Annonaceae

Según la descripción de la APG (1998), son árboles, arbustos o raramente subarbustos o trepadoras, a veces con xilopodio, aromáticos, con indumento de pelos simples, estrellados o escamosos.

Hojas simples, enteras, alternas, dísticas, rara vez espirales, con nerviación craspedódroma a broquidódroma, sin estípulas. Estomas paracíticos. Idioblastos presentes, oleosos o mucilaginosos. Astrosclereidas y osteosclereidas presentes.

Tallos con leño característico que presenta bandas tangenciales concéntricas continuas de parénquima, y vasos pequeños, radios homogéneos a débilmente heterogéneos, uniseriados o más frecuentemente multiseriados.

Plantas dioicas, raramente monoicas (algunas especies de *Uvariopsis*) o androdioicas (en *Pseuduvaria*, *Greenwayodendron* y *Diclinanona*).

Flores solitarias, pareadas o en fascículos, terminales, axilares o supra-axilares, apareciendo sobre troncos o ramas, raramente en serpollos subterráneos, perfectas o unisexuales, actinomorfas, hipóginas, frecuentemente con una única bráctea adaxial. Receptáculo plano, hemisférico o cónico. Sépalos (2-) 3(-4), en un verticilo, valvados o imbricados, libres o soldados al menos en la base, persistentes o caducos. Pétalos (0-) 3-6 (-12), usualmente en 2 verticilos de (2-)3 (-4) o en un verticilo, valvados o imbricados, libres o soldados en la base, usualmente alternisépalos, carnosos o coriáceos, raramente membranosos.

Estambres numerosos y espiralados, o bien 3-15 y verticilados; estaminodios presentes a veces; filamentos cortos y libres, rara vez largos y monadelfos, anteras lineares, con dehiscencia extrorsa o raramente latrorsa, a veces transversalmente septadas, conectivo usualmente con una prolongación truncada, cónica o piramidal. Carpelos numerosos a 1, apocárpicos a sincárpicos o paracárpicos, estilos libres o soldados, usualmente cortos, cilíndricos, estigmas capitados, oblongos o en herradura; óvulos numerosos a 1 por carpelo, anátropos, placentación basal o marginal en la sutura ventral en 1-2 filas.

**Fruto** simple, cada elemento carnoso o leñoso, dehiscente o indehiscente, sésil o estipitado, o bien compuesto (sincarpo) con numerosos carpelos uniseminados, o bien unilocular y pluriseminado. Existe una enorme variedad de formas y tipos.

**Semillas** usualmente grandes y con arilo, con un surco periférico en los frutos en folículo dehiscente, endospermo abundante, ruminado, duro, oleoso, embrión pequeño, recto.

**Polen** muy delicado, navicular a triangular, globoso o disciforme, monoaperturado distalmente o inaperturado, frecuentemente en díadas, tríadas o tétradas, exina granular o columelar, a veces una capa basal lamelada, superficie reticulada a atectada.

Número cromosómico:  $x=7, 8, 9$ ;  $2n=16, 24, 32, 48, 64$ ; existe poliploidía en varios géneros (APG, 1998).

## Usos actuales

De las plantaciones comerciales el objetivo de la explotación de las anonas es la obtención de frutos. Los rendimientos son muy variables, pues éstos dependen de la especie, la edad de la plantación, el sistema de manejo y las condiciones naturales donde se encuentran. Un aspecto importante de mencionar es la necesidad de las polinizaciones artificiales de las anonas, principalmente para el chirimoyo que se requiere para el amarre y el desarrollo del fruto, sin esta práctica se tiene muy poco éxito en la producción, pues se obtiene un porcentaje muy bajo en el amarre de frutos por árbol y éstos son muy asimétricos que no se aceptan en los estándares de calidad. Si bien la práctica de la polinización manual aumen-

ta los costos de producción, sin embargo, se justifica para el chirimoyo en huertos comerciales. Es muy probable que ésta práctica pueda mejorar el rendimiento y la calidad en todas las especies de *Annona*. Los frutos se utilizan principalmente para consumo en fresco. También se puede separar la pulpa y congelarla o en fresco para elaborar helados, paletas, licores, mermeladas o jugos. Particularmente la guanábana tiene este tipo de uso. Los frutos de las anonas son altamente frágiles y se requiere de cuidados extremos desde la cosecha y el manejo postcosecha, pues el manejo inadecuado afecta y reduce la calidad del producto.

Este es otro problema de las anonas para transportarlas a grandes distancias, ya que hay que colocar protecciones especiales para evitar el deterioro de la calidad del producto. Algunos frutos como los del saramuyo son altamente perecederos, más que los de otras especies, ya que en dos días puede alcanzar su madurez de consumo, en cambio el de chirimoyo y guanábana requieren de entre 4-7 días para llegar a la madurez de consumo, dependiendo del estado de madurez y la temperatura de almacenamiento. Cada especie, por tanto, requiere del diseño de manejo en postcosecha. Un potencial para el aprovechamiento de las frutas de anonas es la extracción de la pulpa para congelarla y aumentar su tiempo de conservación y uso por varios meses. Mucha fruta que no reúne las características externas o está dañada, puede ser utilizada para la extracción y comercialización de la pulpa. El caso de la guanábana es un ejemplo de ello.

## Capacidad de regeneración natural

En general las especies de la familia Annonaceae tienen la capacidad de regenerarse en forma natural cuando se encuentran en hábitat apropiados. Los agricultores pueden contribuir a la dispersión de las plantas a través del consumo de la pulpa y la germinación en traspatio de las semillas. Los animales silvestres también participan en la propagación de las plantas de algunas especies al consumir los frutos y dispersar las semillas. La producción de frutos depende de lo que ya se señaló: las condiciones ambientales como la humedad y la temperatura, así como la presencia de agentes polinizadores como algunos insectos.

La adaptación es un elemento muy importante para que las anonas produzcan frutos en forma natural, aunque, generalmente la producción de frutos no de alto rendimiento debido a los problemas de dicogamia protogínica y la polinización natural, debido a lo cual se han diseñado las técnicas de polinización artificial. En las visitas de diagnóstico se encontraron muchas plantas de chirimoyo en la región del Bajío, sin embargo en muy pocos árboles se encontraron algunos frutos. Esto muestra que la adaptación no es la más adecuada para el chirimoyo en esa región, lo que puede ser debido a las dificultades naturales de polinización. En las recientes visitas a los declives de la Sierra Madre Oriental en comunidades del municipio de Acaxochitlán, Hgo., en los límites con Veracruz se encontraron árboles de chirimoyo con muy buena producción de frutos en condiciones naturales, lo que puede deberse a la elevada humedad ambiental y las temperaturas más benignas en época de floración, así como probablemente a la presencia de agentes polinizadores.

Particularmente para el caso del chirimoyo he observado que la raíz tiene una elevada capacidad de regenerar nuevos brotes aún cuando se corten muchas veces, esta capacidad se mantiene. Debido a esta característica el árbol del chirimoyo se utiliza para la extracción de leña de los troncos y se deja el tocón con la finalidad de que vuelva a regenerarse el árbol al cabo de unos dos años.

## Conclusión

En México existen 14 géneros y 62 especies de Annonaceae según los herbarios y colectas realizadas en el presente trabajo.

## Agradecimientos

Se agradece al SNICS (SINAREFI) y a la UACH por el apoyo financiero otorgado a la presente investigación.





## Referencias

- Angiosperm Phylogeny Group (APG). 1998. An ordinal classification for the families of flowering plants. *Annals of the Missouri Botanical Garden*. 85: 531-553.
- Bailley, L.H. 1949. Manual of cultivated plants. McMillan. New York, USA.
- Chatrou, L.W. 1999. The *Annonaceae* and the *Annonaceae* Project: a brief overview of the state of affairs. *Acta Horticulturae*. 497: 43-49.
- Fries, R.E. 1959. *Annonaceae*. In: Die natürlichen pflanzenfamilien. 2<sup>a</sup> Edition. Engler, A. and Prantl, K. Aufl., Band. Berlin, Germany. 17a II: 1-171.
- Lorea-Hernández, F. 2000. Base de datos del Herbario del Instituto de Ecología, A.C. (XAL). Herbario Xal. División de Vegetación y Flora, Instituto de Ecología, AC. Base de datos SNIB-CONABIO proyecto K004. México, D.F.
- Ochse, J.J., Soule Jr., M.J., Dijkman, M.J. y Wehlburg, C. 1974. Otros cultivos frutales. En: Cultivo y mejoramiento de plantas tropicales y subtropicales. Editorial Limusa. México. pp. 587-818.
- Popenoe, W. 1974. The Anonaceous fruits; the cherimoya. In: Manual of tropical and subtropical fruits, Facsimile of the 1920. Ed. Hafner

Press, a Division of MacMillan Publishing Co. Inc. New York, Collier-Macmillan Publishers. London. Chapter 5: 161-189.

Sistema Integrado de Información Taxonómica-México (SIIT<sup>mx</sup>-CONABIO). 1996. <http://siit.conabio.gob.mx/>

# Metodología para estudios palinológicos en Annonaceae y su aplicación en especies del estado de Tabasco, México

Barragán-Cupido, Helen<sup>1</sup>  
Burelo-Ramos, Carlos Manuel<sup>1</sup>  
Salvador-Esparza, Rosa María<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Herbario UJAT. División Académica de Ciencias Biológicas  
Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Carr. Villahermosa-Cárdenas km. 1.5, entrada  
a Bosques de Saloya. Villahermosa, Tabasco, México. carlos.burelo@dacbiol.ujat.mx

<sup>2</sup> Universidad Popular de la Chontalpa  
Carr. Cárdenas-Huimanguillo, km 2.0. Cárdenas, Tabasco, México.

## Resumen

**S**e ha reconocido alto valor taxonómico en los caracteres del polen en la familia Annonaceae, ya que contribuye al reconocimiento de grupos mayores. El análisis del polen en la familia Annonaceae, no puede realizarse usando la metodología tradicional, ya que esta técnica lo daña, debido a que presentan una exina delgada y frágil. Para lograr el análisis de esas estructuras se menciona el uso de baños de hexano. La metodología propuesta consiste en los siguientes pasos: las anteras

de ejemplares herborizados se hidratan (en baño María), se maceran levemente, se centrifugan, se elimina el agua y se colocan en alcohol absoluto, sometidas de nuevo a centrifugación, y se elimina el alcohol añadiéndose hexano, en el cual se dejan por 10 minutos. Posterior a la centrifugación, se elimina el hexano y se agrega alcohol absoluto y glicerina en proporción 1:1. Las series de centrifugación fueron de 4,000 rpm por 10 min. Con esta técnica se logró la observación de granos de polen en microscopio de luz, reconociéndose, polen solitarios y agrupados en tétradas, a los cuales pudimos realizarles observaciones de forma y tamaño, así como de la ornamentación. Asimismo, se realizaron observaciones con el MEB, debido a que el valor taxonómico de los granos de polen a niveles específicos puede ser alto, por lo que lograr la observación de granos donde se puedan observar detalles en ornamentación es de gran importancia, esto es posible lograr siguiendo la metodología propuesta. Proponemos se pruebe su utilidad en otros miembros de las Magnoliales. La descripción de los granos de polen de las especies de Tabasco brinda evidencias que pueden contribuir al esclarecimiento de problemas taxonómico del grupo.

Palabras clave: *Annonaceae*, *polen*, *hexano*

## Introducción

La palinología es la ciencia que estudia el palinomorfo contemporáneo o fosilizado, esto incluye el estudio de polen, esporas, orbículos, dinoflagelados y cualquier estructura resistente a ácidos (Bryant, 1990). Es una ciencia interdisciplinaria y reúne conocimientos de las ciencias de la tierra (geología) y de la biología, específicamente de la botánica. El nombre de palinología fue propuesto por Hyde y Williams a mediados del siglo XX, quienes la definieron como la ciencia que se ocupa del estudio del polen y de las esporas. La podemos dividir de acuerdo al objeto y estructura de lo que se estudia en Melisopalinología, se encarga del reconocimiento y clasificación de los granos de polen en mieles; la Actuopalinología utiliza la morfología y aberturas del grano de polen para taxonomía vegetal, la Aeropalinología,

estudio del polen, esporas y otras partículas vivas presentes en el aire (Sánchez-Reyes, 1996).

El término polen procede del latín *pollen-inis*, que significa “polvo muy fino” o “flor de harina” y se utilizó por Linneo por primera vez e incorporó al castellano por Cavanilles (Trigo *et al.*, 2008). Los granos de polen son partículas fecundantes con potencialidad masculina (procedentes de los sacos polínicos en plantas con semilla), necesarios para la reproducción de las plantas superiores, ya que su misión es la de fecundar los óvulos para dar lugar a la formación de semillas y asegurar, así, la continuidad de la especie, ya que que ejercen la función transportadora del gametofito masculino a partir de la parte masculina a la femenina de la flor (Trigo *et al.*, 2008; REMA, 2010).

Los estudios de palinología en Annonaceae son pocos por lo que existe un vacío en este conocimiento, por lo que estudios descriptivos de los granos de polen son de un alto valor para diferentes aspectos del estudio de las Annonaceae: sistemática, taxonomía, biología reproductiva, y en campos como la alergología, paleofitología, entre otras. Aunque existen varios trabajos palinológicos de la familia Annonaceae (Hesse *et al.*, 1985; Su y Saunders, 2003; Chaowasco *et al.*, 2008; Couvreur *et al.*, 2008) en los que se mencionan que los granos de polen en esta familia son frágiles y no soportan la acetólisis tradicional y aunque se mencionan algunos datos de cómo lograr hacer observaciones con el MEB, no establecen una metodología clara. En el presente trabajo planteamos una metodología para lograr las observaciones con microscopio óptico y con el MEB, rescatando lo realizado por los trabajos anteriormente mencionados. Para probar la utilidad de nuestro método utilizamos las 18 especies de Annonaceae reportadas para el estado de Tabasco (Salvador-Esparza, 2005).

## Método

Se obtuvieron muestras de los herbarios UJAT, MEXU y XAL de colecciones de anonáceas del estado de Tabasco, de las que se tomaron anteras maduras, las cuales se colocaron en bolsas de papel, posteriormente fueron llevadas al laboratorio. La metodología propuesta consiste en lo

siguiente: las anteras de ejemplares herborizados se hidratan (en baño María), se maceran levemente, se centrifugan, se elimina el agua y se colocan en alcohol absoluto, se someten de nuevo a centrifugación, y se elimina el alcohol añadiendo hexano, en el cual se dejan por 10 minutos, posteriormente se centrifugan, se elimina el hexano y se agrega alcohol absoluto, la muestra se divide en dos tubos. Las series de centrifugación se realizan a 4,000 rpm por 10 minutos.

Para observaciones bajo el microscopio de luz se toma uno de los tubos y se añade glicerina en la misma proporción del alcohol que contenga el tubo. De este tubo se sustrajeron muestras con las cuales se realizaron preparaciones permanentes, que forman parte de la colección palinológica del Herbario UJAT. Realizándose observaciones a varias magnificaciones. Para las observaciones con el MEB, se tomaron muestras del segundo polen, sometidos a punto crítico y sometidos a un baño de oro-paladio, llevados con el MEB, donde se realizaron observaciones a varias magnificaciones.

## Resultados

La metodología que utilizamos nos permitió observar granos de polen en tétradas (figuras 1 y 5) y monadas (figuras 3 y 6) en las especies estudiadas, asimismo se pudo describir la superficie de los granos: pudimos reconocer especies de polen trabeculado (figura 2) y especies con polen rugoso (figura 4) esto principalmente observable con el MEB. Es de notarse que la metodología empleada provoca que muchos de los granos de polen sufran cambios en su tamaño, ya que se observan granos de polen comprimidos (ponchados) lo cual no nos permite realizar medidas de las longitudes polares y ecuatoriales.



Figura 1. Tétradas en *Annona cherimola*

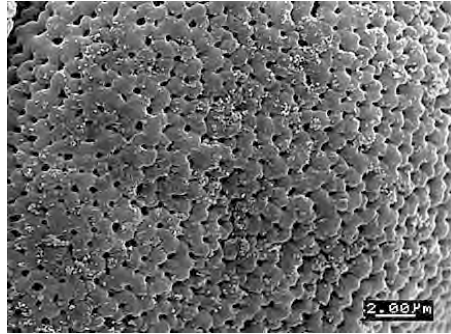


Figura 2. Superficie trabeculada en *A. cherimola*

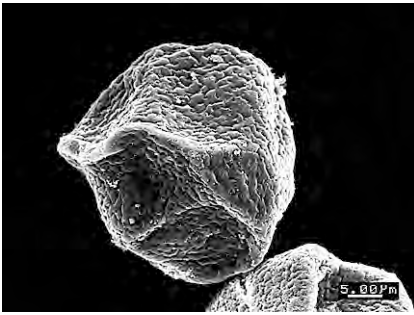


Figura 3. Monadas en *Desmopsis trunciflora*

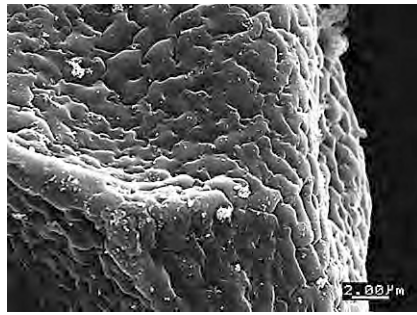


Figura 4. Superficie rugosa en *D. trunciflora*



Figura 5. Tétradas en *A. squamosa*, vista al microscopio de luz



Figura 6. Monada de *Guatteria amplifolia*, vista al microscopio de luz.



## Conclusión

La acetolisis ácida (Erdman, 1960) utilizada en la mayoría de los trabajos palinológicos que se realizan, ha demostrado su inutilidad en las Annonaceae, debido a que la superficie de los granos de polen de esta familia es débil al efecto de los ácidos, por lo que la metodología que aquí proponemos es una buena opción si lo que se pretende observar son la conformación y ornamentación de los granos de polen. No así, si lo que pretendemos es hacer medidas de tamaño de estos granos de polen.

Consideramos que la metodología que proponemos permitirá identificar caracteres que pueden ser utilizados en cuestiones taxonómicas de la familia, así como para la identificación de granos de polen provenientes de sedimentos, aire y mieles.

## Agradecimientos

A la División Académica de Ciencias Biológicas (UJAT), por el apoyo otorgado.

## Referencias

- Bryant, V.M.J., Jones, J.G. and Mildenhall, D.C. 1990. Forensic palynology in the United States of América. *Palynology*. 14: 193-208.
- Chaowasko, T., Mols, J., Raymond, W.J.M. and Van Der Ham, B.J. 2008. Pollen morphology of *Miliusa* and relatives (*Annonaceae*). *Grana*. 47: 175-184.
- Couvreur, T.L.P., Botermans, M., Van Heuven, B.J. and Van Der Ham, R.W. J.M. 2008. Pollen morphology between the *Monodora* clade, a diverse group of five African *Annonaceae* genera. *Grana*. 47: 185-210.
- Erdtman, G. 1960. The acetolysis method. *Swensk. Bot. Tidskrift*. 54 (4): 561-564.
- Gutiérrez, M., Sáenz, C., Aránguez, E. y Ordóñez, J.M. 2001. Polen atmosférico en la comunidad de Madrid. Documentos Técnicos de Salud Pública 70. Madrid, España. 204 pp.
- Hesse, M., Morawetz, W. and Ehrendorfer, F. 1985. Pollen ultrastructure and systematic affinities of *Anaxagorea* (*Annonaceae*). *Pl. Syst. Evol.* 148: 253-285.

- Salvador E., R.M. 2005. Estudio taxonómico florístico de la familia Anonaceae en el estado de Tabasco, México. Tesis de Licenciatura. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México.
- Sánchez Reyes, E. 2004. Estudio aeropalinológico de la ciudad de Salamanca durante el año 1996. Tesis de Licenciatura. Universidad de Salamanca. España.
- Trigo, M.M., Jato, V., Fernández, D. y Galán, C. (Coordinadoras). 2008. Atlas aeropalinológico de España. Red Española de Aerobiología. Universidad de León. 177 pp.
- [www.atmosfera.unam.mx/rema/polen.html](http://www.atmosfera.unam.mx/rema/polen.html) accesado septiembre de 2010.
- Yvonne C. F. Su, Richard, M. and Saunders, K. 2003. Pollen structure, tetrad cohesion and pollen-connecting threads in *Pseuduvaria* (Anonaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*. 143: 169-78.

# Catálogo de las Annonaceae de Tabasco

Salvador Esparza, Rosa María<sup>1</sup>  
Guadarrama Olivera, María de los Ángeles<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidad Popular de la Chontalpa, Carr. Cárdenas-Huimanguillo, km. 2.0  
Cárdenas, Tabasco. C.P. 86500. rossyfress@hotmail.com

<sup>2</sup>Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. DACBIOL, km 0.5  
Carr. Villahermosa-Cárdenas, s/n, entronque a Bosques de Saloya, C.P. 86150.

## Resumen

Se presenta la elaboración de un catálogo ilustrado de la familia Annonaceae en el estado de Tabasco como herramienta para enriquecer la información científica y el desarrollo de investigación florística en la zona. La familia Annonaceae en esta región, hasta el presente, está constituida por 10 géneros con 18 especies distribuidos en gran parte del estado. Para cada especie listada en el catálogo se presenta información sobre nombres comunes, hábitat, hábito, herbarios de referencia, usos y distribución geográfica en Tabasco y sus alrededores.

Palabras clave: *Annonaceae*, *flora*, *investigación*, *catálogo*

## Introducción

La contribución de los estudios florísticos regionales ha sido a diferentes niveles, por ejemplo, en los planes de investigación y manejo de las áreas naturales protegidas para garantizar su conservación.

El interés del herbario UJAT en Tabasco durante los últimos años ha sido la exploración botánica para representar la flora con que cuenta el Estado y ubicar plantas con valor científico, de uso conocido o de aquellas con potencial para su aprovechamiento, como es el grupo de especies pertenecientes a la familia Annonaceae.

Como tal, dicha familia botánica se caracteriza por ser un grupo de plantas muy conocido, principalmente el fruto de las especies del género *Annona*, sin embargo existen otras especies de la misma familia, que destacan, no precisamente por su fruto, sino por el hábitat en que se encuentran y funcionan como indicadores ecológicos de ecosistemas naturales como selva y acahuales recientes. Por lo anterior es notable la importancia que presentan las especies vegetales a nivel mundial, ya que son herramientas que permiten la biodiversidad y los peligros que presentan. El objetivo del presente trabajo es elaborar un catálogo ilustrado de la familia Annonaceae, como contribución al conocimiento, investigación y divulgación de la flora del estado, pero también para facilitar el aprendizaje y reconocimiento de este grupo botánico.

## Método

El presente trabajo se deriva del estudio taxonómico-florístico de la familia Annonaceae (Salvador Esparza, 2005) en el estado de Tabasco. Los especímenes reportados son parte de las colectas periódicas que se realizaron en la mayoría de los municipios del estado, haciendo referencia al conjunto vegetal de selva, acahuales y vegetación riparia (cerca de ríos y lagunas) donde comúnmente se encuentra la mayoría de especies de la familia Annonaceae, excepto el género *Annona* que es exclusivo de huertos familiares, potreros, cercos vivos, zonas pantanosas e inundables.

Posteriormente se realizaron visitas a diversos herbarios del estado de Tabasco particularmente al herbario UJAT (Universidad Juárez

Autónoma de Tabasco), al herbario del Colegio Superior de Agricultura Tropical antiguamente conocido como el Colegio de Posgraduados, ubicado en el municipio de Cárdenas, Tabasco. También se visitaron los herbarios localizados fuera del estado, como el Instituto de Ecología, A. C. de Xalapa, Veracruz (INECOL), el herbario del Instituto de Biología de la UNAM (MEXU) todo esto con el fin de cuantificar y co-tejar medidas con especímenes de otras partes del país y el extranjero, de cada uno de los géneros con sus respectivas especies.

El catálogo incluirá el nombre científico, el nombre común de cada especie, descripción morfológica, fotos o ilustraciones de respaldo, indicando a la vez la distribución de la familia en el estado, ecología y usos. Al final del documento se incluirá un glosario de términos botánicos empleados.

## Resultados y discusión

El catálogo de Annonaceae de Tabasco documentará 10 géneros y 18 especies, siendo el género *Annona* más importante en el estado. Incluirá 8 novedades botánicas para el estado, mencionadas en el cuadro 1.

Cuadro 1. Novedades botánicas para Tabasco

<b>Especies</b>
<i>Anaxagorea guaternalensis</i> Standl.
<i>Annona purpurea</i> Mociño & Sessé
<i>Annona primigenia</i> L. Standl. & Steyerl.
<i>Cananga odorata</i> (Lam.) Hook. F. & Thomas
<i>Desmopsis trunciflora</i> L.
<i>Mosannonia depresa</i> G.E. Schatz
<i>Rollinia mucosa</i> (Jacq.) Baill.
<i>Stenanona stenopetala</i> (Donn. Sm) G.E. Schatz.

Al analizar la distribución general se encontró que el género más numeroso de todos los encontrados en Tabasco es *Annona* con 7 especies, el cual crece en huertos familiares, potreros, cercos vivos, y en ocasiones de forma silvestre en zonas pantanosas e inundables. Es un género con alto valor comestible y cultivado en la mayor parte del estado, siendo *Annona muricata* (guanábana) y *Annona reticulata* (anona) las especies más aprovechadas.

En segundo término, se encuentran las especies que destacan en la vegetación de selvas altas y medianas como *Guatteria anomala* (zopo), *Cymbopetalum bailloni*, *Desmopsis trunciflora*, *Rollinia mucosa*, *Rollinia membranacea*, *Stenannonia stenopetala*, y *Xylopia frutescens*. Otras especies como *Guatteria amplifolia* y *Mosannonia depresa* se encuentran en acahuales recientes o en vegetación poco perturbada, cuadro 2.

Considerando que la familia Annonaceae se encuentra dignamente representada en el estado por los frutos del género *Annona* y los géneros poco conocidos, pero que tienen la función de cubrir parte de la vegetación del lugar aludido. Es primordial y necesario definir la presentación de un catálogo como contribución al conocimiento de la flora que permitirá guiar acciones para el manejo de dichas especies. La implementación de estos tipos de programas de estudios de plantas requiere de atención inmediata en lo que respecta a investigación, conocimiento y divulgación.

Cuadro 2. Diversidad y distribución de los géneros de Annonaceae en Tabasco

Géneros	No. de especies	Forma biológica	Hábitat	Usos
<i>Anaxagorea</i>	1	Arbusto	Acahuales	Sin uso
<i>Annona</i>	7	Árbol	Huertos	Comestible
<i>Cananga</i>	1	Árbol	Huertos	Aromáticas
<i>Cymbopetalum</i>	2	Árbol	Selva y acahuales	Sin uso
<i>Desmopsis</i>	1	Arbusto	Selva y acahuales	Sin uso
<i>Guatteria</i>	2	Arbusto	Acahuales	Sin uso
<i>Mosannonia</i>	1	Arbusto	Acahuales	Sin uso
<i>Rollinia</i>	2	Árbol	Selva y acahuales	Sin uso
<i>Stenannonia</i>	1	Arbusto	Acahuales	Sin uso
<i>Xylopia</i>	1	Arbusto	Acahuales	Sin uso

## Conclusión

Se confirma la diversificación de los géneros y especies de la familia Annonaceae, la presencia de estructuras florales masculinas y femeninas, el arreglo de los estambres, son esenciales y determinantes para ubicar correctamente a las especies de este grupo botánico.

El presente catálogo incluirá la relación de las especies de la familia Annonaceae ubicadas en Tabasco, puntualizando que existe una notable diferencia morfológica y de hábitat que hace interesante profundizar los detalles que hacen únicos a esta interesante familia botánica. Dicha diferencia y diversidad se representará bajo un enfoque didáctico, para atribuirse a la gran cantidad de floras que existen en nuestro país y tener una mejor facilidad de manejo y traslado en las diferentes corrientes florísticas, según el criterio de investigación.





## Referencias

- Salvador Esparza, R.M. 2005. Estudio taxonómico-florístico de la familia Annonaceae en Tabasco. Tesis de Licenciatura. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Villahermosa, Tabasco. 107 pp.
- Zomlefer, B. 1994. Plant families. The University of North Carolina. Press Chaper Hill & London USA. pp. 31-33.



# Las anonáceas de Chiapas en el herbario CHIP

Hernández Najarro, Francisco  
Díaz Montesinos, Ma. Guadalupe  
Jonapá Solís, José M.

Secretaría del Medio Ambiente Vivienda e Historia Natural. Herbario CHIP  
Calzada de los Hombres Ilustres s/n. Col Centro, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas 29000,  
México. Tel. y fax: (961) 6123622. Pako735@hotmail.com  
ldbiologia77@gmail.com, anubis\_816@hotmail.com

## Resumen

La flora del estado de Chiapas es muy abundante, tanto en especies como en tipos de vegetación, se tienen registradas 8,248 especies de plantas vasculares según Breedlove (1981) pero algunos investigadores calculan que esta riqueza florística puede llegar hasta las 12,000 especies, con ello Chiapas posee un 31% de la flora nacional. En cuanto a lo que se conoce de la riqueza florística, existen algunos trabajos que muestran información precisa de las especies existentes en determinadas regiones, pero falta mucho por conocer de la flora del estado.

Un herbario se concibe como un centro cuya función básica es la de resguardar e incrementar un acervo de información biológica representativa de la flora, constituye una fuente de consulta autorizada para la realización de investigaciones botánicas.

El herbario CHIP se creó en 1949 a partir de las colectas que hiciera el Dr. Faustino Miranda las cuales son el punto de partida de la colección actual, también alberga ejemplares de los Doctores E. Matuda y D. Breedlove, entre otros; actualmente cuenta con cerca de 43,000 ejemplares de plantas vasculares y 2,000 ejemplares en colecciones anexas (frutos, semillas, hongos, xiloteca, maíces criollos).

La colección de plantas vasculares que actualmente tenemos, representa aproximadamente el 58 % de las especies de plantas vasculares de Chiapas (Breedlove, 1981), donde el grupo mejor representado son las Angiospermas. Entre estas se encuentra la familia Annonaceae, siendo ésta una familia del orden Magnoliales, que consta de 130 géneros con unas 2,300 especies que se distribuyen en los trópicos del Nuevo y Viejo Mundo, hasta el norte de Australia y las islas del Pacífico lo que las hace tener una historia evolutiva muy antigua.

El acervo de la colección de Anonáceas del herbario CHIP es de 201 ejemplares botánicos, repartidos en 9 géneros con 27 especies comparadas con lo reportado por Breedlove en el *Listado florístico de Chiapas* de 1986. Para el herbario CHIP el género más representado es *Annona* con 11 especies, lo que representa el 40.74% del total de anonáceas registradas en la colección, seguido de *Cymbopetalum*, *Guatteria* y *Rollinia* con 3 (11.11%), y los menos representados son *Desmopsis*, *Cananga* y *Xylopiya* con tan sólo una especie. La especie que más se ha colectado es *Annona cherimola* Miller la cual cuenta con 27 registros, esto es el 13.43% del total de la colección. En uso etnobotánico se reportan 4 usos antropogénicos destacando el uso medicinal y comestible; para las zonas fisiográficas tenemos que la región más colectada es Altiplanicie Central, Sierra Madre de Chiapas, Depresión Central, Montañas del Norte, y las menos colectadas son Llanura Costera del Pacífico y Montañas del Oriente.

Palabras clave: *Annona*, uso etnobotánico, herbario

## Introducción

La flora del estado de Chiapas es muy abundante tanto en especies como en tipos de vegetación, se tienen registradas 8,248 especies de plantas

vasculares según Breedlove (1981) pero algunos investigadores calculan que esta riqueza florística puede llegar hasta las 12,000 especies, con ello Chiapas posee un 31% de la flora nacional. En cuanto a lo que se conoce de la riqueza florística de Chiapas, existen algunos trabajos que muestran información precisa de las especies existentes en determinadas regiones, pero falta mucho por conocer de la flora del estado.

Un herbario se concibe como un centro cuya función básica es la de resguardar e incrementar un acervo de información biológica representativa de la flora, constituye una fuente de consulta autorizada para la realización de investigaciones botánicas. El herbario CHIP se creó en 1949 a partir de las colectas que hiciera el Dr. Faustino Miranda las cuales son el punto de partida de la colección actual, también cuenta con ejemplares de los Doctores E. Matuda y D. Breedlove, entre otros, actualmente cuenta con cerca de 43,000 ejemplares de plantas vasculares y 2,000 ejemplares en colecciones anexas (frutos, semillas, hongos, xiloteca, maíces criollos). Intercambia ejemplares con 25 herbarios nacionales y extranjeros, además de contar con reconocimiento nacional e internacional, la finalidad, es tener colecciones representativas de Chiapas y estados vecinos, para fungir como un centro de información y consulta que apoye la realización de estudios e investigaciones multidisciplinarias que a su vez, se relacionen con la flora de Chiapas. Dichas investigaciones tienen como propósito no sólo generar conocimientos nuevos para la sociedad, sino que al mismo tiempo, incrementar y conservar las colecciones de la flora de Chiapas.

La colección de plantas vasculares que actualmente tiene el herbario, representa aproximadamente el 58 % de las especies de plantas vasculares de Chiapas (Breedlove, 1981), donde el grupo mejor representado son las angiospermas. Entre estas se encuentra la familia Annonaceae, siendo esta una familia del orden Magnoliales, consta de 130 géneros con unas 2,300 especies que se distribuyen en los trópicos del Nuevo y Viejo Mundo, hasta el norte de Australia y las islas del Pacífico lo que las hace tener una historia evolutiva muy antigua.

Breedlove (1986), reporta para Chiapas nueve géneros de anonáceas, los cuales se encuentran representados en nuestra colección, arrojando un total de 27 especies.

## Objetivo

Proporcionar información actualizada acerca de la familia Annonaceae en las colecciones del Herbario CHIP y dar a conocer cifras aproximadas de las anonáceas en Chiapas.

## Método

Se realizó una minuciosa revisión, actualización e interpretación de archivos, libro de registros, bases de datos y de las colecciones de ejemplares de herbario.

## Resultados

Breedlove (1986) reporta para Chiapas nueve géneros de la familia Annonaceae con un total de 24 especies, con el análisis realizado se ratifica la existencia de dichos géneros en la colección del herbario CHIP, para el caso de las especies el herbario cuenta con 27 especies, tres más que lo reportado en listado florístico (cuadros 1 y 2). En la gráfica 1 se plasma que *Annona cherimola* es la más representada en la colección, esto debido a que sus poblaciones aún se encuentra en estado silvestre y es utilizada como cerco vivo en algunos poblados de la Depresión Central, lo contrario de *Annona muricata* que tiene dificultades de adaptación y establecimiento en lugares que no ostentan las condiciones adecuadas para su supervivencia, además de ser presa de un sinnúmero de plagas. Por tanto podemos asegurar que lo representado en la gráfica 2 nos da un panorama de que el género *Annona* es el mejor caracterizado debido a que soporta condiciones muy adversas y no requiere de tanto cuidado, caso contrario de lo que presentan los géneros *Cannanga*, *Desmopsis* y *Xylopia*. Para el caso de las regiones fisiográficas (figura 1) se tiene que la Altiplanicie Central es la más colectada, ya que reúne las mejores condiciones para la adaptación de las especies de anonas por presentar mejor adaptación a altitudes menores de 1,000 msnm, lo que nos lleva a pensar que en las Montañas del Oriente es poco probable que en estas zonas encontráramos debido a que las altitudes van desde 1,200 has-

ta 3,000 msnm, por lo tanto no es clima propicio para establecimiento (gráfica 3).

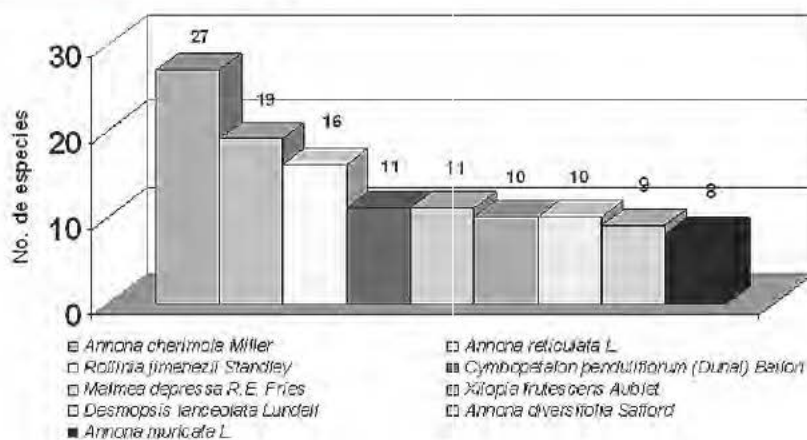
Cuadro 1. Especies de anonáceas de Chiapas en la colección del herbario CHIP

<b>Especies</b>	<b>Número de ejemplares</b>
<i>Annona cherimola</i> Miller	27
<i>Annona reticulata</i> L.	19
<i>Rollinia jimenezii</i> Standley	16
<i>Cymbopetalon penduliflorum</i> (Dunal) Baillon	11
<i>Malmea depressa</i> R.E. Fries	11
<i>Desmopsis lanceolata</i> Lundell	10
<i>Xilopia frutescens</i> Aublet	10
<i>Annona diversifolia</i> Safford	9
<i>Annona holosericea</i> Safford	8
<i>Annona muricata</i> L.	8
<i>Annona primigenia</i> Standley & Steyermark	8
<i>Annona purpurea</i> M. & S. ex Dunal	6
<i>Guatteria amplifolia</i> Triana et Planchon	5
<i>Sapranthus campechianus</i> (Kunth) Standley	5
<i>Annona globiflora</i> Schlecht	4
<i>Annona scleroderma</i> Safford	4
<i>Annona squamosa</i> L.	4
<i>Cymbopetalon stenophyllum</i> J.D. Smith	3
<i>Guatteria anomala</i> R.E. Fries	3
<i>Guatteria oliviformis</i> J.D. Smith	3
<i>Annona glabra</i> L.	2
<i>Cananga odorata</i> (Lam.) Hook & Thoms	2
<i>Rollinia mucosa</i> (Jacq.) Baillon	2
<i>Cymbopetalon mayanum</i> Lundell	1
<i>Malmea gaumeri</i> (Greenman) Lundell	1
<i>Rollinia rensioniana</i> Standley	1
<i>Sapranthus microcarpus</i> (J.D. Smith) R.E. Fries	1

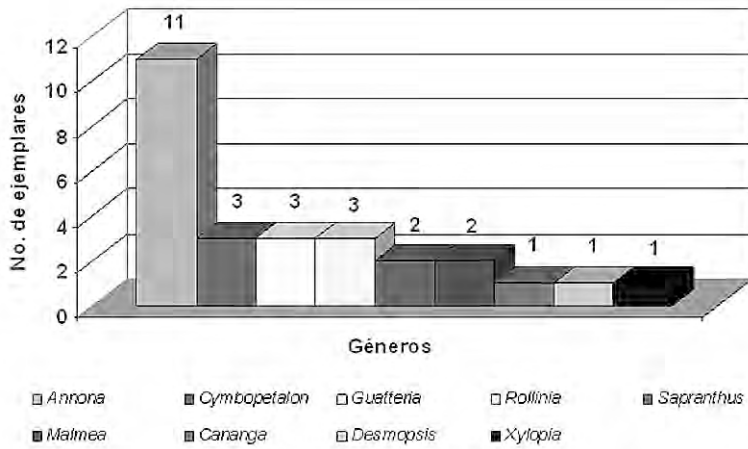


Cuadro 2. Dentro del aspecto etnobotánico, las anonáceas presentan varios usos antropogénicos

Nombre científico	Nombre común	Usos
<i>Annona cherimola</i> Miller	Chirimoya	Medicinal, comestible
<i>Annona diversifolia</i> Safford	Papausa	Comestible
<i>Annona holosericea</i> Safford	Chincuya, Anona	Comestible
<i>Annona muricata</i> L.	Guanábana	Comestible, medicinal
<i>Annona purpurea</i> M. & S. ex Dunal	Chincuya	Medicinal Comestible y sombra de café
<i>Annona reticulata</i> L.	Anona	Comestible, medicinal y sombra para café
<i>Annona squamosa</i> L.	Anona	Alimenticia, combustible, sombra de café
<i>Annona lutescens</i> L.	Anona	Medicinal
<i>Cymbopetalon stenophyllum</i> J.D. Smith	Orejuela, orijuela	Medicinal, combustible
<i>Guatteria oliviformis</i> J.D. Smith	Zopo, corcho negro	Maderable
<i>Rollinia jimenezii</i> Standul	Anonilla, anona de mono, anona de mico, chirmolla	Comestible y combustible



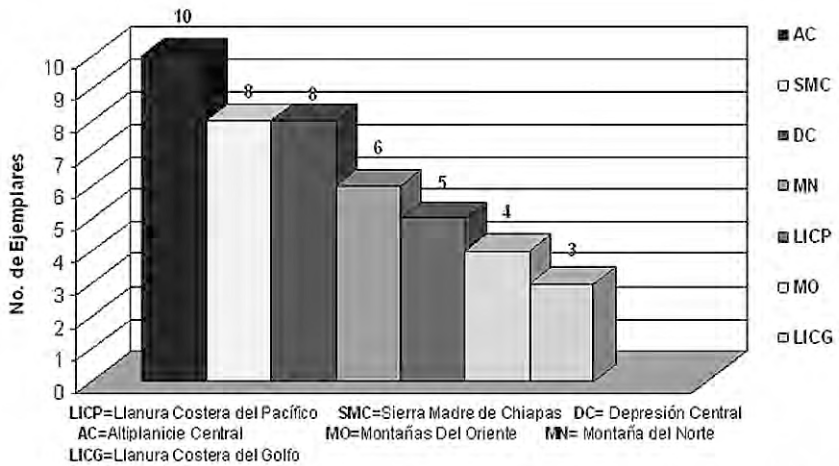
Gráfica 1. Especies mejor representadas de la familia Annonaceae en la colección Herbario CHIP



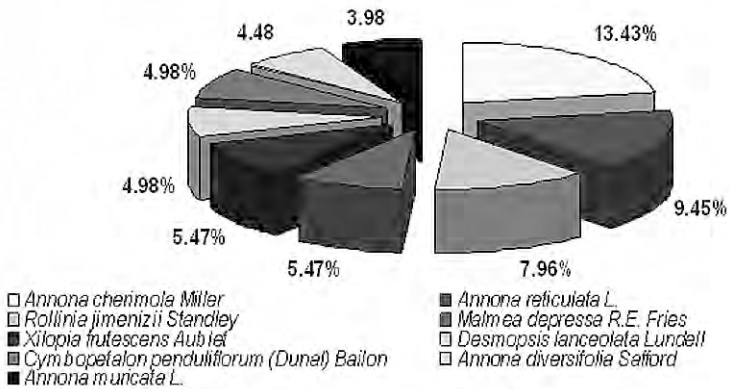
Gráfica 2. Géneros mejores representados en la colección del Herbario CHIP



Figura 1. Regiones fisiográficas de Chiapas



Gráfica 3. Las anonáceas de Chiapas en las diferentes regiones fisiográficas



Gráfica 4. Porcentaje de representatividad de la colección de anonáceas en el Herbario CHIP



Figura A. Flor de *Cymbopetalum penduliflorum* (Dunal) Ballon



Figura B. Flor de Anona roja (*Annona reticulata* L.)



Figura C. Frutos de *Cymbopetalum penduliflorum* (Dunal) Ballon

## Conclusiones

El acervo de la colección de anonáceas del herbario CHIP es de 201 ejemplares botánicos debidamente etiquetados e identificados, repartidos en 9 géneros con 27 especies teniendo con esto superado lo reportado por Breedlove en el listado florístico de Chiapas de 1986.

Para el herbario CHIP el género más representado es *Annona* con 11 especies, lo que representa el 40.74% del total de anonáceas registradas en la colección, seguido de *Cymbopetalum*, *Guatteria* y *Rollinia* con 3 (11.11%), y los menos representado son *Desmopsis*, *Cananga* y *Xylopia* con tan sólo una especie. La especie que más se ha colectado es la *Annona cherimola* Miller la cual cuenta con 27 registros, esto es, el 13.43% de lo registrado en la colección, dentro del uso etnobotánico se reportan 4 usos antropogénicos para la región en la cual destacan el uso medicinal y comestible; para las zonas fisiográficas tenemos que la región más colectada es Altiplanicie Central, Sierra Madre de Chiapas, Depresión Central, Montañas del Norte, y las menos colectadas son Llanura Costera del Pacífico y Montañas del Oriente.

## Referencias

- Breedlove, D.E. 1986. Listado florístico de México. IV Flora de Chiapas. Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. México. Pp. 33.
- Isidro V., Ma.A. y Moreno Gutiérrez, Ma. N. 2006. Plantas medicinales de Ocuilapa, una comunidad zoque de Chiapas. En: Aramoni Calderón, D., Lee Whiting, T.A., Lisbona Guillén, M. (coordinadores) Presencia zoque. UNICACH-COCyTECH-UNACH-UNAM. México. Pp. 399- 412.
- Miranda, F. 1998. La vegetación de Chiapas. 3ª Edición. CONECULTA. México. 279 pp.
- Isidro V., Ma.A. 1997. Etnobotánica de los zoques de Tuxtla Gutiérrez. Instituto de Historia Natural-Gobierno del Estado de Chiapas. México. Pp. 61-125.
- Velasco, P.A. 2005. Introducción al patrimonio cultural de Chiapas. Gobierno del Estado de Chiapas. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas.



# Aspectos etnobotánicos de anonáceas en Chiapas, México

Farrera Sarmiento, Oscar

Secretaría de Medio Ambiente Vivienda e Historia Natural (Jardín Botánico F. Miranda)  
Calz. Hombres Ilustres S/N. Edificio Museo Botánico. Col. Centro. Tuxtla Gutiérrez,  
Chiapas, México. Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas, Libramiento Norte  
Poniente 1150, col. Lajas Maciel, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México. Tel. (961)6123622.  
ofarreras@hotmail.com; oscar.farrera@unicach.mx

## Resumen

Los estudios etnobotánicos en Chiapas son escasos. El presente análisis pretende conocer las especies de anonáceas útiles de Chiapas, sus nombres vernáculos y las partes vegetativas empleadas en los diferentes usos. Se revisaron y analizaron las colecciones de herbarios (CHIP, CH, HEM, MEXU) y diversos estudios etnobotánicos de Chiapas. Se documentan 20 especies de anonáceas útiles de Chiapas agrupadas en 6 géneros. Destacan los usos comestible como fruta fresca y medicinal en sus distintas aplicaciones como gastrointestinales, respiratorias, fiebre, paludismo, dolor de cabeza, gripe, sinusitis, hemorragia nasal, golpes, fuego bucal, “cruda”<sup>1</sup>, renal, vómito,

---

<sup>1</sup>Estado fisiológico y psicológico como resultado de la embriaguez.



principalmente para las especies del género *Annona*; de menor frecuencia tenemos artesanal, leña, construcción, forraje, ornato, sombra de cacaotales y cafetales. Se tienen registros de todas las regiones fisiográficas, la menos registrada es la Sierra Madre de Chiapas. Es necesario continuar con los estudios etnobotánicos y más aún en las áreas menos estudiadas y vincularlos a otros campos de estudios para un mejor aprovechamiento integral y sostenido de estos recursos fitogenéticos de Chiapas.

Palabras clave: *Annonaceae*, *etnobotánica*, *Chiapas*, *México*.

## Introducción

Los estudios etnobotánicos en Chiapas son escasos, las regiones fisiográficas más estudiadas son la Depresión Central y la Meseta Central de forma general y más frecuentemente sobre plantas medicinales en general. El presente análisis pretende conocer las especies de anonáceas útiles de Chiapas, sus nombres vernáculos y las partes vegetativas empleadas en los diferentes usos. Se revisaron y analizaron las colecciones de los herbarios (CHIP, CH, HEM, MEXU) y diversos estudios etnobotánicos de Chiapas.

## Resultados y discusión

Se documentan 20 especies de anonáceas útiles de Chiapas agrupadas en seis géneros detallándose en los cuadros 1 y 2. Destacan los usos comestibles como fruta fresca y medicinales en sus distintas aplicaciones como gastrointestinales, respiratorias, fiebre, paludismo, dolor de cabeza, gripe, sinusitis, hemorragia nasal, golpes, fuego bucal, cruda, renal, vómito, principalmente para las especies del género *Annona*; de menor frecuencia tenemos artesanal, leña, construcción, forraje, sombra de cacaotales y cafetales y ornato; la mayoría de las especies son silvestres principalmente del bosque tropical caducifolio; las especies *Annona cherimola*, *A. diversifolia*, *A. muricata* (figura 1) y *Cananga odorata* son cultivadas principalmente en los solares o huertos familiares, *A. lutescens*,

*A. reticulata* y *A. purpurea* son especies toleradas o fomentadas, probablemente en proceso de domesticación en los diversos agroecosistemas de la región. Referente a la frecuencia de usos *A. purpurea* (figura 2) es la especie con diez aplicaciones antropogénicas diferentes. Únicamente la especie *Guatteria anomala* “Ek bache” distribuida en las montañas de oriente es una de las especies en riesgo considerada en la Norma Oficial Mexicana (NOM-059-ECOL-SEMARNAT-2001), en la categoría de Amenazada. Se tienen registros de anonáceas útiles de Chiapas en todas las regiones fisiográficas, la que menos registros tiene es la Sierra Madre de Chiapas.

Cuadro I. Especies útiles el género *Annona* de Chiapas, México

Nombre científico	Nombre vulgar	Municipio	Uso	Parte usada
<i>A. cherimola</i>	Chirimuya, K'evex, Jipil Vinik, K'wex, Anona agría, Anona fría, Yadi, Batz'ik'evex	Berriozábal, Ocozocoautla, Copainalá, San Juan Chamula, Amatenango del Valle, Rayón, San Fernando, Mapastepec, Ocoatepec, Pantepec, Comitán Zinacantán	Comestible, medicinal (hemorragia nasal, fiebre, diarrea, paludismo, mal de ojo), sombra de cafetal, sombra de cacaotal, artesanal	Fruto Hoja Planta completa Tallo
<i>A. diversifolia</i>	Papausa K'evex	Tuxtla Gutiérrez, Jiquipilas, Zinacantán, San Fernando, Villa de Acala, Villa Corzo	Comestible, leña, medicinal (golpes, cruda, hemorragia nasal, sinusitis)	Fruto Tallo Hoja
<i>A. glabra</i>	Anona de monte	Villa Comaltitlán	Comestible	Fruto
<i>A. holosericea</i>	Chirimuya	Jiquipilas, Tapachula	Comestible	Fruto

<i>A. lutescens</i>	Anona colorada	Jiquipilas, Tuxtla Gutiérrez, Ocozocoautla, San Fernando, Zinacantán	Comestible, medicinal (gripe, sinusitis), cerco vivo, sombra de cafetal	Fruto Hoja Planta completa
<i>A. muricata</i>	Guanábana	Jiquipilas, Tuxtla Gutiérrez, Ocozocoautla, San Fernando, Villa Corzo, Copainalá, Mapastepec	Comestible, medicinal (tos, fuego bucal, dolor riñones), leña, sombra de cafetal	Fruto Hoja Planta completa
<i>A. purpurea</i>	Chincuya Chin-jol K'evex Chinkuya	Jiquipilas, Tuxtla Gutiérrez, Ocozocoautla, San Fernando, Copainalá, Zinacantán, Amatenango del Valle, Villa de Acala	Comestible, aromatizante, medicinal (vómito y diarrea, fiebre, hemorragia nasal), leña, construcción, artesanal, sombra de cafetal	Fruto Hoja Tallo Planta completa
<i>A. reticulata</i>	Anona colorada K'anál K'evex	Tonalá, Pichucalco, Jiquipilas	Comestible, medicinal (gripa, sinusitis), leña	Fruto Hoja Tallo
<i>A. scleroderma</i>	Chincuya	Ocosingo, Acacoyagua	Comestible	Fruto
<i>A. squamosa</i>	Anona	Arriaga	Comestible, leña, sombra de ganado	Fruto Planta completa
<i>A. sp.</i>	?	San Juan Chamula	Medicinal, coraje	Corteza

Cuadro 2. Especies útiles de la familia Annonaceae de Chiapas

Nombre científico	Nombre vulgar	Municipio	Uso	Parte usada
<i>Cananga odorata</i>	llan-llan	Tuxtla Gutiérrez, Berriozábal	Ornato	Flor
<i>Cymbopetalon penduliflorum</i>	Kewesh, Anonillo, Ton Kuk, Ton cuc	Ocozocoautla, Arriaga, Ocosingo	Comestible, forraje	Fruto
<i>Cymbopetalum stenophyllum</i>	Orijuela	Mapastepec	Medicinal, leña	Hoja

<i>Desmopsis stenopetala</i>	Opicax	Ocosingo (Nahá)	?	?
<i>Desmopsis lanceolata</i>	?	Arriaga	Leña	Tallo
<i>Guatteria oliviformis</i>	Ek Bak che Zopo E Bog- che	Ocosingo (Nahá, Lacanjá- Chansayab)	Construcción	Tallo
<i>Guatteria anomala</i>	Ek bache	Ocosingo (Nahá)	Construcción	Tallo
<i>Rollinia jimenezii</i>	Anonilla Anona de mico, de mon- te, Anona	Rayón, Acacoyagua, Amatán, Ocozocoautla, Tuxtla Chico	Comestible, leña, sombra cacaotal	Fruto Tallo Planta completa
<i>Rollinia sp.</i>	Anona	Rayón	Medicinal (tos y diarrea)	Hoja



Figura 1. *A. muricata* en flor



Figura 2. Al centro fruto de *A. purpurea* y alrededor frutos de *A. diversifolia* en sus dos variedades blanca y rosa

## Conclusión

Es necesario continuar con los estudios etnobotánicos y más aún en las áreas menos estudiadas y vincularlos a otros campos de estudios para un mejor aprovechamiento integral y sostenido de estos recursos fitogenéticos de Chiapas.

## Referencias

- Breedlove, D. 1986. Listado florístico de México. IV Flora de Chiapas. Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 246 pp.
- Breedlove, D. and Laughlin, R.M. 1993. The flowering of man. A tzotzil botany of Zinacantan. Vol. II. Smithsonian contributions to anthropology. Number 35. pp. 426.
- Farrera S., O. 1997. Plantas útiles del ejido Quintana Roo, Jiquipilas, Chiapas. Tesis de Licenciatura. Universidad de Ciencias y Artes del Estado de Chiapas. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México. 87 pp.
- Isidro V., M.A. 1997. Etnobotánica de los zoques de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. Gobierno del Estado de Chiapas. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México. 125 pp.
- Gutiérrez M., L.D. 2003. Etnobotánica de huertos familiares en Gabriel Esquina, San Fernando, Chiapas. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. México 114 pp.
- Gutiérrez M., M.J. 2006. Plantas comestibles y medicinales de una comunidad zoque de Copainalá, Chiapas, México. Monografía de Licenciatura. Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México. 100 pp.

- Ríos A., A. 2006. Plantas medicinales del ejido Monterrey, municipio de Villa Corzo, Chiapas, México. Tesis de Licenciatura. UNICACH. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México. 95 pp.
- Sánchez de la Torre., A.A. 2005. Plantas medicinales de la cabecera municipal de La Concordia, Chiapas. Tesis de Licenciatura. Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México. 88 pp.
- Velasco A., R.K. Plantas útiles del ejido Francisco Sarabia, Comitán de Domínguez, Chiapas. Tesis de Licenciatura. Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México. En prensa.

## II. *Annona cherimola* Mill.



Fotos: Marcela Montiel Moreno





# Experiencia de campo en polinización manual del chirimoyo (*Annona cherimola* Mill) en Chile

Montiel Moreno, Marcela<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ingeniero Agrónomo asesor, Francisco Bilbao 237  
La Cruz, Provincia de Quillota, V región, Chile  
marcela.montiel@gmail.com

## Resumen

El conocimiento de los estados fenológicos florales del chirimoyo son claves para el éxito de la polinización manual. El manejo de las etapas de control mediante una planificación de la temporada de floración; el uso de diferentes alternativas de recolección de estambres; un manejo de la conservación de estambres y finalmente la polinización manual están directamente relacionados con un alto porcentaje de cuaja, lo que determina un alto rendimiento en huertos de chirimoyos con condiciones de riego, fertilización y poda que permiten tener árboles en un estado sanitario ideal.

Palabras clave: *polinización, floración, tépalos, dicogamia protogínea*

## Introducción

La polinización artificial del chirimoyo es una práctica común en la mayoría de los países donde se le cultiva. En Chile, con la incorporación de nuevas técnicas de poda, de fertilización, de riego y el aumento de las densidades de plantación, la polinización artificial ha tomado relevancia, debiendo integrar los aspectos fisiológicos florales.

La polinización artificial además de la técnica en sí misma, involucra aspectos de manejo de personal, control en las etapas de recolección de estambres, estrategia de polinización y almacenaje de estambres. La planificación de la polinización durante la época de floración es fundamental. La capacitación del personal en aspectos básicos y técnicos es imprescindible. La complejidad de dichas variables junto a otros importantes factores de manejo y de mercado, ha determinado que la superficie no se haya incrementado en forma notoria en Chile, siendo la gran limitante el factor climático que acentúa la dicogamia protogínea.

## Método

Para realizar la polinización manual de flores de chirimoyo en Chile, es fundamental conocer la fenología floral. Las flores del chirimoyo presentan en primer lugar la madurez del estado femenino (pistilos) y después desde 6 hasta 24 horas madura el estado masculino (estambres). Este mecanismo se conoce con el nombre de Dicogamia Protogínea.

## Estados florales

Los encargados del terreno y operarios deben conocer e identificar los siguientes estados florales:

### *Flor cerrada*

Los tépalos se observan cerrados. Este periodo se extiende desde que se observan las primeras flores hasta que alcanza el tamaño de una flor madura (previo al estado prehembra).

### ***Flor en estado prehembra***

Los tépalos comienzan ligeramente a separarse. Al observar los estigmas, éstos se presentan brillantes, con fluido estigmático. La duración y el momento de inicio de este estado dependen de las condiciones climáticas, pudiendo durar desde 5 hasta 20 horas.

### ***Flor en estado hembra***

Los tépalos se encuentran más separados que en el estadio anterior. Los estigmas se presentan brillantes y con fluido estigmático. El momento de inicio y la duración de este estado dependen de las condiciones ambientales. Su duración es variable, en nuestras condiciones puede permanecer 30 horas, llegando ocasionalmente hasta 54 horas, si los días están nublados.

### ***Flor en estado macho***

En este estado las flores presentan los tépalos totalmente extendidos, el cono pistilar inicialmente comienza a perder su secreción hasta adquirir una coloración café. Los estambres inicialmente están de color blanco y unidos, con el transcurso de las horas comienzan a separarse, luego se liberan los granos de polen, cambiando a una tonalidad café. En Chile, en general es posible encontrar este estado a partir de las 18 horas.

En el manejo de polinización propiamente se puede distinguir cuatro etapas:

- Control
- Recolección de estambres
- Almacenaje de estambres
- Polinización manual

Uno de los grandes desafíos al realizar la polinización del chirimoyo consiste en determinar una meta de cantidad de flores a polinizar en el huerto y cumplirla. Para esto es importante conocer la cantidad de ár-

boles existentes y el estado sanitario en que se encuentren. De acuerdo a la edad, vigor y cantidad de ramillas es posible estimar el número de flores a polinizar por árbol.

### ***Control de la polinización***

Es posible llevar un registro de la cantidad de flores polinizadas por árbol. Para esto, se cuelgan tarjetas de cartulina a un lado de los árboles. En algunos huertos acostumbran a colgar tablas con medidas determinadas (ejemplo 15 x 10 cm) donde las personas anotan directamente o bien sobre un cartón adosado a la madera. Además, es posible controlar la cantidad de flores polinizadas por persona y por día. Se recomienda llevar los registros en pequeñas libretas personales. El operario una vez realizada la polinización debe anotar en la tarjeta del árbol y luego en su libreta. En algunos huertos prefieren el uso de tarjetas de cartulina.

El monitor a cargo de la polinización debe controlar que los dos manejos mencionados se cumplan, y a la vez deberá llevar los registros de la cantidad de flores polinizadas diariamente y cantidad de estambres colectados (cc) por día.

Si la cantidad de árboles a polinizar no hace posible el control en detalle, es posible registrar la cantidad de insufladores o bombillas entregadas al operario y a partir de esto obtener la cantidad promedio estimada de flores por día. La evaluación de la cuaja y el muestreo de flores cuajadas, polinizadas y abortadas también deben ser registrados.

Es necesario que el monitor detecte el día en que tendrá la mayor cantidad de flores hembras de una determinada variedad. Debe comenzar a polinizar donde se podó primero. De ahí que sea conveniente en aquellos huertos que poseen diferentes variedades podar aquellas variedades tempranas en primer lugar. Por ejemplo, Concha negra, Concha lisa y luego Bronceada. De acuerdo a la cantidad de árboles a polinizar y a la cantidad de polen más estambres disponibles, es factible indicar a los operarios una determinada cantidad de flores, con la finalidad de cubrir el mayor número de árboles en determinado sector. De lo contrario, al polinizar todas las flores que se presentan, los estambres disponibles alcanzan para pocos árboles. La primera situación es

posible cuando los árboles tienen más de 10 años y presentan una alta densidad floral (promedio: 15 flores por metro lineal) para la condición de Chile.

La cantidad de flores totales a polinizar por árbol depende de la edad, vigor, tamaño, cantidad de ramillas semivigorosas, también influyen factores como tipo de suelo, riego, fertilización y la poda efectuada. También se han detectado árboles con aspecto decaído debido a temporadas con sobrecarga de fruta. En la práctica es recomendable indicar a los operarios la cantidad máxima de flores a polinizar por tipo de ramilla. Se ha llegado a detectar ramillas semivigorosas hasta con 10 frutitos.

En cuanto a las horas de polinización es conveniente realizarla desde las 7 am hasta las 11 o 12 horas. Si las flores están iniciando su ciclo hembra en horas de la tarde (18 horas) es posible polinizarlas, siempre y cuando exista total certeza de esta situación, lo que se produciría con días nublados.

### *Medición del porcentaje de cuaja*

En las condiciones de Chile, por la cantidad de mano de obra que se ocupa por hectárea (por ejemplo 14 personas/hectárea en un huerto de 13 años en plena floración) se hace necesario llevar un control de la cantidad de las flores cuajadas. Para medir el porcentaje de cuaja se marcan flores recién polinizadas con algún elemento de color intenso (ejemplo lana roja) y se inspeccionan a los 7 u 8 días.

Elegir un determinado número de árboles y marcar todas las flores polinizadas. En la práctica, dependiendo de la edad del árbol, en aquellos menores de 10 años es posible muestrear 5 árboles/día. Esto se acostumbra a realizar a principio y mediado de la floración, y de este modo incentivar a los operarios a anotar la cantidad exacta de flores polinizadas. También al final de la temporada se acostumbra a elegir al azar un determinado número de árboles (1%), y se contabilizan los pequeños frutos. Con el resultado total anotado en la tarjeta del árbol es posible obtener el porcentaje de cuaja (número de frutitos encontrados/número de flores polinizadas anotadas en la tarjeta).

### ***Recolección de estambres***

Son diversos los sistemas de recolección de estambres que se ocupan actualmente en Chile. En la práctica influyen factores como disponibilidad de flores en estado hembra y disponibilidad de operarios.

#### ***Recolección de estambres a partir de flores en estado macho***

En las condiciones de Chile, en general es posible observar flores en estado macho después de las 18 horas.

Durante la década de 1980 se realizaba la recolección de estambres con un pincel, este sistema aún se utiliza en algunos huertos. Los operarios lo recogen directamente de la flor en pequeños vasos plásticos que cuelgan al cuello. También está la alternativa de utilizar el pincel para esta labor y con los dedos tirar suavemente los tépalos, golpeándolos con las paredes interiores del vaso que va colgado al cuello. En ambos casos, quedaba el cono pistilar en la ramilla y los estambres recolectados se observan en la flor ligeramente separados entre sí e iniciando su maduración que corresponde al cambio de color de blanco a café rojizo.

En Chile se ocupan diferentes alternativas como: uso de un harnero portátil, que consiste en un envase plástico que en su interior lleva una bolsa de malla mosquitera. Cada operario lo lleva colgado al cuello. La ventaja que presenta es que el espacio de aire entre el recipiente y la malla impide la fermentación de los estambres por el aumento de la temperatura. Cada vez que la malla se llena con flores, éstas se agitan de manera que caigan los estambres al fondo del recipiente, luego se eliminan los restos de estambres.

#### ***Recolección de estambres a partir de flores en estado hembra***

Las flores se recolectan generalmente entre las 13 y 18 horas, con estambres que se encuentran fusionados entre sí y de color blanco. En forma práctica se complementa la recolección de flores en estado macho con el uso de un mesón, que consiste en una mesa de 1 x 2 metros aproximadamente con plástico negro o verde en su fondo y un harnero de

malla mosquitera que calza sobre el mesón. Las consideraciones acerca del uso del mesón, son las siguientes:

Es variable la cantidad de flores que pasa al estado macho. Por esta razón los operarios que realizan esta labor deben cortar aquellas flores hembras de mayor tamaño, que tengan una alta probabilidad de abrir el mismo día que fueron depositadas sobre el mesón.

Luego, si quedan flores en estado hembra se acostumbra a dejar un grupo de operarios que retiren en forma manual los estambres desde las flores. En aquellos huertos en que se dispone de la máquina mecánica para la obtención de estambres las flores se destinan a ésta.

Los operarios que realizan el corte de flores hembra para el mesón o para la máquina de obtención de estambres, deben cortar una cantidad controlada de flores. Esto significa que en los árboles deben elegir aquellas flores de mayor tamaño y dejar una cantidad para polinizar al día siguiente (por ejemplo dejar 1 o 2 flores por ramilla).

A menudo, es posible que exista un incremento de temperatura, por lo que las flores se tornan de color café y se pierde la viabilidad del polen. Esto ocurre cuando se depositan demasiadas capas de flores, lo ideal es dejar una capa.

En aquellos huertos que no cuentan con la máquina trilladora de flores y tampoco es posible tener un mesón recolector, se utiliza sólo el harnero portátil. Para esto los operarios cortan la flor hembra y en forma manual obtienen el estambre desde las flores en el mismo huerto. Los estambres caen al fondo del envase donde permanecen aireados.

Independiente del sistema de recolección de estambres es conveniente registrar diariamente la cantidad colectada por persona, o bien la cantidad total colectada y disponible para ocupar al día siguiente. Para medir los estambres generalmente se utiliza una probeta graduada.

### *Almacenaje de estambres*

Una vez obtenidos los estambres, es necesario almacenarlos para ocuparlos al día siguiente. Es indispensable colocarlos en una bandeja extendida con una altura no mayor a 4 mm, de manera que se eviten alzas de temperatura.



Los estambres provenientes de flores en estado macho deben ser refrigerados (7°C) cuando se ha producido la liberación del polen. Es conveniente observar con lupa y luego almacenar (Guirado, 1991).

En el caso de los estambres provenientes de flores en estado hembra deben quedar a temperatura ambiente por un tiempo mayor, en todo caso hasta que se produzca la liberación del polen. Los estambres más polen deben ser transportados en bandejas extendidas dentro de una nevera, con una temperatura ideal desde 3 hasta 7°C, para entregarlos a los operarios en la medida que lo soliciten.

### ***Polinización artificial***

Para realizar la polinización artificial en Chile se utiliza el insuflador artificial, en algunas plantaciones se emplea el pincel o bien la combinación de ambos. Al inicio de la temporada de polinización es necesario que los árboles estén claramente identificados mediante una tarjeta. Se acostumbra a indicar, número de árbol y sector. Los operarios anotan la fecha, cantidad de flores polinizadas y sus iniciales o código. La variedad generalmente está indicada por pintado del tronco (franja) con colores predeterminados.

El mayor problema en esta etapa es la identificación de la flor hembra receptiva. Se ha detectado un alto porcentaje de flores polinizadas en estados previos al estado prehembra. De ahí la importancia de controlar continuamente la flor polinizada por parte del monitor o encargado.

Las recomendaciones prácticas son las siguientes:

Al utilizar insuflador los operarios no deben levantar los pétalos de la flor, ya que de lo contrario es probable que con el tubo se dañe el cono pistilar. Se sugiere cortar todos los pétalos una vez polinizada, de este modo la flor queda marcada y es baja la probabilidad que sea cortada en la recolección de estambres desde flores hembras o machos.

Cada operario anotará la cantidad precisa de flores polinizadas en su libreta y en la tarjeta del árbol, así se facilitará llevar el control diario. Cada vez que el operario realice la polinización deberá revisar si efectivamente depositó estambres. Cada polinizador deberá agitar continuamente la mezcla de estambres más polen y dispersante del insuflador.

## Resultados y discusión

En Chile, cuando se presentan condiciones ambientales con días despejados y con diferencia de temperatura respecto a la noche (por ejemplo promedio de 23.4°C/11°C día/noche) es posible encontrar un alto porcentaje de flores en estado hembra (superior al 48% aproximadamente) durante la mañana (desde 8 am hasta 12 am). En cambio con días nublados, el inicio de este estado y la mayor cantidad de flores pasando a hembra es posible encontrarlas durante horas de la noche (desde 8 pm hasta 8 am). Sainte Marie (1987) realizó un estudio que demuestra este comportamiento.

Es importante detectar el momento en que se tiene la mayor cantidad de flores en estado hembra de una determinada variedad, ya que en terreno es posible observar una alternancia natural diariamente. Por ejemplo, un determinado día se puede polinizar manualmente la variedad Bronceada y al día siguiente la variedad Concha lisa.

Las flores del chirimoyo presentan una distribución de igual proporción entre el número de flores ubicadas sobre madera de un año y aquellas que se encuentran sobre el crecimiento de la temporada (Magdahl, 1990). La proporción puede ser alterada por una desfoliación anticipada o por podas severas.

La floración se afecta fuertemente por las altas temperaturas. Con éstas, superiores hasta 28°C existe una menor producción de flores acompañado por un mayor crecimiento vegetativo, causando además una deshidratación de las flores presentes. También la humedad relativa es importante durante la floración, para lograr buena cuaja debe ser desde 70 hasta 80%, aproximadamente.

En la provincia de Quillota (32°, 52' de latitud sur), el periodo de floración comienza en Diciembre, sin embargo algunos huertos ubicados en cerros pueden iniciarla a fines de Noviembre. Aquellos árboles jóvenes florecen tempranamente.

Según Farré *et al.* (2003) el polen proveniente de flores macho tuvo un mejor comportamiento cuando se mantuvo refrigerado a 3-7°C que cuando se conservó a temperatura ambiente; aplicado en cualquier momento de los dos días del ciclo de apertura floral. En cambio el polen

proveniente de flores hembra almacenado a temperatura ambiente y aplicado a la mañana siguiente (16 horas después) dio un excelente resultado.

## Conclusión

El conocimiento de los estados fenológicos de la flor y el comportamiento floral son claves en el éxito de la polinización manual del chirimoyo. La planificación de la polinización manual en chirimoyos permite estimar el rendimiento de una determinada superficie comercial en chirimoyos en Chile.

## Agradecimientos

A todos aquellos trabajadores, que con gran dedicación polinizan diariamente en los campos de anonáceas de Chile y en otros países del mundo. A los investigadores de diferentes centros de estudio, que logran resultados extraordinarios que permiten entender la fisiología de este cultivo.

## Referencias

- Farré, J., Hermoso, J., Guirado, E. y Pérez, M. 2003. Introducción al cultivo del chirimoyo. Finca Experimental La Nacla. Portal Besana, España. Pp. 17- 19.
- Guirado, E. 1991. Polinización artificial del chirimoyo. Gabinete Técnico Caja Rural de Granada. España. 15 pp.
- Magdahl, C. 1990. Efecto de la defoliación anticipada sobre la brotación, floración y desarrollo de los frutos de chirimoyo *Annona cherimola* Mill cv Concha lisa y efectividad de algunos productos como defoliantes. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. Chile. 99 pp.
- Sainte Marie, M. 1987. Efecto del polen y diferentes sistemas de polinización sobre la cuaja, simetría y peso en tres cultivares de chirimoyo. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. Chile.



# Acetogeninas de anonáceas estimulantes de la producción de autoinductores y biofilms de bacterias degradadoras de HAPs

Parellada, Eduardo Alberto<sup>3</sup>, Ramos, Alberto<sup>3</sup>  
Valdez, Juan Carlos<sup>2</sup>, Cartagena, Elena<sup>1</sup>  
Bardón, Alicia<sup>1,3</sup>, Neske, Adriana<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Química Orgánica, Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia  
Universidad Nacional de Tucumán

Ayacucho 471, Tucumán (4000), Argentina. aneske@fbqf.unt.edu.ar

<sup>2</sup>Instituto de Microbiología, Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia  
Universidad Nacional de Tucumán, Ayacucho 471, Tucumán (4000), Argentina.

<sup>3</sup>INQUINOA-CONICET. Ayacucho 471. Tucumán (4000). Argentina.

## Resumen

Las acetogeninas de anonáceas (ACG) aisladas de plantas de la familia Annonaceae estimulan la formación de biofilms bacterianos de cepas degradadoras de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) (Riva Mercadal, en prensa). Esta estrategia adaptativa representa una alternativa eficiente y segura para la biorremediación. La for-

mación de biofilms se regula a través de un mecanismo llamado quórum sensing, regulado por genes específicos en respuesta a la densidad celular. La expresión de genes se alcanza por la producción, liberación y detección de moléculas señales llamadas autoinductores (AI). El objetivo de este trabajo es evaluar el efecto de las ACG en la producción de AI y biofilms de una cepa degradadora de naftaleno, *Pseudomonas plecoglossicida*. La cuantificación de los AI se realizó midiendo la actividad de la enzima  $\beta$ -galactosidasa de una cepa reportera (Miller, 1992). Se empleó un cultivo de *P. plecoglossicida* en LB y sobrenadantes de cultivos de 22 h, los que estuvieron expuestos a diferentes factores de estrés (ACG, NaCl 5% y pH 5), que se compararon con un sobrenadante no estresado.

La scuamocina a 2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  estimuló la producción de AI (33.9%) de *P. plecoglossicida*, mientras laherradurinaa mostró un efecto similar a dosis mayores (50, 100 y 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). La cepa reportera no produjo unidades de  $\beta$ -galactosidasa con diferencias significativas al nivel basal en presencia de las ACG, no son agonistas de los AI.

La scuamocina a 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  produjo la mayor estimulación de la producción de biofilms de *P. plecoglossicida* (120%) comparativamente con laherradurina que mostró un efecto menor a la misma dosis (98%). Resultados similares se observaron bajo la influencia de NaCl 5% (116%) y pH 5 (110%). Las ACG aumentaron el crecimiento celular en todas las concentraciones del experimento a diferencia de los otros factores de estrés.

Las ACG interfieren positivamente en el mecanismo de quórum sensing, incrementando la producción de AI y la comunicación celular en *P. Plecoglossicida*, lo que se traduce en un notable incremento en la producción de biofilms sin inhibir el crecimiento celular. Estos resultados serían promisorios para biorremediación mediada por biofilms.

Palabras clave: acetogeninas anonáceas, bacterias degradadoras de HAPs, biofilms

## Introducción

Nuestra investigación está orientada a la búsqueda de productos naturales de importancia biotecnológica y sus aplicaciones útiles en la

remediación de sitios contaminados con hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs). Debido a sus propiedades carcinogénicas, mutagénicas y a su toxicidad, varios HAPs son considerados contaminantes prioritarios para su remediación por la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA) y la Agencia Europea de Medio Ambiente. Estudios previos en nuestro laboratorio demostraron que las acetogeninas de anonáceas (ACG) aisladas de plantas de la familia Annonaceae estimulan la formación del biofilm bacteriano de distintas cepas degradadoras de HAPs que poseen la capacidad natural de producirlo (Cartagena *et al.*, 2007; Ferrero *et al.*, 2006). Esta estrategia adaptativa representa una alternativa eficiente y segura para la biorremediación (Singh y Jain, 2006). La formación de biofilms se regula a través de un mecanismo llamado quórum sensing, que involucra la expresión de genes específicos en respuesta a la densidad celular. Dicha expresión se alcanza por la producción, liberación y detección de pequeñas moléculas señales llamadas autoinductores (AI) (González y Keshavan, 2006). El objetivo de este trabajo es evaluar el efecto de las ACG scuamocina y laherradurina (figura 1) en la producción de AI de una cepa degradadora de naftaleno (*Pseudomonas plecoglossicida*) así como también, cuantificar la producción de biofilms estimulada por los sobrenadantes y el crecimiento celular bajo la acción de diferentes factores de estrés.

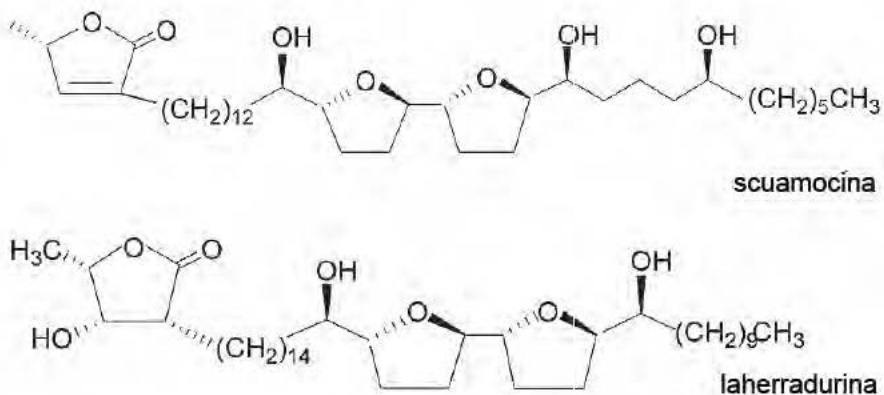


Figura 1. Estructuras de las ACG empleadas en el experimento



## Método

La cuantificación de los AI (Miller, 1992), se realizó midiendo la actividad de la enzima  $\beta$ -galactosidasa de una cepa reportera (*P. aeruginosa* mutada). El ensayo se realizó con las ACG solas y con sobrenadantes de cultivos de 22 h, los que estuvieron expuestos a los siguientes factores de estrés: ACG (2.5, 25, 50, 100 y 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), naftaleno (2.5, 25, 50 y 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), y octanol (2.5, 25, 50 y 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) en solución etanólica, NaCl 5% y pH (5 y 8) en solución acuosa y EtOH (2%). Se empleó como control un sobrenadante de la cepa *P. plecoglossicida*. Simultáneamente, se cuantificó la producción de biofilms (O'Toole y Kolter, 1998) y el crecimiento celular (DO 600 nm).

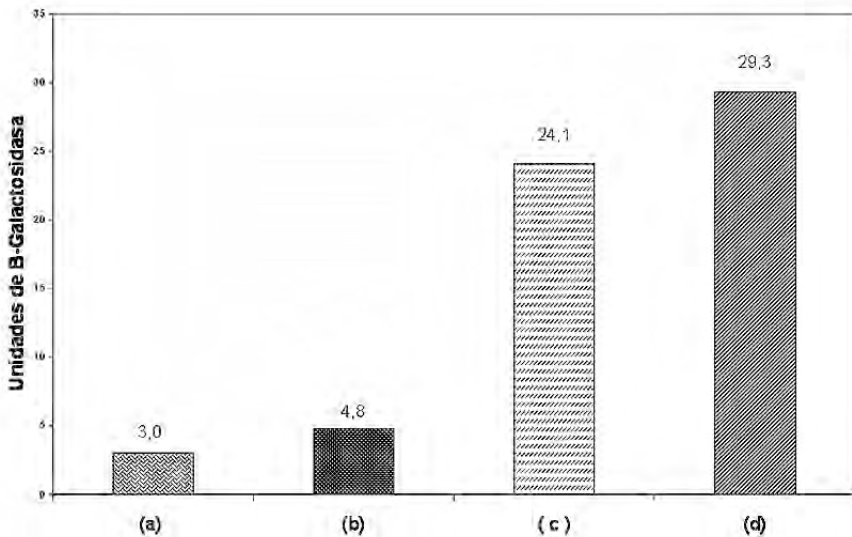
### *Cuantificación de AI bacterianos*

Se inoculan a 10 mL de medio LB un cultivo overnight de *P. plecoglossicida*, los que fueron sometidos a distintos factores de estrés. Transcurridas 22 h de incubación a 30°C, se centrifuga a 8000 rpm durante 15 min, a 25°C. Se esteriliza el sobrenadante por filtros esterilizantes de 0.22  $\mu$ . Se mezcla en partes iguales un cultivo overnight de la cepa reportera con los distintos sobrenadantes y se incuba durante 1 h hasta 37°C para que la cepa reportera reconozca los AI de cada sobrenadante y produzca  $\beta$ -galactosidasa. A continuación, se agregan 0.5 mL de una mezcla de  $\beta$ -mercaptoetanol con buffer Z, 0.1 mL de cloroformo y 0.05 mL de SDS 0.1%. Se agita por un tiempo breve y se procede a una segunda incubación durante 5 min hasta 28°C. Se añade el sustrato de la enzima a cada uno de los tubos. Se homogenizan ligeramente con un agitador y se incuban a 37°C en total oscuridad hasta la aparición del color amarillo. Se registran medidas de absorbancia a 420, 550 y 600 nm y se calculan las unidades de  $\beta$ -galactosidasa con la siguiente fórmula:  $(\text{Unid } \beta\text{-gal}-1000 (\text{DO}420-1.75\text{DO}550))/T \text{ V DO}600$ , donde T= tiempo de incubación durante el cual la enzima formada está consumiendo el ONPG, V= volumen de cultivo de la cepa reportera en mL. Cuanto mayor es la cantidad de AI en el sobrenadante mayor es la actividad de la enzima.

Simultáneamente, se determinaron las unidades de  $\beta$ -galactosidasa de la cepa reportera en presencia de la ACG en solución acuosa de DMSO (< del 3%).

## Resultados y discusión

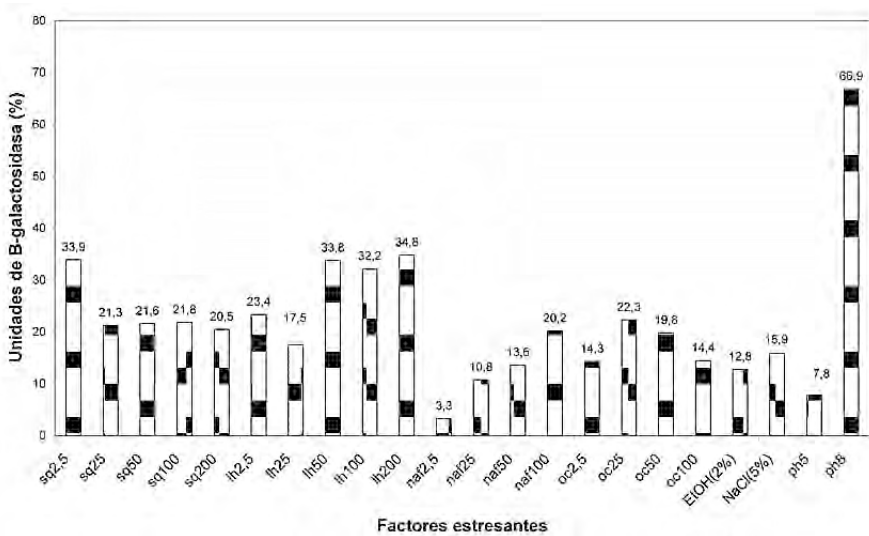
La cepa reportera no produce unidades de  $\beta$ -galactosidasa con diferencias significativas al nivel basal en presencia de scuamocina, por lo que la ACG no se comportaría como agonista de los AI, ya que la cepa reportera no la reconoce como AI (gráfica 1).



Gráfica 1. Unidades de  $\beta$ -galactosidasa de la cepa reportera. (a) Producción basal, (b) Con scuamocina (100  $\mu$ g/mL), (c) Con sobrenadante de *P. plecoglossida*, (d) Con sobrenadante de *P. plecoglossida* y scuamocina (100  $\mu$ g/mL)

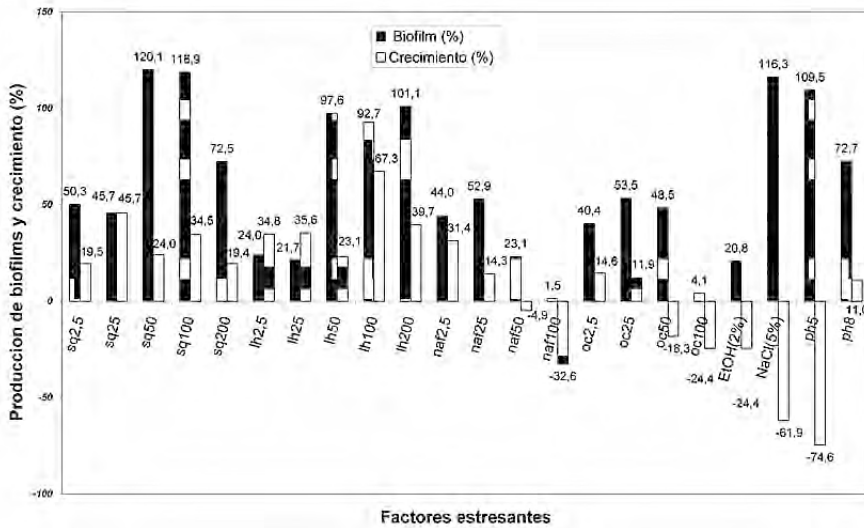
La scuamocina a 2.5  $\mu$ g/mL presenta estimulación de la producción de AI (33.9%) de *P. plecoglossida*, mientras la herradurina muestra un efecto similar a concentraciones mayores (50, 100 y 200  $\mu$ g/mL), comparado con el sobrenadante de un cultivo normal en LB (control). Es

relevante el efecto producido por el pH 8 (66.9%), (gráfica 2). El incremento de AI indicaría el efecto estresante producido por las ACG a *P. plecoglossida*.



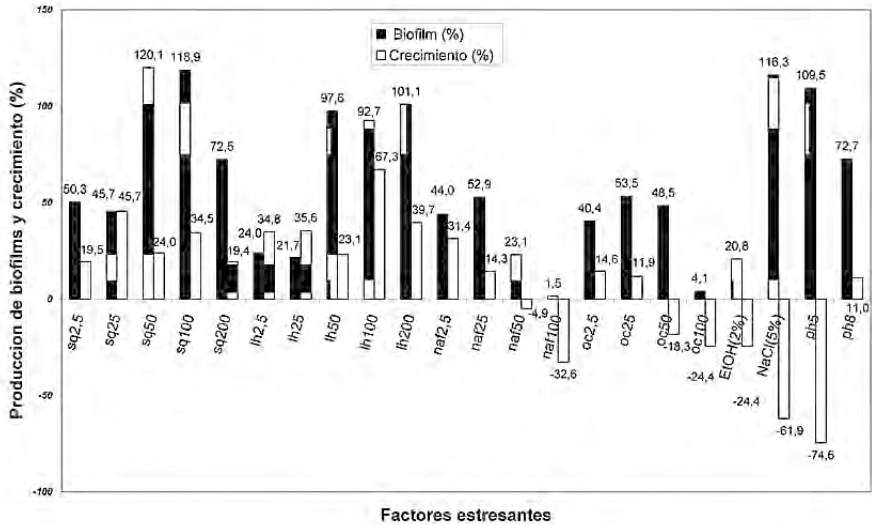
Gráfica 2. Cuantificación de AI de *P. plecoglossida* bajo la influencia de diferentes factores de estrés

La scuamocina a 50 µg/mL, presenta la mayor estimulación de la producción de biofilms de *P. plecoglossida* (120%), mientras la herra-durina muestra menor efecto a la misma concentración (98%). Efectos similares se observan bajo la influencia de una solución de NaCl 5% (116%) y pH 5 (109.5%) como se muestra en la gráfica 3.



Gráfica 3. Cuantificación de biofilms y crecimiento celular de *P. plecoglossicida* bajo la influencia de diferentes factores de estrés

Por otra parte, las ACG aumentan el crecimiento celular en todas las concentraciones del experimento a diferencia de los otros factores de estrés (gráfica 4).



Gráfica 4. Cuantificación de biofilms y crecimiento celular de *P. plecoglossicida* bajo la influencia de diferentes factores de estrés

El incremento de la producción de biofilms se correlaciona con el crecimiento celular para el caso de las ACG, sin guardar una relación directa entre ambos incrementos, a diferencia de lo que se observa bajo la influencia de los otros factores de estrés, que inhiben el crecimiento celular, lo que dificultaría la remediación mediada por *P. plecoglossicida* (gráfica 3).

Es importante destacar que el agregado de un sobrenadante de la misma cepa a un cultivo de *P. plecoglossicida* produjo estimulación de la producción de biofilms en un 69%, lo que indicaría que la producción de biofilms está regulada a través de AI del tipo *N*-acil-homoserin lactonas (acilo: 4 y 12 C) ya que son reconocidos por la cepa reportera (figura 2).

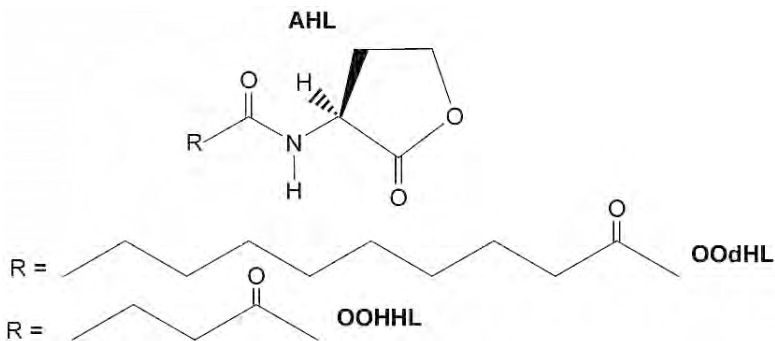


Figura 2. Estructura general de un AI bacteriano aislado de *P. aeruginosa*

## Conclusiones

Las ACG interfieren positivamente en el mecanismo de quórum sensing, incrementando la producción de AI y la comunicación celular en la cepa *P. plecoglossicida*. No son reconocidas como AI por la cepa reportera por lo que no son agonistas. El mecanismo de quórum sensing de la cepa *P. plecoglossicida* está mediado por AI del tipo de las *N*-acil homoserina lactonas de cadena de 4 y 12 carbonos, que fueron reconocidos por la cepa mutante y son en parte responsables de la producción de biofilms.

Estos resultados constituyen un valioso aporte al conocimiento de la cepa *P. plecoglossicida* en la remediación mediada por biofilms de medios contaminados con HAPs. Scuamocina y laherradurina, estimulantes naturales de la producción de biofilms de *P. plecoglossicida*, podrían considerarse promisorios en la biorremediación ambientalmente más segura.

## Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) y el Consejo de Investigaciones de la Universidad Nacional de Tucumán (CIUNT).



## Referencias

- Cartagena, E., Álvarez Colom, O., Neske, A., Valdez, J.C. and Bardón, A. 2007. Effects of plant lactones on the production of biofilm of *Pseudomonas aeruginosa*. *Chem & Pharm Bull.* 55: 22-25.
- Ferrero, M., Riva Mercadal, J.P., Rodríguez, A., Cartagena, E., Bardón, A. and Neske, A. Effect of plant metabolite, scumocina, on the biofilm formation in naphthalene-degrading bacteria. Enviado a *J. of Biotech.*
- González, J. and Keshavan, N. 2006. Messing with bacterial quórum sensing. *Microbiol & Mol Biol Rev.* 70: 859-875.
- Miller, J.A. 1992. A short course in bacterial genetics. A laboratory normal and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria. Cold Spring Harbor. NY. USA. pp. 71-74.
- Riva Mercadal, J.P., Rodríguez, A., Cartagena, E., Bardón, A., Ferrero, M. and Neske, A. Effect of annonaceous acetogenin, scumocina, on the biofilm formation in naphthalene-degrading bacteria. Enviado a *J. of Biotech.*
- Singh, R., Paul, D. and Jain, R. 2006. Biofilms: implications in bioremediation. *Trends in Microbiol.* 14: 389-397.





# Modificación del entorno de los grupos funcionales de membranas lipídicas artificiales por interacción con acetogeninas de anonáceas

Di Toto Blessing, Lilian<sup>3</sup>, Álvarez Colom, Olga<sup>1</sup>, Díaz, Sonia<sup>2</sup>, Ben Altabef, Aída<sup>2,3</sup>, Bardón, Alicia<sup>1,3</sup>, Neske, Adriana<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Química Orgánica, aneske@fbqf.unt.edu.ar

<sup>2</sup>Instituto de Química Física, Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia. Universidad Nacional de Tucumán, Ayacucho 471, Tucumán (4000), Argentina.

<sup>3</sup>INQUINOA-CONICET. Ayacucho 471. Tucumán (4000), Argentina.

## Resumen

Las acetogeninas de anonáceas (ACG) son productos naturales aislados sólo de la familia Annonaceae y presentan variada actividad biológica (Tormo *et al.*, 2001). Los sistemas biológicos están compartimentalizados por membranas cuya estructura principal, la bicapa lipídica, se estabiliza por hidratación de los fosfolípidos. En consecuencia, todo proceso que involucre cambios en el contenido de agua afecta la estabilidad y las propiedades de la membrana pudiendo producir serios daños en la célula y su muerte. Nos proponemos estu-

diar las interacciones de las ACG bis-THF, laherradurina y scuamocina con membranas artificiales de POPC (palmitoiloleoilfosfatidilcolina) empleando FTIR (Hübner y Blume, 1998) y realizar un estudio estructura-actividad con las ACG, rolliniastatina-1, asimicina, annonacina y *cis*-annonacina-10-one, estudiadas previamente.

La laherradurina y la scuamocina, en todas las relaciones molares incluidas en POPC, presentan pequeños cambios negativos en los números de onda del grupo fosfato de la membrana lipídica con respecto al lípido puro. Este resultado indicaría que las ACG producen desplazamiento de moléculas de agua y posterior formación de uniones de H (débil) con el grupo fosfato. Mientras que las ACG bis-THF, rolliniastatina-1 y asimicina que tienen posibilidades de formar puente de H intramolecular entre el carbonilo de la  $\gamma$ -lactona y el OH en posición 4, producen significativos cambios positivos en los números de onda del grupo fosfato, lo que produciría desplazamiento de las moléculas de agua. En cuanto a las mono-THF, annonacina y *cis*-annonacina-10-one, la presencia de un grupo OH o carbonilo en posición 10, sería el responsable de una fuerte unión de H con los grupos fosfato y carbonilos previo desplazamiento de moléculas de agua en la interfase lipídica. Por otra parte, el entorno de los grupos carbonilo (poblaciones P1 y P2) no presenta diferencias significativas con el lípido puro en las ACG bis-THF.

Las alteraciones que las ACG provocan en los principales grupos de hidratación de las membranas lipídicas artificiales permitirían conocer los aspectos estructurales influyentes de su actividad biológica y como consecuencia diseñar derivados sintéticos más activos.

Palabras clave: *acetogeninas de anonáceas, membranas lipídicas artificiales, FTIR*

## Introducción

Las acetogeninas de anonáceas (ACG) son productos naturales aislados sólo de la familia Annonaceae, que presentan una variada actividad biológica (Álvarez Colom *et al.*, 2007; Tormo *et al.*, 2001). Los sistemas biológicos están compartimentalizados por membranas cuya estructura principal, la bicapa lipídica, se estabiliza por hidratación de los fos-

folípidos. Los lípidos son moléculas anfifílicas que se estabilizan en una bicapa cuando son dispersadas en agua por arriba de la temperatura de transición como consecuencia de su hidratación. El agua que hidrata los lípidos, se organiza alrededor de los grupos “cabeza-polares”, en la interfase de la membrana. Se ha establecido que el agua de organización determina importantes propiedades de membrana tal como el volumen excluido, las fuerzas de hidratación y el potencial bipolar (Disalvo *et al.*, 1983; Rand *et al.*, 1989).

Recientemente se reportó que los anillos de tetrahidrofurano (THF) de una serie de ACG tipo asimicina residen cerca de la cabeza polar, en la región interfacial de membranas de DMPC (dimiristoilfosfatidilcolina). Estos resultados provenientes de estudios de RMN llevaron a la conclusión que las ACG que contienen anillos de THF, ya sean mono o bis, adyacentes o no, juegan un rol de ancla hidrofílica en las membranas lipídicas. Esto fue corroborado por espectroscopía bidimensional protónica (NOE) y estudios de calorimetría diferencial de barrido (Barrachina *et al.*, 2007; Shimada *et al.*, 1998).

En consecuencia, todo proceso que involucre cambios en el contenido de agua afecta la estabilidad y las propiedades de la membrana pudiendo producir serios daños en la célula y su muerte. La interacción de las ACG con las membranas celulares, podría alterar la estabilidad de las mismas, la capacidad de las ACG de difundir en ellas y se podría conocer los sitios de anclaje de las mismas en los grupos funcionales de las membranas (Díaz *et al.*, 1999; Hübner *et al.*, 1998). Nuestra estrategia para el estudio de estas interacciones es el estudio por FTIR (Lewis *et al.*, 1998) de la mezcla en diferentes relaciones molares de membranas artificiales de POPC (palmitoiloleoilfosfatidilcolina) y ACG fuertemente citotóxicas, laherradurina y scuamocina y realizar un estudio estructura-actividad con las ACG, rolliniastatina-1, asimicina, annonacina y cis-annonacina-10-one, estudiadas previamente.

Las alteraciones que las ACG provoquen en los principales grupos de hidratación de las membranas lipídicas artificiales permitirán relacionar la toxicidad con el conocimiento de los aspectos estructurales influyentes en la actividad y de esa manera diseñar derivados sintéticos más activos.

## Método

**Preparación de liposomas.** Las vesículas multilamelares (MLV's) de POPC se preparan siguiendo el método de Bangham. Las soluciones clorofórmicas del fosfolípido son secadas bajo corriente de nitrógeno hasta obtener un film homogéneo adherido a las paredes del tubo.

La hidratación del film lipídico seco se logra incubándolo en D<sub>2</sub>O o buffer Tris, pH=7.4, a una temperatura 10°C superior a la de transición de fase del lípido. La dispersión mecánica del film lipídico hidratado se realiza con agitación vigorosa, obteniéndose una suspensión opalescente de vesículas multilamelares (MLV) cuyo tamaño varía entre 5 y 50 µm de diámetro.

Las suspensiones de vesículas multilamelares del lípido y ACG se preparan disolviendo ambos en CHCl<sub>3</sub>, se mezclan las soluciones y se evapora a sequedad el solvente. Se resuspende el film lipídico en D<sub>2</sub>O. La concentración final de las vesículas MLV's es de 0.5 mg/mL. Para llevar a cabo las medidas de FTIR se cuenta con un espectrofotómetro Perkin Elmer GX 1. El análisis espectral se realizó mediante el programa matemático GRAMS, para la sustracción de bandas de agua, aplicándose el algoritmo de deconvolución para definir los contornos de bandas superpuestas.

## Resultados y discusión

Las ACG bis-THF, laherradurina y scuamocina, incluidas en diferentes relaciones molares en membranas lipídicas artificiales, presentan pequeños cambios negativos en los números de onda de las frecuencias del grupo fosfato de la membrana lipídica con respecto al lípido puro. Esto indicaría que además de desalojar agua, existe una débil formación de uniones de H con los fosfatos, las que se justifican por la disponibilidad del C=O de la γ-lactona, que a diferencia de las ACG rolliniastatina-1 y asimicina no forman puente intramolecular. El entorno de los grupos carbonilo (poblaciones P1 y P2), no presenta diferencias significativas con el lípido puro.

Las ACG bis-THF, rolliniastatina-1 y asimicina, incluidas en diferentes relaciones molares en membranas lipídicas artificiales, produ-

cen significativos cambios positivos en los números de onda de las frecuencias del grupo fosfato de la membrana con respecto al lípido puro. Esto ocurre cuando se altera la primera capa de hidratación del grupo fosfato, lo que indicaría que las ACG estarían reemplazando el agua de hidratación del entorno de los mismos. En cambio el entorno de los grupos carbonilos (poblaciones P1 y P2) no presenta diferencias significativas con el lípido puro. Por otra parte el grupo carbonilo de la  $\gamma$ -lactona formaría puente intramolecular con el OH en posición 4 anulándose el efecto de ambos en forma aislada.

Las ACG mono-THF, annonacina y cis-annonacina-10-one, incluidas en diferentes relaciones molares en membranas lipídicas artificiales, presentan significativos cambios negativos en los números de onda de las frecuencias del grupo fosfato y carbonilos de la membrana lipídica con respecto al lípido puro, indicando el desalojo de moléculas de agua en los alrededores de la cabeza polar del mismo. La diferencia estructural con rolliniastatina-1 y asimicina es el grupo carbonilo y OH en posición 10, respectivamente. Esta diferencia estructural sería la responsable de una fuerte unión de H con el grupo fosfato previo desalojo de moléculas de agua de la interfase lipídica.

## Conclusión

Las ACG mono-THF interactúan tanto con el grupo fosfato como con los grupos carbonilos del fosfolípido, desalojando moléculas de agua del entorno y formando fuertes uniones de H con el grupo fosfato. Las ACG bis-THF interactúan en forma directa con el grupo fosfato produciendo desplazamiento de moléculas de agua, mientras que no se observan interacciones significativas con los grupos carbonilos.

## Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) y el Consejo de Investigaciones de la Universidad Nacional de Tucumán (CIUNT).



## Referencias

- Álvarez Colom, O., Neske, A., Popich, S. and Bardón, A. 2007. Toxic effects of annonaceous acetogenins from *Annona cherimolia* (Magnoliales: Annonaceae) on *Spodoptera frugiperda*. *J Pest Sci.* 80: 63-67.
- Barrachina, I., Royo, I., Baldoni, H., Chahaboune, N., Suvire, F., De Pedro, N., Zafra-Polo, M.C., Bermejo, A., El Aouad, N., Cabedo, N., Saez, J., Tormo, J.R., Enriz, R.D. and Cortes, D. 2007. New anti-tumoral acetogenin guanacone type derivatives: isolation and bioactivity. Molecular dynamics simulation of diacetyl-guanacone. *Bioorg Med Chem.* 15: 4369-4381.
- Díaz, S.B., Amalfa, F., Biondi de López, A.C. and Disalvo, E.A. 1999. Effect of water polarized at the carbonyl groups of phosphatidylcholines on the dipole potential of lipid bilayers. *Langmuir.* 15: 5179-5182.
- Disalvo, E.A. and De Gier, J. 1983. Contribution of aqueous interphases to the permeability barrier of lipid bilayers for non electrolytes. *Chem Phys Lipids.* 32: 39.
- Hübner, W. and Blume, A. 1998. Interactions at the lipid-water interface. *Chem phys lipids.* 96: 99-123.
- Lewis, R.N. and Mc Elhaney, R.N. 1998. The structure and organization of phospholipid bilayers as revealed by infrared spectroscopic. *Chem Phys Lipids.* 96: 9-21.



- Rand, R.P. and Parsegian, V.A. 1989. Hidration forces between phospholipid bilayers. *Biochem Biophys Acta*. 988: 351-376.
- Shimada, H., Grutzner, J.B., Kozlowski, J.F. and McLaughlin, J.L. 1998. Membrane conformations and their relation to cytotoxicity of asimicin and its analogues. *Biochem*. 37: 854-866.
- Tormo, J.R., Estornell, E., Gallardo, T., González, M.C., Cavé, A., Grannell, S., Cortes, D. and Zafra-Polo, M.C. 2001.  $\gamma$ -Lactone-functionalized antitumoral acetogenins are the most potent inhibitors of mitochondrial Complex I. *Bioorg Med Chem Lett*. 11: 681-684.

# Identificación del hongo agente causal de la necrosis foliar en chirimoyo (*Annona cherimola* Mill.) a través de técnicas moleculares

Vidal Martínez, Nayelli Ayatzol<sup>1</sup>, Noa Carrazana, Juan Carlos<sup>2</sup>  
Chiquito Contreras, Roberto G.<sup>1</sup>, Castillo Rocha, Doris G.<sup>1</sup>  
Ruiz Bello, Romeo<sup>1</sup>, Vidal Hernández, Librado<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Ciencias Agrícolas, Campus Xalapa, Universidad Veracruzana.

<sup>2</sup>Instituto de Biotecnología y Ecología Aplicada. UV. Email: angelitonv@gmail.com

## Resumen

En los últimos años el cultivo del chirimoyo en México ha adquirido importancia en los estados de centro del país. En México existen pocos estudios de diagnósticos fitosanitarios en el chirimoyo, siendo las plagas y enfermedades las principales barreras para la obtención de fruta de buena calidad. El objetivo principal fue identificar el agente causal que afecta a este frutal, así como describir las características moleculares del hongo. Las muestras fueron sembradas en placas de medio PDA. Los micelios crecidos fueron purificadas en 3 cepas H1, H2 y H3, posteriormente se evaluó en diferentes medios: PDA, V8, Agar maíz (A-M) y Agar bacteriológico. La prueba de patogenicidad

dad fue a través de cámaras húmedas y en un medio PDA. La extracción de ADN se realizó mediante la técnica de Diez *et al.* (1999 modificado). Las muestras purificadas de PCR fueron secuenciadas en el Instituto de Biotecnología de la UNAM. El mejor crecimiento de micelio se logró en los medios PDA, A-M y V8, a partir del tercer, cuarto y quinto día de incubación, observándose un micelio más desarrollado en medio PDA. Se logró amplificar la región ITS, el producto amplificado fue de  $\approx 600$  pb, ésta arrojó un porcentaje de identidad para la muestra H2 de un 98% - 97% , el hongo reportado como *Phomosis* sp y para la muestra H3 un porcentaje de identidad de un 98% - 97% el hongo reportado como *Sordaria* sp.

Palabras claves: *antracnosis, técnicas moleculares, cepa*

## Introducción

La familia de las Annonaceae está representada por cerca de 75 géneros y más de 600 especies. El género *Annona*, con aproximadamente 120 especies, es el más cultivado. La especie de *Annona cherimola* Mill., es actualmente la más importante comercialmente en el mundo, seguida del guanábano (*Annona muricata* L.); (*Annona squamosa* L.) y el híbrido de *A. cherimola* x *A. squamosa* (Kavati, 1992; Paiva y Fioravanco, 1994 y Junqueira *et al.*, 1996). De acuerdo con Rebollar (1995) y Rebollar *et al.* (1997), el cultivo de estas especies de anonáceas tiene grandes perspectivas en México y pueden emplearse como cultivos alternativos en algunos estados, ya que poseen un excelente sabor al paladar, además de que han tenido gran aceptación y demanda en algunos mercados internacionales como Japón y Estados Unidos. Sin embargo, la importancia económica de las especies de la familia Annonaceae es diversa y no se restringe a las especies comestibles, pues además incluye especies con propiedades medicinales, propiedades tóxicas a peces y propiedades insecticidas (Much, 1988 citado por Rodríguez y Nieto, 1997). A pesar de las importantes características antes mencionadas, en general el cultivo de las anonáceas no se ha formalizado agronómica y económicamente en México, quizá debido en parte, a lo percedero de sus frutos

(consistencia suave, textura fina) y por lo mismo a las dificultades para su transporte y mantenimiento en los mercados (Rodríguez, 1999). Por otro lado, también existe una falta de información en cuanto a estudios poblacionales y de comunidad que permitan establecer algunas características como son la fenología, la variabilidad genética, susceptibilidad y/o resistencia a diversos factores ambientales, incluyendo el efecto ocasionado por diversas plagas y enfermedades, los cuales ayudarían a definir y caracterizar poblaciones y especies en los diversos estados de la República Mexicana en donde se cultivan o crecen las especies de anonáceas.

La alta diversidad en el grupo de las especies del género del *Colletotrichum* ha sido muy problemática ya que el diagnóstico fitopatológico requiere identificar con precisión patógenos específicos para el control de enfermedades. Esta confusión taxonómica ha provocado el aumento en el uso de herramientas moleculares para la identificación de diversidad interespecífica e intraespecífica dentro de un grupo complejo de especies (Gubert *et al.*, 2003). A pesar de la importancia que tiene este frutal, en México se tienen pocos estudios de diagnóstico fitosanitario en el chirimoyo, siendo las plagas y las enfermedades las principales barreras para la obtención de fruta de buena calidad, por ello, la importancia de esta investigación es identificar el hongo que provoca la necrosis foliar en este frutal.

## Objetivo general

Determinar las especies de los agentes causales de la antracnosis foliar y su incidencia de enfermedad en árboles de *Annona cherimola* Mill.

## Hipótesis

Dadas las características de las lesiones en las hojas es posible que se trate del hongo del género *Colletotrichum* spp.

## Método

### *Ubicación de zona de muestreo*

El muestreo de las hojas enfermas se llevó a cabo en la localidad de El Fresno, municipio de Tlacolulan, Veracruz. Esta localidad se encuentra ubicada en la zona centro del estado de Veracruz, en las coordenadas geográficas 19° 37' 47.6" de Latitud Norte y 96° 58' 48.5 " Longitud Oeste, con una altitud 1740 m, temperatura media anual de 19.6°C y una precipitación pluvial media anual de 1,346.9 mm, el clima es templado, húmedo, extenso (Enciclopedia de los Municipios de México, 2005).<sup>1</sup>

### *Recolecta de muestras e Incidencia de enfermedad.*

Se realizaron muestreos de árboles de chirimoyo en los meses de noviembre y diciembre de 2008 en la zona de muestreo. Se seleccionaron 5 árboles, de éstos se recolectaron 6 hojas por árbol que presentaran incidencia de antracnosis (manchas irregulares de color café a café oscuro en el borde, base, nervaduras principales, secundarias y ápice de la hoja). Éstas se trasladaron en bolsas de plástico, al Laboratorio de Química de la Facultad de Ciencias Agrícolas Campus Xalapa. Las hojas se procesaron durante las 24 h siguientes a la colecta. De cada árbol seleccionado, se evaluó la incidencia de enfermedad, tomando como base dos puntos cardinales del árbol, Este y Oeste. Se contabilizó y se promedió la incidencia de la enfermedad de un total de 100 hojas de cada lado del árbol y con el apoyo de una escala donde A= 0%, B= 1 – 10%, C= 11 – 25%, D= 26 – 50%, E= > 51%.

---

<sup>1</sup>Tomado de la red mundial: <http://www.inafed.gob.mx/work/templates/enciclo/veracruz/municipios/30177a.htm>. Página consultada 30 de enero de 2010.

## *Caracterización e identificación de la enfermedad*

### *Aislamiento en medios de cultivo*

De las hojas recolectadas se seleccionaron 10 hojas, las más representativas, se lavaron con alcohol al 10% durante 2 minutos, posteriormente se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 5% durante 3 minutos, consecutivamente se enjugaron 3 veces con agua destilada estéril, se cortaron cuadrados de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> de cada hoja en la parte del área dañada, y se sembraron en placas de papa dextrosa agar (PDA). Las cajas se incubaron durante 73 horas a 25 ± 2°C. Posteriormente se seleccionaron las tres colonias más representativas para posteriormente ser purificadas en placas de PDA para posteriormente ser utilizados para nuevos estudios.

### *Caracterización en medios de cultivos, patogénica y molecular*

#### *Medios de cultivo*

El crecimiento radial de cada una de las cepas H1, H3 y H3 se evaluó en cuatro diferentes medios: PDA, V8, Agar maíz y Agar bacteriológico. Del cultivo PDA original, se extrajeron trozos de aproximadamente 0.5 cm<sup>2</sup> los cuales contenían el hongo problema ya purificado, estos fueron sembrados en los medios anteriormente mencionados. Posteriormente fueron incubados a temperatura de 27°C. El crecimiento se determinó midiendo el radio de desarrollo de cada cepa a intervalos de 24 horas durante 7 días y realizando 4 repeticiones por cada cepa.

Para determinar las tasas de crecimiento los datos obtenidos se registraron en una hoja de cálculo. El análisis estadístico aplicado a este trabajo fue entorno a las siguientes variables: día, tipo cepa, medio de cultivo; todos bajo un diseño experimental completamente al azar 4x4. Para conocer las diferencias estadísticas significativas se procedió a la realización de pruebas de medias de Tukey ( $P \leq 0.05$ ). Se utilizó el paquete estadístico Statistical Analytical System (SAS).

### ***Pruebas de Patogenicidad***

Esta prueba se realizó con el fin de observar la capacidad patogénica que tienen los aislamientos de la hoja del chirimoyo en generar síntomas de antracnosis sobre hojas sanas. Se evaluaron las 3 cepas problema, H1- H2- H3, inoculando 27 hojas sanas de chirimoyo, 9 para cada cepa. Las hojas fueron previamente lavadas y desinfectadas con alcohol al 10% durante 3 minutos y 5 minutos con hipoclorito de sodio al 5% finalizando con 3 enjuagues con agua destilada estéril. Después de su lavado, se les provocó una herida física, se aplicó un corte de aproximadamente 0.5 cm de medio PDA con micelio del hongo con un crecimiento de 7 días. A cada caja petri se le agregó 25 mL de agua destilada estéril, humedeciendo perfectamente el algodón y el papel filtro. Se realizaron 3 repeticiones por cada cepa, las cámaras húmedas fueron selladas con klean pack e incubadas a una temperatura de 25°C y diariamente durante 7 días se revisaron para observar el desarrollo de la enfermedad.

### ***Análisis moleculares (PCR -ITS)***

La extracción de ADN (ácido desoxiribonucleico) del micelio de las 3 cepas obtenidas H1 - H2 - H3, se realizó con la metodología de Diez *et al.* (1999 modificado). Su calidad se evaluó por electroforesis en gel de agarosa (1%) y se cuantificó en un espectrofotómetro a 260 OD (Genesys 10 uv). La amplificación de las región ITS de los genes ribosomales (rARN) 18S - 5.8S y 5.8S - 28S fueron con los iniciadores universales ITS1F (CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA) (Bruns *et al.*, 2004) e ITS4/R (TCCTCCGCTTATTGATATGC) (White *et al.*, 1990) para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés). Cada reacción tuvo por volumen final 25 µL con la siguiente formulación: agua ultrapura estéril, 16 µL; solución amortiguadora 1x 2.5 µL; MgCl<sub>2</sub> a 1.5 mM, 1.5 µL; iniciadores ITS1 e ITS4 a 0.5 pM cada uno 1.25 µL por iniciador; muestra problema de ADN a 100 ng, 1 µL; dNTPs Mix a 0.2 mM (Promega), 0.5 µL; *Taq*-ADN Polimerasa (Fermentas Life Sciences) a 1 u; 1 µL. se utilizó un termociclador (Lavet) con el siguiente programa: desnaturalización inicial a 94°C por 5 min; 30 ciclos de

desnaturalización a 94°C por 30 s; 30 ciclos de alineamiento a 55°C por 30 s; y extensión 72°C por 1 min; y una extensión final de final a 72°C durante 7 min. El producto de PCR se analizó por electroforesis en gel de agarosa (1.5%), se tiñó en una solución de bromuro de etidio y la banda se visualizó en un trasiluminador. La purificación se realizó con el Kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) según el protocolo de la Compañía.

### ***Variables de estudio***

Para este trabajo se evaluaron las siguientes variables:

En campo: incidencia de porcentaje de enfermedad en hojas de chimoya.

En Laboratorio: crecimiento radial de las cepas H1, H2 y H3 en cuatro diferentes medios (PDA, A-B, A-M y V8) y 7 días de incubación.

## **Resultados y discusión**

### ***Recolecta e Incidencia de la enfermedad***

Se recolectaron hojas con síntomas característicos de antracnosis (figura 1). Para determinar la incidencia el muestreo se realizó con base a dos puntos cardinales, esto por la influencia que la luz solar puede ejercer en el desarrollo del hongo.





Figura 1. Hoja de chirimoyo con lesiones de la enfermedad

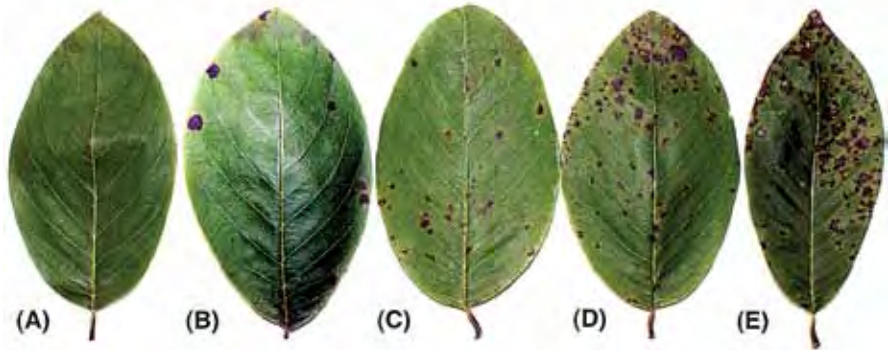


Figura 2. Incidencia de porcentaje de infección

Los resultados obtenidos se basaron en una escala que va de 0% a más de 50% (figura 2) de incidencia del hongo en la hoja donde A= 0%, B= 1 – 10%, C= 11 – 25%, D= 26 – 50%, E= > 51% (Noa, 2009, comunicación personal)<sup>2</sup>. Sin embargo Tovar *et al.* (2002) en un estudio sobre inciden-

<sup>2</sup> Noa, J.C. 2009. Instituto de Biotecnología y Ecología Aplicada. Universidad Veracruzana.

cia de enfermedad en hojas de chirimoyo emplearon la Escala Logarítmica Diagramática de Severidad para su estudio.

Se observó en la figura 3 que del lado Oeste existe una mayor incidencia de enfermedad en las hojas de chirimoyo que oscila entre el 10 y 24% (Grado B), teniendo en segundo lugar un avance de enfermedad de entre el 40 y 50% (Grado E) en un 25% del índice total. Teniendo en un porcentaje menor una incidencia de entre 11 y 25% (Grado C).

En la figura 4 se puede observar una alta presencia de hojas enfermas con una incidencia que oscila entre 10 y 24% (Grado B) seguida de un avance de más de >50% (Grado E), lo que nos da como resultado un porcentaje de aproximadamente menos de 15% de hojas sanas para este cuadrante.

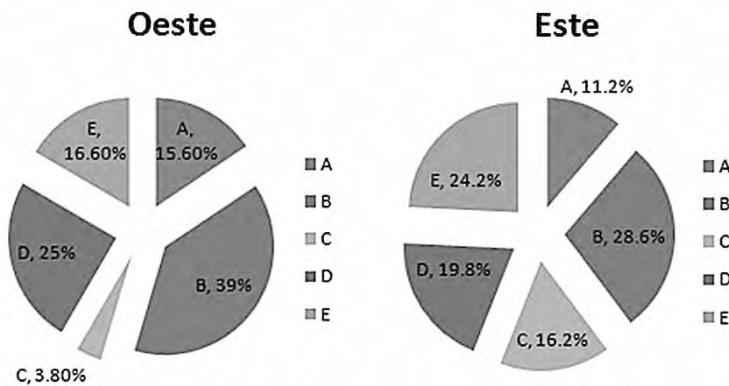


Figura 3. Porcentajes de incidencia de enfermedad en árboles de chirimoyo lado Oeste

Figura 4. Porcentajes de incidencia de enfermedad en árboles de chirimoyo lado Este

Al comparar los resultados de las medias de cada punto cardinal (figura 5) se puede observar un mayor número de hojas infectadas con clasificación con la grado B en ambos hemisferios, presentándose en mayor porcentaje el hemisferio Oeste con un aproximado de 40%. Seguido de la incidencia con la clasificación con los grados E y D. Siendo más baja la incidencia de enfermedad de la clasificación con el grado E, presentando un porcentaje más bajo en el hemisferio Oeste de menos del 10% y con un porcentaje de aproximadamente 15% para el

hemisferio Este. Sin embargo Arroyo *et al.* (2004) en un estudio sobre incidencia de enfermedades del Pejibaye (*Bactris gasipaes*) reporta como una de las enfermedades de esta especie la Mancha negra de las hojas cuyo agente causal se identificó como *Colletotrichum* sp., señalan que esta enfermedad no presenta relación clara con las variables en la precipitación, temperatura o la evaporación. Ellos reportan que los niveles máximos observados en estas variables se presentaron en el mes de octubre.

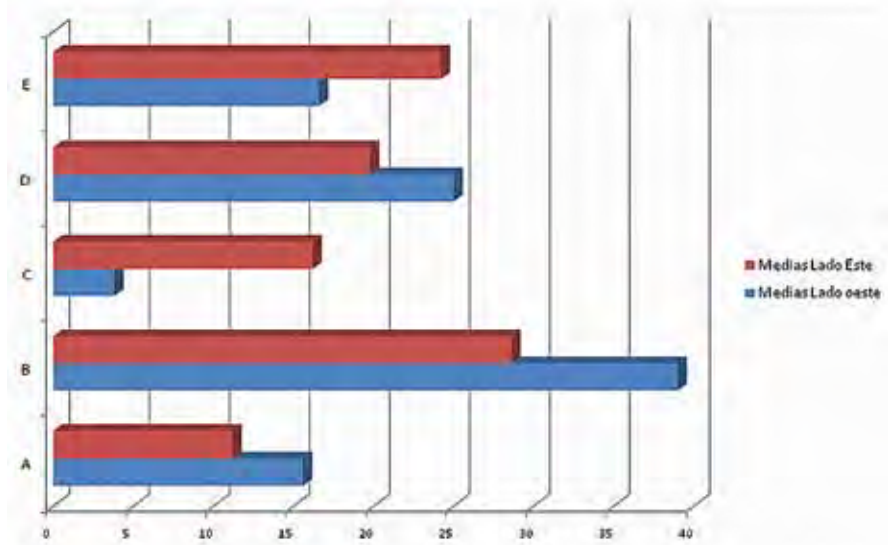


Figura 5. Comparación de medias de porcentaje infección entre lado Este y Oeste

### *Medios de cultivos*

Consecuencia de cuatro medios de cultivos en el crecimiento de micelio de las muestras H1, H2 y H3 a los 7 días de incubación (figura 9). Se observó que el crecimiento inicial del micelio estuvo influenciado por el tipo de medio utilizado. Los mejores crecimientos de micelio se logró en los medios PDA, A-M y V8, a partir del tercer, cuarto y quinto día de incubación, se observó un micelio más desarrollado en medio PDA, estos resultados concuerdan con Orozco *et al.*, 2004 quienes reportan

un crecimiento de micelio a los 3, 7 y 10 días de incubación obteniendo un micelio mejor desarrollado en medio PDA que en medio de jugo V8.

Crecimiento radial de la cepa H1 (figura 6) donde se pudo observar que en el día uno no hubo diferencias significativas en el análisis de la variable crecimiento del micelio. En el segundo y tercer día se observó que el crecimiento del micelio en el medio A-M hubo diferencia significativa en relación a los demás medios. En el cuarto día se observó una diferencia significativa para los medios A-M y V8 en comparación con el crecimiento del micelio en los medios PDA y A-B. Al analizar el crecimiento del micelio en el quinto día se observó una diferencia significativa en el medio V8 en relación a los otros medios. Para el sexto y séptimo día se observó una diferencia altamente significativa para los medios PDA, A-M y V8 en comparación con el medio A-B.

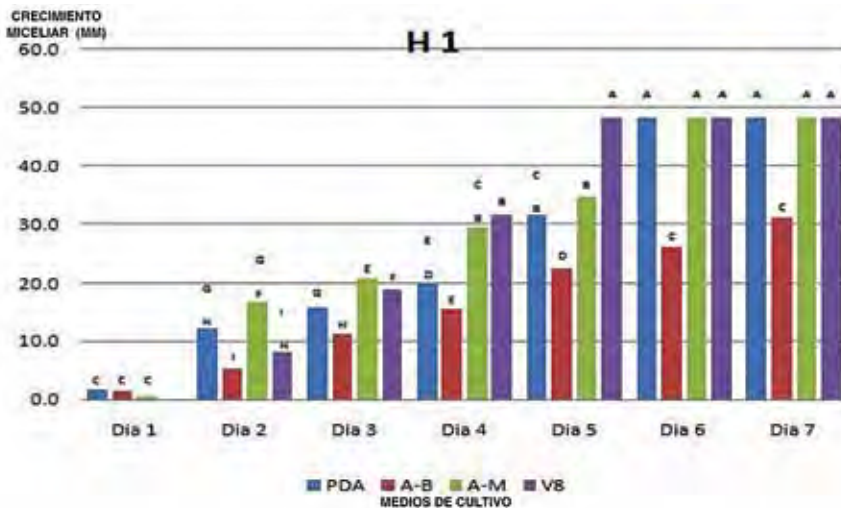


Figura 6. Comparación entre medias de crecimiento de micelio de la cepa H1 en los 4 diferentes medio de cultivo durante 7 días de incubación. Separación de medias según la prueba de Tukey ( $P \leq 0.05$ ) ( $N=14$ )

Crecimiento radial de la cepa H2 (figura 7) se pudo observar que el primer y segundo día hay una diferencia significativa en el crecimiento de micelio en el medio V8. Para el tercer día se pudo notar una diferen-

cia altamente significativa para el crecimiento de micelio en los medios de cultivo A-M y V8. En los días cuarto, quinto y sexto, se pudo observar una diferencia altamente significativa para los medios PDA, A-M y V8 en relación con el crecimiento de micelio en el medio A-B donde se visualizó que el medio no pudo completar su crecimiento total en los siete días de incubación.

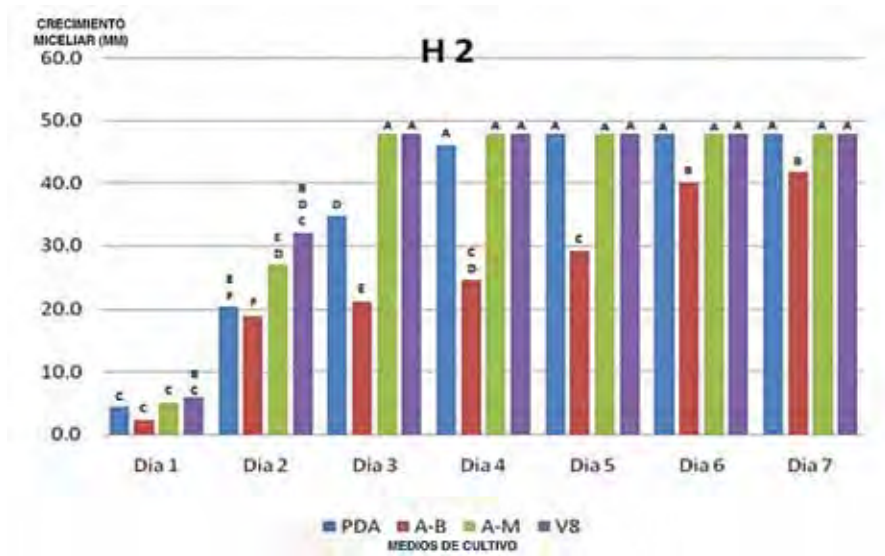


Figura 7. Comparación entre medias de crecimiento de micelio de la cepa H2 en los 4 diferentes medio de cultivo durante 7 días de incubación. Separación de medias según la prueba de Tukey ( $P \leq 0.05$ ) (N=14)

El crecimiento radial de la cepa H3 (figura 8) donde se observó una diferencia altamente significativa en el crecimiento de la cepa en el medio A-M y V8. Para el segundo día se observó una diferencia significativa en el crecimiento de este micelio en el medio V8 con respecto a los demás medios. En el tercer día se observó una diferencia altamente significativa entre los medios A-M y V8 en relación con los otros dos medios. Para el cuarto, quinto, sexto y séptimo día se observó el crecimiento total de la cepa H3.

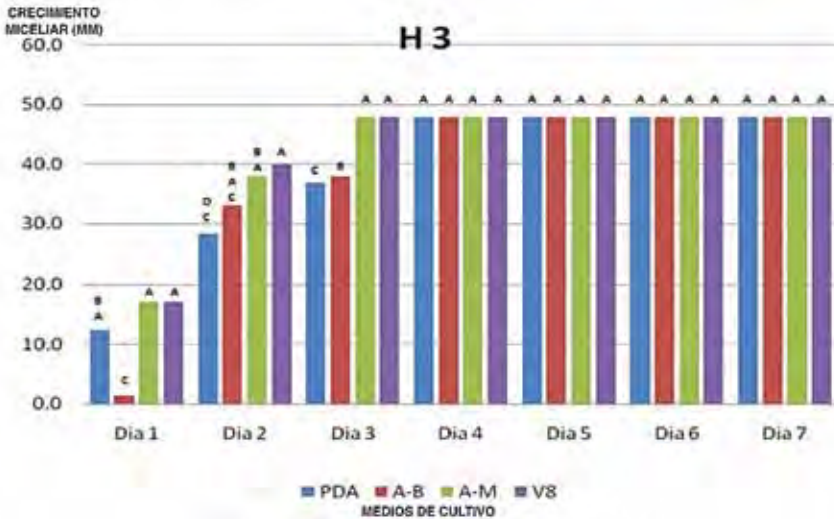


Figura 8. Comparación entre medias de crecimiento de micelio de la cepa H3 en los 4 diferentes medio de cultivo a los 7 días de incubación. Separación de medias según la prueba de Tukey ( $P \leq 0.05$ ) (N=14)

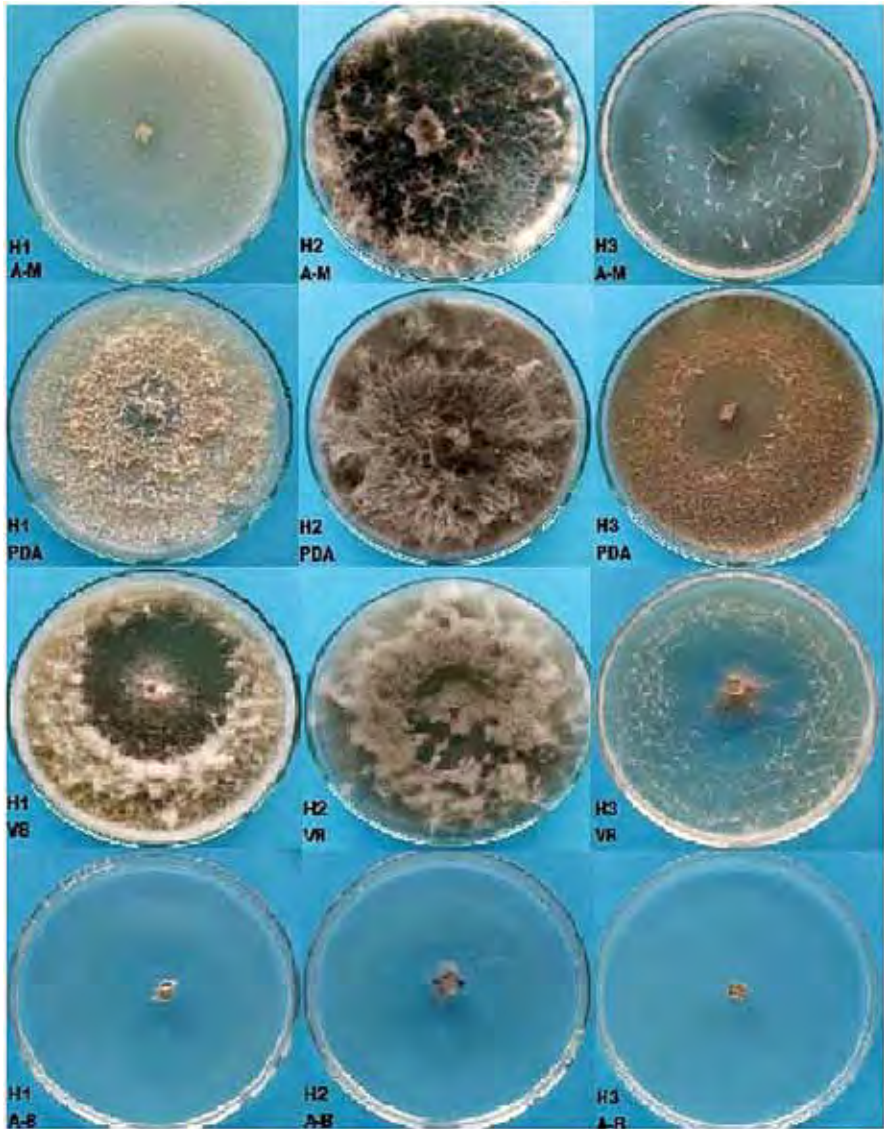


Figura 9. Crecimiento que micelio de *Colletotrichum sp* en cuatro medios de cultivo sólidos: Agar Maíz (A-M), PDA (Papa-Dextrosa-Agar), Jugo de verduras V8 (V8), Agar Bacteriológico (A-B) a los 7 días de incubación. Primera fila cepas H1, H2 y H3 en medio A-M, segunda fila cepas en medio PDA, tercera fila cepas en medio V8 y cuarta fila cepas en medio A-B

### *Patogenicidad*

Los síntomas desarrollados que se observaron en los aislamientos patogénicos sobre hojas de chirimoyo inoculadas con micelio desarrollado en medio PDA con un crecimiento de 7 días, fueron lesiones necróticas. Después de 72 horas de inoculadas las hojas, se observaron los primeros síntomas a manera de lesiones sin forma definida ubicadas principalmente en el ápice y en el borde de la hoja (figura 10), los tonos de las lesiones fueron de color café a café oscuro, con bordes delimitados que abarcaron un 30% de la hoja, estos datos concuerdan con los reportados con Villanueva-Arce *et al.*(2006) quienes realizaron esta prueba de patogenicidad en frutos de chirimoyo donde se observaron los mismos síntomas a las 72 horas, sin embargo, Contreras (2006) reporta los mismos síntomas en frutos de lulo (*Solanum quitoense*) hasta 7 días después de la inoculación. En esta prueba se observó la invasión del micelio en las hojas de chirimoyo al cabo de 7 días de inoculadas en un 80 a 100% del total de la hoja provocando la muerte del tejido foliar (figura 10).



Figura 10. Síntomas de antracnosis en hojas a los 7 de incubación



## Análisis Molecular

### Extracción de ADN

Usando el protocolo de Diez *et al.* (1999) modificado (Noa, 2009, comunicación personal) se logró extraer ADN genómico de las muestras H2 y H3 (figura 11) obteniendo:

Muestra	Peso de micelio	Resultado de lectura en el espectrofotómetro dilución 5:1000
H2 ( 270709)	0.2047g	210 ng/ $\mu$ L
H3(120110)	0.2907g	1090 ng/ $\mu$ L

Comparando los resultados obtenidos con lo reportado por Rodríguez (2007) y utilizando el protocolo de Goodwin que señala haber obtenido de ADN entre 30 y 200 ng/ $\mu$ L, y reporta que este resultado es una cantidad suficiente para la realización de la PCR, se puede observar una cantidad mayor de ADN al utilizar el protocolo de extracción modificado de Diez *et al.* (1999).

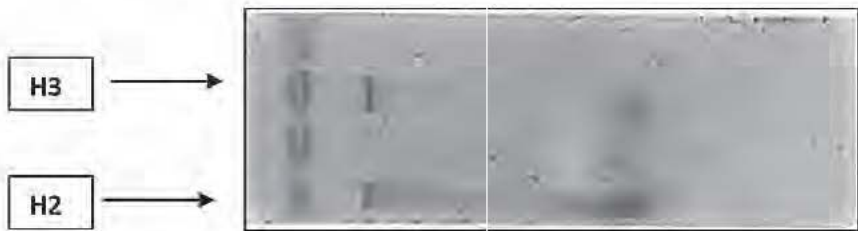


Figura 11. Electroforesis de ADN genómico en gel de agarosa al 0.8%

### Amplificación de la región ITS

La amplificación de ADN con los cebadores universales ITS1F e ITS4/R, se realizó utilizando una concentración de 100 ng/mL para cada una de las muestras donde se obtuvo un peso aproximado de 600 pares de

bases (pb) para cada muestra (figura 12), estos resultados concuerdan con Rodríguez (2007) quien reporta haber obtenido el mismo tamaño molecular utilizando los cebadores ITS2 e ITS2 y utilizando solo 30 ng de ADN. Sin embargo, Álvarez *et al.* (s/f) reporta haber obtenido fragmentos de 580 pb utilizando los cebadores ITS1 e ITS4, mientras que con los cebadores ITS1 e ITS2 obtuvo un fragmento con una cantidad de 240 pb indicando ausencia de polimorfismo entre sus aislamientos de *Colletotrichum* sp. La purificación de las muestras H2 y H3 se realizó de acuerdo al Protocolo del Kit (Promega PCR Clean- up System).



Figura 12. Electroforesis de los productos de PCR en gel de agarosa al 1.5 % gel de la región ITS de las cepas en estudio (H2 y H3)

Los productos de PCR purificados fueron enviadas al Instituto de Biotecnología de la Universidad Autónoma de México (UNAM) para su secuenciación, obteniendo:

Cepa H2 de 59l pb

AGGTGCAAGTCCTCCGGTTGTGTTGGCCAGCGGAGGGT-  
CATTGCTGGAACGCGCCTCGGCGCACCCAGAAACCCTTTG-  
TGAACCTATACCTACTGTTGCCTCGGCGCAGGCCGGCTTCT-  
GTCACAAGAAGCCCCCTGGAGACAGGGAGCAGCCCGC-  
CGGCGGCCAACCAAACCTCTTGTTTCTATAGTGAATCTCT-  
GAGTAAAAACATAAATGAATCAAAACTTTCAACAACG-  
GATCTCTTGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAAT-  
GCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGA-  
ATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTCTGGTATTCCGGAGGG-  
CATGCCTGTTGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCCTGGCTT-  
GGTGATGGGGCACTGCCTGTAAAAAGGCAGGCCCTGA-  
AATCTAGTGGCGAGCTCGCCAGGACCCCGAGCGTAGTAG-  
TTATATCTCGCTCTGGAAGGCCCTGGCGGTGCCCTGCCG-  
TTAAACCCCAACTTCTGAAAATTTGACCTCGGATCAGGTA-  
GGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAA

Cepa H3 de 666 pb

AACTGTCTCCGTTGGTGACAGCGGAGGGTCATTACAGAGTT-  
GCAAAACTCCCACAAACCATCGCGAATCTTACCCGTACGG-  
TTGCCTCGGCGCTGGCGGTCCGGAAGGCCCTCGGGCCCC-  
CGGACCCTCGGGCCTCCCGCGAGCGGGAGGCTGCCCGC-  
CGGAGTGCCGAAACCAAACCTTTGATATTTTATGTCTCTCT-  
GAGTAAACTTTTAAATAAGTCAAAACTTTCAACAACG-  
GATCTCTTGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAAT-  
GCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATC-  
GAATCTTTGAACGCACATTGCGCTCGCCAGTATTCTGGC-  
GAGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTCAACCATCAAGCTCT-  
GCTTGCGTTGGGGATCCGCGGCTGCCCGCGGTCCCTCA-  
AAAACAGTGCGGGGCTCGCTAGTCACACCGAGCGTAG-  
TAATTCTACATCGCTATGGTCGTGCGGCGGGTTCTTGC-  
CGTAAAACCCCAATTTCTAAGGTTGACCTCGGATCAGG-  
TAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGGCGGA-

GGAACTCATACGCAGGAAAGAATTTTTTTTTCTCTTCCCT-  
 CACTTACTGCATAAAAAAAAAACTAAAACAAAAAATGCACA-  
 AAAATCAAAAATGACCATTATTACAACTAAAAAAAAAAAA-  
 CAAAAAAAAGAGAGAGAAAAATTAACGAGAATCA-  
 TACCTTAAATCAAGTAACGAATGACTCCGCGACATAAT-  
 CATTATCACAACCCAGGGGATATCTAAGAAAAACAAATC-  
 GACCGAAAACGCAAACCACCACGCGTAGTGGTCAAAGCA-  
 AAAAAAAAAAAAAATAACACATACATAACCAATCATATGAGC-  
 TAATAGTCTACAATAGAGATAGTATAGTCATAAGACAAAATC-  
 TACACAGAGCAGT

También se realizó la comparación de las dos muestras mediante el programa BLAST (Basic Local Alingment Search Tool) del National Center for Biotechnology Information (NCBI), ésta arrojó un porcentaje de identidad para la muestra H2 de un 98%-97% con el hongo reportado como *Phomopsis* spp, Gardiazabal y Rosenberg (1993) lo reportan como agente causal de enfermedad en postcosecha en el cultivo del chirimoyo. Pinto (2005) reporta a este hongo con el nombre común de cancro negro (*Phomopsis* spp) y podredumbre diplodia (*Phomopsis anonacearum*) ambas enfermedades fúngicas afectan a las hojas, ramas y frutos de especies de *Annona*, estas ocurren principalmente en huertos abandonados y muestran síntomas de manchas en la superficie de la fruta. Para la muestra H3 el BLAST arrojó un porcentaje de identidad de un 98%-97% con el hongo reportado como *Sordaria* sp, mismo que a la fecha no ha sido reportado como agente causal del chirimoyo

Es necesario realizar una caracterización morfológica para un mejor resultado y así obtener una caracterización más específica de estos hongos, ya que los resultados de este programa, muestran porcentajes de identidad muy cercana hacia otros hongos reportados.



## Referencias

- Álvarez, E., Ospina, C.A., Mejía, J.F., y Llano, G.A. (s/f). Caracterización morfológica, patogénica y genética del agente causal de la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporoides*) en guanábana (*Annona muricata*) en el Valle de Cauca. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia. 10 pp.
- Arroyo, C., Arauz, L.F. y Mora, J. 2004. Incidencia de enfermedades en Pejibaye (*Bactris gasipaes kunth*) para palmito. *Agronomía Mesoamericana*. 15: 61-68.
- Bruns, T.D., and Shefferson R.P. 2004. Evolutionary studies of ectomycorrhizal fungi: recent advances and future directions. *Canadian Journal of Botany*. 82: 1122-1132.
- Contreras, H.C. 2006. Caracterización y pruebas de patogenicidad cruzada entre aislamientos de *Colletotrichum* sp. obtenidos de frutos de Lulo con síntomas de antracnosis. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia. 115 pp.
- Diez, S., García, E.A., Pino, P.A., Botero, S., Corredor, G.G., Peralta, L.A., Castaño, J.H., Restrepo, A. and, McEwen J.G. 1999. PCR with *Paracoccidioides brasiliensis* specific primers: potential use in ecological studies. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo* [online]. 41 (6): 351-358.

- Gardiazabal, I.F., y Rosenberg, M.G. 1993. El cultivo del chirimoyo. Facultad de Agronomía, Universidad Católica de Valparaíso. Chile. 118 pp.
- Gurbert, J.C., Liu, B., and Correll, J.C. 2003. Characterization of diversity in *Colletotrichum acutatum* sensu lato by sequence analysis of two gene introns, mtDNA and intro RFLPs, and mating compatibility. *Mycologia*. pp. 872- 895.
- Junqueira, N.T.V., Cunha, M.M. da; Oliveira, M.A.S., Pinto, A.C.Q. 1996. Graviola para exportação: aspectos fitossanitários. Brasília: MA-SDR- FRUPEX/ EMBRAPA- SPI. Brasil. 67 pp.
- Kavati, R.O. 1992. Cultivo de atemóia. In: Donadio, L. C., Martins, A.B.G., Valente, J.P. (Ed.) Fruticultura Triopical. FUNEP Jaboticabal, Brasil. pp. 39 -70.
- Orozco, M.S., Manzo, S.G., Guzmán, G.S., Farías, L.J. y Timmer L.W. 2004. Crecimiento y cambios morfológicos de *Colletotrichum acutatum* agente causal de la antracnosis en el limón mexicano incubado en diferentes medios de cultivo sólidos y líquidos. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 22 (33): 7.
- Paiva, M.C. y Fioravanco, J.C. 1994. Cultivares e melhoramento. In: Manica, I. Fruticultura: Cultivo de anonáceas: ata, cherimólia e graviola. Porto Alegre Evangraff. Brasil. pp. 18-29.
- Pinto, A.C. de Q. 2005. Agronomy. In: *Annona* species. International Centre for Underutilised Crops. University of Southampton. Southampton. Uk. pp. 71- 126.
- Rebollar, A.A. 1995. Observaciones preliminares de plagas y enfermedades de seis frutales nativos potenciabes para el estado de Michoacán. En: Primera Reunion Regional sobre Cultivos alternati-

vos, tecnología y mercados para la agricultura de la región Centro Occidente de México. México.

Rebollar, A.A., Domínguez, J.L., Nieto-Ángel, P., Nava-Díaz, C., y Delgado Sánchez, F. 1997. Principales plagas y enfermedad de las anonáceas en México. In: Sao Jose, A.R., Sousa I., V.B, Morais, O. M., e Reboucias, T.N.H. (Eds.) Anonaceas Produção e mercado (Pinha, Graviola, Atemoia e Cherimólia). Unoversidade Estadual do Sudoeste de Bahia. Brasil. pp. 222-239.

Rodríguez, G.M.P. 1999. Aplicación de algunos enfoques epidemiológicos en el estudio y manejo de las plagas y las enfermedades de las anonáceas. En: Memoria II Congreso Internacional de Anonáceas. Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México. pp. 23.

Rodríguez, J. y Nieto, D. 1997. El cultivo de la chirimoya (*Annona cherimola* Mill.) en México. In: Sao Jose, A.R., Sousa I., V.B, Morais, O. M., e Reboucias, T.N.H. (Eds.) Anonaceas, Produção e Mercado (Pinha, Graviola, Atemoia e Cherimólia). Unoversidade Estadual do Sudoeste de Bahia. Brasil. pp. 7-19.

Rodríguez, G.A. 2007. Caracterización molecular de poblaciones de *Colletotrichum* sp. asociadas a *Coffea arabica* en Colombia y su aplicación en el diagnóstico del CBD. Facultad de Ciencias. Pontifica Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia. 126 pp.

Tovar, S.A., Hernández, M.M., Cristobal, A.J., Romero, H.R. y Mora-Aguilera, G. 2002. Escala logarítmica diagráfica de severidad de la mancha negra (*Colletotrichum gloeosporoides* Penz.) en chirimoyo (*Annona cherimola* Mil.). *Revista Mexicana de Fitopatología*. 103- 109.

Villanueva- Arce, R., Cárdenas, S.E., Hernández, A.A., Mora, A.A. y Telíz, O.D. 2006. Patogénesis de la antracnosis (*Colletotrichum fraga-*



*riae*) en frutos de chirimoya. Instituto Politécnico Nacional y Colegio de Postgraduados. México. 10 pp.

White, T.J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand, D.J., White, T.J. (Eds.). *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press. New York, USA. pp. 315- 322.

### III. *Annona cherimola* x *Annona squamosa*



Fotos: Costa y Ferreira



# Condicionamiento osmótico en semillas de *Annona cherimola* Mill. x *A. squamosa* L.

Ferreira, Gisela<sup>1</sup>, Gimenez, Juliana Iassia<sup>1</sup>  
Corsato, Jaqueline Malagutti<sup>1</sup>, Bueno, Silvana Sales Catarina<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Biociências-UNESP, Departamento de Botânica. Distrito de Rubião Junior, s/n. CEP:18618-970. Botucatu, SP, Brasil. gisela@ibb.unesp.br

<sup>2</sup>CATI-Núcleo de Produção de Plantas de São Bento do Sapucaí, SP

## Resumen

Entre los problemas del uso de las semillas de la atemoya (*Annona cherimola* Mill. x *Annona squamosa* L.) para la producción de portainjertos, se revela el bajo porcentaje de germinación. El condicionamiento osmótico se ha utilizado para incrementar la germinación y reducir el tiempo entre la siembra y la emergencia. Esta técnica consiste en sumergir las semillas en soluciones osmóticas a ciertas temperaturas y periodos, controlando la entrada del agua, dando por resultado la germinación más rápida y uniforme de varias especies. El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto del acondicionamiento osmótico a diferentes tiempos de remojo sobre la germinación de las semillas de

atemoya. Las semillas fueron colocadas en remojo en soluciones de polietilenglicol (PEG 6000), a potenciales de 0; -0.2; -0.4; -0.6; -0.8; -1.0; -1.2 y -1.4 MPa durante 18, 36, 54 y 72 horas. El diseño experimental fue completamente aleatorizado en esquema factorial 8 x 4 (potenciales osmóticos x tiempos de remojo). Después del acondicionamiento osmótico, las semillas fueron envueltas en rollos de papel, alternando la temperatura y el fotoperiodo (16 h en la oscuridad hasta 20°C y 8 h en la luz hasta 30°C). Las variables analizadas fueron el porcentaje, índice de velocidad, sincronización, tiempo medio y frecuencia de germinación. Los datos fueron sometidos a análisis de varianza y las medias se compararon mediante prueba de Tukey al 5%. Para el porcentaje e índice de velocidad de la germinación, hubo interacción sólo entre los tiempos de condicionamiento con el potencial de -0.8 MPa. El condicionamiento osmótico en el potencial de -1.0 MPa por 18 horas, a pesar de no promover aumento en el porcentaje de la germinación, produce el menor tiempo medio de la germinación en las semillas de atemoya.

Palabras clave: *germinación, potenciales osmóticos, propagación*

## Introducción

La atemoya es un híbrido resultante del cruzamiento de la chirimoya (*Annona cherimola* Mill.) con la fruta del conde (*Annona squamosa* L.). Esta especie presenta gran interés comercial debido a su sabor dulce, menor número de semillas, mejor conservación pos-colecta, ausencia de rajaduras y resistencia a plagas (Mello *et al.*, 2003).

La injertía es el método usual de propagación para esta especie, pero son pocas las alternativas para el portainjerto, motivo por cual se recomienda muchas veces la utilización de la propia atemoya (Tokunaga, 2000). Los portainjertos son normalmente obtenidos vía seminífera. Entre tanto, las especies pertenecientes a la familia Annonaceae presentan semillas con dormancia, lo que causa un bajo índice germinativo (Vieira e Irber, 1996). Esta dormancia es causada por la presencia del embrión inmaduro (Rizzini, 1973) y por la variación en el balance hormonal (Melo *et al.*, 2007).

Diversas técnicas son desarrolladas para el incremento en la germinación de las semillas. El condicionamiento osmótico, propuesto por Heydecker y Gibbins (1978), es utilizado para aumentar la germinación y reducir el tiempo entre el sembrado y la emergencia.

Este tratamiento consiste en la inmersión de las semillas en soluciones osmóticas en determinadas temperaturas y periodos, controlando la entrada de agua, lo que resulta en la germinación más rápida y uniforme en varias especies. El control de la imbibición permite la ocurrencia de los procesos fisiológicos iniciales (fase I y II), pero no permite alcanzar la humedad suficiente para el alargamiento celular y consecuentemente, emergencia de la raíz primaria (fase III) (Bradford, 1986).

El aumento en la germinación y vigor de las semillas después del condicionamiento osmótico es explicado por la retención de subproductos resultantes de la degradación de las reservas durante el tratamiento. El condicionamiento osmótico lleva al acúmulo de solutos (azúcares, ácidos orgánicos e iones), provenientes del inicio del metabolismo de la semilla, resultando en mayor turgor en la rehidratación y promoviendo la emergencia de la raíz primaria en menor espacio de tiempo (Bradford, 1986).

Además de eso, la absorción lenta del agua por la semilla durante el condicionamiento osmótico proporciona más tiempo para la reparación o reorganización de las membranas celulares, lo que posibilita a los tejidos, desarrollarse de manera ordenada, reduciendo los riesgos de daños al tejido embrionario, causados por la rápida absorción de agua (Smith y Coob, 1992). Según Powell (1998) las evidencias indican que la activación de los mecanismos de esta reparación metabólica es uno de los factores que más contribuye a los beneficios alcanzados por el condicionamiento osmótico.

De acuerdo con Wanli *et al.* (2001) el control de la absorción de agua por las semillas por medio de la solución osmótica también puede ser utilizado con el objetivo de no permitir la emergencia de la raíz primaria, evitando así, daños al embrión, hasta que la semilla sea sometida a condiciones favorables de germinación.

La técnica de condicionamiento osmótico también permite que las semillas con diferentes velocidades de germinación sean llevadas al mis-

mo estadio de desarrollo (Taylor *et al.*, 1998). De esta manera, las semillas de menor vigor (emergencia más lenta) se nivelan cualitativamente con las de mayor vigor durante la imbibición controlada, resultando en una germinación uniforme, hasta en condiciones desfavorables (Guimarães *et al.*, 1993).

La duración del tratamiento de condicionamiento es un factor importante, debiendo inhibir la germinación por un periodo que garantice el efecto máximo de la técnica. Por tanto, cuando es extendida la duración del tratamiento, los efectos pueden ser revertidos, fenómeno denominado *overpriming* (Ely y Heydecker, 1981).

A pesar del éxito obtenido en algunos trabajos experimentales, hay carencia de información para que el método sea empleado en varias especies. Por ello, son necesarios trabajos que adopten esta metodología para determinadas especies, incluyendo el potencial y el tiempo adecuado de condicionamiento.

El objetivo de este trabajo fue determinar el tiempo de imbibición y el potencial adecuado para el condicionamiento osmótico de semillas de atemoya (*Annona cherimola* Mill. x *A. squamosa* L.).

## Método

El trabajo fue realizado en el Laboratorio de Fisiología de la Germinación de Semillas del Departamento de Botánica, en el Instituto de Biociencias de la Universidade Estadual “Julio de Mesquita Filho” – UNESP, *Campus* de Botucatu, São Paulo, Brasil.

El diseño experimental fue enteramente casualizado en esquema factorial 8 x 4 (potenciales osmóticos x tiempos de imbibición), totalizando 32 tratamientos con 4 repeticiones de 25 semillas por lote. Las semillas fueron colocadas a imbibir en soluciones de polietilenglicol (PEG 6000), en los potenciales de 0, -0.2, -0.4, -0.6, -0.8, -1.0, -1.2 e -1.4 MPa por cuatro diferentes periodos de condicionamiento: 18, 36, 54 y 72 horas.

Para evitar la falta de oxígeno en las soluciones, durante la imbibición, fue adoptado el mecanismo de aireación, con auxilio de un compresor de aire para acuario.

Al término del acondicionamiento, las semillas fueron lavadas en agua corriente y colocadas en rollos de papel Germitest humedecidos con agua desionizada y llevadas a una germinadora con temperatura y fotoperiodo alternados (16 horas de oscuridad a 20°C y 8 horas de luz a 30°C). El conteo del número de semillas germinadas fue realizado cada dos días, considerando como germinadas, las semillas que presentaban, en lo mínimo, 2 mm de raíz primaria (Hadas, 1976).

Las variables analizadas fueron porcentaje, índice de velocidad, tiempo medio y frecuencia de germinación. Los datos fueron sometidos a análisis de varianza y las medias comparadas por la prueba de Tukey a 5% de probabilidad.

## Resultados y discusión

Para el porcentaje e índice de velocidad de la germinación, hubo interacción sólo entre los tiempos de condicionamiento con el potencial de -0.8 MPa. En este potencial, se observa que el porcentaje e índice de velocidad de la germinación, disminuyeron en los mayores tiempos de condicionamiento de las semillas, y el menor porcentaje e índice de velocidad de germinación fueron en las semillas condicionadas por 54 horas.

Cuadro 1. Germinación (%), tiempo medio de germinación (TMG) e índice de velocidad de germinación (IVG) de las semillas de atemoya (*Annona cherimola* Mill. x *A. squamosa* L.) sometidas al condicionamiento osmótico en diferentes potenciales y tiempos de condicionamiento

Potencial hídrico	Tiempo de condicionamiento (horas)				Medias
	18	36	54	72	
	PG (%)				
0	28 aA	21 aA	17 aA	25 aA	23 a
-0.2	23 aA	16 aA	16 aA	30 aA	21 a
-0.4	25 aA	21 aA	17 aA	29 aA	23 a
-0.6	23 aA	18 aA	20 aA	30 aA	23 a
-0.8	27 aA	19 aAB	10 aB	19 aAB	19 a
-1.0	19 aA	20 aA	15 aA	21 aA	19 a
-1.2	14 aA	14 aA	16 aA	20 aA	16 a



Potencial hídrico	Tiempo de condicionamiento (horas)				
	18	36	54	72	Medias
-1.4	17 aA	11 aA	18 aA	15 aA	15 a
Medias	22 AB	17 BC	16 C	24 A	
C.V. (%)	42.75				
	TMG (días)				
0	16 abA	18 aA	15 aA	13 bA	16 b
-0.2	15 abA	20 aA	14 aA	16 abA	17 b
-0.4	14 bAB	18 aAB	12 aB	21 abA	17 b
-0.6	16 abA	16 aA	19 aA	17 abA	17 b
-0.8	15 abA	21 aA	19 aA	17 abA	19 ab
-1.0	12 bB	22 aA	17 aAB	24 aA	19 ab
-1.2	15 abA	22 aA	21 aA	19 abA	19 ab
-1.4	24 aA	25 aA	21 aA	20 abA	23 a
Medias	16 B	21 A	18 AB	19 AB	
C.V. (%)	25.96				
	IVG				
0	0.49 aA	0.31 aA	0.31 aA	0.50 aA	0.40 a
-0.2	0.43 aA	0.22 aA	0.30 aA	0.51 aA	0.36 ab
-0.4	0.46 aA	0.34 aA	0.27 aA	0.46 aA	0.38 a
-0.6	0.39 aA	0.30 aA	0.27 aA	0.51 aA	0.37 ab
-0.8	0.48 aA	0.28 aAB	0.14 aB	0.30 aAB	0.30 ab
-1.0	0.34 aA	0.28 aA	0.25 aA	0.26 aA	0.28 ab
-1.2	0.30 aA	0.18 aA	0.21 aA	0.32 aA	0.25 ab
-1.4	0.21 aA	0.13 aA	0.24 aA	0.20 aA	0.19 b
Medias	0.38 A	0.25 B	0.25 B	0.38 A	
C.V. (%)	51.61				

Medias seguidas por la misma letra, minúscula en la columna y mayúscula en la línea, no difieren entre sí por la prueba de Tukey a 5% de probabilidad

En el potencial de -1.0 MPa, el menor tiempo medio de la germinación fue en las semillas condicionadas por sólo 18 horas, a pesar de no promover aumento en el porcentaje de la germinación, lo que justifica la necesidad de utilizar reguladores de la planta.

La germinación a menor tiempo es importante porque reduce el tiempo de exposición de las semillas a las condiciones adversas, como los microorganismos y la deficiencia de agua (Khan, 1992). El condicionamiento osmótico proporciona la retención de subproductos re-

sultados de la degradación de las reservas durante el tratamiento. La acumulación de solutos (azúcares, ácidos orgánicos e iones), provenientes del inicio del metabolismo de la semilla, resulta en mayor turgor en la rehidratación y promueve la emergencia de la raíz primaria en un menor periodo de tiempo (Bradford, 1986).

## Conclusión

El condicionamiento osmótico en el potencial de  $-1.0$  MPa por 18 horas, a pesar de no promover aumento en el porcentaje de la germinación, reduce el tiempo medio de este proceso en las semillas de atemoya.



## Referencias

- Bradford, K.J. 1986. Manipulation off seed water relations via osmotic priming to improve germination under stress conditions. *Hortscience*. 21 (5): 1105-1112.
- Ely, P.R. and Heydecker, W. 1981. Fast germination of parsley seeds. *Science Horticulturae*. 15 (2): 127-136.
- Guimarães, R.M., Fraga, A.C., Vieira, M.G.G.C., Silveira, J.F. and Oliveira, J.A. 1933. Efeito do condicionamento osmótico sobre a germinação e desempenho de sementes de algodão (*Gossypium hirsutum* L.) sob condições ideais e de estresse térmico e hídrico. *Ciência e Prática*. 17 (3): 215-223.
- Hadas, A. 1976. Water uptake germination of leguminous seeds under changing external water potential in osmotic solution. *Journal of Experimental Botany*. 27: 480-489.
- Heydecker, W. and Gibbins, B.M. 1978. The priming of seeds. *Acta Horticulturae*. 83: 213-223.
- Khan, A.A. 1992. Preplant physiological seed conditioning. *Horticultural Review*. 13: 131-181.

- Mello, N.T.C. de, Nogueira, E.A. and Maia, M.L. 2003. Atemóia: perspectivas para a produção paulista. *Informações Econômicas*. 33 (9).
- Melo, D.L.B. de, Davide, A.C., Silva, E.A.A. da, Faria, J.M.R. and Queiroz, S.E. 2007. Estudo morfo-anatômico do endosperma e embrião de sementes de *Annona crassiflora* Mart. *Revista Cerne*, in press.
- Powell, A.A. 1998. Seed improvement by selection and invigoration. *Scientia Agricola*. 55: 126-133.
- Rizzini, C.T. 1973. Dormancy in seeds of *Annona crassiflora* Mart. *Journal of Experimental Botany*. 24 (78): 117-123.
- Smith, P.T. and Coob, B.G. 1992. Physiological and enzymatic characteristic of primed, re-dried air, and germinated pepper seeds. *Seed Science and Technology*. 20: 503-513.
- Taylor, A.G., Allen, P.S., Bennett, M.A., Bradford, K.J., Burris, J.S. and Misra, M.K. 1998. Seeds enhancements. *Seed Science Research*. 8: 245-256.
- Tokunaga, T. 2000. *A cultura da Atemóia*. Boletim Técnico 233. CATI. Campinas, Brasil. Pp. 80.
- Vieira, M.H.P. and Irber, M. de V. 1996. Emergência e taxa de germinação em *Annona coriácea*. In: Congresso Nacional de Botânica. Brasil. Pp. 47.
- Wanli, Z., Leihong, L. and Perez, S.C.J.G.A. 2001. Pré condicionamento e seus efeitos em sementes de canafistula (*Peltophorum dubium* (Spreng) Taub). *Revista Brasileira de Sementes*. 23 (1): 146-153.

#### IV. *Annona diversifolia* Saff.



Fotos: Alejandro Martínez Mena



# Composición química y actividad antirradical de tres variedades de frutos de *Annona diversifolia* Safford

Santos-Sánchez, Norma Francenia, Julián-Loeza, Adriana Paola  
Valadez-Blanco, Rogelio, Sánchez-Guzmán, Balbina Senorina  
Salas-Coronado, Raúl

Instituto de Agroindustrias, Universidad Tecnológica de la Mixteca. Carretera a Acatli-  
ma km 2.5, Huajuapán de León, Oaxaca, 69000 México. nsantos@mixteco.utm.mx

## Resumen

**E**n el presente trabajo se comparó y relacionó la actividad antirradical frente al DPPH con el contenido de fenoles totales y flavonoides totales de la pulpa de frutos de las variedades blanca, rosa y rosa mexicano de *Annona diversifolia*. También se realizó un análisis fisicoquímico, un comparativo (ANOVA) y correlaciones de Pearson. De las tres variedades estudiadas, la rosa mexicano presentó las características químicas y actividad antirradical más importantes.

Palabras clave: *Annona diversifolia*, composición química, actividad antirradical.



## Introducción

Las frutas son una fuente diversa de nutrientes antioxidantes tales como las vitaminas C y E, y carotenoides. También contienen otros constituyentes dietarios que poseen actividad antioxidante como los polifenoles, que incluyen compuestos fenólicos simples y flavonoides. Estudios epidemiológicos sugieren que existe una relación entre el consumo de alimentos ricos en polifenoles y la prevención de enfermedades asociadas con el estrés oxidativo, tales como cáncer, aterosclerosis y enfermedades neurodegenerativas (Halliwell y Gutteridge, 1999; La Vecchia *et al.*, 2001; Neto, 2007; Steinmetz y Potter, 1996; Zibadi *et al.*, 2007). En general las frutas contienen compuestos fenólicos y su consumo se ha incrementado en los últimos años en todo el mundo (Vasco *et al.*, 2008). El género *Annona* (Annonaceae), originario de América, agrupa frutas tropicales y tiene importancia comercial porque algunas de sus especies son comestibles, como la guanábana (*A. muricata* L.), chirimoya (*A. cherimola* Mill.), araticum o marolo (*A. crassiflora* Mart.) y papause o ilama (*A. diversifolia* Saff.). Esta última, es originaria del sureste de México, Guatemala y El Salvador. La pulpa de los frutos de *A. diversifolia* es suave y tiene un sabor agradable, los colores más comunes de la pulpa son el blanco, rosa o rosa mexicano. Los frutos de *A. diversifolia* se cultivan una vez al año, y se consumen cuando la cáscara se abre del pedúnculo y parte de la pulpa se expone al ambiente. Generalmente, si estos frutos se cortan antes de que se abra la cáscara no maduran. Moreno-Velázquez *et al.*, en el 2008, reportaron los cambios bioquímicos, biofísicos y fisiológicos durante el crecimiento y maduración del fruto de papause, y encontraron que la producción de azúcares inicia a los 85 días después de la floración. Esto puede ser un indicativo de la madurez del fruto. Sin embargo, en términos prácticos es difícil utilizar este parámetro para la cosecha del fruto. Es de mayor utilidad práctica emplear el color de los frutos como un parámetro de maduración. Cabe resaltar que la papausa se encuentra principalmente en tres variedades que difieren entre ellas por el color de la pulpa y la cáscara. Por tanto, es importante caracterizar física y químicamente las variedades de papause existentes.

Por otra parte, también es importante conocer las propiedades antioxidantes de frutos, debido a que pueden ser un parámetro para establecer el grado de funcionalidad de los mismos. La actividad antioxidante es una de las propiedades más relevantes que han sido evaluadas y se puede determinar *in vitro* por métodos espectrofotométricos. Algunos de los métodos más empleados son la actividad antirradical frente al radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) (Sánchez-Moreno, 2002; Sharma *et al.*, 2009), la cuantificación de fenoles totales usando el reactivo de Folin-Ciocalteu (Wolfe *et al.*, 2003; Ercisli *et al.*, 2008; Roesler *et al.*, 2006; Vasco, Ruales *et al.*, 2008) y los flavonoides totales por el método de Lee (Lee *et al.*, 2003; Wolfe *et al.*, 2003). La actividad antirradical se basa en la decoloración del radical DPPH en presencia de antioxidantes capaces de donar radicales hidrógeno, figura 1. Se conoce que los frutos contienen antioxidantes derivados de compuestos fenólicos capaces de inhibir a los radicales libres, la actividad antirradical se expresa como la cantidad de extracto o antioxidante requerido para inhibir el 50% de una concentración conocida de DPPH. La concentración de DPPH que se utiliza para realizar el ensayo generalmente es 0.004% *p/v* en etanol.

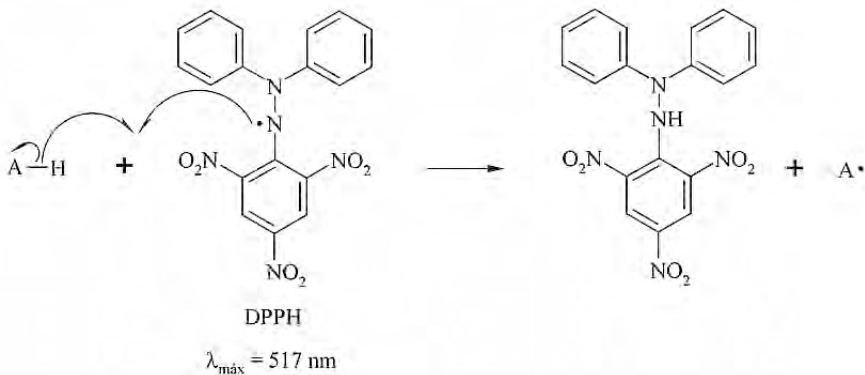


Figura 1. Reacción del radical DPPH con un agente antioxidante (A-H)

La cuantificación de fenoles totales involucra la reducción de sales de molibdeno y tungsteno en presencia de sustancias reductoras, tales como los fenoles. La concentración de fenoles se expresa generalmente como mg equivalentes de ácido gálico por 100 g de muestra

(mg EAG/100g). La cuantificación de flavonoides totales se realiza espectrofotométricamente mediante el uso de dos ensayos, uno consiste en formar un complejo de boro cuya coloración rosa salmón tiene una absorbancia máxima en 404 nm (Hairi *et al.*, 1991; Duh *et al.*, 2004). Este ensayo es susceptible a interferencias atribuidas a carotenoides. El segundo ensayo consiste en la formación de un complejo de aluminio en medio básico y tiene una absorbancia máxima en 510 nm (Lee *et al.*, 2003; Wolfe *et al.*, 2003; Du *et al.*, 2009). El ensayo involucra una decoloración inicial del sustrato con nitrito de sodio para medir el complejo de aluminio-flavonoide, minimizando de esta manera las interferencias generadas por compuestos coloridos presentes en la muestra. Los flavonoides totales se expresan como mg equivalentes de catequina o quercetina por cada 100 g de muestra (mg EC o mg EQ/100 g de muestra, respectivamente).

Existen algunos estudios relacionados con el contenido de fenoles totales (FT) y actividad antirradical (AA) de frutos del género *Annona*, ejemplo de ello es el trabajo reportado acerca del contenido de FT, determinado por el método de Folin-Ciocalteu, de la pulpa del fruto de *A. muricata* (Hassimotto *et al.*, 2005). Este contenido, expresado como miligramos equivalentes de ácido gálico (EAG), fue de  $120 \pm 8$  mg EAG/100 g de pulpa húmeda. También se ha estudiado la *A. cherimola*, y el contenido de FT reportado fue de  $323 \pm 83$  mg EAG/100 g de pulpa húmeda (Vasco *et al.*, 2008). En Malasia realizaron un estudio del contenido de vitamina C, FT y AA en dos variedades de *A. squamosa*, una café-rojiza y otra verde (Yan *et al.*, 2006). Los autores, reportaron que la *A. squamosa* café-rojiza y verde tuvieron un contenido de vitamina C de  $21.3 \pm 2.2$  y  $6.8 \pm 0.8$  mg/100 g de pulpa húmeda, de FT de  $175 \pm 36$  y  $165 \pm 18$  mg EAG/100 g de pulpa húmeda, y una AA expresada como  $IC_{50}$  de  $3900 \pm 400$  y  $4600 \pm 800$   $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente.

Con respecto al fruto de *A. diversifolia*, existen algunos reportes acerca de su composición química, así como de algunas de sus características físicas. En El Salvador se realizó una comparación entre las especies más comercializadas y cultivadas del género *Annona* (Cruz y Deras, 2000). Dentro de estas especies está *A. diversifolia*, los autores reportaron el análisis proximal del fruto y algunas características morfológi-

cas. Aunque identificaron dos variedades del fruto, la variedad blanca y rosa, no aclaran si los resultados derivados de su estudio corresponden a una variedad u otra. Cabe mencionar que en México se conocen tres variedades de *A. diversifolia* y se distinguen principalmente por el color de la pulpa del fruto, figura 2.

En este trabajo se reporta la actividad antirradical frente al DPPH, contenido de fenoles totales y flavonoides totales de la pulpa de las variedades blanca, rosa y rosa mexicano (Julián-Loeza *et al.*, 2010).



Figura 2. Frutos de *Annona diversifolia*

## Método

Cuantificación de color por reflectancia en un espectrofotómetro colorímetro (Ultra HunterLab ScanVis). Análisis proximal por métodos de la AOAC (1997). Cuantificación de minerales por absorción atómica de flama y vitamina C por el método espectrofotométrico de decoloración del DCIP (Dürüst *et al.*, 1997). Fenoles totales con el reactivo de Folin-Ciocalteu (Ercisli *et al.*, 2008). Flavonoides totales por el método de Lee (2003). Actividad antirradical por reducción del DPPH (Roesler *et al.*, 2006).

## Resultados y discusión

Se cuantificaron y compararon componentes químicos y la actividad antirradical en las variedades blanca, rosa y rosa mexicano de frutos de *Annona diversifolia* Safford. También, se determinaron los parámetros de color CIE  $L^*a^*b^*$ . Se observó una correlación negativa ( $p < 0,05$ ) entre el contenido de fenoles totales y la  $IC_{50}$  del radical DPPH ( $r = -1,00$ ) (Julián-Loeza *et al.*, 2010).

## Conclusión

De las tres variedades estudiadas, la rosa mexicano presentó las características químicas y actividad antirradical más importantes.

## Referencias

- AOAC. 1997. Official methods of analysis association of official analytical chemists. 15<sup>th</sup> ed. William Horwits. Washington D.C. USA.
- Cruz, E. y Deras, H. 2000. Colecta y establecimiento de anonáceas en El Salvador. *Agron. Mesoamer.* 11: 91-95.
- Du, G., Li, M., Ma, F. and Liang, D. 2009. Antioxidant capacity and the relationship with polyphenol and vitamin C in *Actinidia* fruits. *Food Chem.* 113: 557-562.
- Duh, P.-D., Yen, G.-C., Yen, W.-J., Wang, B.-S. and Chang, L.-W. 2004. Effects of pu-erh tea on oxidative damage and nitric oxide scavenging. *J. Agric. Food Chem.* 52: 8169-8176.
- Dürüst, N., Sümengen, D. and Dürüst, Y. 1997. Ascorbic acid and element contents of foods of Trabzon (Turkey). *J. Agric. Food Chem.* 45 (6): 2085-2087.
- Ercisli, S., Akbulut, M., Ozdemir, O., Sengul, M. and Orhan, E. 2008. Phenolic and antioxidant diversity among persimmon (*Diospyrus kaki* L.) genotypes in Turkey. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 59 (6): 477-482.
- Hairi, B., Salle, G. and Andary, C. 1991. Involvement of flavonoids in the resistance of two popular cultivars to mistletoe (*Viscum album* L.). *Protoplasma.* 162: 20-26.

- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. 1999. Oxidative stress and antioxidant protection: some special cases. In: Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. (Editors). *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3rd ed. Oxford Press. NY, USA. pp. 105-230, 485-491.
- Hassimotto, N.M.A., Genovese, M.I. and Lajolo, F.M. 2005. Antioxidant activity of dietary fruits, vegetables, and commercial frozen fruit pulps. *J. Agric. Food Chem.* 53 (8): 2928-2935.
- Julián-Loeza, A.P., Santos-Sánchez, N.F., Valadez-Blanco, R., Sánchez-Guzmán, B.S. and Salas-Coronado, R. 2010. Chemical composition, color, and antioxidant activity of three varieties of *Annona diversifolia* Safford fruits. *Ind. Crops Prod.* doi:10.1016/j.indcrop.2010.06.012.
- La Vecchia, C., Altieri, A. and Tavani, A. 2001. Vegetables, fruit, antioxidants and cancer: a review of Italian studies. *Eur. J. Nutr.* 40 (6): 261-627.
- Lee, K.W., Kim, Y.J., Lee, H.J. and Lee, C.Y. 2003. Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. *J. Agric. Food Chem.* 51 (25): 7292-7295.
- Moreno-Velázquez, D., Saucedo-Veloz, C., Arévalo-Galarza, L., Peña-Valdivia, C.B., Soto-Hernández, M. y Cruz-Lagunas, B. 2008. Cambios bioquímicos, biofísicos y fisiológicos durante el crecimiento y maduración del fruto de ilama (*Annona diversifolia* Saff.). *Agrociencia*, 42 (4): 407-414.
- Neto, C.C. 2007. Cranberry and its phytochemicals: A review of in vitro anticancer studies. *J. Nutr.* 137: 186S-193S.
- Roesler, R., Malta, L.G., Carrasco, L.C. and Pastore, G. 2006. Evaluation of the antioxidant properties of the Brazilian Cerrado fruit *Annona crassiflora* (Araticum). *J. Food Sci.* 71 (2): 102-107.

- Sánchez-Moreno, C. 2002. Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Sci. Tech. Int.* 8 (3): 121-137.
- Sharma, O.P. and Bhat, T.K. 2009. DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chem.* 113: 1202-1205.
- Steinmetz, K.A. and Potter, J.D. 1996. Vegetables, fruit, and cancer prevention: a review. *J. Am. Diet. Assoc.* 96 (10): 1027-1039.
- Vasco, C., Ruales, J. and Kamal-Eldin, A. 2008. Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. *Food Chem.* 111 (4): 816-823.
- Wolfe, K., Wu, X. and Liu, R.H. 2003. Antioxidant activity of apple peels. *J. Agric. Food Chem.* 51: 609-614.
- Yan, L.Y., Teng, L.T. and Jhi, T.J. 2006. Antioxidant properties of guava fruit: comparison with some local fruits. *Sunway Academic Journal.* 3: 9-20.
- Zibadi, S., Farid, R., Moriguchi, S., Lu, Y., Foo, L.Y., Tehrani, P.M., Ullrich, B.J. and Watson, R.R. 2007. Oral administration of purple passion fruit peel extract attenuates blood pressure in female spontaneously hypertensive rats and humans. *Nutr. Res.* 27 (7): 408-416.





# Rolliniastatina-2 sobre bacterias Grampositivas

Luna-Cazáres, Lorena Mercedes<sup>1</sup>, González-Esquinca, Alma Rosa<sup>1</sup>  
Guevara Fefer, Patricia<sup>2</sup>, Brechu Franco, Alicia Enriqueta<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. Libramiento Norte-Poniente 1150. Colonia Lajas Maciel. C.P. 29035. Tuxtla Gutiérrez Chiapas, México. lucaz58@hotmail.com

<sup>2</sup>Facultad de Ciencias, Ciudad Universitaria, Delegación Coyoacán C.P. 04510 Universidad Nacional Autónoma de México.

## Resumen

**A**lgunas acetogeninas (ACG) inhiben a bacterias Gramnegativas y Grampositivas, la ACG rolliniastatina-2 no se ha investigado aún, por ello y en la búsqueda de alternativas para el control de bacterias el propósito de este trabajo fue el de evaluar el efecto de ésta sobre el crecimiento de las bacterias *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*. La ACG se obtuvo de semillas de *Annona diversifolia* Saff. colectadas en la delegación de Copoya, municipio de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México; se aisló del extracto hexánico (González Esquinca, 2001). La actividad antibacteriana de rolliniastatina-2 en concentraciones de µg/mL (2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 236 y 512) y ng/mL (1, 2, 4, 8, 16, 32 y 64) se evaluó utilizando macrodilución en

caldo (Andrews, 2001) y los inóculos se ajustaron al estándar 0.5 de McFarland (Cona, 2002). Se hicieron lecturas espectrofotométricas a las 18 y 7 h; para determinar el efecto de la ACG sobre el aumento poblacional de cada bacteria se realizó la lectura de cada una de las concentraciones (ng/mL) cada hora durante 7 h. Rolliniastatina-2 en concentraciones de  $\mu\text{g/mL}$  y  $\text{ng/mL}$  a las 18 y 7 h presentó mayor efecto inhibitorio sobre *S. aureus* (30%) con la concentración más baja (2  $\mu\text{g/mL}$ ) y 43.68% (8  $\text{ng/mL}$ ) respectivamente. Ninguna de las bacterias ensayadas presentó una relación concentración-dependencia. El efecto sobre el aumento poblacional de cada bacteria (bact/mL) no presentó grandes diferencias, excepto en *B. subtilis*, la inhibición se detectó en diferentes tiempos asociados a una prolongación de la fase de latencia. La ACG tuvo efecto inhibitorio sobre el crecimiento de las tres bacterias, su mayor actividad se produjo sobre *S. aureus* en los dos tiempos de exposición ensayados y al parecer la actividad sobre la proliferación de las bacterias está relacionada con el retraso del inicio de la fase logarítmica del crecimiento de cada una de ellas.

Palabras clave: *acetogenina*, *Annona*, *Grampositivas*

## Introducción

Las plantas constituyen una fuente natural de compuestos bioactivos (antifúngicos, antiparasitarios, antimicrobianos, insecticidas) lo que ha propiciado el aumento de investigaciones sobre dichas moléculas y su efecto sobre diferentes sistemas biológicos (Yeaman y Yount, 2003). Aunado a ello, la detección de microorganismos multirresistentes o de susceptibilidad reducida a los antibióticos que se emplean en la actualidad, así como la presencia de infecciones oportunistas asociadas al síndrome de inmunodeficiencia adquirida y la aparición de efectos indeseables de ciertos antibióticos, ha propiciado la investigación de compuestos bioactivos provenientes de plantas (Domingo y López-Brea, 2003; Zampini *et al.*, 2007).

Especies de la familia Annonaceae, han sido estudiadas de manera casi sistemática por su contenido de alcaloides, y desde el aislamiento

de la uvaricina en 1982 por Jolad *et al.* el interés se centró en la presencia de compuestos de origen policétido llamados: acetogeninas de anonáceas (ACG).

Uno de los géneros más representativos de la familia es *Annona*, del que se han caracterizado y aislado más de 180 ACG de 22 especies (Cavé *et al.*, 1997; Alali *et al.*, 1999; Bermejo *et al.*, 2005; Alvarez Colom *et al.*, 2009; Alves Rodrigues *et al.*, 2009).

Diferentes bioensayos realizados con estos compuestos indican actividad biológica frente a insectos (González-Coloma *et al.*, 2002; Alvarez Colom *et al.*, 2007), levaduras y hongos (Cepleanu *et al.*, 1993; Padmaja *et al.*, 1993), parásitos (Raynaud *et al.*, 2004; Rakotomanga *et al.*, 2004), bacterias (Padmaja *et al.*, 1995; Rahmann *et al.*, 2005) y líneas celulares cancerosas y tumorales (Han *et al.*, 2004; Tormo *et al.*, 2005; Schlie *et al.*, 2009). Su efecto sobre diferentes sistemas biológicos se ha relacionado con la capacidad de inhibir al Complejo I, enzima presente en la cadena respiratoria de prácticamente todos los sistemas biológicos.

Los ensayos para determinar la actividad antibacteriana de las ACG son escasos (Padmaja *et al.*, 1993; Mia *et al.*, 1997; Rhamann *et al.*, 2005), aunque también se han realizado con mezclas de ACG obtenidas de diversas estructuras botánicas (Padmaja *et al.*, 1993; Jumana *et al.*, 2000). De acuerdo a los resultados reportados tanto los compuestos puros como las mezclas inhiben tanto a bacterias Gramnegativas como a Grampositivas.

Se ha demostrado el efecto de isodesacetiluvavicina y escuamocina sobre *Salmonella Typhi* y *Escherichia coli*; escuamocina y gigantetrocina A y B sobre *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *S. Typhi* y *E. coli*, además escuamocina tuvo efecto sobre *Pseudomonas aeruginosa*, y goniotalamusina sobre *S. aureus* y *S. Typhi* (Padmaja *et al.*, 1993; Mia *et al.*, 1997; Jumana *et al.*, 2000; Rhamann *et al.*, 2005)

Sin embargo, el efecto de rolliniastatina-2 sólo se ha reportado sobre bacterias Gramnegativas (Luna-Cazáres y González-Esquinca, 2010), por ello y en la búsqueda de alternativas para el control de bacterias el propósito de este trabajo fue el de evaluar el efecto de esta ACG sobre el crecimiento de las bacterias Grampositivas *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*.

## Método

### *Material vegetal*

La acetogenina se obtuvo de semillas de *Annona diversifolia* Saff., colectadas en la delegación de Copoya del municipio de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México en 2004. El ejemplar herborizado se depositó en el herbario HEM de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas (no. 351).

### *Obtención de la acetogenina*

Las semillas se secaron a temperatura ambiente y luz natural, después se molieron hasta obtener un polvo fino, se pesaron 350 g de material vegetal que se extrajo con hexano en un equipo Soxhlet durante 8 horas tres veces (24 h). El extracto se concentró por destilación al vacío en un rotaevaporador Caframo WB 2000® (rendimiento 100 g) a partir del que se obtuvo la acetogenina empleando el procedimiento de González-Esquina (2001).

El producto obtenido fue identificado por el Dr. Diego Cortes del Departamento de Farmacología, Laboratorio de Farmacognosia de la Universidad de Valencia, España como rolliniastatina-2.

### *Susceptibilidad de las bacterias a la acetogenina*

Las cepas bacterianas ensayadas fueron: *Bacillus subtilis* (ATCC 6051), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) y *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) provenientes del cepario de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional. Los cultivos fueron mantenidos a 4°C en agar soya tripticaseína y se transfirieron a placas de agar Mueller Hinton por 24 h a 37°C.

Rolliniastatina-2 se disolvió en etanol al 70%, para la prueba de sensibilidad a las 18 h se ensayaron concentraciones de 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 236 y 512 µg/mL (3.21, 6.43, 12.89, 25.72, 51.44, 102.89, 205.78, 411.57 y 823.15 nmol/mL). También se prepararon concentraciones de

1, 2, 4, 8, 16, 32 y 64 ng/mL (0.0016, 0.00321, 0.00643, 0.01286, 0.02572, 0.05144 y 0.10289 nmol/mL) para realizar el ensayo de sensibilidad de 7 horas.

La evaluación del efecto de las ACG se realizó con el método macrodilución en caldo de Andrews (2001) y la estandarización espectrofotométrica del estándar 0.5 de McFarland empleando el de Cona (2002).

Después de sembrar cada bacteria en agar Mueller Hinton (BBL®) e incubar por 24 h a 37°C, se tomaron desde 3 hasta 5 colonias y se cultivaron en caldo Mueller Hinton (BBL®) a 37°C por aproximadamente 3-5 horas, se ajustó la turbidez al estándar 0.5 de McFarland (absorbancia 0.1 a 625 nm) por lo que el inóculo contiene aproximadamente  $1.5 \times 10^8$  unidades formadoras de colonia/mL (UFC/mL) o Bact/mL; posteriormente a celdas estériles con 0.95 mL de caldo Mueller Hinton y 1 mL del inóculo bacteriano se les añadieron 50 µL de las diferentes concentraciones de rolliniastatina-2 (2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 236 y 512 µg/mL). Los tubos se incubaron a 37°C por 18 horas. Los controles fueron un inóculo de  $1.5 \times 10^8$  UFC/mL sin compuesto y otro con etanol al 70%. El efecto sobre la proliferación de las bacterias se determinó por turbidimetría en un espectrofotómetro Genesys 10uv THERMO a 625 nm. Todas las pruebas se realizaron por triplicado. Se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento con la siguiente fórmula =  $100 - [(medida \text{ del crecimiento del experimento} / medida \text{ del crecimiento del control}) \times 100]$  (Javor, 1983).

Se realizó el mismo procedimiento pero con concentraciones menores: 1, 2, 4, 8, 16, 32 y 64 ng/mL y también se determinó el efecto sobre el crecimiento de las bacterias en un lapso de 7 horas, para ello se realizó el procedimiento anterior con las siguientes modificaciones: se empleó un inóculo de  $1.5 \times 10^4$  UFC/mL que se obtuvo por dilución del inóculo de  $1.5 \times 10^8$  UFC/mL, se emplearon 7 concentraciones de la ACG en concentraciones de ng/mL y se realizaron lecturas en un espectrofotómetro y cada hora durante 7 horas. Todas las pruebas se realizaron por triplicado. En este último caso los resultados indican el efecto de las ACG en la disminución del número de bacterias en el medio de ensayo.

## Resultados y discusión

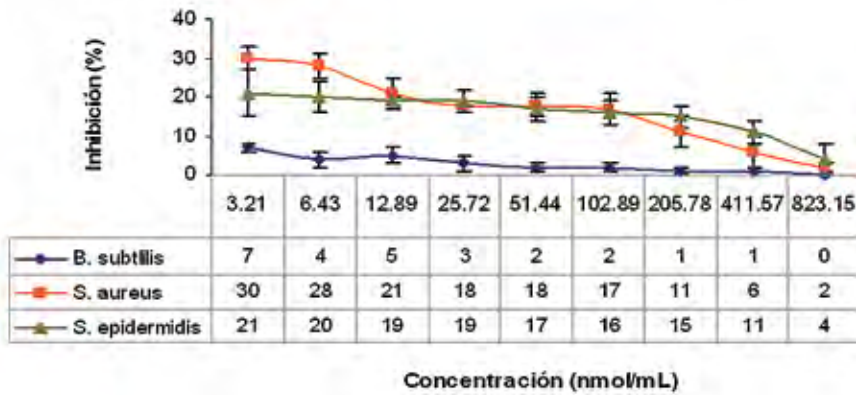
Se seleccionaron semillas de *A. diversifolia* porque son fuente de ACG (Reyes Trejo *et al.*, 1997; de la Cruz Chacón, 2001; González Esquinca, 2001). Así, del extracto hexánico se obtuvieron 15 mg de rolliniastatina-2.

Algunas ACG con estructura bis-tetrahidrofurano adyacente (THF), adyacentes y lactona insaturada muestran actividad inhibitoria sobre bacterias (Padmaja *et al.*, 1993; Rhaman *et al.* 2005). La ACG utilizada en este trabajo también es bis-THF adyacente. Por ello y debido a que está documentado que las ACG actúan sobre el Complejo I se eligieron para realizar el ensayo bacterias Grampositivas aeróbicas.

### *Ensayo a las 18 h utilizando concentraciones en µg/mL*

Para conocer el potencial antimicrobiano de rolliniastatina-2 se realizó una primera evaluación con concentraciones del orden de µg/mL ya que existen reportes de ACG que inhiben el crecimiento bacteriano en dichas concentraciones.

Las bacterias *B. subtilis*, *S. aureus* y *S. epidermidis* fueron sensibles a rolliniastatina-2 ( $P < 0.000$ ); no se encontró un efecto concentración-dependencia ( $r = -0.815$ ;  $r = -0.811$ ;  $r = -0.775$ ) sino por el contrario, el mayor efecto se encuentra en la concentración más baja, 3.21 nmol/mL (2 µg/mL), las dos especies de *Staphylococcus* son las más sensibles ( $P < 0.000$ ) en tanto que en *B. subtilis* la inhibición es pequeña (gráfica 1).



Gráfica 1. Efecto inhibitorio de rolliniastatina-2 sobre el crecimiento de bacterias Grampositivas. A las 18 h de exposición en medio líquido, el porcentaje de inhibición se determinó con relación al control sin compuesto

Rolliniastatina-2 con la menor concentración (3.21 nmol/mL=2 µg/mL) presentó mayor actividad sobre *S. aureus* (30%), siendo 9% mayor que la inhibición de *S. epidermidis* y 23% más a la de *B. subtilis*.

La diferencia antiproliferativa a las 18 h dependió de la especie bacteriana, mostrando una actividad diferencial documentada para las ACG en éstos (Padmaja *et al.*, 1993; Rahman *et al.*, 2005) y otros sistemas biológicos (Rupprecht *et al.*, 1990; Alali *et al.*, 1999; Tormo *et al.*, 1999; Hu *et al.*, 2003; Bermejo *et al.*, 2005). Por ejemplo, *B. subtilis* es la bacteria menos “sensible” a la rolliniastatina-2 (7%), sin embargo inhibe el crecimiento de *S. aureus* hasta en un 30%.

Se ha señalado que las ACG despliegan efectos inhibitorios muy potentes en concentraciones muy bajas, por ejemplo la trilobacina y la asimincina muestran valores de dosis efectiva media (DE<sub>50</sub>) menores a 10-12 µg/mL en varias líneas celulares tumorales humanas, incluso superiores al taxol (Oberlies *et al.*, 1997; Alali *et al.*, 1999; Li *et al.*, 1999). Esto también se puede apreciar en las bacterias de este ensayo: 3.21 nmol/mL.

En la bibliografía no hay datos para realizar una buena comparación con los resultados obtenidos, los más cercanos son los de Padmaja *et al.*



(1993) y Rahman *et al.* (2005) aunque estos autores usan la técnica de difusión en medio sólido y en este trabajo el de dilución en caldo, por tanto sus resultados y los obtenidos en esta investigación sólo señalan si la ACG tiene o no efecto sobre las bacterias comunes a ambos ensayos.

Rahman *et al.* (2005) con escuamocina (ACG bis-THF con lactona insaturada cuya diferencia radica en la posición de un -OH) en concentraciones de 200 µg/disco reportaron halos de inhibición en las bacterias Grampositivas *S. aureus* (15 mm) y *B. subtilis* (12 mm) coincidiendo con los resultados obtenidos en esta investigación ya que rollinistatina-2 fue más potente sobre *S. aureus* (30%) y difiriendo en *B. subtilis* ya que con esta ACG la inhibición es muy pequeña (7%).

Dado que en esta investigación el porcentaje de inhibición no llegó al 50% es posible que el peptidoglucano de la pared celular de las bacterias Grampositivas participe como barrera.

### ***Ensayo a las 7 h utilizando concentraciones en ng/mL***

En función de los resultados anteriores, en los que las concentraciones menores son más potentes y producen los mayores porcentajes de inhibición, se decidió realizar un ensayo con concentraciones menores, aunque las pruebas de inhibición bacteriana frente a compuestos de plantas no se realizan en concentraciones tan pequeñas por su bajo nivel de actividad, especialmente sobre las bacterias Gramnegativas (Tegos *et al.*, 2002); se consideró la potencia de la ACG para medir el efecto inhibitorio, se emplearon siete concentraciones de rolliniastatina-2 (cuadro 1) así como un inóculo bacteriano menor y la densidad óptica se midió a un menor tiempo (7 horas).

Bajo las condiciones del experimento los resultados obtenidos (cuadro 1) indican que *S. aureus* es más sensible (43.68%) seguida de *S. epidermidis* (33.81%) y *B. subtilis* fue menos sensible (29.94%) (cuadro 1).

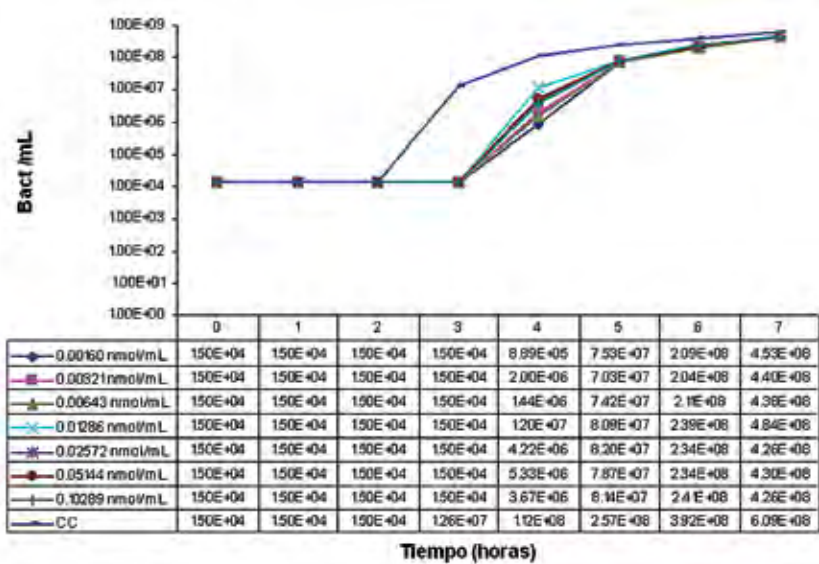
Cuadro 1. Actividad inhibitoria de rolliniastatina-2 sobre el crecimiento de bacterias Grampositivas. A la 7 h de exposición en medio líquido, el porcentaje de inhibición se determinó con relación al control sin compuesto

ng/mL	nmol/mL	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>
		% de inhibición		
1	0.0016	25.56	27.18	25.83
2	0.00321	27.66	38.06	33.81
4	0.00643	27.66	37.31	28.22
8	0.01286	20.54	43.68	23.96
16	0.02572	29.94	35.62	26.09
32	0.05144	29.3	28.5	32.48
64	0.10289	29.94	11.06	27.42

En la séptima hora de exposición los mayores porcentajes de inhibición se produjeron frente a *S. aureus* (43.68%, 0.01286 nmol/mL=8 ng/mL), *S. epidermidis* (33.81%, 0.00321 nmol/mL=2 ng/mL) y *B. subtilis* (29.94%, 0.10289 nmol/mL=64 ng/mL). Los porcentajes de inhibición a la séptima hora señalaron que todas las bacterias son sensibles a la ACG, aunque con valores de inhibición diferentes. Ninguna de las bacterias Grampositivas presentó una relación concentración-dependencia. Los porcentajes de inhibición son mayores a los obtenidos con las mayores concentraciones evaluadas (3.21 a 823.15 nmol/mL=2 a 512 mg/mL), pero sin llegar al 50%.

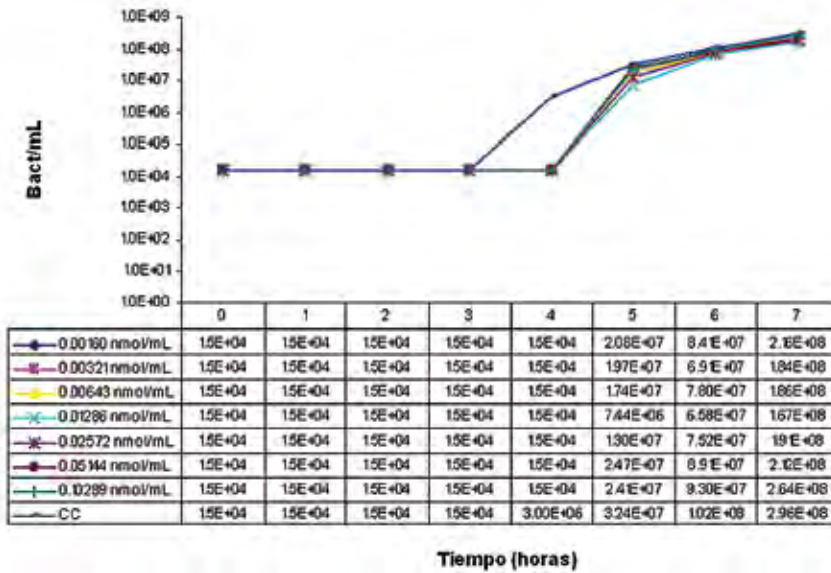
### *Ensayo durante 7 h utilizando concentraciones en ng/mL*

Con el fin de determinar el efecto de la ACG sobre el aumento poblacional de cada bacteria se realizó la lectura de cada una de las concentraciones evaluadas cada hora durante 7 h. El número de bact/mL de la curva de crecimiento del control de *B. subtilis* aumentó a partir de la segunda hora. El mayor efecto de la rolliniastatina-2 se observó a partir de la tercera hora de exposición con todas las concentraciones. Entre la cuarta y sexta hora prácticamente todas las concentraciones tienen el mismo efecto. En la séptima hora el crecimiento de los tratamientos es igual al del control del crecimiento (gráfica 2).



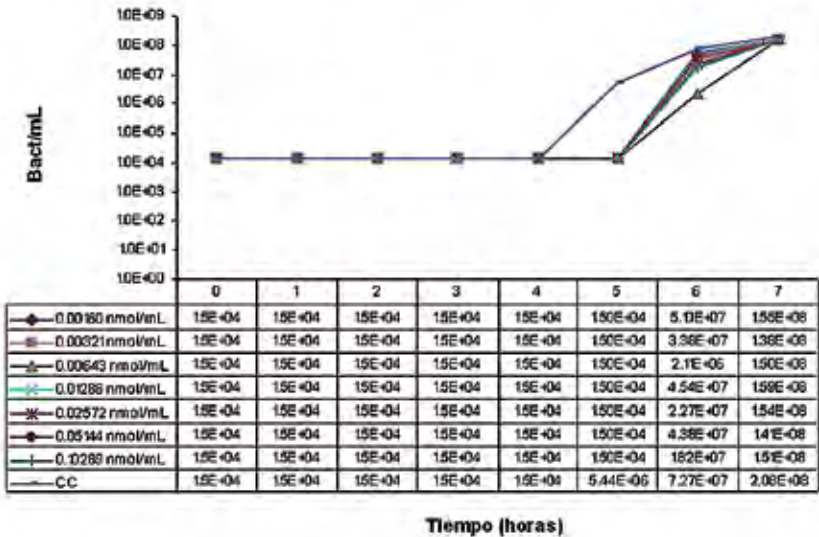
Gráfica 2. Efecto de rolliniastatina-2 sobre el crecimiento poblacional de *B. subtilis*

El número de bact/mL de la curva de control del crecimiento de *S. aureus* y las expuestas a las concentraciones de rolliniastatina-2 hasta la hora tres no presentaron variación. El mayor efecto se observó en la cuarta hora de exposición con todas las concentraciones. En la quinta hora algunas de las concentraciones de la ACG tuvieron una ligera actividad pero en la sexta y séptima hora el efecto fue muy parecido. El comportamiento con las diferentes concentraciones es bastante semejante a la del control del crecimiento bacteriano, excepto en la cuarta hora (gráfica 3).



Gráfica 3. Efecto de rolliniastatina-2 sobre el crecimiento poblacional de *S. aureus*

La cantidad de bacterias de la curva de crecimiento de *S. epidermidis* y los tratamientos hasta la cuarta hora no presentaron variación. En la quinta hora se observó la acción de todas las concentraciones empleadas; en la sexta y séptima el efecto de la rolliniastatina-2 fue muy ligero, excepto en la sexta hora con la concentración de 0.0643 nmol/mL (4 ng/mL) (gráfica 4).



Gráfica 4. Efecto de rolliniastatina-2 sobre el crecimiento poblacional de *S. epidermidis*

En los ensayos en los que se evaluó la actividad con relación al número de bact/mL se observó que la inhibición del crecimiento poblacional bacteriano se detecta en distintos tiempos asociados a una prolongación de la fase lag (de latencia) o a un retraso en el inicio de la fase log (logarítmica) de las bacterias expuestas a la ACG, efecto que tal vez pudiera estar asociado con la pared celular.

La sensibilidad hacia rolliniastatina-2 se manifestó a diferentes tiempos, aunque los resultados obtenidos indicaron que no existen grandes diferencias entre el número de bact/mL del control y los ensayos, excepto en *B. subtilis* expuesta a rolliniastatina-2.

## Conclusiones

- Rolliniastatina-2 tiene efecto inhibitorio sobre el crecimiento de las tres bacterias Grampositivas ensayadas.

- A las 18 h el mayor porcentaje de inhibición se produjo con la menor concentración evaluada en las tres bacterias (3.21=2 µg/mL) mientras que a la séptima hora se produjeron con concentraciones diferentes.

-El mayor efecto inhibitorio de rolliniastatina-2 se produjo sobre *S. aureus* en los dos tiempos de exposición ensayados.

-La actividad de rolliniastatina-2 fue mayor con las concentraciones menores y es independiente del tiempo de exposición.

-Con un inóculo y concentraciones menores se produjo el retraso del inicio de la fase logarítmica de crecimiento de las bacterias.

-Los resultados sugieren que la pared celular de las bacterias ensayadas funciona como barrera para la entrada de la ACG.



## Referencias

- Alali, F.Q.; Liu, X.X. and McLaughlin, J.L. 1999. Annonaceous acetogenins: recent progress. *J. Nat. Prod.* 62: 504-540.
- Alvarez Colom, O., Neske, A., Popich, S. and Bardón, A. 2007. Toxic effects of annonaceous acetogenins from *Annona cherimolia* (Magnoliales: Annonaceae) on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Pest Science.* 80: 63-67.
- Alvarez Colom, O., Neske, A., Chaboune, N., Zafra-Polo, M.C. and Bardón, A. 2009. Tucupentol, a novel mono-tetrahydrofuranic acetogenin from *Annona montana*, as a potent inhibitor of mitochondrial complex. *Chemical Biodiversity.* 6 (3): 335-340.
- Alves Rodrigues dos Santos Lima, L., Pinheiro, Santos Pimenta, L. and Diamantino Boaventura, M.A. 2009. Two new adjacent bis-tetrahydrofuran annonaceous acetogenins from seeds of *Annona cornifolia*. *Planta Medica.* 75: 80-83.
- Andrews, J.M. 2001. Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 48 (Suppl. S1): 5-16.
- Bermejo, A., Figadère, B., Zafra-Polo, M.C., Borrachina, I., Estornell, E. and Cortes, D. 2005. Acetogenins from Annonaceae: recent progress in isolation, síntesis and mechanisms of action. *Natural Product Report.* 22: 269-303.



- Cavé, A., Figaderè, B., Laurens, A. and Cortes, D. 1997. Acetogenins from Annonaceae. In: Hertz, W., Kirby, G. W., Moore, R. E., Steglich, W. and Tamm, Ch. (Ed.). *Progress in the chemistry of organic natural products* 70. SpringerWienNewYork. Austria. Pp. 81-288.
- Cepleanu, F., Ohtani, K., Hamburguer, M., Hostettman, K., Gupta, M.P. and Solís, P. 1993. Novel acetogenins from the leaves of *Annona purpurea*. *Helvetica Chimica Acta*. 76 (3): 1379-1388.
- Cona T., E. 2002. Condiciones para un buen estudio de susceptibilidad mediante test de difusión en agar. *Revista Chilena de Infectología*. 19 (Supl. 2): 77-81.
- De la Cruz Chacón, I. 2001. Acetogeninas bioactivas de *Annona diversifolia* Saff. Tesis de Licenciatura. Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. México. 85 pp.
- Domingo, E. y López-Brea, M. 2003. Plantas con acción antimicrobiana. *Revista Española de Quimioterapia*. 16 (4): 385-393.
- González-Coloma, A., Guadaño, A., de Inés, C., Martínez-Díaz, R. and Cortes, D. 2002. Selective action of acetogenin mitochondrial complex I inhibitors. *Z. Naturforsch.* 57c: 1028-1034.
- González Esquinca, A.R. 2001. Contribución al estudio del género *Annona* (Annonaceae). Análisis fitoquímico de tres especies del Estado de Chiapas. Tesis de Doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 251 pp.
- Han, H., Sinha, M.K., D'Souza, L.J., Keinan, E. and Sinha, S.C. 2004. Total synthesis of 34-hydroxiasimicin and its photoactive derivative for affinity labeling of the mitochondrial complex I. *Chem. Eur. J.* 10: 2149-2158.

- Javor, G.T. 1983. Depression of adenosylmethionine content of *Escherichia coli* by thioglycerol. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 24 (6): 860-867.
- Jumana, S., Hasan, Ch.M. and Rashid, M.A. 2000. Antibacterial activity and citotoxicity of *Miliusa velutina*. *Fitoterapia*. 71: 559-561.
- Li, X.X., Alali, F.Q., Pilarinou, E. and MacLaughlin, J.L. 1999. Two bioactive mono-tetrahydrofuran acetogenins, annoglacins A and B, from *Annona glabra*. *Phytochemistry*. 50 (5): 816-821.
- Luna-Cazáres, L.M y González-Esquinca, A.R. 2010. Susceptibility of bacteria and complete spheroplasts of *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella Typhi* to rolliniastatin-2. *Natural Product Research*. 24 (12): 1139-1145
- Mia, M.Y., Hasa, C.M. and Reiner, R. 1997. Antibacterial activity of two acetogenins. *Bangladesh J. Bot.* 26 (1): 71-73.
- Oberlies, N.H., Croy, V.L., Harrison, M.L. and McLaughlin, J.L. 1997. The annonaceous acetogeninas bullatacin is citotoxic against multidrug-resistant mammary adenocarcinoma cells. *Cancer Letters*. 115: 73-39.
- Padjama, V., Thankamany, V. and Hisham, A. 1993. Antibacterial, antifungal and antihelminthic activities of root barks of *Uvaria hooki* and *Uvaria narum*. *Journal of Ethnopharmacology*. 40: 181-186.
- Padjama, V., Thankamany, V., Hara, N., Fujimoto, Y. and Hisham, A. 1995. Biological activities of *Annona glabra*. *Journal of Ethnopharmacology*. 48: 21-24.
- Rahman, M.M., Parvin, S., Haque, M.E., Islam, M.E. and Mosaddik, M.A. 2005. Antimicrobial and cytotoxic constituents from the seeds of *Annona squamosa*. *Fitoterapia*. 76: 484-489.

- Rakotomanga, M., Razakantoanina, V., Raunaud, S., Loiseau, P.M., Hocquemiller, R. and Jaureguiberry, G. 2004. Antiplasmodial activity of acetogenins and inhibitory effect on *Plasmodium falciparum* adenylate-translocase. *J. Chemother.* 16 (4): 350-356
- Raynaud-Le, G.S., Fourneau, C., Laurens, A., Bories, C., Hocquemiller, R. and Loiseau, P.M. 2004. *In vitro* antileishmanial activity of acetogenins from Annonaceae. *Biomed Pharmacother.* 58 (6-7): 388-392
- Reyes Trejo, B., Coeto, J.L., Peralta, M.J., Marroquín-Andrade, L., Navarrete Castro, A. y Nathan, Pedro Joseph. 1997. Laherradurina: acetogenina activa de *Annona diversifolia* Safford. Memorias del Primer Congreso Internacional de Anonáceas. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Estado de México. México. Pp. 24.
- Ruppercht, J.K., Hui, Y.H. and McLaughlin, J.L. 1990. Annonaceous acetogenins: A review. *Journal of Natural Products.* 53 (2): 237-278.
- Schlie-Guzmán, M.A., González-Esquínca, A.R. and Luna-Cazáres, L.M. 2009. Las acetogeninas de Annonaceae: efecto antiproliferativo en líneas celulares neoplásicas. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas.* 8 (4): 245-257.
- Tegos, G., Stermitz, F.R., Lomovskaya, O. and Lewis, K. 2001. Multi-drug pump inhibitors remarkable activity of plants antimicrobial. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 46 (10): 3133-3134.
- Tormo, J.R., González, M.C., Cortes, D. and Estornell, E. 1999. Kinetic characterization of mitochondrial complex I inhibitors using annonaceous acetogenins. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 369 (1): 119-126.
- Tormo, J.R., De Pedro, N., Royo, I., Barrachina, I., Zafra-Polo, M.C., Cuadrillero, C., Hernández, P., Cortes, D. and Pelaez, F. 2005. *In Vitro* antitumor structure-activity relationships of threo/trans/threo/

trans/erythro bis-tetrahydrofuranic acetogenins: correlations with their inhibition of mitochondrial complex I. *Oncol Res.* 15 (3): 129-128.

Yeaman, M.R. and, Yount, N.Y. 2003. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacological Reviews.* 55: 27-55.

Zampini, I.C.; Cudmani, N. e Isla, M.I. 2007. Actividad antimicrobiana de plantas medicinales argentinas sobre bacterias antibiótico-resistentes. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana.* 41 (3): 385-393.



# Administración *in vivo* de acetogeninas guiada por la concentración inhibitoria media *in vitro*

Schlie-Guzmán, María Adelina<sup>1</sup>, García-Carrancá, Alejandro<sup>2,3</sup>  
Gutiérrez-Jiménez, Javier<sup>1</sup>, Vidal-López, Dolores<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Ciencias Biológicas, UNICACH. adelina.schlie@unicach.mx

<sup>2</sup>Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer  
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

<sup>3</sup>Instituto Nacional de Cancerología, SS.

## Resumen

Las acetogeninas de la familia Anonaceae (ACG) son metabolitos secundarios que exhiben en las células cancerosas un gran efecto citotóxico *in vitro* (Schlie *et al.*, 2009). La actividad antitumoral *in vivo* de algunas ACG ha sido reportada y aunque los resultados son prometedores (Ahmmadsahib *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 2002) los autores no señalan razones para las dosis empleadas. En este estudio se administró *in vivo* las acetogeninas laherradura y cherimolina-2 utilizando la concentración inhibitoria media (CI<sub>50</sub>) *in vitro* en la dosis inicial. La CI<sub>50</sub> *in vitro* de las ACG se determinó a las 48 h en ensayos de proliferación en células HeLa y SW-480 en cultivo. Lotes de ratones atímicos implanta-

dos con células HeLa o SW-480 recibieron diariamente durante 20 días, diferentes dosis de acetogeninas. La dosis inicial correspondió a la  $CI_{50}$  de la ACG multiplicada por el peso del animal; las siguientes dosis fueron 10, 100 o 500 veces la dosis inicial. La doxorubicina fue empleada como compuesto antineoplásico control. La laherradurina en dosis de 100x y 500x (1.5 y 7.5 mg  $kg^{-1} día^{-1}$ ) redujo en 53 y 65% el desarrollo de los tumores de células HeLa y en 44 y 60% los de SW-480. Por su parte la cherimolina-2 hasta 100x y 500x (5 y 25 mg  $kg^{-1} día^{-1}$ ) inhibió el desarrollo de los tumores de células HeLa en 30 y 40% pero no mostró efectos significativos sobre los de SW-480. Efectos indeseables en los ratones se encontraron con 15 mg  $kg^{-1} día^{-1}$  de laherradurina y 50 mg  $kg^{-1} día^{-1}$  de cherimolina-2. Con el fin de encontrar *in vivo* el mayor efecto inhibitorio de las ACG en las células cancerosas, así como los menores efectos indeseables en los organismos receptores, un indicativo apropiado puede ser la  $CI_{50}$  de los ensayos de proliferación *in vitro*, la cual puede ser transformada a mg  $kg^{-1} día^{-1}$  y de esta forma es posible su incremento y administración en animales.

Palabras clave: laherradurina, cherimolina-2, antiproliferativo, ratones atómicos

## Introducción

Las acetogeninas de anonáceas (ACG) son metabolitos secundarios que presentan un amplio espectro de actividad biológica como la citotóxica, antitumoral, antiparasitaria y antimicrobiana (Alali *et al.*, 1999; Bermejo *et al.*, 2005; Schlie-Guzmán *et al.*, 2009).

Diversos estudios indican que las ACG son los inhibidores más potentes del Complejo I mitocondrial (NADH: ubiquinona oxidoreductasa) (Degli-Esposti *et al.*, 1994) lo que les permite exhibir un gran efecto citotóxico en las células cancerosas en cultivo induciendo la apoptosis (Yuan *et al.*, 2003; Zhu *et al.*, 2002); sin embargo, aún no se ha encontrado una correlación entre su potencia inhibitoria sobre el Complejo I mitocondrial y su actividad en las células neoplásicas (Royo *et al.*, 2003; Tormo *et al.*, 2005).

Los estudios con animales, especialmente con roedores, señalan que la actividad de las ACG puede ser comparable o inclusive superior a

algunos fármacos anti-neoplásicos. Por ejemplo, en ratones con leucemia murina (L1210), la bullatacina ( $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) y la bullatacinona ( $400 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) por vía intraperitoneal, alargaron en 38 y 44% la vida de los animales enfermos con respecto al lote control (Ahammadshahib *et al.*, 1993). En ratones BDF-1 con carcinoma murino de pulmón (LLC), la administración de  $10 \text{ mg kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$  de annonacina durante dos semanas, logró una reducción de 57.9% en el crecimiento de los tumores, porcentaje similar a la dosis de  $2 \text{ mg kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$  de doxorubicina (Wang *et al.*, 2002). En ratones atómicos implantados con células del carcinoma ovárico humano A2780, la bullatacina ( $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) y la bullatalicina ( $1 \text{ mg kg}^{-1}$ ) redujeron en 67 y 75% el crecimiento de los tumores, y semejante al tratamiento de  $5 \text{ mg kg}^{-1}$  del fármaco antitumoral cisplatina (Ahammadshahib *et al.*, 1993). A pesar de estos resultados prometedores, es difícil establecer alguna relación entre las dosis empleadas en los diferentes trabajos. Por ello, se decidió utilizar como criterio la concentración inhibitoria media de las acetogeninas en los cultivos celulares y multiplicarlo por los gramos de peso del animal experimental. Esta conversión en  $\text{mg kg}^{-1}$  permite que la concentración pueda ser incrementada hasta encontrar el mayor efecto inhibitorio en el desarrollo de los tumores y el menor efecto tóxico en los animales tratados.

En este estudio, las acetogeninas laherradurina (bis THF adyacente con una lactona terminal  $\beta$ -hidroxil  $\gamma$  metil saturada) reportada como uno de los inhibidores más potentes del Complejo I mitocondrial (Warmerdam *et al.*, 1998; Tormo *et al.*, 2001) y la cherimolina-2 (bis THF no adyacente  $\gamma$ -lactona) con actividades citotóxicas (Cortes *et al.*, 1993) (figura 1), fueron utilizadas para analizar el efecto de su administración en ratones implantados con células cancerosas humanas de cérvix HeLa y de colon SW-480 a partir de la concentración inhibitoria media exhibida en las células en cultivo.



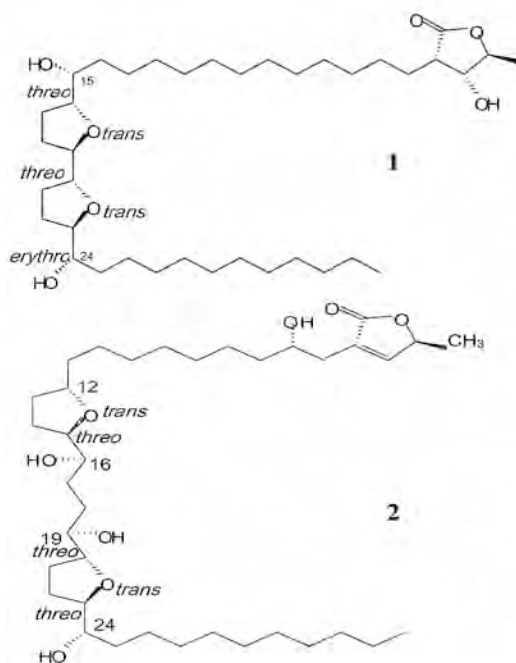


Figura 1. Estructura química de (1) laherradura y (2) cherimolina-2

## Método

Las acetogeninas y el fármaco antineoplásico doxorubicina (Doxolem<sup>®</sup> RU. Lemery, S.A. de C.V. México) fueron inicialmente disueltos en dimetil sulfóxido (DMSO) para los ensayos de proliferación *in vitro* o en EtOH para la actividad antitumoral *in vivo* (soluciones madre). Las líneas humanas de carcinoma cervical (HeLa) y adenocarcinoma colorectal (SW-480) (ATCC Manassas, VA. USA) se mantuvieron con medio de cultivo D-MEM/F12 suplementado con 10% de suero fetal bovino y antibióticos (100 unidades/mL de penicilina y 100 pg/mL de estreptomycin) a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>. Para los ensayos, las células se cosecharon de los cultivos durante su fase exponencial de crecimiento con 0.25% (w/v) tripsina- 0.53 mM EDTA en buffer salino de fosfatos (PBS).

### ***Obtención de la concentración inhibitoria media (CI<sub>50</sub>) de las acetogeninas en los cultivos celulares***

Las células fueron sembradas en placas de 96 pozas a una densidad de 10,000 células por poza. Después de 24 h, las soluciones madre de acetogeninas o doxorubicina se diluyeron en medio de cultivo y se agregaron en las pozas para su concentración final de 20, 10, 1, 0.1, 0.01, 0.001 y 0.0001 µg/mL (desde 1.3 hasta  $1 \times 10^{-4}$  log µg/mL).

La proliferación celular se analizó después de 48 h agregando 10 µl de azul de tetrazolio (MTT) (5 mg/mL) a cada poza e incubando por 4 horas adicionales, posteriormente el medio de cultivo se reemplazó con 100 µL de DMSO y el color desarrollado se midió en un lector de microplacas (Biorad, Hércules CA, USA) a 570 nm de longitud de onda. Cada ensayo se realizó en cuatro ensayos independientes.

El porcentaje de la inhibición de la proliferación se calculó como:  $IP (\%) = [100 - (\text{valor medio de las células tratadas} / \text{valor medio de las células control})] / 100$ . La concentración de acetogeninas que redujo al 50% la proliferación celular en relación al control (CI<sub>50</sub>) fue determinado gráficamente mediante las curvas de concentración-respuesta.

### ***Administración de las acetogeninas en los ratones implantados con las células neoplásicas***

Se utilizaron ratones atímicos de seis semanas de edad y peso aproximado de 15 g provenientes del Instituto Nacional de Ciencias Medicas y Nutrición Salvador Subirán, México. Los animales se cuidaron de acuerdo con los principios y lineamientos de la Asociación Mexicana para Animales de Laboratorio (AMCAL), en jaulas con aire filtrado y acceso libre a la comida y agua. Para los ensayos, los ratones se inocularon subcutáneamente en el lomo con células HeLa ( $1 \times 10^6$ ) o SW-480 ( $5 \times 10^6$ ). Después de 24 h, grupos de 5 ratones recibieron subcutáneamente en la base del tumor, diariamente durante dos semanas, las diferentes concentraciones de ACG disueltas en 0.1 mL de solución de NaCl al 0.9%. Los animales control recibieron 0.1 mL de la solución vehículo.

Se utilizó como dosis inicial la concentración de la  $CI_{50}$  obtenida de los ensayos de proliferación *in vitro*, multiplicada por el peso del animal (1x). Los siguientes grupos de ratones recibieron 10, 100, y 500 veces la concentración de la dosis inicial (10x, 100x y 500x). Laherradurina también se utilizó en un lote de animales en la dosis de 1000x (15 mg  $kg^{-1} día^{-1}$ ).

Los tumores se midieron con un vernier cada 48 h y su tamaño en  $mm^3$  se calculó con la fórmula (largo x ancho<sup>2</sup>)/2. El porcentaje de reducción en el crecimiento de los tumores se obtuvo como:  $RT (\%) = 100 - [(valor\ medio\ del\ grupo\ tratado / valor\ medio\ del\ grupo\ control) / 100]$  (Wang *et al.*, 2002).

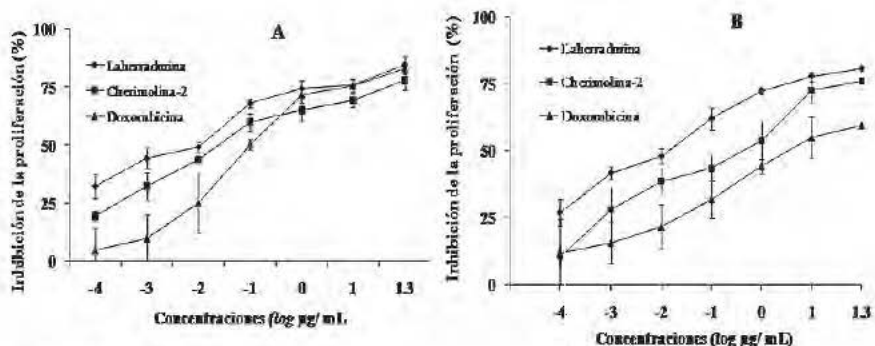
La diferencia estadística entre los grupos experimentales y el grupo control se calculó con la prueba de ANDEVA y la de *a posteriori* de Bonferroni en donde  $P < 0.05$  fue considerado significativo.

## Resultados y discusión

### *Efecto de las acetogeninas en los cultivos celulares*

Después de 48 h de exposición a las acetogeninas, los resultados mostraron que la proliferación de las células HeLa y SW-480 tuvo una reducción dependiente de la concentración de los compuestos. Así, laherradurina a concentración de 20, 0.01 y 0.0001  $\mu g mL^{-1}$ , disminuyó la reproducción de las células HeLa en 85, 49 y 32% y mostró una  $CI_{50}$  de 0.015  $\mu g mL^{-1}$ . A estas mismas concentraciones, la inhibición sobre las células SW-480 fue de 80.5, 48.0 y 27.1% respectivamente y un  $CI_{50}$  cercano a 0.015  $\mu g mL^{-1}$ .

Por su parte la cherimolina-2 redujo la proliferación de las células HeLa en 78, 43 y 19.5% a las concentraciones de 20, 0.01 y 0.0001  $\mu g mL^{-1}$ , y presentó una  $CI_{50}$  de 0.05  $\mu g mL^{-1}$ ; en tanto que en las células SW-480 su efecto fue de 76, 38.6 y 10.5% de descenso en las concentraciones arriba mencionadas y un valor de  $CI_{50}$  de 0.5  $\mu g mL^{-1}$ . Ambas acetogeninas fueron más activas que la doxorubicina que tuvo una  $CI_{50} = 0.1 \mu g mL^{-1}$  sobre las células HeLa y de 5  $\mu g mL^{-1}$  sobre SW-480 (gráficas 1A y 1B; cuadro 1).



Gráfica 1. Inhibición de la proliferación celular *in vitro* de HeLa (A) y SW-480 (B). Los valores están expresados como porcentajes en relación al grupo control. Los valores de las concentraciones se encuentran en escala logarítmica

Cuadro 1. Actividad *in vitro* de las acetogeninas y de la droga control en las líneas neoplásicas humanas

Concentración inhibitoria media (CI <sub>50</sub> ) (mg mL <sup>-1</sup> )			
Células	Laherradurina	Cherimolina-2	Doxorubicina
HeLa	0.015	0.05	0.1
SW-480	0.015	0.5	5.0

Nuestros ensayos de proliferación *in vitro* señalan que las ACG fueron más activas que el fármaco antineoplásico doxorubicina, siendo laherradurina en comparación con la cherimolina 3.3 veces más activa en las células HeLa y 33 veces en las SW-480. La proliferación de ambas líneas tumorales fue inhibida por laherradurina con una CI<sub>50</sub> semejante, pero presentaron diferencias con la cherimolina-2, en donde las células HeLa fueron 10 veces más susceptibles que las SW 480.

Los estudios previos con las ACG como agentes inhibidores de la proliferación de líneas celulares en cultivo, señalan algunas tendencias en la actividad de estos compuestos: pueden ser más citotóxicas en las líneas cancerosas que algunas drogas antineoplásicas; las ACG bis THF adyacentes son más activas que las bis THF no adyacentes (Oberlies *et*

al., 1995; Oberlies *et al.*, 1997) y existe diferencias notables en la susceptibilidad de las líneas celulares hacia la misma ACG (Royo *et al.*, 2003; Tormo *et al.*, 2005).

Los estudios de inhibición sobre el Complejo I mitocondrial que buscan la relación entre la estructura de las ACG y su actividad, señalan que la cadena alifática con 13 átomos de carbono del espaciador que une el sistema THF al anillo  $\gamma$ -lactónico en la moléculas de estos compuestos, pudiera ser un factor esencial para exhibir una mayor potencia inhibitoria (Miyoshi *et al.*, 1998; Takada *et al.*, 2000; Abe *et al.*, 2005). La molécula de laherradurina contiene en su cadena espaciadora el largo mencionado, en tanto que la cherimolina-2 con un sistema THF no adyacente y una cadena espaciadora más corta pudiera tener una conformación menos apropiada. Estas diferencias podrían explicar sus diferentes comportamientos en las líneas celulares, sin embargo la laherradurina ha sido reportada como un potente inhibidor del Complejo I mitocondrial, con actividad superior a la rolliniastatina-1 y la cherimolina -1 (Tormo *et al.*, 2001).

### *Efecto de las dosis de acetogeninas en el desarrollo de los tumores in vivo*

La concentración de las ACG administradas a los ratones atímicos fue variable de acuerdo a la  $CI_{50}$  exhibida en los ensayos de proliferación (cuadro 2). En general, las ACG inyectadas diariamente en un periodo de 20 días, tuvieron un efecto inhibitorio en el desarrollo de los tumores, dependiendo de la dosis utilizada.

Cuadro 2. Dosis de acetogeninas administradas en los grupos de ratones atímicos

	1x	10x	100x	500x	1x	10x	100x	500x
Línea celular	Laherradurina*				Cherimolina-2*			
HeLa	0.015	0.15	1.5	7.5	0.05	0.5	5.0	25.0
SW-480	0.015	0.15	1.5	7.5	0.5	5.0	50	250
* mg kg <sup>-1</sup> día <sup>-1</sup>								

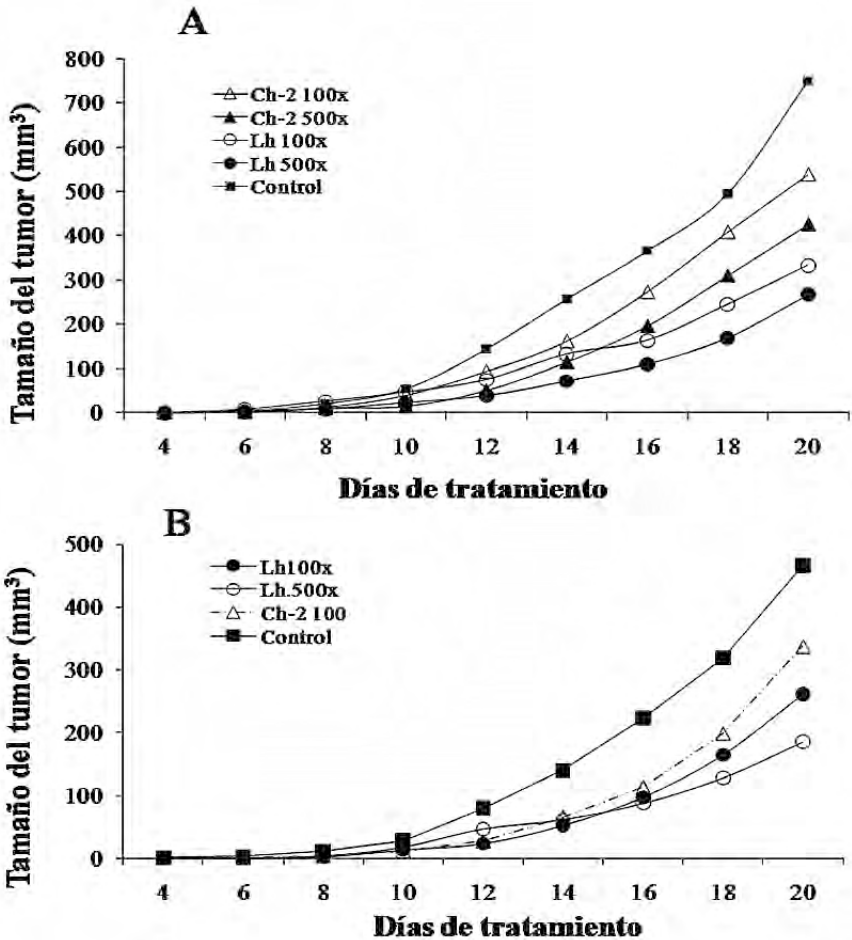
### ***Efecto en los tumores inducidos de células HeLa***

En los animales que recibieron las concentraciones de 10x, 100x, y 500x de la herradurina (Lh), se halló una reducción significativa del tamaño final de los tumores de 39.6, 53.6 y 64% respectivamente con relación al grupo control; en las últimas dos concentraciones, las diferencias estadísticas se encontraron desde los días 15 y 11 respectivamente. En los animales que recibieron la dosis de 1000x ( $15 \text{ mg kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$ ) si bien el desarrollo de los tumores fue mínimo, manifestaron a partir del cuarto día de tratamiento una pérdida importante de peso, inestabilidad en sus movimientos y finalmente murieron. Por estas razones se decidió suspender la administración de ACG a esta concentración o mayores.

Por su parte la cherimolina-2 (Ch-2) redujo significativamente los tumores en 30% con las dosis de 100x y en 43.4% con la de 500x; con la dosis más alta, la reducción de los tumores de manera significativa se inició el día 13 de tratamiento (gráfica 2A). El fármaco antineoplásico doxorubicina tuvo efectos con valores intermedios entre ambas acetogeninas y no se encontró diferencias significativas entre los animales tratados con las acetogeninas y el fármaco control en dosis similares.

### ***Efecto en los tumores de células SW-480.***

La herradurina también afectó el desarrollo de los tumores de SW-480 en un 29% en la dosis 10x y de manera significativa por las dos más altas; la dosis 100x inhibió el desarrollo tumoral en 44% y la de 500x en 60 %.



Gráfica 2. Inhibición del desarrollo de los tumores *in vivo* de HeLa (A), células SW-480; (B). Diferencias estadísticas se encontraron en todas las dosis mostradas

Debido a que en los ensayos de proliferación *in vitro* las células SW-480 mostraron ser 10 veces menos susceptibles a la cherimolina-2 que las células HeLa, las dosis de esta acetogenina se incrementó considerablemente. Así, la dosis 100x inyectada a los animales implantados con célu-

las SW-480, contenía dos veces la concentración de cherimolina-2 que la administrada como 500x en los ratones con HeLa ( $50$  vs  $25$   $\text{mg kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$ ) (cuadro 2). Al finalizar el tratamiento, la dosis 10x no produjo reducciones significativas y las siguientes indujeron en los animales, pérdida de peso e inestabilidad de sus movimientos. Con la dosis 100x ( $50$   $\text{mg kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$ ) únicamente un animal continuó vivo al finalizar el tratamiento (línea punteada, gráfica 2B) y ninguno de ellos en la dosis de 500x ( $250$   $\text{mg kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$ ).

Se ha reportado que  $200$   $\mu\text{g kg}^{-1}$  de bullatacina es tóxica en los animales, en tanto que  $100$   $\mu\text{g/kg}^{-1}$  inhibe el desarrollo de los tumores de carcinoma ovárico humano A2780 en 68%, aunque la mortalidad de los animales es aún del 25% (Ahammadsahi *et al.*, 1993). En nuestros resultados la dosis 10x de laherradurina correspondiente a  $150$   $\mu\text{g kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$  mostró una reducción final de 40% sobre los tumores de células HeLa y de 29% en los de SW-480. Más aún, el incremento de 10 y 50 veces de laherradurina equivalentes a  $1.5$  y  $7.5$   $\text{mg kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$  inhibió el desarrollo de los tumores de células HeLa en 53 y 65%, en tanto que en los de células SW-480 esta inhibición correspondió a 44 y 60%; las reducciones significativas se encontraron en las dosis con mayor contenido de ACG en tiempo cada vez más temprano.

Nuestros resultados señalan que laherradurina es efectiva en inhibir el desarrollo de los tumores de células HeLa entre  $0.15$  y  $7.5$   $\text{mg kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$  y de SW-480 entre  $1.5$  a  $7.5$   $\text{mg kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$ , con porcentajes semejantes a lo descrito con  $10$   $\text{mg/kg}$  de la mono-THF annonacina (Wang *et al.*, 2002) y  $1$   $\text{mg kg}^{-1}$  de bullatalicina (Ahammadsahi *et al.*, 1993) donde ningún animal murió al igual que en nuestros ensayos. La muerte de los animales con  $15$   $\text{mg kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$  de laherradurina (1000x) sugiere que si bien la actividad de la ACG sobre las células tumorales es potente, también pueden actuar sobre las células normales afectando severamente al organismo. Estos resultados pudieran señalar que los límites entre las dosis terapéuticas vs las tóxicas de laherradurina en estos animales se encuentra entre  $7.5$  hasta  $15$   $\text{mg kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$ .

El efecto significativo de la cherimolina-2 en los animales implantados con células HeLa se encontró en las dosis 100x y 500x al igual que laherradurina, aunque debe resaltarse que su concentración fue 3.3 veces mayor ( $1.5$  y  $7.5$  de laherradurina vs  $5.0$  y  $25$   $\text{mg kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$  de cheri-



molina-2); más aún, la concentración de  $50 \text{ mg kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$  suscitó efectos indeseables en los ratones implantados con células SW-480, lo que pudiera señalar que las dosis terapéuticas de esta ACG son más elevadas y con peligro de llegar a efectos indeseables. Así, tanto laherradurina como la cherimolina-2 presentaron concentraciones perjudiciales en los animales que pudieran ser el resultado de su actividad inhibitoria sobre el Complejo I mitocondrial.

Cuadro 3. Reducción final de los tumores en los animales que recibieron las concentraciones 100 y 500 veces la  $CE_{50}$  de laherradurina y la cherimolina-2

	Dosis analizada		Porcentaje de reducción en el tamaño de los tumores (tratados vs controles)	
		$\text{mg kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$	HeLa	SW-480
<b>Laherradurina*</b>	100x	1.5	55	45
	500x	7.5	65	60
<b>Cherimolina-2</b>	100x	5.0	30	
	500x	25.0	40	
	100x	50		38**
	500x	NA		NA
* Se administró concentraciones iguales de la ACG.				
** Un animal sobreviviente al término del tratamiento				
NA. No analizada				

Uno de mayores problemas durante la quimioterapia en los pacientes con cáncer, es la expresión de mecanismos de resistencia a los fármacos en las células malignas, lo que puede llevar a la ineficacia del tratamiento oncológico. Las ACG son candidatas en el desarrollo de fármacos antineoplásicos debido a que aún no se conocen mecanismos de resistencia a ellas por parte de las células tumorales (Oberlies *et al.*, 1997). Sin embargo, es necesario encontrar métodos que permitan comparar los diferentes estudios con animales, y valorar adecuadamente

te su actividad en las células blanco vs los efectos negativos que puede desarrollar en los organismos receptores (Champy *et al.*, 2004). En el caso de la administración de las acetogeninas esto es un aspecto crucial, debido a que la inhibición del Complejo I mitocondrial pudiera suscitar niveles reducidos de ATP en las células normales, afectando seriamente su funcionamiento.

## Conclusión

Nuestros resultados muestran un enfoque razonable para el diseño de las dosis de ACG a ser administradas *in vivo* a partir de la concentración inhibitoria media ( $CI_{50}$ ) obtenidas de los ensayos de proliferación celular *in vitro*.



## Referencias

- Abe, M., Murai, M., Ichimaru, N., Kenmochi, A., Yoshida, T., Kubo, A., Kimura Y., Moroda, A., Makabe, H., Nishioka, T. and Miyoshi, H. 2005. Dynamic function of the alkyl spacer of acetogenins in their inhibitory action with mitochondrial complex I (NADH-ubiquinone oxidoreductase). *Biochemistry*. 44 (45): 14898-14906.
- Ahammadsahib, K.I., Hollingworth, R.M., McGovren, J.P., Hui, Y.H. and McLaughlin, J.L. 1993. Mode of action of bullatacin: a potent anti-tumor and pesticidal annonaceous acetogenin. *Life Sci*. 53:1113-1120.
- Alali, F.Q., Liu, X.X. and McLaughlin, J.L. 1999. Annonaceous acetogenins. Recent progress. *J Nat Prod*. 62: 504-540.
- Bermejo, A., Figadère, B., Zafra-Polo, M.C., Barrachina, I., Estornell, E. and Cortes, D. 2005. Acetogenins from annonaceae: recent progress in isolation, synthesis and mechanisms of action. *Nat Prod Rep*. 22: 269-303.
- Champy, P., Höglinger, G.U., Féger, J., Gleye, C., Hocquemiller, R., Laurens, A., Guérineau, V., Laprèvote, O., Medja, F., Lombe's, A., Michel, P.P., Lannuzel, A., Hirsch, E.C. and Ruberg, M. 2004. Annonacin, a lipophilic inhibitor of mitochondrial complex I, induces nigral and striatal neurodegeneration in rats: possible relevance for atypical parkinsonism in Guadeloupe. *J Neurochem*. 88(1): 63-69.

- Cortes, D., Myint, S.H., Dupont, B. and Davoust, D. 1993. Bioactive acetogenins from seeds of *Annona cherimolia*. *Phytochemistry*. 32: 1475-1482.
- Degli-Esposti, M., Ghelli, A., Ratta, M., Cortes, D. and Estornell, E. 1994. Natural substances (acetogenins) from the family Annonaceae are powerful inhibitors of mitochondrial NADH dehydrogenase (Complex I). *Biochem J*. 301: 161-167.
- Miyoshi, H., Ohshima, M., Shimada, H., Akagi, T., Iwamura, H. and McLaughlin, J.L. 1998. Essential structural factors of annonaceous acetogenins as potent inhibitors of mitochondrial complex I. *Biochim Biophys Acta*. 1365: 443-452.
- Oberlies, N.H., Chang, C.J. and McLaughlin, J.L. 1997. Structure-activity relationships of diverse Annonaceous acetogenins against multidrug resistant human mammary adenocarcinoma (MCF-7/Adr) cells. *J. Med Chem*. 40: 2102-2106.
- Oberlies, N.H., Jones, J.L., Corbett, T.H., Fotopoulos, S.S. and McLaughlin, J.L. 1995. Tumor cell growth inhibition by several Annonaceous acetogenins in an in vitro disk diffusion assay. *Cancer Lett*. 96: 55-62.
- Royo, I., DePedro, N., Estornell, E., Cortes, D., Peláez, F. and Tormo, J.R. 2003. *In vitro* antitumor SAR of *threo/cis/threo/cis/erythro* bis-THF acetogenins: correlations with their inhibition of mitochondrial Complex I. *Oncol Res*. 13:521-528.
- Schlie-Guzmán, M.A., González-Esquinca, A.R. and Luna-Cazáres, L.M. 2009. Las acetogeninas de Annonaceae: efecto antiproliferativo en líneas celulares neoplásicas. *BLACPMA*. 8 (4) 245-257.
- Takada, M., Kuwabara, K., Nakato, H., Tanaka, A., Iwamura, H. and Miyoshi, H. 2000. Definition of crucial structural factors of aceto-

genins, potent inhibitors of mitochondrial complex I. *Biochim Biophys Acta*. 1460: 302-310.

Tormo, J.R., DePedro, N., Royo, I., Barrachina, I., Zafra-Polo, M.C., Cuadrillero, C., Hernández, P., Cortes, D. and Peláez, F. 2005. *In vitro* antitumor structure-activity relationships of *threo/trans/threo/trans/erythro* bis-tetrahydrofuranic acetogenins: correlations with their inhibition of mitochondrial complex I. *Oncol Res*. 15(3): 129-138.

Tormo, J.R., Estornell, E., Gallardo, T., González, M.C., Cave, A., Grannell, S., Cortes, D. and Zafra-Polo, M.C. 2001. Gamma-lactone-functionalized antitumoral acetogenins are the most potent inhibitors of mitochondrial complex I. *Bioorg Med Chem Lett*. 11(5): 681-684.

Wang, L.Q., Min, B.S., Li, Y., Nakamura, N., Qin, G.W., Li, C.J. and Hattori, M. 2002. Annonaceous acetogenins from the leaves of *Annona montana*. *Bioorg Med Chem*. 10: 561-565.

Warmerdam, E., Tranoy, I., Renoux, B. and Gesson, J.P. 1998. Study of butyrolactones related to sub-type 3 Annonaceous acetogenins. Structure revision of itrabin, jetein, laherradurina and otivarin. *Tetrahedron Lett*. 39: 8077-8080.

Yuan, S.S., Chang, H.L., Chen, H.W., Yeh, Y.T., Kao, Y.H., Lin, K.H., Wu, Y.C. and Su, J.H. 2003. Annonacin, a mono-tetrahydrofuran acetogenin, arrests cancer cells at the G1 phase and causes cytotoxicity in a Bax- and caspase-3-related pathway. *Life Sci*. 72 (25): 2853-2861.

Zhu, X.F., Liu, Z.C., Xie, B.F., Li, Z.M., Feng, G.K., Xie, H.H., Wu, S.J., Yang, R.Z., Wei, X.Y. and Zeng, Y.X. 2002. Involvement of caspase-3 activation in scumocina-induced apoptosis in leukemia cell line HL-60. *Life Sci*. 70 (11): 1259-1269.



# Posible actividad estimulante y ansiógena de un extracto de alcaloides quinolínicos de *A. diversifolia* en ratonas.

Aguilar, Efraín<sup>1</sup>, González-Esquinca, Alma Rosa<sup>1</sup>  
de la Cruz, Iván<sup>1</sup>, Riley, Christian<sup>1</sup>, Vidal, Dolores<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Fisiología y Química Vegetal, Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. aguilar01@gmail.com

<sup>2</sup>Bioterio, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas.

## Resumen

La ingestión de frutos y tés de guanábana (*A. muricata*) parece causar parkinsonismo atípico en humanos y esto ha sido atribuido a las acetogeninas y a las quinolinas. La administración de acetogeninas en animales de experimentación causa degeneración de neuronas dopaminérgicas y no dopaminérgicas en las mismas estructuras cerebrales que en el parkinsonismo atípico; esta neurodegeneración se atribuye a inhibición selectiva del Complejo I mitocondrial. Los alcaloides quinolínicos también son neurotóxicos y lo hacen por el mismo proceso inhibitorio de energía en mitocondrias, sin embargo aún se duda que sean causantes de la enfermedad. Para reafirmar si los alcaloides



quinolínicos generan signos de parkinsonismo en ratones, se les inyectó un extracto rico en estos compuestos obtenido de la raíz de *A. diversifolia*. Fueron utilizadas ratonas de la cepa Balb C. El grupo experimental recibió por vía intraperitoneal 30 mg/kg/día del extracto durante dos periodos de 5 días, con 2 días de intervalo entre cada uno. Para medir el retardo en la actividad motora se usó la prueba de la pértiga. Ésta fue aplicada antes y después de las inyecciones. Al grupo control se le inyectó DMSO -disolvente del extracto- con el mismo esquema. Contrario a lo esperado, el grupo experimental redujo significativamente el tiempo de la prueba y además mostró signos de ansiedad tales como desarrollo de calvicie e hiperreactividad a la manipulación, al ser comparado con los controles. Se concluye, a manera de hipótesis, que los alcaloides quinolínicos de la raíz de *A. diversifolia* en este modelo experimental tienen propiedades ansiógenas y estimulantes a través de activar los sistemas dopaminérgicos mesolímbico y mesoestriado.

Palabras clave: *alcaloides quinolínicos, hipercinesia, ansiedad*

## Introducción

La ingestión crónica de frutos y tés de hojas de guanábana (*A. muricata*) parece causar parkinsonismo atípico en humanos y esto ha sido atribuido a la presencia de acetogeninas y alcaloides quinolínicos (Caparros-Lefebvre *et al.*, 2002). En animales de experimentación la administración crónica de acetogeninas causa degeneración de neuronas dopaminérgicas y no dopaminérgicas en las mismas estructuras cerebrales que presentan muerte celular en el parkinsonismo atípico (Höglinder *et al.*, 2003); esta neurodegeneración se atribuye a inhibición selectiva del Complejo I mitocondrial (Sherer *et al.*, 2002; Champy *et al.*, 2004). A su vez, los alcaloides quinolínicos también son neurotóxicos y al parecer esto sucede por el mismo proceso inhibitorio de energía en mitocondrias *in vitro* (Lannuzel *et al.*, 2002; Kotake *et al.*, 2004). Por otro lado, existen quinolinas endógenas en mamíferos y su administración experimental produce parkinsonismo en muridos y monos (Kotake *et al.*, 1996; Kawai *et al.*, 1998) a través de sus metabolitos tóxicos (Booth

*et al.*, 1989; Nagatsu, 1997) y mediante inhibición del Complejo I mitocondrial (McNaught *et al.*, 1995; Kawai *et al.*, 2000).

Para determinar si los alcaloides quinolínicos vegetales pueden generar signos de parkinsonismo en ratones, se les inyectó un extracto rico en estos compuestos obtenido a partir de la raíz de *A. diversifolia*.

## Método

Fueron utilizados ratones hembras jóvenes de la cepa Balb C. El grupo experimental recibió por vía intraperitoneal 30 mg/kg/día del extracto durante dos periodos de 5 días, con 2 días de intervalo entre cada uno. Para medir el probable retardo en la actividad motora (bradicinesia) se usó la prueba de la pértiga (Ogawa *et al.*, 1987). Ésta fue aplicada dos veces antes de iniciar y después de concluir las inyecciones. Al grupo control se le inyectó DMSO, el disolvente usado como vehículo del extracto y con el mismo esquema de los controles.

La prueba de la pértiga fue usada con modificaciones del método original descrito por Ogawa *et al.* (1987). Los ratones fueron colocados en la punta de una varilla de metal rugoso (8 mm de diámetro y 55 cm de largo) y se les midió el tiempo de giro (Tg) y el tiempo de arribo a la base (Ta). Tg es el tiempo que tarda el ratón para voltearse en dirección hacia abajo, y el Ta es el tiempo que tarda en ubicar las cuatro patas en la base. La prolongación de esos parámetros refleja bradiquinesia (Okuda *et al.*, 2006). Los experimentos se llevaron a cabo en un cuarto aislado y poco iluminado.

## Resultados y discusión

Contrario a lo esperado, los animales del grupo experimental redujeron significativamente el tiempo de la prueba (hipercinesia) (cuadros 1 y 2) y además mostraron signos de ansiedad tales como desarrollo de calvicie (figura 1) e hiperreactividad a la manipulación, al ser comparados con los controles.

Cuadro 1. Tiempos de giro y arribo antes y después de administrar las sustancias

		Tiempo de giro (seg.)			<i>p</i>	Tiempo de giro (seg.)			<i>p</i>
		Pre	vs	Post		Pre	vs	Post	
30 mg/kg	1a	2.4		1.4	0.0002	10.5		7.7	0.01
"	2a	1.5		1.3	0.006	10		7.8	0.0008
DMSO	1a	4.8		4.0		14.7		13.6	
"	2a	3.1		1.8	0.03	10.9		10.4	

Cuadro 2. Comparación de los tiempos entre alcaloides quinolínicos y DMSO

		Tiempo de giro		Tiempo de arribo	
		<i>p</i>		<i>p</i>	
30 mg/kg vs DMSO	1a.	0.0006		0.00008	
"	2a.	0.05		0.02	



Figura 1. Calvicie por ansiedad en animales tratados con quinolinas vegetales

Haber obtenido un resultado inesperado requiere discutir por qué se obtuvo ese dato y no el ideado. Comenzaremos por esto último.

Los experimentos con alcaloides quinolínicos vegetales y su toxicidad sobre neuronas dopaminérgicas de mamíferos han sido hechos *in vitro* (Goto *et al.*, 1997; Lannuzel *et al.*, 2002; Kotake *et al.*, 2004) o mediante aplicación directa intracerebral *in vivo* (Koshimura *et al.*, 1997). Nosotros dimos quinolinas vegetales por vía intraperitoneal durante 10 días y no registramos signos de parkinsonismo en ese lapso. Sin embargo, las isoquinolinas de mamíferos administradas por vía intraperitoneal en ratones (Kawai *et al.*, 1998) y subcutánea en monos (Kotake *et al.*, 1996) producen lesiones neuronales y signos parkinsónicos; e *in vitro* bloquean la captura de dopamina (Johnson *et al.*, 1989; Okada *et al.*, 1998), son capturadas e introducidas en la neurona por el transportador de dopamina y luego convertidas en citotóxicas (Booth *et al.*, 1989; Nagatsu, 1997; Kawai *et al.*, 2000), para inhibir así el Complejo I mitocondrial (McNaught *et al.*, 1995) y reducir el contenido de dopamina en mesencéfalo (Kotake *et al.*, 2002). Es posible que los alcaloides quinolínicos vegetales no sean introducidos en la neurona y/o no sean transformados en compuestos neurotóxicos, de ahí la ausencia de signos parkinsónicos en nuestro modelo experimental.

No obstante, los animales con quinolinas vegetales mostraron hipercinesia en vez de bradicinesia en la prueba de la pértiga, y además presentaron conducta de ansiedad manifestada por hiperreactividad a la manipulación y calvicie. Todo esto no se dio en los controles con DMSO. Este tipo de conducta sugiere que fueron estimulados dos sistemas dopaminérgicos: uno relacionado con el aumento de la actividad motora (mesoestriado) y otro con el incremento de actividad emocional negativa (mesolímbico). La estimulación dopaminérgica de los alcaloides quinolínicos vegetales la basamos en que aumentan la concentración de dopamina al inhibir su captura por el transportador (Lannuzel *et al.*, 2002) y muestran afinidad por los sitios de unión  $D_1$  y  $D_2$  en sinaptosomas del estriado de ratas (Protais *et al.*, 1995). Lo anterior sugiere propiedades estimulantes de los alcaloides quinolínicos en este sistema neuroquímico, similar a lo observado con algunas isoquinolinas animales con afinidad por los ligandos  $D_1$  y  $D_2$  (Cabedo *et al.*, 1998; El Aouad

*et al.*, 2009) y con propiedades que parecen ser antidepresivas en otros modelos experimentales (Berenguer *et al.*, 2009).

Por último, éste sólo es un trabajo preliminar, falta reproducir el estudio en ratones machos y a dosis hasta 50 mg/kg que ya sabemos son subletales.

## Conclusión

Se concluye, a manera de hipótesis, que los alcaloides quinolínicos de la raíz de *A. diversifolia* en este modelo experimental tienen propiedades ansiógenas y estimulantes a través de activar los sistemas dopaminérgicos mesolímbico y mesoestriado.

## Referencias

- Berenguer, I., El Aouad, N., Andujar, S., Romero, V., Suvire, F., Freret, T., Bermejo, A., Ivorra, M.D., Enriz, R.D., Boulouard, M., Cabedo, N. and Cortes, D. 2009. Tetrahydroisoquinolines as dopaminergic ligands: 1-Butyl-7-chloro-6-hydroxy-tetrahydroisoquinoline, a new compound with antidepressant-like activity in mice. *Bioorg Med Chem.* 17 (14): 4968-80.
- Booth, R.G., Castagnoli, N.J. and Rollema, H. 1989. Intracerebral microdialysis neurotoxicity studies of quinoline and isoquinoline derivatives to MPTP/MPP<sup>+</sup>. *Neurosci Lett.* 100: 306-312.
- Cabedo, N., Protais, Ph., Cassels, B.K. and Cortes, D. 1998 Synthesis and dopamine receptor selectivity of the benzyltetrahydroisoquinoline, (R)-(+)-nor-roefractine. *J Nat Prod.* 61 (6): 709-712.
- Caparros-Lefebvre, D., Sergeant, N., Lees, A., Camuzat, A., Daniel, S., Lannuzel, A., Brice, A., Tolosa, E., Delacourte, A. and Duyckaerts, Ch. 2002. Guadeloupean parkinsonism: a cluster of progressive supranuclear palsy-like tauopathy. *Brain.* 125 (4): 801-811.
- Champy, P., Höglinger, G., Féger, J., Gleye, Ch., Hocquemiller, R., Laurens, A., Guérineau, V., Laprévote, O., Medja, F., Lombes, A., Michel, P.P., Lannuzel, A., Hirsch, E.C. and Ruberg, M. 2004. Annonacin, a lipophilic inhibitor of mitochondrial Complex I, induces

nigral and striatal neurodegeneration in rats: possible relevance for atypical parkinsonism in Guadeloupe. *J Neurochem.* 88: 63–69.

El Aouad, N., Berenguer, I., Romero, V., Marín, P., Serrano, A., Andujar, S., Suvire, F., Bermejo, A., Ivorra, M.D., Enriz, R.D., Cabedo, N. and Cortes, D. 2009. Structure-activity relationship of dopaminergic halogenated 1-benzyl-tetrahydroisoquinoline derivatives. *Eur J Med Chem.* 44 (11): 4616-21.

Goto, K., Mochizuki, H., Hattori, T., Nakamura, N. and Mizuno, Y. 1997. Neurotoxic effects of papaverine, tetrahydropapaverine and imethoxyphenylethylamine on dopaminergic neurons in ventral mesencephalic-striatal co-culture. *Brain Res.* 754 (1-2): 260-68.

Höglinger, G., Feger, J., Prigent, A., Michel, P.P., Parain, K., Champy, P., Ruberg, M., Oertel, W.H. and Hirsch, E.C. 2003. Chronic systemic complex I inhibition induces a hypokinetic multisystem degeneration in rats. *J Neurochem.* 84: 491–502.

Johnson, E.A., Wu, E.Y., Rollema, H., Booth, R.G., Trevor, A.J. and Castagnoli, N. Jr. 1989. 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP<sup>+</sup>) analogs: in vivo neurotoxicity and inhibition of striatal synaptosomal dopamine uptake. *Eur J Pharmacol.* 166 (1): 65-74.

Kawai, H., Makino, Y., Hirobe, M. and Ohta, S. 1998. Novel endogenous 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline derivatives: uptake by dopamine transporter and activity to induce parkinsonism. *J Neurochem.* 70: 745-751.

Kawai, H. and Ohta, S. 2000. Dopamine transporter and catechol-O-methyltransferase activities are required for the toxicity of 1-(3', 4'-dihydroxybenzyl)-1, 2, 3, 4-tetrahydroisoquinoline. *Chem Res Toxicol.* 13 (12): 1294-301.

- Koshimura, I., Imai, H., Hidano, T., Endo, K., Mochizuki, H., Kondo, T. and Mizuno, Y. 1997. Dimethoxyphenylethylamine and tetrahydroapapaverine are toxic to the nigrostriatal system. *Brain Res.* 773 (1-2): 108-116.
- Kotake, Y., Yoshida, M., Ogawa, M., Tasaki, Y., Hirobe, M. and Ohta, S. 1996. Chronic administration of 1-benzyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline, an endogenous amine in the brain, induces parkinsonism in a primate. *Neurosci Lett.* 217: 69-71.
- Kotake, Y., Okuda, K., Kamizono, M., Matsumoto, N., Tanahashi, T., Hara, H., Caparros-Lefebvre, D. and Ohta, S. 2004. Detection and determination of reticuline and N-methylcoclaurine in the Annonaceae family using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatography B.* 806: 75-78.
- Lannuzel, A., Michel, P.P., Caparros-Lefebvre, D., Abaul, J., Hocquemiller, R. and Ruberg, M. 2002. Toxicity of Annonaceae for dopaminergic neurons: potential role in atypical parkinsonism in Guadeloupe. *Mov Disord.* 17 (1): 84-90.
- McNaught, K., Thull, U., Carrupt, P.-A., Altomare, C., Cellamare, S., Carotti, A., Testa, B. and Marsden, C.D. 1995. Inhibition of complex I by isoquinoline derivatives structurally related to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *Biochem Pharmacol.* 50 (11): 1903-1911.
- Nagatsu, T. 1997. Isoquinoline neurotoxins in the brain and Parkinson's disease. *Neurosci Res.* 29: 99-111.
- Ogawa, N., Mizukawa, K., Hirose, Y., Kajita, S., Ohara, S. and Watanabe, Y. 1987. MPTP-induced parkinsonian model in mice: biochemistry, pharmacology and behavior. *Eur Neurol.* 26:16-23.



- Okada, T., Shimada, S., Sato, K., Kotake, Y., Kawai, H., Ohta, S., Toyama, M. and Nishimura, T. 1998. Tetrahydropapaveroline and its derivatives inhibit dopamine uptake through dopamine transporter expressed in HEK293 cells. *Neurosci Res.* 30 (1): 87-90.
- Okuda, K., Kotake, Y. and Ohta, S. 2006. Parkinsonism-preventing activity of 1-methyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline derivatives in C57BL mouse *in vivo*. *Biol Pharm Bull.* 29 (7): 1401-1403.
- Protais, P., Arbaoui, J., Bakkali, E.H., Bermejo, A. and Cortes, D. 1995. Effects of various isoquinoline alkaloids on *in vitro* 3H-dopamine uptake by rat striatal synaptosomes. *J Nat Prod.* 58 (10): 1475-84.
- Sherer, T.B., Betarbet, R., Stout, A.K., Lund, S., Baptista, M., Panov, A.V., Cookson, M.R. and Greenamyre, J.T. 2002. An *in vitro* model of Parkinson's disease: linking mitochondrial impairment to altered-synuclein metabolism and oxidative damage. *J Neurosci.* 22: 7006-7015.

# Actividad insecticida de *Annona diversifolia* frente a *Atta mexicana*

Acuña Castro, Walter<sup>1</sup>  
De la Cruz Chacón, Iván  
González Esquinca, Alma Rosa<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Fisiología y Química Vegetal, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas, Libramiento Norte Poniente s/n, col. Lajas Maciel C.P. 29032, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México. alesquinca@unicach.mx

## Resumen

Varias anonáceas exhiben propiedades insecticidas, esta actividad está asociada a su capacidad de producir metabolitos secundarios, principalmente alcaloides y acetogeninas (Lebovef *et al.*, 1982; Cave *et al.*, 1997; Leatemía e Isman, 2004). Las hormigas arrieras (*Atta mexicana* Myrmeciinae) constituyen en ocasiones una de las principales plagas defoliadoras de plantaciones forestales y de cultivos agrícolas (Sánchez-Peña, 2005). El uso de insecticidas de síntesis química para tratar insectos plaga no constituye un medio eficaz de control, ya que suelen ser altamente tóxicos y tener un espectro amplio,

además, generan problemas de residualidad en los alimentos en los que se utiliza (Molina, 2001). Una alternativa es la utilización de extractos y de moléculas obtenidas de fuentes naturales que presenten actividad dirigida, moderada y que sean biodegradables, por ello en este estudio se evaluó el efecto insecticida de extractos hexánicos de *Annona diversifolia*.

Se obtuvieron extractos de las semillas, raíces, tallos y hojas mediante el método soxhlet, para la evaluación se emplearon 25 hormigas (n=5), a las que se les alimentó con soluciones de los extractos en concentraciones de 0, 1, 10, 100 y 1000 mg/ml disueltos en aceite de olivo y como cebos miel y avena. Se utilizaron testigos sin cebos y vehículo de disolución. El efecto biocida se observó a las 12, 24, 36, 48 y 60 h de exposición.

Los extractos de raíces y semilla tuvieron actividades moderadas ( $p=0.01$ ) que no superan el 50% de mortalidad ( $CL_{50}$  1.051 y 1.635 mg/ml respectivamente), el efecto se observó con las concentraciones más altas y a partir de las 36 h, con una ligera dosis-dependencia y un tiempo-dependencia muy marcado. Los extractos de tallo sólo aceleran la mortalidad con respecto a los testigos, mientras que los de hoja son inactivos. La actividad de los extractos hexánicos de *A. diversifolia* señala el potencial de esta especie sobre *Atta mexicana*.

Palabras clave: *extractos, insecticidas vegetales, actividad biológica*

## Introducción

Las plantas han evolucionado por más de 400 millones de años y para contrarrestar el ataque de los insectos desarrollaron mecanismos de protección, como la repelencia y la acción insecticida (Molina, 2001). Los vegetales poseen rutas metabólicas que forman compuestos, por lo general de bajo peso molecular, llamados metabolitos secundarios por derivarse del metabolismo primario. En las anonáceas las rutas biosintéticas de los alcaloides y de las acetogeninas están favorecidas, de manera que se caracterizan por la diversidad de estos metabolitos. También se ha reportado que producen aceites esenciales, galactoma-

nanos, flavonas, terpenos, glucósidos cianogénicos y heterocíclicos de nitrógeno no alcaloidales (González, 2005). Recientemente se ha encontrado que tanto extractos como compuestos de especies de la familia Annonaceae presentan una potente actividad insecticida, antiparasítica, acaricida, antibacteriana, antifúngica, antitumoral, antiespasmódica y citotóxica (Zafra-Polo *et al.*, 1996; Alali *et al.*, 1999). Las hormigas arrieras (*Atta mexicana*) constituyen una de las principales plagas que afectan a las plantaciones forestales, las cuales pueden reducirse hasta el 20% (López, 1999). También es considerada una plaga doméstica por su presencia en lugares donde se almacenan alimentos. Los insecticidas sintéticos han provocado la contaminación del suelo y fuentes de agua, así como la destrucción de enemigos naturales benéficos que ayudan en el control de las plagas, la intoxicación de animales domésticos, la muerte de polinizadores, la disminución de los microorganismos del suelo, favoreciendo el deterioro del ambiente (Castro, 2005). *Annona diversifolia* es un árbol abundante en Chiapas, cuyos extractos han demostrado actividad larvicida frente a la mosca mexicana de la fruta *Anastrepha ludens* (Rueda, 2007) y *Culex pipiens quiquefaciatus* (Alamilla *et al.*, 2000), aunado a esto la presencia de moléculas bioactivas (De la Cruz, 2001). Por ello la evaluación de extractos y compuestos de *Annona diversifolia* frente a *Atta mexicana* es importante en la búsqueda de alternativas menos dañinas para el ambiente.

En este estudio se evaluó la capacidad insecticida de extractos hexánicos de *A. diversifolia* frente a *Atta mexicana*.

## Método

Para la obtención de semillas en octubre de 2008, se recolectaron en la colonia de Terán de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, frutos de *A. diversifolia*, mientras que las raíces, tallos y hojas se recolectaron en el mismo lugar en enero del 2009. Las muestras se secaron a temperatura ambiente e iluminación natural y se molieron hasta polvo fino en un molino de manivela.

Los extractos hexánicos se obtuvieron usando 50 g de semillas, 100 g de raíces, 100 g de tallos y 100 g de hojas, empleando el método de Soxhlet (Bonner y Castro, 1967). Con los extractos hexánicos de cada parte

de *A. diversifolia*, se realizaron concentraciones de 1, 10, 100 y 1000 mg/mL, utilizando aceite de olivo como diluyente y a una mezcla de avena (0.5 g) y miel (0.5 g), se le agregaron las diferentes soluciones de extractos (1.5 mL), al testigo se le colocó solamente 1.5 mL de aceite de olivo, esta mezcla se colocó en una torunda de algodón con 5 mL de agua y se incorporó en cada contenedor, todo se realizó por quintuplicado.

Se recolectaron cortadoras de *A. mexicana* de cinco hormigueros, localizados en el parque del Oriente (al lado de la puerta 6) y en la colonia San José Chapultepec (andador paso del ático) en Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. Se colocaron 25 hormigas en contenedores de plásticos transparentes, con tapas horadadas para dar ventilación. El efecto biocida se midió a las 12, 24, 36, 48 y 60 h de exposición.

Los datos se agruparon en una hoja de cálculo de Excell MO<sup>R</sup> y mediante el programa estadístico STATGRAPHICS plus versión de prueba, se realizaron análisis de varianza y de contrastes de diferencias mínimas significativas con el método de Fisher para realizar comparaciones entre los extractos y regresión lineal para conocer la posible dosis y tiempo dependencia, así como la concentración letal media (CI<sub>50</sub>).

## Resultados y discusión

El rendimiento de cada uno de los extractos es variable, el de semillas fue el de mayor proporción, seguido por los de raíces, hojas y tallos (cuadro 1).

Cuadro 1. Rendimientos de los extractos obtenidos

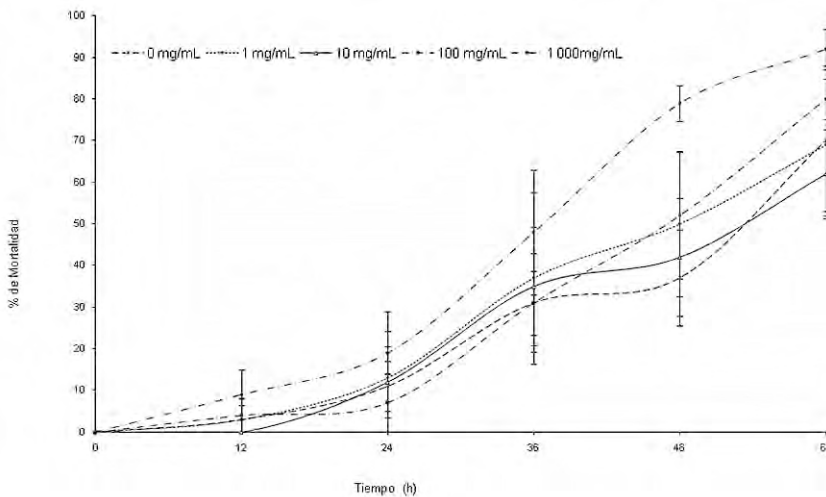
Extracto	Rendimiento (%)			
	Raíces	Tallos	Hojas	Semillas
Hexánico	6.08	4.18	4.99	20.33

Esta variabilidad se puede atribuir al metabolismo de la planta y a la especialización bioquímica de los tejidos involucrados en la biosíntesis y/o

acumulación de estos productos naturales (Piñol *et al.*, 2000), por ejemplo, el mayor rendimiento obtenido de las semillas puede deberse a que éstas son órganos de reserva, que al contener a la nueva generación vegetal, comúnmente acumulan productos fotosintéticos (Pérez *et al.*, 2004).

### Actividad del extracto de raíces

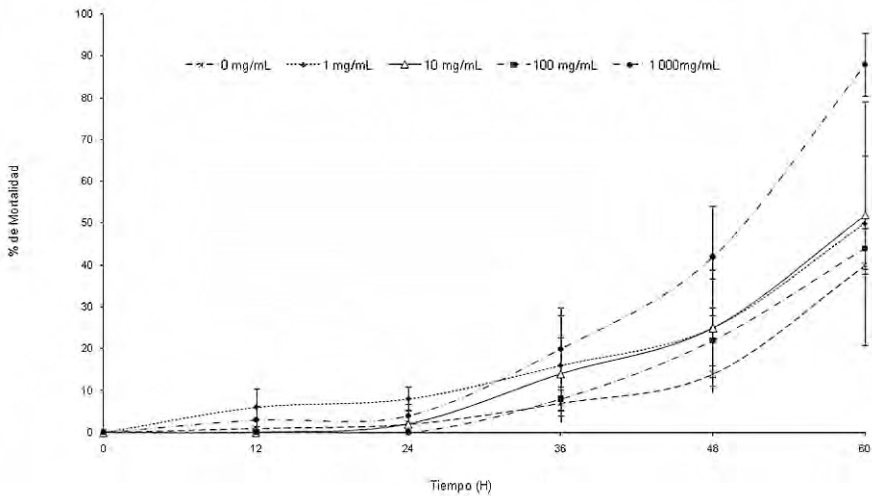
El extracto hexánico de raíces durante las primeras 36 horas tiene una actividad semejante a las de los testigos, sólo el promedio de la concentración más alta es superior a éstos. Aunque la diferencia no es estadísticamente significativa, el testigo se mantiene por debajo de los tratamientos. A las 48 horas la diferencia es marcada con respecto al control y se aprecian diferencias entre las concentraciones de 1, 100 y 1000 mg/mL. El extracto de 1000 mg/mL muestra diferencia estadísticamente significativa ( $p=0.0670$ ) dejando ver también una dependencia con el tiempo de exposición, este patrón se repite en la última lectura (60 h), con lo que se puede decir que esta es la concentración más activa a partir de las 36 horas (gráfica 1).



Gráfica 1. Mortalidad de *A. mexicana* producida por el extracto hexánico de raíces

### *Actividad del extracto de semillas*

El extracto mostró actividad a partir de las 12 horas, se observa que los porcentajes de mortalidad de 1 y 1000 mg/mL son superiores respecto al testigo, sin embargo, sólo la concentración de 1 mg/mL tiene diferencia estadísticamente significativa a las 12 y 24 h. A partir de las 48 h la concentración de 1000 mg/mL muestra diferencia estadísticamente significativa ( $p=0.0577$ ) con respecto al testigo y una actividad creciente con respecto al tiempo de exposición, convirtiéndose en la concentración más activa (gráfica 2). Aun sin diferencia significativa el promedio de la actividad del resto de las concentraciones evaluadas son superiores al control desde las 48 h.

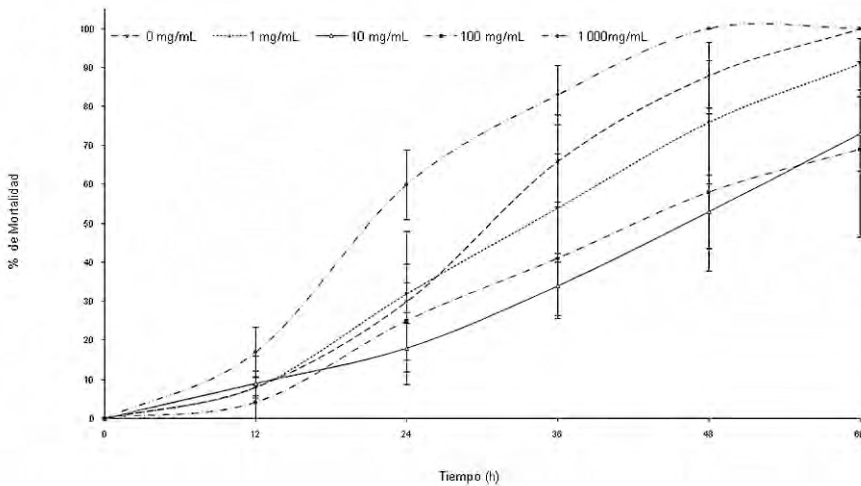


Gráfica 2. Mortalidad de *A. mexicana* producida por el extracto hexánico de semillas

### *Actividad del extracto de tallos*

La actividad insecticida del extracto se limita desde las 12 h a la concentración de 1000 mg/mL incrementándose en las horas subsecuentes, sin embargo, no hay una diferencia estadísticamente significativa, ya

que el control presenta también una alta tasa de mortalidad, incluso mayor que tres de las concentraciones evaluadas, alcanzando a las 60 h una mortalidad del 100% igual a la concentración más elevada (gráfica 3). Lo que podría deberse a una variabilidad en la recolecta de los ejemplares de las hormigas y por tanto representar una muerte natural sistemática. Aun así lo que se observa es que el extracto de 1000 mg/mL incrementa el porcentaje de mortalidad desde el tiempo inicial.



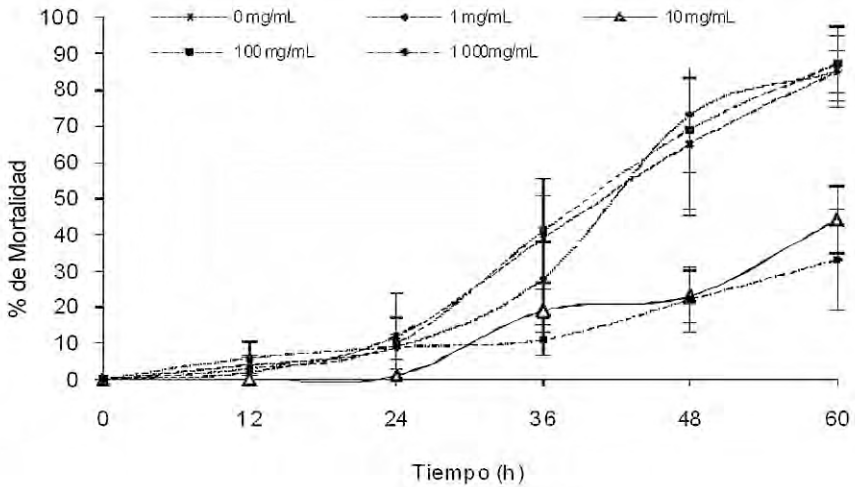
Gráfica 3. Mortalidad de *A. mexicana* producida por el extracto hexánico de tallos. Se señala con un \* las diferencias mínimas estadísticamente significativas (LSD) de Fisher e incluye valores de p con un 95.0 % de confianza

### *Actividad del extracto de hojas*

El extracto hexánico de hojas presenta un comportamiento irregular en las concentraciones evaluadas, ya que no existe una relación generalizada en los efectos observados, la concentración de 1000 mg/mL tiene menor efecto, a diferencia de la concentración de 1 mg/mL cuyo efecto es mayor, pero entre ellas se intercalan las otras dos. Es decir, no hay una tendencia que permita explicar que el efecto es antialimentario a concentraciones altas e insecticida a concentraciones bajas. La muerte

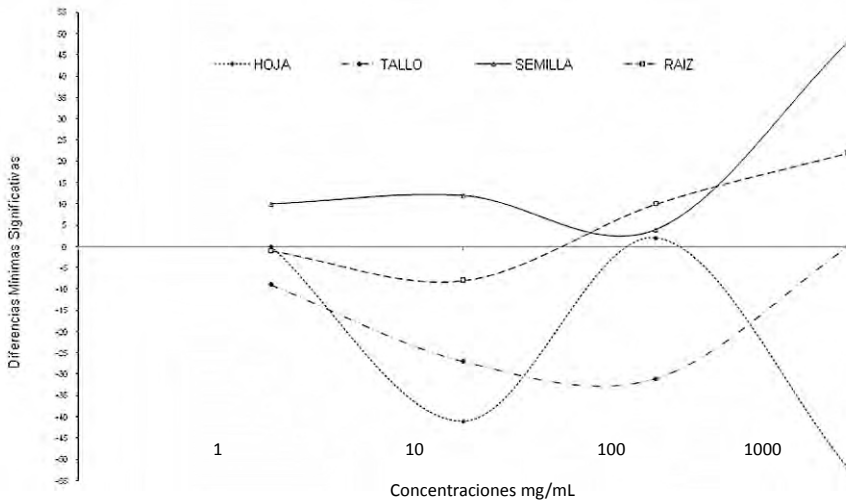


natural en los testigos deja entrever la variabilidad en los ejemplares recolectados, todo conduce a señalar que las hojas de *A. diversifolia* no tienen efecto insecticida sobre *A. mexicana* (gráfica 4).



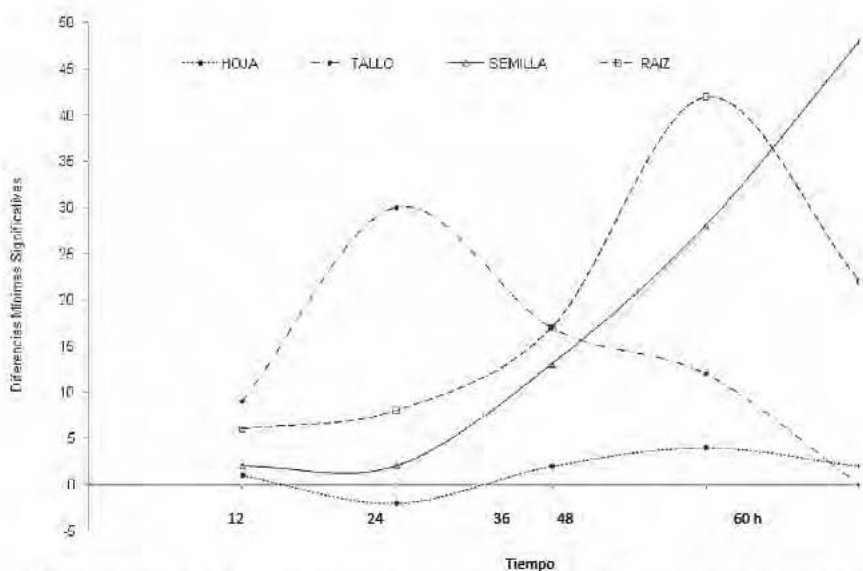
Gráfica 4. Mortalidad de *A. mexicana* producida por el extracto hexánico de hojas

Una comparación de los 4 extractos con las 4 concentraciones evaluadas en el tiempo final de exposición (60 h) utilizando las diferencias mínimas (LSD) permite señalar que sólo los extractos de semillas y raíces a concentración de 1000 mg/mL presentan una actividad insecticida moderada pero significativa contra *A. mexicana*. El extracto de semillas resultó el más activo, en el de raíces se observa una ligera dosis dependencia (gráfica 5).



Gráfica 5. Mortalidad de *A. mexicana* producida por extractos hexánicos

Se realizó una comparación de los extractos con la concentración más activa de 1000 mg/mL y el tiempo de exposición (12, 24, 36, 48 y 60 h) utilizando las diferencias mínimas (LSD) se observa que el extracto de semilla presenta una relación entre la actividad y el tiempo de exposición durante las 48 horas evaluadas ( $y=11.8x-16.8$ ,  $R^2=0.91$ ), en raíces la dependencia es lineal hasta las 36 horas ( $y=11.7x-11$ ,  $R^2=0.84$ ), mientras que con hojas ( $y=0.8x-1$ ,  $R^2=0.33$ ;) y tallos ( $y=-3.6x+24$ ,  $R^2=0.27$ ) no existe relación (gráfica 6).



Gráfica 6. Actividad de los extractos hexánicos con relación al tiempo de exposición

De acuerdo con la  $CL_{50}$  se observa que los tallos y las hojas no presentan actividad (cuadro 2).

Cuadro 2. Concentración letal media de extractos (—, se considera sin actividad)

	$CL_{50}$
Semilla	1,051.34 mg
Raíz	1,635.68 mg
Tallo	—
Hoja	—

## Conclusión

Los extractos hexánicos de semillas y raíces de *Annona diversifolia* presentan actividad moderada frente a *Atta mexicana*, mientras que los de hojas y tallos fueron inactivos. Los extractos activos presentan una de-

pendencia con el tiempo de exposición. La actividad demostrada por los extractos hexánicos obtenidos de *A. diversifolia* reflejan el potencial frente a *Atta mexicana* de esta especie nativa de Mesoamérica.



## Referencias

- Alali, F.Q., Xiao-Xi, L. and McLaughlin, J.L. 1999. Annonaceous acetogenins: recent progres. *Journal of Natural Products*. 62: 504-540.
- Alamilla, B. 2000. Evaluación de la actividad larvicida de 4 especies del género *Annona*, mediante el bioensayo de *Culex quinquefasciatus* Say. En: Memorias del Primer Congreso Nacional de Anonáceas. Universidad Autónoma Chapingo. Estado de México. México. Pp. 75-80.
- Booner, William and Castro, Albert. 1967. Essential of modern organic chemistry. Reinhold Publishing Corporation. New York, USA. Pp. 36-53.
- Castro, M. 2005. Introducción a la agricultura orgánica. Programa Nacional de Agricultura Orgánica. PLAGSALUD. Costa Rica. <http://www.cor.ops-oms.org/TextoCompleto/documentos/AGRICULTURA%20ORG.pdf>.
- Cavé, A., Figadére, B., Laurens, A. and Cortes, D. 1997. Acetogenins from Annonaceae. *Fortschr Chem Org. Naturst.* 70: 81-288.
- De la Cruz, I. 2001. Acetogeninas bioactivas de *Annona diversifolia* Safford. Tesis de Licenciatura. Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. México. Pp. 20.

- González, A.R. 2005. La familia Annonaceae en Chiapas y sus metabolitos. *Ciencia y Tecnología en la Frontera*. 3 (2): 41-52.
- Leatemala J.A. and Isman, M.B. 2004. Toxicity and antifeedant activity of crude seed extracts of *Annona squamosa* (Annonaceae) against lepidopteran pest and natural enemies. *Phytoparasitica*. 32 (1): 30-37.
- Leboeuf. M., Cavé, A., Bhaumik, P.K., Mukherjee, B. and Mukherjee, R. 1982. The phytochemistry of the Annonaceae. *Phytochemistry*. 21: 2783-813.
- López, Lucía. 1999. La hormiga arriera, amenaza para las plantas. *Ecología*. Gaceta Universitaria. Universidad de Guadalajara. Guadalajara, México. Pp. 6.
- Molina, N. 2001. Uso de extractos botánicos en control de plagas y enfermedades. *Avances en el fomento de productos fitosanitarios*. Costa Rica. Pp. 76-77.
- Pérez, P.R., Rodríguez, H.C., Lara Reyna, J., Montes B.R. y Ramírez, V.G. 2004. Toxicidad de aceites, esencias y extractos vegetales en larvas de mosquitos *Culex quinquefasciatus* Say. *Acta Zoológica Mexicana*. 20 (1): 141-152.
- Piñol, M., Palazón, J. y Cusidó, R.M. 2000. Introducción al metabolismo secundario. En: Azcón-Bieto, J. y M. Talón. *Fundamentos de fisiología vegetal*. McGraw-Hill-Interamericana. Madrid, España. Pp. 261-283, 435-449.
- Rueda Pérez, M.L. 2007. Actividad insecticida de *Annona diversifolia* Safford sobre *Anastrepha ludens* Loew. Tesis de Licenciatura. Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. México. Pp. 9, 10, 21-32.

- Sanchez-Peña, S.R. 2005. New view on origin of Attine ant-fungus mutualism: Exploitation of a preexisting insect-fungus symbiosis (Hymenoptera: Formicidae). *Annals of the Entomological Society of America*. 98 (2): 151-164.
- Zafra-Polo, M.C., González, M.C., Estornell, E., Saphaz, S. and Cortes, D. 1996. Acetogenins from Annonaceae, inhibitors of mitochondrial complex I. *Review Phytochemistry*. 42 (2): 253-271.





# Manejo fitosanitario para el control de la antracnosis en anona (*Annona diversifolia* Saff.)

Cruz Pineda, Eduardo<sup>1</sup>  
Guerrero Berrios, Mauricio<sup>1</sup>

<sup>1</sup>MAG-CENTA. Programa Frutales, km 33 ½ Carretera Panamericana  
El Salvador. epineda04@yahoo.com

## Resumen

El cultivo de anona (*Annona diversifolia*) en El Salvador es afectado por las plagas, siendo la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*, Penzig) la que incide en una pérdida desde el 40 hasta el 70% de la cosecha; por tal razón se realizó la investigación con el objetivo de generar una técnica de manejo para el control de la antracnosis en anona, instalándose dos parcelas entre el 2008 y 2009 en el municipio de Tonacatepeque, departamento de San Salvador a 750 msnm, suelo franco arcilloso; topografía con el 20% de pendiente y en el Centro Experimental de Desarrollo Agropecuario, Cantón San Andrés, municipio de Ciudad Arce, departamento de La Libertad a 460 msnm, suelo franco arcilloso y topografía plana desde el 2 hasta el 5% de pendiente en

plantaciones sin manejo agronómico. La evaluación se realizó en parcelas apareadas, para lo cual se escogió el tratamiento que resultó mejor en la investigación llevada entre el 2007-2008 en las que los tratamientos fueron aplicación de plaguicida, poda de aclareo y embolsado de frutos, siendo las conclusiones que las podas de aclareo y la aplicación de plaguicidas proporcionan una reducción de la antracnosis, no así el embolsado de los frutos que incrementan el problema de la antracnosis con la aparición del hongo *Phaceloma*. Por tanto, el tratamiento fue con podas de aclareo y la aplicación de plaguicidas antes de la floración, plena floración y frutos pequeños, para el control de la antracnosis y la otra parcela sin manejo y sin aplicaciones de plaguicidas. Como resultado se observaron diferencias altamente significativas ( $<0.10$ ) entre tratamiento para el porcentaje de daño de antracnosis, siendo el tratamiento con manejo con podas de aclareo y aplicación de plaguicidas el que obtuvo un promedio de 17% de frutos dañados y en la parcela sin manejo un 44% para Tonacatepeque y en San Andrés un 32% de frutos dañados para la parcela con manejo y 68% para la parcela sin manejo, lo que pone de manifiesto que el control fue efectivo en cuanto el análisis económico resultó un beneficio neto marginal para la parcela con manejo de Tonacatepeque de \$655.00 y de \$873.00 para la parcela con manejo de San Andrés siendo las relaciones de beneficio-costos de 3.83 y 5.1, respectivamente.

Palabras claves: *hongo, embolsado, podas, enfermedad, antracnosis*

## Introducción

La anona (*Annona diversifolia* Saff.) es una fruta muy afectada por las plagas, siendo la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*, Penzig) la que incide en una pérdida desde el 40 hasta el 70% de la cosecha. La anona se encuentra con mayor frecuencia en los departamentos de Sonsonate, Santa Ana, Ahuachapán, La Libertad, Usulután y San Miguel (Cruz Pineda y Deras Flores, 2000). La antracnosis puede atacar el tallo, hojas, flores y fruto, esta infección se presenta en estadios tempranos del desarrollo del fruto, pero la enfermedad aparece luego de etapas cercanas

a la maduración (Cifuentes Beltrán y García Jaramillo, 2006). Entre las anonáceas la guanábana presenta problemas fitosanitarios, el principal es el barrenador de la semilla (*Bephrateloides cubensis*). Se realizaron pruebas de embolsado de frutos, el material que presentó mejores resultados fue la utilización de bolsas de polietileno de color azul (Evangelista Lozano y Domínguez Álvarez, s/f).

En El Salvador la anona (*Annona diversifolia*) es un cultivo que no recibe un manejo agronómico adecuado, tiene una producción limitada en volumen y calidad, esto se debe en parte al poco enfoque comercial. Tiene problemas de calidad y presentación que pueden mejorarse con un mejor manejo del cultivo (IICA-MAG-Programa Nacional de Frutas, 2004). En el cultivo de anona se sugiere trabajar en los siguientes aspectos: recolección y manejo comercial de la fruta, aumento en el periodo de producción, exploración de áreas productoras en México, Guatemala y El Salvador (Orellana Polanco y Tambito Martínez, 2001). En México, se reportó que el embolsado de la fruta de guanábana trae como consecuencia la abscisión de frutos, así como la incidencia de otras plagas y enfermedades (Ponce, 1976). En México se reportó que en las plantaciones de guanábana la infección por antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*) se presenta más durante la época de lluvia o cuando existe más humedad relativa, los daños se han estimado en un 35%, siendo la flor la parte más afectada (Vidal Hernández y Nieto Ángel, 1997). Se ha estimado que sin control fitosanitario se reduce el rendimiento en un 60%, el efecto de plagas y enfermedades en el rendimiento es de 25% y en plantaciones con manejo (riego, podas y control fitosanitario) el rendimiento se reduce en un 8% por plagas y enfermedades (Vidal Hernández y Nieto Ángel, 1997).

Dada la importancia de la caída de frutos debido al problema de antracnosis y perforador del fruto se instaló un ensayo en las localidades de San Andrés y Tonacatepeque (El Salvador, 2008) para determinar las medidas de control más efectivas de esta enfermedad, donde se evaluaron diferentes alternativas: 1) poda de aclareo más un fungicida, 2) poda de aclareo más fungicida e insecticida, 3) poda de aclareo más un fungicida, insecticida y embolsado de frutos y 4) testigo sin aplicar. Se evaluó la efectividad de estos tratamientos con el recuento del porcen-

taje de frutos dañados, siendo los resultados que los tratamientos con poda de aclareo más un fungicida, insecticida tuvieron una incidencia del 15 y 16% y los otros tratamientos testigo y con embolsado de frutos fueron de 35 y 41%, respectivamente.

El objetivo es generar una tecnología sobre el manejo fitosanitario para el control de antracnosis en anona, y obtener fruta de mejor calidad y presentación comercial.

## Método

En vista de los resultados obtenidos en el 2008 se instaló otro ensayo de parcelas apareadas (2009) en las localidades de Tonacatepeque y San Andrés en plantaciones ya establecidas en las que se evaluaron los tratamientos que mejor resultados dieron como es el de poda de aclareo más aplicación de plaguicidas, comparándolo con un testigo sin aplicación de plaguicidas ni manejo. Los productos utilizados en forma alterna fueron: Carbendazim (1.2 cc/L), Azoxistrobina (0.3 g/L), Lorsban (3.2 cc/L). Se aplicaron antes de la floración, plena floración y frutos pequeños. La única variable a medir fue el porcentaje de daño de frutos cosechados. El análisis económico se determinó para frutos sanos. Los análisis por prueba de t Student y la relación beneficio costo.

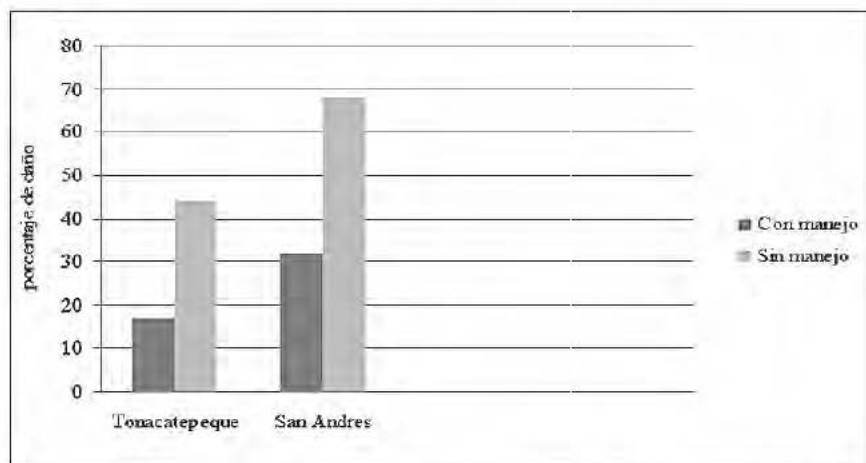
## Resultados y discusión

Comparando ambas localidades se puede observar que el porcentaje de daño fue menor en la parcela con manejo desde el 17 hasta el 32%, en relación a la parcela sin manejo donde se presentó un incremento desde el 44 hasta el 68%. La falta de un manejo al cultivo influye negativamente en una mayor pérdida de frutos por antracnosis (cuadro 1), lo que concuerda con lo encontrado para guanábana por Vidal Hernández y Nieto Ángel (1997). También se puede observar que la incidencia de antracnosis fue mayor en San Andrés, cuya topografía es más plana en la cual la humedad se encuentra más retenida comparándola con la de mayor pendiente que es Tonacatepeque (17%).

Cuadro 1. Porcentaje de daño por antracnosis en frutos de anona (*A. diversifolia*) 2009

	Tonacatepeque	San Andrés
Con manejo	17%	32%
Sin manejo	44%	68%

Se puede observar en la gráfica 1 que al proporcionarle un manejo al cultivo de anona, el porcentaje de daño de los frutos se redujo significativamente entre 17 hasta 32%, la incidencia de la enfermedad fue menor por el control aplicado previamente. Sin manejo, la incidencia de la enfermedad incrementó el porcentaje de daño entre 44 hasta 68%. El manejo con poda de aclareo más aplicación de plaguicidas favoreció en un mejor control de la enfermedad.



Gráfica 1. Porcentaje de daño por antracnosis en frutos de anona (*Annona diversifolia*) en parcelas con manejo y sin manejo. El Salvador, 2009

El análisis económico indicó que el beneficio neto con el tratamiento con manejo con ingresos de \$655 y \$873 y relación beneficio-costo de 3.83 y 5.1. La implementación de prácticas de manejo permite la recuperación de los costos invertidos (cuadro 2).

Cuadro 2. Análisis económico relación beneficio-costo en anona (*A. diversifolia*) 2009

Localidad	Costos de aplicación (\$)	Ingreso bruto (\$)	Ingreso neto (\$)	R B/C
<b>Tonacatepeque</b>				
Con manejo	170.9	2013.0	655.0	3.83
Sin manejo		1358.0		
<b>San Andrés</b>				
Con manejo	170.9	1649.0	873.0	5.1
Sin manejo		776.0		

## Conclusiones

-El manejo aplicado favoreció las condiciones fitosanitarias para un mejor control de la enfermedad.

-Con la implementación de un manejo de podas y uso de productos químicos se tuvo un efecto positivo en el control de la enfermedad.

-El manejo de la antracnosis contribuyó a minimizar la pérdida de frutos y obtener frutos de mejor calidad y valor comercial.

-Con poda de aclareo y el uso de productos químicos se disminuyó el daño de la enfermedad y se incrementaron los ingresos en un 71%.

-El empleo de prácticas de podas y uso de plaguicidas en el manejo de la enfermedad, incrementa los ingresos siendo la relación beneficio-costo desde 3.83 hasta 5.1.

## Recomendación

La aplicación de la tecnología o el uso de otros productos.

## Referencias

- Cruz Pineda, E. y Deras Flores, H. 2000. Diagnóstico ecogeográfico de especies de anonáceas en El Salvador. San Andrés, Ciudad Arce, La Libertad. El Salvador. Pp. 1-8.
- Cifuentes Beltrán, M.C. y García Jaramillo, D.J. 2006. *Colletotrichum gloeosporioides* fitopatógeno asociado a la nutrición. Fundación Universitaria Andina. Colombia.
- Evangelista Lozano, S. y Domínguez Álvarez, A. s/f. Centro de desarrollo de productos bióticos-IPN. Yautepec, Morelos, México.
- IICA (Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura). 2004. Boletín oferta frutícola de El Salvador. MAG-Programa Nacional de Frutales. La Libertad, El Salvador. Pp. 22-23.
- Orellana Polanco, A.D. y Tambito Martínez, E. 2001. Diagnóstico geográfico de anonáceas en Guatemala. Guatemala. 6 pp.
- Ponce, J.M. 1976. Problemas fitosanitarios de la guanábana. En: Memoria del IV Simposium Nacional de Parasitología Agrícola. Veracruz, México. Pp. 104-110.
- Vidal Hernández, L. y Ángel Nieto, D. 1997. Diagnóstico técnico y comercial de la guanábana en México. En: Memoria del I Congreso Internacional de Anonáceas. Universidad Autónoma Chapingo. México. Pp. 1-17.





V. *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer



Foto: Gisela Ferreira



# Perfil de azúcares solubles de semillas de *Annona emarginata* (Schldtl.) H. Rainer sometidas a secado

Corsato, Jaqueline Malagutti<sup>1</sup>, Ferreira, Gisela<sup>1</sup>  
Gimenez, Juliana Iassia<sup>1</sup>, Barbedo, Claudio Jose<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Botánica, Instituto de Biociencias–UNESP  
Botucatu-SP. jaque\_corsato@hotmail.com

<sup>2</sup>Instituto de Botánica, Secretaría del Medio Ambiente, Sección de Semillas  
y Mejoramiento Vegetal, Agua Funda, SP.

## Resumen

Se utiliza la especie *Annona emarginata* (araticum de tierra fría) como porta injerto para especies de la familia Annonaceae. Se sugiere que la siembra de esta especie sea aplicada inmediatamente después de la extracción de las semillas, lo que indica que ellas no tienen tolerancia a la desecación. Son varios los mecanismos implicados en la tolerancia a la desecación y entre ellos se destaca la acumulación de carbohidratos solubles, que actúan como moléculas osmoprotectoras para el sistema de membranas durante el secado. El objetivo del trabajo fue evaluar el perfil de carbohidratos solubles de las semillas de *Annona emarginata* (Schldtl.) H. Rainer sometidas a secado. Las semillas se seca-

ron en un horno de aire forzado a una temperatura de 50°C, alcanzando niveles de agua de 31%, 19%, 12% y 5%. Para la extracción de los azúcares solubles se realizó una triple extracción en etanol durante 5 minutos, seguidos de centrifugación, y de la combinación de los tres extractos de alcohol se obtuvo la proporción correspondiente a la fracción de azúcares solubles. Los extractos fueron sometidos a la lectura en HPLC para la determinación del perfil de carbohidratos solubles (3). Los niveles de glucosa fueron alrededor del 61% cuando las semillas tenían el 31% de agua y se redujeron a 40% cuando las semillas se habían secado a 5%, en contraste con los niveles de sacarosa que aumentaron con el secado. El contenido de fructuosa fue de 20% en semillas con 31% del agua y se redujo a 11.84%, 14.02% y 13.97% en las semillas con 19%, 12% y 5% de agua, respectivamente. También se identificó mioinositol en porcentajes bajos (alrededor de 5%). En todos los contenidos de agua, la cantidad de rafinosa y estaquiosa fue pequeña y se encontró 0.04% de rafinosa para las semillas con 31% de agua y 0.02% y 0.03% en las semillas con 19% y 12% de agua, respectivamente. La sacarosa es el azúcar que se acumula en las semillas con el secado y puede estar directamente envuelta en el mecanismo de tolerancia a la desecación de las semillas de *Annona emarginata*.

Palabras clave: tolerancia a la desecación, sacarosa, glucosa, rafinosa, estaquiosa.

## Introducción

La especie *Annona emarginata* (Schldtl.) H. Rainer, sinonimia de las especies de *Rollinia* sp. (Rainer, 2007), se utiliza como patrón para otras especies de la familia Annonaceae como la atemoya (*Annona cherimola* Mill. x *Annona squamosa* L.) y la chirimoya (*Annona cherimola* Mill.) por proporcionar una mayor compatibilidad entre el injerto y portainjerto, vigor, y resistencia a los hongos, podredumbre de raíces y barrenadores que atacan el tallo de las plantas (Kavati *et al.*, 1997; Bonaventure, 1999; Tokunaga, 2000).

Hay informes de que las Annonaceae como *Annona crassiflora* Mart. no permiten el almacenamiento prolongado de semillas, siendo necesari-

rio que la siembra se realice inmediatamente después de la extracción de la fruta (Bernardes *et al.*, 2007) por lo que se concentra la producción de plántulas en un único periodo del año. Por otra parte, Carvalho *et al.* (2001) informaron de que las semillas de *Annona glabra* L. soportan una reducción del contenido de agua y congelación, con germinación elevada después de 365 días de almacenamiento. Contrario a lo anterior, Tokunaga (2000) sugiere que la siembra de araticum de tierra fría (*A. emarginata*) se realice inmediatamente después de la extracción de las semillas debido al bajo porcentaje de germinación observado después del almacenamiento.

Las semillas que toleran el contenido reducido de agua de la segunda mitad del periodo de acumulación de materia seca y cuando maduran permiten el almacenamiento por un largo periodo se consideran ortodoxas (tolerantes a la desecación) y las intolerantes a la extracción de agua se denominan recalcitrantes (Roberts, 1973; Barbedo *et al.*, 2002; Marcos Filho, 2005).

Los carbohidratos solubles son componentes importantes envueltos en la tolerancia a la desecación, pues durante la pérdida de agua de las semillas actúan como moléculas osmoprotectoras, reemplazando al agua y evitando que ocurran daños a la membrana celular durante el remojo (Koster y Leopold, 1988; Pammenter y Berjak, 2000).

La sacarosa es uno de los principales carbohidratos que se encuentran en las semillas maduras y puede actuar como un sustrato para reacciones metabólicas o tener un efecto protector sobre las membranas celulares cuando se presenta en altas concentraciones (Uemura y Steponkus, 2003). Los demás azúcares relacionados con la tolerancia a la desecación son la rafinosa y estaquirosa, que también se pueden acumular en algunas semillas durante el desarrollo y en respuesta a la desecación (Peterbauer y Richter, 2001).

El objetivo del trabajo fue evaluar el perfil de carbohidratos solubles de las semillas de *Annona emarginata* (Schldtl.) H. Rainer sometidas a secado.

## Método

El trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Fisiología de la Germinación y Latencia de Semillas, del Departamento de Botánica del Instituto de Biociencias (IB) de la Universidad Estadual Paulista Julio de Filho Mesquita (UNESP), Campus Botucatu, SP, Brasil y en el Instituto de Botánica de São Paulo, Brasil.

Los frutos de *A. emarginata* (Schltdl.) H. Rainer (araticum de tierra fría) se obtuvieron en el CATI (Coordinación de Asistencia Técnica Integral), en São Bento do Sapucaí, SP, Brasil (Latitud 22° 41' 20" Sur y Longitud 45° 43' 51" Oeste).

Después de la obtención de las semillas, se lavaron con agua, se secaron y se les determinó el contenido de agua por el método de Brasil (2009), que consiste en secarlas en un horno con una temperatura de 105°C ± 3°C durante 24 horas, los resultados se expresaron en porcentajes. Luego las semillas se secaron en una estufa de aire forzado a 50°C para obtener diferentes niveles de agua 31% (control), el 19%, 12% y 5%). Después se colocaron en remojo en agua durante 60 horas bajo aireación constante (Costa, 2009). Las semillas se colocaron en papel "germitest" humedecido con agua destilada en una proporción de dos y media veces su peso seco (Brasil, 2009). El experimento se llevó a cabo en una cámara de germinación con alternancia de temperaturas de 20°C durante 18 horas de oscuridad y 30°C durante seis horas de luz (Costa, 2009).

El diseño experimental fue al azar, cada tratamiento con cuatro repeticiones de 50 semillas por lote. Se hicieron conteos diarios del número de semillas germinadas, considerándose germinadas aquellas que presentaron dos o más milímetros de raíz primaria (Hadas, 1976). Las variables calculadas fueron: porcentaje, promedio de tiempo, velocidad, frecuencia y sincronización de la germinación (Laboriau, 1983; Laboriau y Agudo, 1987; Silva y Nakagawa, 1995). Para cada uno de los tratamientos, se molieron semillas en un molino utilizando 100 mg para las extracciones de azúcares solubles que se determinaron en un HPLC. Al material vegetal se le añadió etanol al 70% y luego fue sometido a extracción triple por ebullición en etanol durante 5 minutos (Durda *et al.*, 2007). Los extractos se centrifugaron a 3,000 rpm a 20°C durante 10

minutos y luego fueron filtrados. La combinación de los tres extractos de alcohol fue la fracción de azúcares solubles que fueron sometidos a cromatografía líquida de alta resolución con un HPLC para determinar el perfil de carbohidratos (García *et al.*, 2006).

## Resultados y discusión

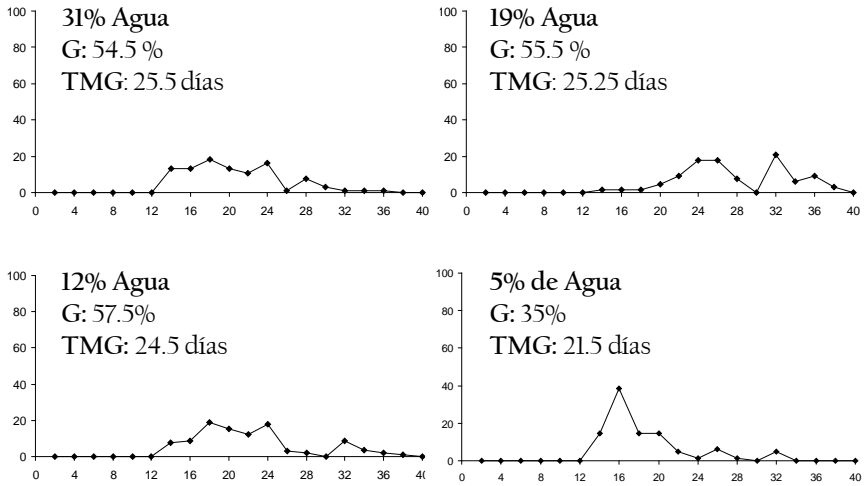
El contenido de agua de las semillas de *A. emarginata* recién extraído fue de 31%. La reducción hasta el 12% no influyó en el porcentaje de germinación de las semillas, mientras que la disminución hasta un 5% sí redujo la germinación de manera significativa (cuadro 1). Los resultados para el índice de sincronización (U) muestran que el secado no es suficiente para sincronizar la germinación, pero, se observó que la reducción en el contenido de agua al 19% y 12% anticipó la germinación (gráfica 1).

Cuadro 1. Germinación [G (%)], tiempo medio de germinación [TMG (días)] e índice de la velocidad de germinación (IVG) de semillas de araticum de tierra fría (*A. emarginata* (Schldt.) Rainer H.) sometidas a secado

Contenidos de agua (%)	G (%)	TMG (días)	IVG
31	54.5 a	25.50 a	14.00 a
19	55.5 a	25.25 a	11.25 a
12	57.5 a	24.25 a	19.5 a
5	35.0 b	21.50 b	18.75 a

Medias seguidas por la misma letra no difieren por la prueba de Tukey al 5% de probabilidad.





Gráfica I. Frecuencia relativa de germinación de las semillas de araticum de tierra fría (*A. emarginata* (Schldtl.) H. Rainer) con diferentes cantidades de agua y sumergidas en agua destilada

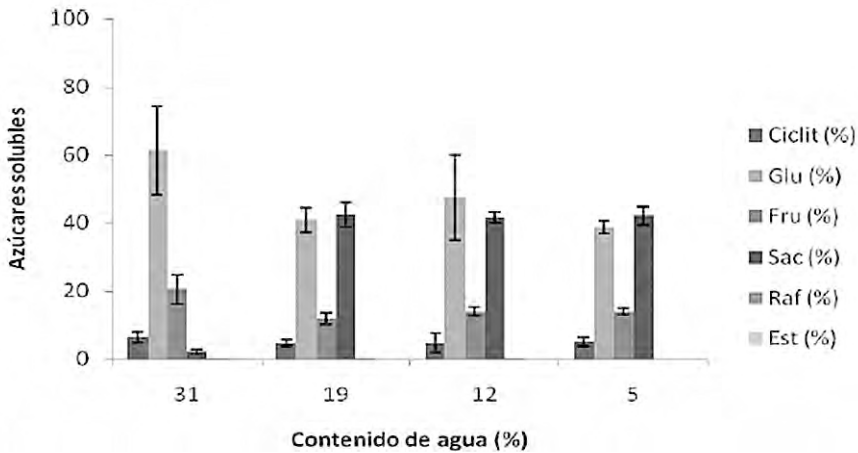
De acuerdo con Tokunaga (2000) las semillas de araticum de tierra fría, se deben sembrar inmediatamente después de que son extraídas del fruto, porque si se almacenan pierden rápidamente su viabilidad. En este experimento, se observó que las semillas de araticum de tierra fría, toleran una sequía de hasta un 12%. Por tanto, la posibilidad de eliminar una cantidad considerable de agua de las semillas sin que el potencial de germinación se pierda, puede ayudar a mantener la viabilidad de las semillas durante el almacenamiento (Rosa, 2005).

El hecho de que las semillas de *A. emarginata* hayan tolerado la desecación, se relaciona con algún mecanismo de protección de las membranas, ya que se sabe que la eliminación de agua de las células causa daños debido a trastornos del metabolismo durante el secado lo que puede minimizar la germinación (Pammenter y Berjak, 2000; Walters, 2000; Berjak y Pammenter, 2007).

Varios estudios se han realizado para identificar los mecanismos de protección a las membranas, éstos implican una sinergia entre distintas

sustancias como proteínas, carbohidratos y complejos enzimáticos que aseguran la supervivencia de las semillas cuando se secan (Walters, 2000; Berjak, 2006). Como se sabe, los hidratos de carbono se pueden acumular en respuesta a las tensiones ambientales como el frío y la sequía, y actúan como osmoprotectores (Leslie *et al.*, 1995).

El análisis del perfil de azúcares solubles por HPLC mostró que hay cambios en el contenido de estos azúcares a medida que las semillas se secan. Los niveles de glucosa fueron alrededor de 61% cuando las semillas presentaban 31% de agua, o sea cuando fueron recién extraídas de los frutos; pero disminuyeron con el secado del 5%. Los niveles de sacarosa cuando las semillas tenían el contenido inicial de agua (31%) fueron bajos (11.58%), pero con el secado se incrementaron hasta el 42% en las semillas con 5% de agua (gráfica 2).



Gráfica 2. Perfiles de azúcares solubles (%) de semillas de araticum de tierra fría (*Annona emarginata* (Schldtl.) H. Rainer) sometidas a niveles de secado (50°C). Desviación estándar de comparación de cada azúcar en los diferentes niveles de secado

El contenido de fructosa (fru) fue de 20% en las semillas con 31% de agua y se reduce a 11.84%, 14.02% y 13.97% para las semillas con 19%,

12% y 5% de agua, respectivamente (gráfica 2). También se identificó mioinositol en bajos porcentajes (alrededor de 5%).

Con todas las proporciones de agua, la cantidad de rafinosa (raf) y estaquiosa (est) fue pequeña y no se muestra en el gráfico. Las pequeñas concentraciones de rafinosa que se detectaron en las semillas con 31% de agua fueron de 0.04% y 0.02% y 0.03% en semillas con 19% y 12% de agua, respectivamente. Así, se comprobó que el secado aumenta los niveles de sacarosa en las semillas (gráfica 2). Según lo propuesto por Koster y Leopold (1988) y Delseny *et al.* (2001), la sacarosa pudo haber actuado como una molécula osmoprotectora, reemplazando al agua y evitando que ocurran daños a la membrana durante la reanudación del desarrollo a lo largo del proceso de germinación. En este contexto, la sacarosa actuaría en la formación del estado plasma, siendo capaz de atenuar la actividad de las especies reactivas del metabolismo del oxígeno (EROs) y por tanto ayudando en la tolerancia a la desecación y al congelamiento (Pammenter y Berjak, 2000; Parnanova *et al.*, 2004; Da Rosa *et al.*, 2005).

Los cambios en el contenido de azúcares solubles de las semillas de *A. emarginata* pueden estar relacionados con alteraciones en el equilibrio hormonal de las semillas durante el secado, ya que se sabe que el secado conduce a la producción de ácido abscísico (ABA), el cual regula varios genes que llevan a la acumulación de azúcares solubles, especialmente la sacarosa (Wang *et al.*, 2002).

## Conclusión

La sacarosa es el azúcar que se acumula en las semillas con el secado y puede estar directamente relacionada con el mecanismo de tolerancia a la desecación de las semillas de *Annona emarginata*.

## Referencias

- Barbedo, C.J.; Bilia, D.A.C. and Figueiredo-Ribeiro, R. de C. 2002. Tolerância à dessecação e armazenamento de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil), espécie da mata atlântica. *Revista Brasileira de Botânica*. 25 (4): 431-439.
- Berjak, P. 2006. Unifying perspectives of some mechanisms basic to desiccation tolerance across life forms. *Seed Science Research*. 16: 1-15.
- Berjak, P. and Pammenter, N.W. 2007. From *Avicennia* to *Zizania*: Seed recalcitrance in perspective. *Annals of Botany*. 27: 1-16.
- Bernardes, T.G., Estrela, C.T., Naves, R.V., Rezende, C.F.A., Mesquita, M.A.M. and Pires, L. L. 2007. Efeito do armazenamento e de fitohormônios na qualidade fisiológica de sementes de *Araticum* (*Annona crassiflora* Mart.). *Pesquisa Agropecuaria Tropical*. 37 (3): 163-168.
- Bonaventure, L. 1999. El cultivo de la chirimoya e de su híbrido atemoya em Brasil. In: *First International Symposium on Cherimoya*. Ecuador.
- BRASIL. 1992. Regras de análise de sementes (RAS). Brasília: Ministério da Agricultura e Reforma Agrária.

- Carvalho, J.E.U. de, Nascimento, W.M.O do and Muller, C.H. 2001. Tolerância de sementes de araticum-do-brejo (*Annona glabra* L.) ao dessecamento e ao congelamento. *Revista Brasileira de Fruticultura*. 23 (1): 179-182.
- Costa, P.N. 2009. Reguladores vegetais, luz e temperatura na germinação de sementes de araticum de tierra fría (*Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer). Dissertação Mestrado. Instituto de Biociências, UNESP–Universidade Estadual Paulista. Botucatu, Brasil. 78 pp.
- Delseny, M., Bies-Etheve, N., Carles, C., Vicent, C., Raynal, M., Grellet, F. and Aspart, L. 2001. Late embryogenesis abundant (LEA) protein gene regulation during Arabidopsis seed maturation. *Journal of Plant Physiology*. 158: 419-427.
- Durda, F., Uhlmann, A. and Pescador, R. 2007. Dosagem de carboidratos nas sementes de *Shizolobium parahyba* e *Talauma ovata* de acordo com o tamanho seminal. *Revista Brasileira de Biociências*. 5 (supl. 2): 465-467.
- Garcia, I.S., Souza, A., Barbedo, C.J., Dietrich, S.M.C. and Figueiredo-Ribeiro, R.C.L. 2006. Changes in soluble carbohydrates during storage of seeds of *Caesalpinia echinata* Lam. (Brazilwood), an endangered leguminous tree from the brazilian atlantic forest. *Brazilian Journal of Biology*. 66: 739-745.
- Kavati, R.O. 1997. A cultura da atemóia (*Annona cherimola* Mill. x *Annona squamosa* L.). Departamento de Comunicação e Treinamento (DCT)–SAA/CATI. Campinas. 22 pp.
- Koster, K.L. and Leopold, A.C. 1988. Sugars and desiccation tolerance in seeds. *Plant Physiology*. 88: 829-832.

- Labouriau, L.G. and Agudo, M. 1987. On the physiology of seed germination in *S. hispanica* L. 1. Temperature effects. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 59 (1): 37-56.
- Laboriau, L.G. 1983. A germinação das sementes. Série Biologia, Monografia 24, Secretaria General da OEA.
- Marcos Filho, J. 2005. Fisiologia de sementes de plantas cultivadas. FEALQ. Piracicaba. 495 pp.
- Ministerio da Agricultura. 2009. *Regra de análise de sementes*. Brasilia: Departamento de Produção Vegetal. Brasília, Brasil. 398 pp.
- Pammenter, N.W. and Berjak, P. 2000. Evolutionary and ecological aspects of recalcitrant seed biology. *Seed Science Research*. 10: 301-306.
- Peterbauer, T. and Richter, A. 2001. Biochemistry and physiology of raffinose family oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seeds. *Seed Science Research*. 11: 185-197.
- Rainer, H. 2007. Monographic studies in the genus *Annona* L. (Annonaceae): Inclusion of the genus *Rollinia* A.ST.-Hil. *Annals Natuhist. Mus*. 108: 191-205.
- Roberts, E.H. 1973. Predicting the storage life of seeds. *Seed Science and Technology*. 1: 499-514.
- Rosa, S.D.V.F. da, Pinho, E.R.V., Vieira, E.S.N., Veiga, R.D. and Veiga, A.D. 2005. Enzimas removedoras de radicais livres e proteínas LEA associadas à tolerância de sementes de milho à alta temperatura de secagem. *Revista Brasileira de Sementes*. 27 (2): 91-101.
- Silva, J.B. and Nakagawa, J. 1995. Estudos de fórmulas para cálculo de velocidade de germinação. *Informativo Abrates*. 5: 62-73.

- Tokunaga, T. 2000. A cultura da Atemóia. Boletim técnico 233. CATI: Campinas. Brasil. pp. 80.
- Uemura, M. and Steponkus, P.L. 2003. Modification of the intracellular sugar content alters the incidence of freeze-induced membrane lesions of protoplasts isolated from *Arabidopsis thaliana* leaves. *Plant Cell and Environment*. 26: 1083-1096.
- Walters, C. 2000. Levels of recalcitrance in seeds. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*. 12 (Edição especial): 7-21.

# Curva de adquisición del agua en semillas de *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer sometidas al condicionamiento osmótico

Gimenez, Juliana Iassia<sup>1</sup>, Ferreira, Gisela<sup>1</sup>  
Corsato, Jaqueline Malagutti<sup>1</sup>, Pinho, Sheila Zambello de<sup>2</sup>  
Bueno, Silvana Sales Catarina<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Biociências-UNESP, Departamento de Botánica. Distrito de Rubião Junior, s/n. CEP:18618-970. Botucatu, SP, Brasil. julianaiassia@gmail.com

<sup>2</sup>Instituto de Biociências-UNESP, Departamento de Bioestatística. Distrito de Rubião Junior, s/n. CEP:18618-970. Botucatu, SP, Brasil.

<sup>3</sup>CATI – Núcleo de Producción de Plantas de São Bento do Sapucaí, SP

## Resumen

El proceso de germinación comienza con la entrada de agua en la semilla que desencadena una secuencia de cambios metabólicos, que culminan con la emergencia de la raíz primaria. Así, es importante el conocimiento de la curva de imbibición de agua con las fases que la componen, para la selección de tiempos de duración de los tratamientos con fitoreguladores, y también para conocer el comportamiento fisiológico de las semillas bajo restricciones de la disponibilidad del agua en con-



dicionamiento osmótico. El objetivo del trabajo fue caracterizar la curva de absorción de agua en semillas de *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer, sometidas a condicionamiento osmótico. Las semillas fueron colocadas en soluciones osmóticas de polietilén glicol, a potenciales de 0, -0.3, -0.6, -0.9 y -1.2 MPa y al final de la fase I (imbibición), fueron retiradas de las soluciones y colocadas en rollos de papel, humedecidos con agua. A cada intervalo de tiempo las semillas fueron retiradas de las soluciones o del rollo de papel, secadas superficialmente, pesadas y nuevamente colocadas en la solución osmótica o en rollo de papel. Este procedimiento fue realizado hasta la germinación visible (2 mm de raíz primaria). A las semillas germinadas, se determinó el contenido de agua.

El diseño experimental fue completamente aleatorizado con 5 tratamientos y cuatro repeticiones de 25 semillas por lote. Para estudiar las variaciones en el contenido de agua, fase I e inicio de la fase II, se ajustó al modelo de Brody. Se realizó análisis de varianza y las medias se compararon mediante la prueba de Tukey. El cambio entre las fases I y II se produjo después de 109 horas de remojo en el potencial de 0 MPa, sin embargo, para los otros potenciales el cambio de fase se produjo después de 143 y 155 horas de remojo, y no hubo diferencias significativas entre los puntos de estabilización. Las semillas condicionadas en todos los potenciales llegaron a la fase III, en momentos diferentes: 664 horas después del inicio de los tratamientos potenciales de 0, -0.3 y -0.9 MPa, 760 horas en el potencial -0.6 MPa y 808 horas en el potencial -1.2 MPa. En todos los potenciales, el porcentaje de agua en las semillas germinadas siempre fue del 40%. La entrada del agua en las semillas de *A. emarginata* (Schltdl.) H. Rainer fue más lenta a medida que se redujo el potencial osmótico, pero al empezar la fase III, todas las semillas alcanzaron el 40% de agua.

Palabras clave: *Annonaceae*, fases de la germinación, potenciales osmóticos

## Introducción

La especie *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer posee elevado interés económico, por servir de portainjerto para especies comerciales de la fa-

milia Annonaceae, como *A. squamosa* L., *A. muricata* L. y *A. cherimola* Mill. x *A. squamosa* L. (Scaloppi Junior, 2007). Los portainjertos, son obtenidos normalmente por semillas, pero, la familia Annonaceae por lo general, produce semillas de bajo índice germinativo (Vieira e Irber, 1996).

Entre las causas apuntadas como responsables de la baja tasa germinativa, se cita la impermeabilidad del tegumento (Pawshe *et al.*, 1997; Smet *et al.*, 1999), sin embargo, Costa (2009) verificó que las semillas de araticum de tierra fría, no presentan impermeabilidad, aunque la entrada de agua en las semillas sea lenta y no uniforme y el porcentaje de germinación bajo. Según Rizzini (1973) la dormancia en anonáceas es causada por la presencia de un embrión inmaduro, debido a la variación en el balance hormonal.

Varias técnicas han sido utilizadas con el objetivo de superar la latencia fisiológica, así como para aumentar la germinación de las semillas y su tolerancia a diversos ambientes, además de reducir el tiempo comprendido entre el sembrado y la emergencia de las plántulas. Dentro de los tratamientos más importantes se cita el condicionamiento osmótico (Carvalho *et al.*, 2000; Nunes *et al.*, 2000; Bittencourt *et al.*, 2004; Menezes *et al.*, 2006).

El condicionamiento osmótico, propuesto por Heydecker y Gibbins (1978), consiste en la inmersión de las semillas en una solución osmótica por periodos de exposición y temperatura determinados. De esa manera es posible controlar la velocidad de imbibición del agua, permitiendo la ocurrencia de los procesos fisiológicos iniciales (fase I y II del proceso de germinación), sin alcanzar la humedad suficiente para que ocurra el alargamiento celular y, consecuentemente, la emergencia de la raíz primaria (fase III) (Bradford, 1986).

Sin embargo, para el empleo de esta técnica, es necesario conocer el comportamiento de la absorción del agua por las semillas, cuando son expuestas a soluciones osmóticas. El objetivo de este trabajo fue caracterizar la curva de adquisición de agua en semillas de *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer, sometidas a cinco potenciales osmóticos.

## Método

La curva de adquisición de agua fue determinada a través del peso inicial de 5 muestras de 4 repeticiones de 25 semillas por lote. Después, las semillas fueron imbibidas en las soluciones osmóticas de polietilenglicol, en potenciales de 0, -0.3, -0.6, -0.9 y -1.2 MPa, a una temperatura de 25°C.

Las semillas fueron retiradas de las soluciones en intervalos de tiempo predeterminados y secadas superficialmente, después de pesarlas se colocaron nuevamente en la solución osmótica. Tal procedimiento fue realizado hasta el término de la fase I, cuando ocurre la estabilización de la entrada del agua.

Al final de la fase I, las semillas fueron acondicionadas en rollos de papel humedecidos con 2.5 veces su peso seco y se colocaron en una germinadora con temperatura y fotoperiodo alternados (16 horas de oscuridad a 20°C y 8 horas de luz a 30°C). Se pesó periódicamente hasta la germinación visible (2 mm de raíz primaria) (Hadas, 1976). Para las semillas germinadas, se determinó la cantidad de agua a través del método de estufa 105 °C  $\pm$  3 por 24 h (Brasil, 2009).

Para estudiar las variaciones en el contenido de agua, fase I e inicio de la fase II, se ajustó el modelo de Brody, o monomolecular, de ecuación  $y = \alpha [1 - \beta \exp(-c x)]$ , con  $y$ = grado de humedad (%),  $x$ = tiempo e  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $c$ = parámetros del modelo. Se realizó un análisis de varianza y las medias se compararon mediante la prueba de Tukey, con significancia del 5%.

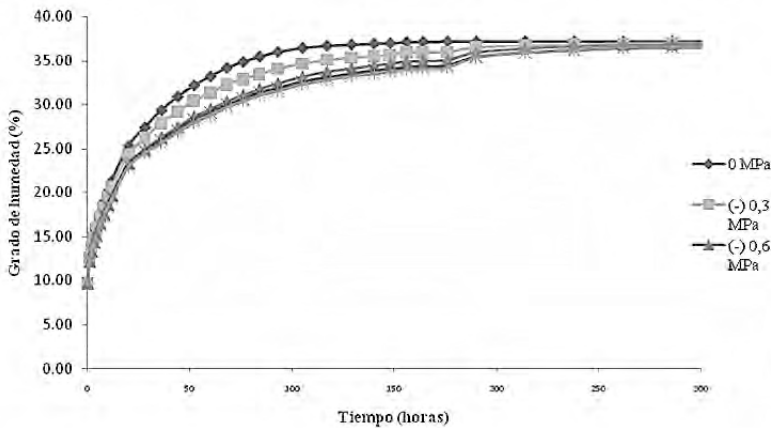
## Resultados y discusión

La curva de adquisición del agua de las semillas de araticum de tierra fría presentó tendencia de ajuste semejante al patrón trifásico propuesto por Bewley y Black (1994), en el cual después de la fase inicial de rápida adquisición de agua, se observó la fase intermediaria de absorción lenta (gráfica 1). Se observa que la velocidad de imbibición decreció a medida que se redujeron los potenciales osmóticos de las soluciones, demostrando la efectividad del tratamiento en restringir la entrada del agua en las semillas de araticum de tierra fría.

Las semillas secas, viables o no, imbiben agua. La fase inicial de imbibición (fase I), en general, es rápida, puramente física, que depende del potencial matricial de las semillas. Este proceso ocurre en cualquier material, muerto o vivo, que contenga sitios de unión o afinidad por el agua (Bewley y Black, 1994).

El cambio entre las fases I y II ocurrió después de las 109 horas de imbibición para el potencial de 0 MPa, mientras que en los demás potenciales, el cambio de fase ocurrió entre las 143 y 155 horas de imbibición.

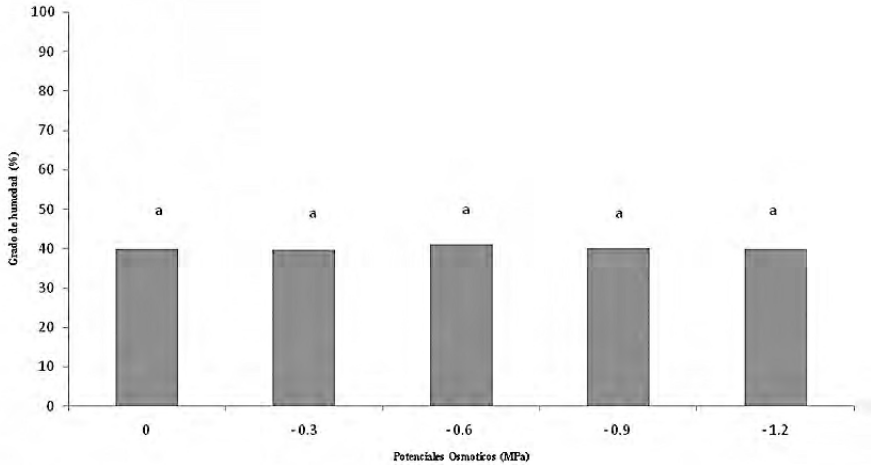
En la fase II, la absorción del agua se torna constante, aunque lenta. Durante el proceso de imbibición de las semillas de *araticum* de tierra fría en las soluciones osmóticas, fue posible observar que a medida que se redujo el potencial osmótico, se extiende más la fase II del patrón trifásico de germinación.



Gráfica 1. Grado de humedad (%) de las semillas de *Annona emarginata* (Schtdl.) H. Rainer sometidas a la imbibición en diferentes potenciales osmóticos

Las semillas sometidas a la imbibición en los diferentes potenciales osmóticos alcanzaron la fase III, en tiempos diferentes. En los tratamientos con potenciales de 0, -0.3 y -0.9 MPa, la germinación ocurrió a las 664 horas del inicio de los tratamientos, en cuanto que en el potencial de -0.6 MPa ocurrió a las 760 horas y en el potencial de -1.2 MPa a las 808 horas.

La fase III de la imbibición es marcada por un aumento en el contenido del agua de la semilla asociada con la emisión de la raíz primaria (Bewley y Black, 1994). En esta fase, las semillas de araticum de tierra fría sometidas a los diferentes potenciales osmóticos alcanzaron la cantidad de 40% de agua (gráfica 2).



Gráfica 2. Grado de humedad (%) de las semillas de *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer en la fase III de la germinación, cuando son sometidas a la imbibición en diferentes potenciales osmóticos

## Conclusión

La entrada del agua en las semillas de *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer fue más lenta en la medida que se redujo el potencial osmótico. No obstante, al alcanzar la fase III, todas las semillas alcanzaron el 40% de agua.

## Agradecimientos

CNPq (Beca) processo n.553428/2010-1

## Referencias

Bewley, J.D. and Black, M. 1994. *Seeds: Physiology of development and germination*. 2 ed. Plenum Press. New York, USA. 445 pp.

Bittencourt, M.L.C., Dias, D.C.F.S., Dias, L.A.S. and Araújo, E.F. 2004. Efeito do condicionamento osmótico das sementes na germinação e no crescimento das plântulas de aspargo. *Revista Brasileira de Sementes*. 26 (1): 50-56.

Bradford, K.J. 1986. Manipulation of seed water relations via osmotic priming to improve germination under stress conditions. *Hortscience*. 21 (5): 1105-1112.

Carvalho, L.F. de, Medeiros-Filho, S., Rossetti, A.G. and Teófilo, E.M. 2000. Condicionamento osmótico em sementes de sorgo. *Revista Brasileira de Sementes*. 22 (1): 185-192.

Costa, P.N. 2009. Reguladores vegetais, luz e temperatura na germinação de sementes de araticum de terra fria (*Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer). Dissertação Mestrado. Instituto de Biociências, UNESP – Universidade Estadual Paulista. Botucatu, Brasil. 78 pp.

Hadas, A. 1976. Water uptake germination of leguminous seeds under changing external water potential in osmotic solution. *Journal of Experimental Botany*. 27: 480-489.

Heydecker, W. and Gibbins, B.M. 1978. The priming of seeds. *Acta Horticulturae*. 83: 213-223.

Menezes, N.L. de, Espindola, M.C.G., Pasqualli, L.L., Santos, C.M.R. and Frazin, S.M. 2006. Associação de tratamentos pré-germinativos em sementes de alface. *Revista da FZVA*. 13 (1): 1-11.

Ministerio da Agricultura. 2009. *Regra de análise de sementes*. Brasília: Departamento de Produção Vegetal. Brasília, Brasil. 398 pp.

Nunes, U.R., Santos, M.R., Alvarenga, E.M. and Dias, D.C.F.S. 2000. Efeito do condicionamento osmótico e do tratamento fungicida na qualidade fisiológica e sanitária de sementes de cebola (*Allium cepa* L.). *Revista Brasileira de Sementes*. 22 (1): 239-246.

Pawshe, Y.H., Patil, B.N. and Patil, L.P. 1997. Effect of pregermination seed treatment on the germination and vigour of seedlings in custard apple (*Annona squamosa* L.). *Annals of Plant Physiology*. 11 (2): 150-154.

Rizzini, C.T. 1973. Dormancy in seeds of *Annona crassiflora* Mart. *Journal of Experimental Botany*. 24 (78): 117-123.

Scaloppi Junior, E.J. 2007. Propagação de espécies de Annonaceae com estacas caulinares. Tese Doutorado. Universidade Estadual Paulista. Jaboticabal. 92f.

Smet, S. de, Damme, P. Van, Scheldeman, X. and Romero, J. 1999. Seed structure and germination of cherimoya (*Annona cherimola* Mill.). *Acta Horticulturae*. 497: 269-278.

Vieira, M.H.P. and Irber, M. de V. 1996. Emergência e taxa de germinação em *Annona coriácea*. In: Congresso Nacional de Botânica. Pp. 47. Nova Friburgo. *Resumos...* Nova Friburgo: Sociedade Botânica do Brasil.

# La germinación de semillas de *Annona emarginata* (Schldtl.) H. Rainer después de diferentes tiempos de reposo de frutos

Corsato, Jaqueline Malagutti<sup>1</sup>, Ferreira, Gisela<sup>1</sup>  
Gimenez, Juliana Iassia<sup>1</sup>, Barbedo, Claudio Jose<sup>2</sup>  
Bueno, Silvana Sales Catarina<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Botánica, Instituto de Biociencias-UNESP  
Botucatu-SP. jaque\_corsato@hotmail.com

<sup>2</sup>Instituto de Botánica, Secretaría del Medio Ambiente  
Sección de Semillas y Mejoramiento Vegetal, Água Funda, SP.

<sup>3</sup>CATI-Núcleo de Producción de Plantas de São Bento do Sapucaí, SP

## Resumen

Las semillas de la familia Annonaceae tienen germinación lenta y desapareja debido a la inmadurez del embrión rudimentario. En este contexto, las investigaciones tratan de incrementar el porcentaje de germinación con la aplicación de fitoreguladores. Otra forma de tratar de romper la latencia es permitir el reposo postcosecha de los frutos. En este procedimiento, se almacenan los frutos en condiciones



adecuadas que permitan la realización del desarrollo de la semilla y asegurar una mayor calidad fisiológica. El objetivo del trabajo fue evaluar el comportamiento fisiológico de las semillas de *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer almacenadas en los frutos reposados postcosecha. El diseño experimental fue completamente aleatorizado en esquema factorial 5 x 2 (épocas de almacenamiento del fruto x tipo de imbibición de las semillas). Los frutos fueron almacenados a 5°C durante un periodo de 0, 7, 14, 21 y 28 días. Después del almacenamiento, las semillas fueron remojadas en agua destilada y en una solución de 800 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>4+7</sub> N-(fenilmetil)-aminopurina durante 60 horas. Las variables analizadas fueron: porcentaje, tiempo medio, índice de velocidad, frecuencia y sincronización de la germinación y análisis cuantitativo de los azúcares solubles y reductores totales. Los resultados fueron sometidos a análisis de varianza y se compararon las medias mediante la prueba de Tukey al 5% de probabilidad. Los mayores porcentajes y menores tiempos medios de germinación fueron observados para las semillas que se mantuvieron durante siete y 21 días en los frutos y remojadas en fitoreguladores. Los mayores contenidos de azúcares solubles totales fueron para las semillas que se mantuvieron por 14 y 21 días en los frutos. El reposo de postcosecha de los frutos ayuda en la germinación de las semillas de *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer.

Palabras clave: *giberelinas*, *citoquininas*, *azúcares solubles*.

## Introducción

La especie *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer, sinonimia de *Rollinia* sp., es popularmente conocida como araticum de tierra fría, nativa de Brasil y ha sido encontrada desde el estado de Rio Grande do Sul hasta Minas Gerais (Tokunaga, 2000; Rainer, 2007).

La importancia de esta especie está relacionada con su rusticidad que justifica su uso en programas de mejoramiento genético y como portainjerto para Annonaceae. Cuando se utiliza araticum de tierra fría como portainjerto para atemoya (*A. cherimola* Mill. x *A. squamosa* L.), o para la chirimoya (*A. cherimola* Mill.) se obtiene mayor compatibilidad,

resistencia a los hongos (*Phytophthora nicotianae*, *Pythium* sp., *Rhizoctonia solani*), a la pudrición de la raíz y a las brocas (*Bombina cratosomus*) que atacan el tallo de las plantas, además, se presenta tolerancia tanto a suelos inundados como secos (Kavati *et al.*, 1997; Buenaventura, 1999; Tokunaga, 2000).

A pesar de que las especies utilizadas como portainjertos se propagan por semillas es importante señalar que en general las especies de la familia Annonaceae presentan germinación lenta y no uniforme (Rizzini, 1973). Pawshe *et al.* (1997) y Smet *et al.* (1999) sugieren que la germinación se ve afectada por la presencia de ácido abscísico en el embrión, impermeabilidad y resistencia de la cubierta de la semilla a la entrada de agua. Sin embargo, Melo *et al.* (2007) encontraron que la latencia de las semillas de Annonaceae se debe a la presencia de un embrión rudimentario.

Una forma de reducir la latencia de la semilla es el reposo de los frutos posterior a la cosecha. En este procedimiento, los frutos se almacenan en condiciones adecuadas que permitan el desarrollo de la semilla garantizando mayor calidad fisiológica (Silva *et al.*, 2009; Vidigal *et al.*, 2006).

El objetivo de este estudio fue evaluar el comportamiento fisiológico de las semillas de *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer después del reposo postcosecha de los frutos.

## Método

El trabajo se realizó en el Laboratorio de Fisiología de la Germinación y Dormancia de Semillas, Departamento de Botánica del Instituto de Biociencias (IB) de la Universidad Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho (UNESP), Campus de Botucatu-SP, Brasil.

Los frutos de *A. emarginata* (Schltdl.) H. Rainer (araticum de tierra fría) fueron recolectados en febrero de 2009. Después de procesar la fruta, se determinó el contenido de agua de las semillas por el método de secado en un horno a  $105^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas y los resultados se expresan en porcentaje de peso húmedo de las semillas (Brasil, 2009).

El diseño experimental fue completamente al azar con un factorial 5 x 2 (tiempo de almacenamiento de frutos x imbibición en agua y fito-

reguladores) con un total de 10 tratamientos con cuatro réplicas de 25 semillas por lote.

Los frutos maduros, que tenían la cáscara verde y las semillas con coloración marrón oscuro se almacenaron a 5°C durante un periodo de 0, 7, 14, 21 y 28 días. Después del almacenamiento, los frutos se despulparon con la mano y las semillas fueron tratadas en una solución fungicida conteniendo N-triclorometiltio-4-ciclohexano-1, 2-dicarboximida (Captan®) al 2% por diez minutos y una solución bactericida de clorhidrato de oxitetraciclina (Terramicina®) al 2% durante veinte minutos, colocándolas en remojo en agua destilada y GA<sub>4+7</sub> + N-(fenilmetil)-aminopurina a una concentración de 800 mg L<sup>-1</sup> durante 60 horas (Costa, 2009).

Las semillas fueron puestas en rollos de papel Germiteste humedecido con agua destilada en una proporción de dos y media veces su peso seco (Brasil, 2009). El experimento se realizó en una cámara de germinación con alternancia de temperaturas de 20°C durante 18 horas de oscuridad y 30°C durante seis horas de luz.

Se contaron diariamente el número de semillas germinadas durante 60 días después de la siembra, considerándose como semillas germinadas las que presentaron por lo menos dos milímetros de la raíz primaria (Hadas, 1976). Las variables fueron: porcentaje, tiempo medio (TMG), índice de velocidad (IVG), frecuencia y sincronización (U) de la germinación, porcentaje de plántulas normales (Brasil, 2009), tamaño medio de las raíces y brotes (Laboriau, 1983; Laboriau y Agudo, 1987; Silva y Nakagawa, 1995). Fueron consideradas como plántulas normales aquellas que presentaron estructuras intactas.

Otra variable analizada fue la conductividad eléctrica, desarrollada por el método de la masa, con cuatro réplicas de 25 semillas por lote, se pesaron y remojaron en 100 mL de agua desionizada en vasos de plástico de 200 mL, mantenidos a 25°C durante 24 horas (Brasil, 2009). La lectura se llevó a cabo poco después de la extracción de los materiales de la incubadora con la ayuda de un banco de conductividad, agitando con cuidado cada recipiente con el fin de normalizar los electrolitos lixiviados en la solución y los resultados se expresaron en  $\mu\text{Scm}^2/\text{g}$  (Vieira y Krzyzanowski, 1999 citados por Vieira y Dutra, 2006).

Para el análisis de azúcares solubles totales y reductores, hubo cuatro réplicas de 25 semillas por lote. Las semillas fueron trituradas con la ayuda de un molino, luego congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas en un ultracongelador a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de la preparación del extracto.

Para la extracción de azúcares solubles totales, se utilizaron 100 mg de muestras de semillas frescas de araticum de tierra fría, las muestras fueron extraídas en agua destilada resultando en la fracción de azúcares solubles totales ajustando el volumen a 100 mL con agua destilada. La cuantificación se realizó mediante análisis colorimétrico, utilizando el método de fenol-sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956).

Los azúcares reductores totales se determinaron por el método de Somogy (1945) y Nelson (1944). Para la extracción se utilizaron 500 mg de masa fresca de semillas de araticum de tierra fría con agua destilada que resulta en la fracción del total de azúcares reductores. La cuantificación se realizó por colorimetría usando una longitud de onda de 500 nm.

Todos los datos fueron sometidos a análisis de varianza (prueba F) y las medias se compararon mediante la prueba de Tukey al 5% de probabilidad y prueba de Dunnett al 5% de probabilidad, cuando fue necesario (Gibson, 1990; Mischan y Pinho, 1996).

## Resultados

Sin la aplicación de los fitoreguladores, la germinación de las semillas de los frutos con reposo por 7, 14 y 21 días no difiere de las semillas retiradas de los frutos recién cosechados y solamente con 28 días de almacenamiento pero se observó una reducción significativa del porcentaje de germinación con relación a los demás tiempos de almacenamiento (cuadro 1). El uso de los fitoreguladores, aumentó el porcentaje de germinación de las semillas cuando los frutos fueron almacenados por 14 días, difiriendo de las semillas provenientes de los frutos recién cosechados (cuadro 1). Cuanto mayor es el tiempo de reposo pos-cosecha de los frutos (7-28 días) mayores fueron los valores de la conductividad eléctrica (cuadro 2).

La aplicación de los fitoreguladores redujo el tiempo medio necesario para que la germinación ocurriese, después de 14, 21 y 28 días de

reposo pos-cosecha (cuadro 1). Las semillas sin almacenamiento y sin aplicación de fitoreguladores germinaron más rápido que aquellas que pasaron por los tiempos de almacenamiento, pero el porcentaje de germinación fue bajo, no difiriendo de aquellas semillas con reguladores. Con el almacenamiento por 7, 14 y 21 días, la germinación fue mayor, pero demoraron más. Después de 28 días de reposo poscosecha el tiempo medio de germinación sin reguladores se empieza a reducir, pero la tasa germinativa también disminuye.

Las semillas que fueron imbibidas en fitoreguladores presentaron menor tiempo medio de germinación en todos los tiempos de almacenamiento del fruto, excepto aquellas sin almacenamiento donde la germinación de las semillas imbibidas en agua fue igual a las imbibidas en fitoreguladores.

Pero, a pesar de la reducción del tiempo medio de germinación, la aplicación de fitoreguladores y el reposo poscosecha de los frutos no fueron suficientes para aumentar el índice de velocidad de germinación (IVG), pues no hubo interacción entre el tiempo de reposo poscosecha del fruto y el tipo de imbibición al que las semillas fueron sometidas, observándose que en promedio, las semillas que permanecieron por 21 días en el interior de los frutos almacenados a 5°C presentaron el mayor índice de velocidad de germinación (12, 82) (cuadro 1).

Además, los tratamientos no fueron suficientes para sincronizar la germinación de las semillas de *Annona emarginata*. Como se observa en la gráfica 1, la germinación fue distribuida a lo largo del tiempo, con gráficos de frecuencia de germinación representando polígonos polimodales.

El porcentaje de plántulas normales (cuadro 3) fue mayor, en promedio, después de siete y 14 días de reposo poscosecha, siendo las de 14 días en reposo pos-cosecha y que fueron imbibidas en 800 mg L<sup>-1</sup> GA<sub>4+7</sub> N-(fenilmetil)-aminopurina las que presentaron mayor porcentaje de plántulas normales (69%) en comparación con las semillas imbibidas en agua destilada.

La longitud promedio de la raíz de las plántulas normales para los tiempos cero, 21 y 28 días de reposo poscosecha fue menor cuando las semillas fueron imbibidas en una solución de fitoreguladores. La longi-

tud promedio de la parte aérea, no tuvo diferencia en ambos tratamientos. Pero las semillas imbibidas en fitoreguladores presentaron mayor longitud media de la parte aérea con siete días de reposo poscosecha de los frutos (cuadro 3).

Los resultados del análisis de azúcares solubles totales (gráfica 2A) demostraron que, la mayor acumulación de azúcares ocurrió en las semillas que permanecieron almacenadas en el fruto por 14 y 21 días. Con respecto al contenido de azúcares reductores (gráfica 2B), no se observó alteración en la cantidad de esos compuestos en las semillas de *Annona emarginata* después del reposo poscosecha de los frutos.

Cuadro 1. La germinación [G (%)], significa la germinación tiempo [TMG (días)] y la velocidad de germinación (TG) de las semillas araticum de tierra fría (*Annona emarginata* (Schldt.) Rainer H.) después de un descanso tratamientos poscosecha de frutas (RPCF) y tratamiento de las semillas con  $GA_{4+7} + N$  (fenilmetil)-aminopurina

RPCF	$GA_{4+7} + N$ (fenilmetil)-aminopurina (mg L <sup>-3</sup> )		Medias
(días)	0	800	
	G (%)		
0	46 ab A	42 b A	44 b
7	62 a A	67 a A	64.5 a
14	57 a B	72 a A	64.5 a
21	49 a A	41 b A	45 b
28	28 b A	23 b A	25.5 c
Medias	48.4 A	49 A	
	C.V. (%) 20,71		
	TMG (días)		
0	25.92 c A	26.09 a A	26 c
7	35.31 ab A	28.86 a B	32.25 ab
14	39.22 a A	29.21 a B	34.37 a
21	32.85 b A	24.10 a B	28.37 bc
28	31.30 bc A	23.67 a B	27.62 c
Medias	33 A	26.45 B	
	C.V. (%) 10.39		

	IVG		
0	6.58 a A	7.15 a A	6.87 b
7	6.62 a A	11.2 a A	8.91 ab
14	7.48 a A	8.86 a A	8.17 ab
21	10.55 a A	15.09 a A	12.82 a
28	6.21 a A	7.56 a A	6.89 b
Medias	7.49 A	9.97 A	
C.V. (%) 45.19			

Medias seguidas por la misma letra minúscula en la línea y minúscula en la columna no difieren por la prueba de Tukey al 5% de probabilidad

Cuadro 2. Conductividad eléctrica CE ( $\mu\text{Scm } 2/\text{g}$ ) de semillas de araticum de tierra fría (*Annona emarginata* (Schldt.) H. Rainer), después del reposo de la poscosecha de los frutos (RPCF)

RPCF (días)	C.E ( $\mu\text{Scm}^2/\text{g}$ )
0	0.003 c
7	0.002 c
14	0.006 bc
21	0.01 b
28	0.017 a
C.V (%)	28,25

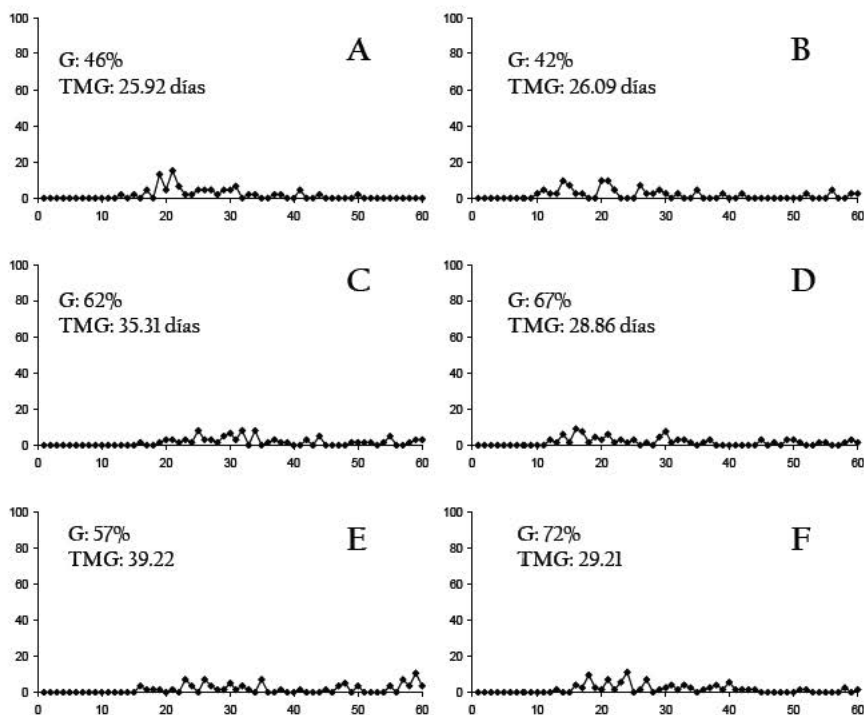
Medias seguidas por la misma letra no difieren por la prueba de Tukey al 5% de probabilidad

Cuadro 3. Plántulas normales (%), la longitud promedio de raíces (cm) y longitud promedio de brotes (cm) de araticum de tierra fría (*Annona emarginata* (Schldt.) H. Rainer) después del reposo poscosecha de los frutos y tratamientos de semillas con  $\text{GA}_{4+7} + \text{N}$  (fenilmetil)-aminopurina

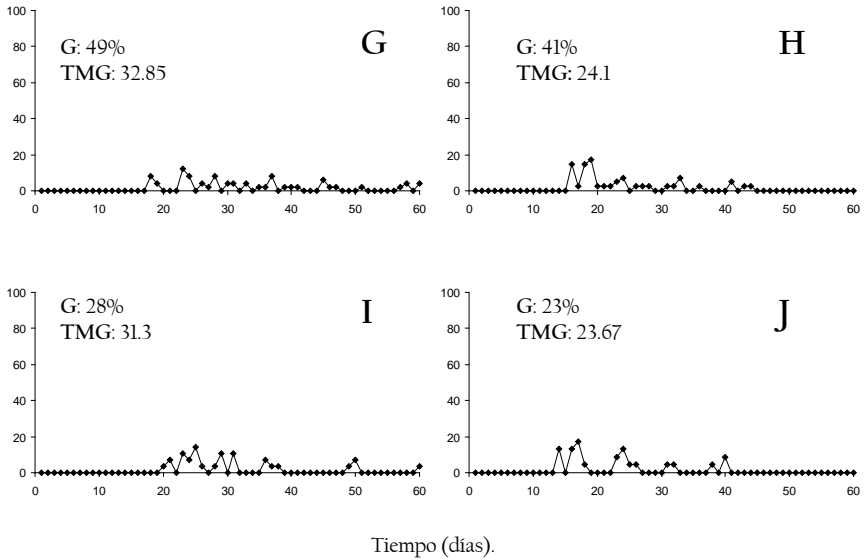
RPCF	$\text{GA}_{4+7} + \text{N}$ (fenilmetil)-aminopurina ( $\text{mg L}^{-1}$ )		Medias
(días)	0	800	
	Plántulas normales (%)		
0	37 ab A	21 c B	29 bc
7	47 a A	47 b A	47 a
14	48 a B	69 a A	58.5 a
21	38 ab A	24 c B	31 b
28	24 b A	8 c B	16 c
Medias	38.8 A	33.8 A	
C.V. (%) 26.13			
	Longitud media de la raíz (cm)		
0	5.05 a A	3.21 a B	4.25 a
7	4.45 a A	3.82 a A	4.25 a
14	3.51 a A	3.62 a A	3.62 a
21	4.49 a A	2.85 a B	3.75 a
28	4.15 a A	2.69 a B	3,50 a

Medias	4.40 A	3.35 A	
	C.V. (%) 25.26		
	Longitud media de parte aérea (cm)		
0	8.42 a A	10.32 ab A	9.62 ab
7	11.00 a A	12.72 a A	12.0 a
14	7.81 a A	10.38 ab A	9.25 ab
21	8.49 a A	11.04 ab A	9.87 ab
28	8.11 a A	7.07 b A	7.75 b
Medias	8.95 B	10.45 A	
	C.V. (%) 23.73		

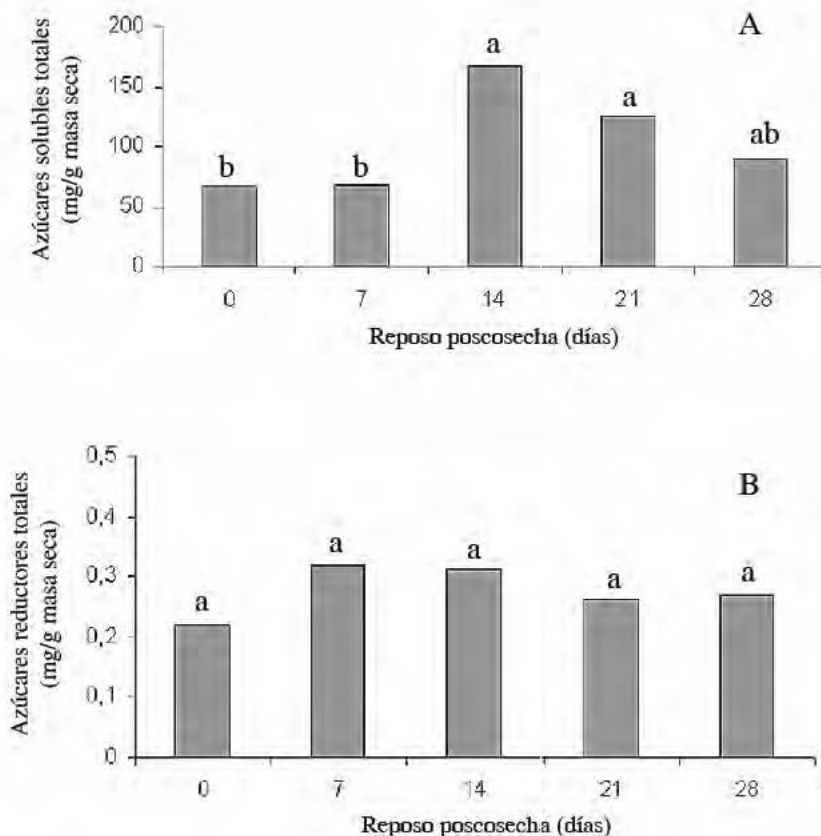
Medias seguidas por la misma letra minúscula en la línea y minúscula en la columna no difieren por la prueba de Tukey al 5% de probabilidad







Gráfica 1. Frecuencia relativa de la germinación de las semillas araticum de tierra fría (*Annona emarginata* (Schldtl.) H. Rainer) después de diferentes periodos de reposo pos-cosecha de los frutos y el tipo de hidratación. A: 0 días de reposo después de la cosecha de los frutos y semillas remojadas en agua destilada; B: 0 días de reposo después de la cosecha de frutas / semillas remojadas en 800 mg L<sup>-1</sup> G<sub>4+7</sub> N-(fenilmetil)-aminopurina; C: 7 días de reposo después de la cosecha de los frutos y semillas remojadas en agua destilada; D: 0 días de reposo después de la cosecha de frutas/semillas remojadas en 800 mg L<sup>-1</sup> G<sub>4+7</sub> N-(fenilmetil)-aminopurina; E: 14 días de reposo después de la cosecha de los frutos y semillas remojadas en agua destilada; F: 14 días de reposo después de la cosecha de frutas/semillas remojadas en 800 mg L<sup>-1</sup> G<sub>4+7</sub> N-(fenilmetil)-aminopurina; G: 21 días de reposo después de la cosecha de los frutos y semillas remojadas en agua destilada; H: 21 días de descanso después de la cosecha de frutas / semillas remojadas en 800 mg L<sup>-1</sup> G<sub>4+7</sub> N-(fenilmetil)-aminopurina; I: 28 días de reposo después de la cosecha de los frutos y semillas remojadas en agua destilada; J: 28 días de reposo después de la cosecha de frutas / semillas remojadas en 800 mg L<sup>-1</sup> G<sub>4+7</sub> N-(fenilmetil)-aminopurina



Gráfica 2. Contenido de azúcares solubles (A) y azúcares reductores totales (B), de las semillas de araticum de tierra fría (*Annona emarginata* (Schldtl.) H. Rainer) después de diferentes periodos de descanso después de la cosecha de los frutos

## Discusión

De acuerdo con Melo *et al.* (2007) las semillas de la familia Annonaceae tienen latencia debido a la presencia de un embrión rudimentario, lo que explica el bajo porcentaje de la germinación de estas semillas cuando son recién extraídas de los frutos. Son comunes los informes de

que la germinación de estas especies es lenta y desigual, dificultando la producción de plántulas a lo largo del año (Rizzini, 1973).

Así, las semillas que presentan embriones rudimentarios, como *araticum* de tierra fría, necesitan un proceso posterior a la cosecha para completar su desarrollo. Dias (2001) y Silva *et al.* (2009) informaron que las semillas contenidas en los frutos después de la cosecha pueden ser favorecidas por un periodo de descanso que permita la realización del proceso de maduración. En este caso, las semillas inmaduras presentes en el fruto completan su desarrollo resultando en la superación de la latencia, como se observó en esta investigación (cuadro 1).

Las especies de frutos carnosos han sido buenos ejemplos de los beneficios del reposo de frutos después de la cosecha cuando se trata de mejorar el rendimiento de semillas, puesto que este proceso reduce el riesgo en el campo, además de ayudar a la superación de la latencia, como ocurre en las semillas de la papaya, que cuando son recién extraídas germinan alrededor del 45% (Martín *et al.*, 2006) y después del almacenamiento de los frutos a 25°C durante 12 días incrementan el potencial de germinación (Aroucha *et al.*, 2004).

El tiempo de almacenamiento de los frutos después de la cosecha varía con la especie (Silva *et al.*, 2009). Martins *et al.* (2006) encontraron que las semillas de papaya almacenadas a 10°C aumentan su germinación de 45% (la semilla inicial) a 86%, concluyendo que la baja temperatura puede haber contribuido a la superación de latencia de las semillas. Un comportamiento similar se observó en las semillas de *araticum* de tierra fría, donde la temperatura de 5°C aumentó la germinación, cuando el almacenamiento fue de 7, 14 y 21 días.

Este efecto positivo sobre la germinación de las semillas de los frutos almacenados a baja temperatura se relaciona con los cambios internos en el equilibrio entre los promotores y los inhibidores de germinación (Carvalho y Nakagawa, 2000). Con el mantenimiento de las semillas en el interior de los frutos, la humedad se mantuvo elevada y con la temperatura baja puede haber cambiado, llegando al equilibrio hormonal (Cuquell, 1994), con un aumento de los promotores de la germinación. Además del almacenamiento de los frutos a bajas temperaturas, cabe destacar el efecto positivo de  $GA^{4+7}N$ - (fenilmetil)-aminopurina sobre

la germinación de semillas, especialmente en los frutos almacenados durante 14 días (cuadro 1).

Por tanto, la aplicación exógena de los reguladores produjo un efecto aditivo sobre las concentraciones endógenas de los promotores, lo que favorece la germinación y confirma los informes de que las especies con embriones rudimentarios responden a las sustancias reguladoras, como las giberelinas y citoquininas (Barbedo y Zaidan, 2004), hecho observado en varias especies del género *Annona* (Jubes *et al.*, 1975; Pawshhe *et al.*, 1997; Ferreira *et al.*, 2002; Stenzel *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2007). Además, las semillas con 14 días de reposo después de la cosecha tienen el mayor contenido de azúcares solubles, lo que pudo haber ayudado a la germinación.

Los azúcares solubles son uno de los primeros compuestos que se movilizan durante la germinación de semillas, con el propósito de proveer materiales y energía para que el proceso ocurra. En este contexto, la presencia de compuestos proveedores de energía en las semillas permite un mayor porcentaje de germinación y la formación de plántulas normales (Buckeridge *et al.*, 2004).

Durante la rehidratación de las semillas, se reparan las estructuras que pudieron haberse dañado, por lo que las reservas como la sacarosa y oligosacáridos son utilizadas como energía inmediata para llevar a cabo estas reparaciones. En general, estos compuestos se acumulan en las vacuolas de las células y en general no hay necesidad de una movilización, lo que resulta en una amplia eficiencia energética en las primeras etapas de germinación (Buckeridge *et al.*, 2004).

De acuerdo con Vidigal *et al.* (2006) el almacenamiento de los frutos después de la cosecha también puede conducir a un deterioro de las semillas y a la consiguiente disminución en el porcentaje de germinación, como ocurrió después de 28 días de almacenamiento.

El deterioro de la semilla lleva a la liberación de los componentes celulares durante la hidratación, debido a los daños causados en las membranas celulares (Barbedo y Cicero, 1998). La conductividad eléctrica representa la cantidad de sustancias extraídas durante el proceso de remojar las semillas, a través de estos resultados se puede inferir cómo las membranas celulares fueron dañadas (Pina-Rodrigues *et al.*, 2004).

La reducción en el porcentaje de germinación de las semillas araticum de tierra fría se relaciona a la pérdida de material vegetal durante la imbibición (Barbedo y Cicero, 1998).

Se observa que el almacenamiento de los frutos de araticum de tierra fría por el periodo desde 7 hasta 21 días favoreció el desarrollo del embrión, lo que está relacionado con cambios en el equilibrio entre los promotores y los inhibidores de germinación y resultó en una mayor germinación cuando el almacenamiento fue de 14 días.

## Conclusión

La posibilidad de almacenar los frutos de araticum de tierra fría después de la cosecha durante 21 días ayuda a la germinación.

## Referencias

- Aroucha, E.M.M. 2004. Influência do estágio de maturação, da época de colheita e repouso dos frutos e do osmocondicionamento na qualidade fisiológica de sementes de mamão (*Carica papaya* L.). Doutorado em Produção Vegetal. Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes. Brasil. 102f.
- Barbedo, C.J. and Cicero, S.M. 1998. Utilização do teste de condutividade elétrica para previsão do potencial germinativo de sementes de ingá. *Scientia Agrícola*. 55 (2): 249-259.
- Bonaventure, L. 1999. El cultivo de la chirimoya e de su híbrido atemoya em Brasil. In: First International Symposium on Cherimoya. Ecuador.
- BRASIL. 1992. Regras de análise de sementes (RAS). Brasília: Ministério da Agricultura e Reforma Agrária.
- Buckeridge, M.S., Santos, H.P.dos, Tiné, A.A.S. and Aidar, A.P.M. 2004. Mobilização de reservas. In: Ferreira, A.G. and Borghetti, F. (Orgs.). Germinação: do básico ao aplicado. Porto Alegre: Artmed. Brasil. Pp. 31-50.
- Carvalho, N.M. de and Nakagawa, J. 2000. Sementes: ciência, tecnologia e produção. 4 edição. Funep: Jaboticabal. 588 pp.

- Costa, P.N. 2009. Reguladores vegetais, luz e temperatura na germinação de sementes de araticum de tierra fría (*Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer). Dissertação Mestrado. Instituto de Biociências, UNESP – Universidade Estadual Paulista. Botucatu, Brasil. 78 pp.
- Cuquel, F.L., Carvalho, M.L.M. de and Chamma, H.M.C.P. 1994. Avaliação de métodos de estratificação para a quebra de dormência de sementes de erva-mate. *Scientia Agricola*. 51 (3): 415-421.
- Dias, D.C.F. 2001. Maturação de sementes. *Seed News*. 5 (6): 22-24.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*. 28 (3): 350-356.
- Ferreira, G., Erig, P.R. and Moro, E. 2002. Uso de ácido giberélico em sementes de fruta-do-conde (*Annona squamosa* L.) visando à produção de mudas em diferentes embalagens. *Revista Brasileira de Fruticultura*. 24 (1): 78-182.
- Gomes, F.P. 1990. Curso de Estatística experimental. Nobel. São Paulo, Brasil. 468 pp.
- Hadas, A. 1976. Water uptake germination of leguminous seeds under changing external water potential in osmotic solution. *Journal of Experimental Botany*. 27: 480-489.
- Jubes, J.T., Martinez, H., Padilla, E. and Oste, C. A. 1975. Efectos de escarificación, medio, posición de siembra y ácido gibberellico, sobre la germinación de semillas em cherimoyas (*Annona cherimola* Mill). *Revista Agronómica N.O. Argentina*. 12 (1-2): 161-171.
- Kavati, R.O. 1997. A cultura da atemóia (*Annona cherimola* Mill x *Annona squamosa* L.). Campinas: Departamento de Comunicação e Treinamento (DCT) – SAA/CATI. 22 pp.

- Labouriau, L.G. and Agudo, M. 1987. On the physiology of seed germination in *S. hispanica* L. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 59 (1): 37-56.
- Laboriau, L.G. 1983. A germinação das sementes. Monografia 24. OEA. Washington D. C., USA. 174 pp.
- Melo, D.L.B., Davide, A.C., da Silva, E.A.A., Faria, J.M.R. and Queiroz, S.E. 2007. Estudo morfo-anatômico do endosperma e embrião de sementes de *Annona crassiflora* Mart. *Revista Cerne*.
- Ministério da Agricultura. 2009. Regra de análise de sementes. Departamento de Produção Vegetal. Brasília, Brasil. 398 pp.
- Mischan, M.M. and Pinho, S.Z. de. 1996. Experimentação agrônômica: dados não balanceados. Fundibio, Botucatu, Brasil. 456 pp.
- Nelson, N.A. 1944. A photometric adaptation of the somogyi method for the determination of glucose. *Journal of Biological Chemistry*. 153 (2): 375-380.
- Pawshe, Y.H., Patil, B.N. and Patil, L.P. 1997. Effect of pregermination seed treatment on the germination and vigour of seedlings in custard apple (*Annona squamosa* L.). *Annals of plant physiology*. 11 (2): 150-154.
- Piña-Rodrigues, F.C.M., Figliolia, M.B. and Peixoto, M.C. 2004. Tecnologia de sementes: Testes de qualidade. In: Ferreira, A.G. and Borghetti, F. (Ogs.). Germinação: do básico ao aplicado. Artmed. Porto Alegre, Brasil. Pp. 265-282.
- Rainer, H. 2007. Monographic studies in the genus *Annona* L. (Annonaceae): Inclusion of the genus *Rollinia* A.St.-Hil. *Annals Naturhist. Mus. Wien*. 108: 191-205.



- Rizzini, C.T. 1973. Dormancy in seeds of *Annona crassiflora* Mart. *Journal of Experimental Botany*. 24 (78): 117-123.
- Silva, J.B. and Nakagawa, J. 1995. Estudos de fórmulas para cálculo de velocidade de germinação. *Informativo Abrate*. 5: 62-73.
- Silva, E.A.A. da, Melo, D.L.B. de, Bode, A.C.D.N. de; Abreu, G. B., Faria, J. M. R. and Hilhorst, H.W.M. 2007. Germination ecophysiology of *Annona crassiflora* seeds. *Annals of Botany*. 99: 823-830.
- Silva, L.B. da, Martins, C.C., Machado, C.G. and Nakagawa, J. 2009. Estádios de colheita e repouso pós-colheita dos frutos na qualidade de sementes de mamoneira. *Revista Brasileira de Sementes*. 31 (1): 50-59.
- Somogyi, M. 1945. Determination of blood sugar. *Journal of Biological Chemistry*. 160 (1): 69-73.
- Stenzel, N.M.C., Murata, I. M. and Neves, C. S. V. J. 2003. Superação da dormência em sementes de atemóia e fruta-do-conde. *Revista Brasileira de Fruticultura*. 25 (2): 305-308.
- Tokunaga, T. 2000. A cultura da Atemóia. Boletim técnico 233. CATI. Campinas, Brasil. P p. 80.
- Vidigal, D. de S., Dias, D.C.F. dos S., Naveira, D. dos S.P.C., Rocha, F.B. and Bhering, M.C. 2006. Qualidade fisiológica de sementes de tomate em função da idade e do armazenamento pós-colheita dos frutos. *Revista Brasileira de Sementes*. 28 (3): 87-93.
- Vieira, R.D. and Dutra, A.S. 2006. Condutividade elétrica em sementes de abóbora, híbrido Bárbara. *Horticultura Brasileira*. 24 (3): 305-308.

Villela, F.A. and Peres, W.B. 2004. Coleta, secagem e beneficiamento de sementes. In: Ferreira, A.G. and Borguetti, R. (Ogs.). Germinação: do básico ao aplicado. Artmed. Porto Alegre, Brasil. Pp. 265-281.

Zaidan, L.B.P. and Barbedo, C.J. 2004. Quebra de dormência em sementes. In: Ferreira, A. G. and Borghetti, F. (Ogs.). Germinação: do básico ao aplicado. Artmed. Porto Alegre, Brasil. Pp.135-146.



# Condicionamiento osmótico y GA<sub>3</sub> en las semillas de *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer

Gimenez, Juliana Iassia,<sup>1</sup>  
Ferreira, Gisela,<sup>1</sup>  
Corsato, Jaqueline Malagutti<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Biociências-UNESP, Departamento de Botânica. Distrito de Rubião Junior, s/n. CEP:18618-970. Botucatu, SP, Brasil. julianaiaassia@gmail.com

## Resumen

La especie *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer tiene interés como portainjertos para las especies comerciales como *Annona cherimola* Mill. x *A. squamosa* L., *Annona squamosa* L. y *Annona cherimola* Mill., debido a la tolerancia a la podredumbre de la raíz y del tallo, a los escarabajos y resistencia a los hongos del suelo. Los portainjertos son generalmente obtenidos a través de semillas. Sin embargo, la familia Annonaceae tiene semillas con bajo índice de germinación. Varias técnicas son usadas para incrementar la germinación y reducir el tiempo entre la siembra y la emergencia. Además de los reguladores de las plantas, otra técnica utilizada es el condicionamiento osmótico, que consiste en la inmersión de las semillas en soluciones osmóticas a temperaturas y periodos determinados, controlando la entrada del agua, ayudando a

tener una germinación más rápida y uniforme de varias especies. Así, el objetivo del trabajo fue determinar el efecto del condicionamiento osmótico y  $GA_3$ , en la germinación de las semillas de *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer. Las semillas fueron colocadas en remojo en soluciones de polietilenglicol (PEG 6000), a potenciales de 0, -0.3, -0.6, -0.9 y -1.2 MPa, con concentraciones de 0, 250, 500, 750 y 1000 mg L<sup>-1</sup> de  $GA_3$ , por 176 horas. El diseño experimental fue completamente aleatorizado en esquema factorial 5 x 5 (potenciales osmóticos x concentraciones de  $GA_3$ ). Después del condicionamiento osmótico, las semillas fueron envueltas en rollos de papel, alternando el fotoperiodo y la temperatura (16 h de oscuridad a 20°C y 8 h de luz a 30°C). Las variables analizadas fueron el porcentaje, el índice de velocidad, sincronización y frecuencia de la germinación. Los datos fueron sometidos a análisis de varianza y las medias se compararon mediante la prueba de Tukey al 5% de probabilidad. Al disminuir el potencial osmótico y aumentar la concentración del regulador, la germinación fue más sincrónica, pero el porcentaje de germinación se redujo. Los tratamientos no presentaron respuestas significativas para el tiempo medio y frecuencia de germinación, siendo la germinación no uniforme y espaciada a lo largo del tiempo. Las altas concentraciones de  $GA_3$  aumentan la velocidad de la germinación de las semillas del araticum de tierra fría (*Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer) igualmente, cuando son condicionadas a los bajos potenciales osmóticos, sin embargo, las combinaciones utilizadas no fueron eficaces para la superación de la dormancia o promover la sincronización de la germinación.

Palabras clave: germinación, regulador de la planta, potenciales osmóticos

## Introducción

La forma de propagación más indicada para las anonáceas comerciales es asexual, en especial con uso de injertos (George y Nissen, 1987; Gama y Manica, 1994), siendo importante escoger un portainjerto que presente al menos, tolerancia a los patógenos presentes en el suelo como *Phytophthora* (Campbell y Phillips, 1994). Como alternativa del

portainjerto, Scaloppi Junior (2007) sugiere el empleo de araticum de tierra fría (*Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer). Esta especie, sinónimo de *Rollinia* sp. (Rainer, 2007) es nativa del territorio brasileño con ocurrencia natural en altitudes de 950 metros (Tokunaga, 2000).

Los portainjertos son normalmente obtenidos a partir de semillas, pero la familia Annonaceae produce semillas de bajo índice germinativo (Vieira e Irber, 1996). Entre las causas responsables de la baja tasa germinativa, se cita la impermeabilidad del tegumento (Pawshe *et al.*, 1997; Smet *et al.*, 1999), sin embargo, Costa (2009) verificó que las semillas de araticum de tierra fría no presentan impermeabilidad, aunque la entrada de agua en las semillas sea lenta y no uniforme y el porcentaje de germinación bajo. Según Rizzini (1973) la dormancia en anonáceas es causada por la presencia de un embrión inmaduro. Melo *et al.* (2007) relatan que la dormancia es del tipo fisiológica, causada por la variación en el balance hormonal.

Varias técnicas han sido utilizadas con el objetivo de romper la dormancia fisiológica, así como para aumentar la germinación de las semillas y su tolerancia a diversos ambientes, además de reducir el tiempo comprendido entre la siembra y la emergencia de las plántulas. Dentro de los tratamientos más promisorios se cita el condicionamiento osmótico (Carvalho *et al.*, 2000; Nunes *et al.*, 2000; Bittencourt *et al.*, 2004; Menezes *et al.*, 2006).

El condicionamiento osmótico propuesto por Heydecker y Gibbins (1978), consiste en la inmersión de las semillas en una solución osmótica por periodos de exposición y temperatura determinados. De esa manera es posible controlar la velocidad de imbibición del agua, permitiendo la ocurrencia de los procesos fisiológicos iniciales (fase I y II del proceso de germinación), sin alcanzar humedad suficiente para que ocurra el alargamiento celular y, consecuentemente, la emergencia de la raíz primaria (fase III) (Bradford, 1986).

También han sido desarrollados trabajos utilizando reguladores de la planta en conjunto con el condicionamiento osmótico. La asociación del ácido giberélico con el condicionamiento osmótico proporciona aumento en la velocidad de germinación de semillas de palo-hormiga (*Triplaris americana*) (Mendonça *et al.*, 2005).

Sin embargo, no hay trabajos de condicionamiento osmótico con semillas de anonáceas, asociado o no a reguladores. Lo que existen son relatos del uso de reguladores para superación de la dormancia de semillas de anonáceas, tales como el de Campbell y Popenoe (1968) con semillas de *Annona diversifolia* Saff. que obtuvieron 77% de germinación usando 350 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> y Jubes *et al.* (1975), que observaron 77.32% de germinación empleando 500 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> en semillas de *Annona cherimola* Mill.

Otros trabajos fueron realizados con semillas de *Annona muricata* (Pinto, 1976), de *Annona squamosa* L. (Pawshe *et al.*, 1997; Stenzel *et al.*, 2003), de *Annona reticulata* (Valenzuela & Osório, 1998), de *Annona cherimola* Mill. (Smet *et al.*, 1999), de *Annona crassiflora* Mart. (Silva *et al.*, 2007) y *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer (Costa, 2009). En este último, el autor observó un bajo porcentaje de germinación (27% en la presencia de luz y 23% en oscuridad) aun a la temperatura que consideró más adecuada (20/30°C) y el uso de GA<sub>4+7</sub> + N-(fenilmetil)-IH-6-aminopurina proporcionó 37% de germinación, pero la germinación no fue uniforme ni sincronizada.

Con base en la importancia de araticum de tierra fría en la producción del portainjerto para especies cultivadas de anonáceas, como atemoya, graviola y fruta del conde y los problemas relacionados a la germinación de las semillas de esta especie, se tornan indispensables estudios que ayuden a la comprensión y la mejoría del proceso germinativo.

El objetivo del trabajo fue determinar el efecto del osmocondicionamiento y GA<sub>3</sub> en la germinación de semillas de *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer.

## Método

El trabajo fue realizado en el laboratorio de Fisiología de Germinación de Semillas del Departamento de Botánica, en el Instituto de Biociências de la Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho-UNESP, Campus de Botucatu, São Paulo, Brasil.

El diseño experimental fue completamente aleatorizado en esquema factorial 5 x 5 (potenciales osmóticos x concentración de GA<sub>3</sub>), totalizando 25 tratamientos, con cuatro repeticiones de 25 semillas por lote.

Las semillas fueron imbibidas en soluciones de polietilenglicol (PEG 6,000), en los potenciales osmóticos de 0; -0.3, -0.6, -0.9 y -1.2 MPa, con las concentraciones de 0; 250; 500; 750 y 1,000 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub>.

El tiempo de condicionamiento de 176 horas fue determinado a través de una prueba previa de imbibición en solución osmótica, siendo este tiempo el necesario para la estabilización de la curva de imbibición (inicio de la fase II). Para evitar la falta de oxígeno durante el experimento, fue adoptado el mecanismo de aireación, con auxilio de un compresor de aire para acuario.

Al término del condicionamiento, las semillas fueron lavadas en agua corriente y colocadas en rollos de papel Germitest humedecidas con agua deionizada y llevadas a una germinadora con temperatura y fotoperiodo alternados (16 horas de oscuridad a 20°C y 8 horas de luz a 30°C). El conteo del número de semillas germinadas fue realizado cada dos días, considerando como germinadas, las semillas que presentaron, un mínimo de 2 mm de raíz primaria (Hadas, 1976).

Las variables analizadas fueron el porcentaje, índice de velocidad, tiempo medio y frecuencia de germinación. Los datos fueron sometidos al análisis de varianza y las medias comparadas por el test Tukey a 5% de probabilidad.

## Resultados y discusión

Para el porcentaje de germinación y sincronización no hubo interacción entre los potenciales osmóticos y las concentraciones del regulador aplicado. En promedio, los mayores porcentajes y menor sincronización de la germinación fueron obtenidos en los tratamientos sin la utilización de GA<sub>3</sub> y con condicionamiento solamente en agua. Se observó que al disminuir el potencial osmótico y aumentar la concentración del regulador, la germinación fue más sincrónica, pero el porcentaje de germinación se redujo (cuadro 1). Los tratamientos tampoco presentaron respuestas significativas para el tiempo medio y frecuencia de germinación, siendo la germinación no uniforme y espaciada a lo largo del tiempo.

Cuando las semillas fueron imbibidas sin el uso de los fitoreguladores, la tasa más alta de velocidad de germinación fue en el potencial de 0



MPa, pero no fueron diferentes a las semillas remojadas en el potencial de -0.3 MPa. Considerando que, cuando se usa a 250 mg L<sup>-1</sup> del regulador, la mayor velocidad de germinación de las semillas se produjo con el potencial de -0.3 MPa, no difiriendo de los encontrados con el potencial de 0 MPa.

Esto se debe a que el condicionamiento osmótico lleva a la acumulación de solutos (azúcares, ácidos orgánicos e iones), necesarios al inicio del metabolismo de la semilla, y promoviendo la emergencia de la raíz primaria en menor espacio de tiempo (Bradford, 1986).

Se observa que en el potencial de 0 MPa y -0.3 MPa, al aumentar la concentración del regulador, el índice de velocidad de germinación disminuyó. Con la reducción del potencial osmótico, ocurrió la disminución del IVG cuando no se utilizó GA<sub>3</sub> y con 250 mg L<sup>-1</sup>. Sin embargo, con el aumento de la concentración de GA<sub>3</sub> (500, 750, 1000 mg L<sup>-1</sup>) no hubo reducción del IVG, igualmente con la reducción del potencial osmótico.

El condicionamiento osmótico permite que las semillas con diferentes velocidades de germinación sean llevadas al mismo estadio de desarrollo (Taylor *et al.*, 1998). De esta manera, las semillas de menor vigor (emergencia más lenta) se nivelan cualitativamente con las de mayor vigor durante la imbibición controlada, resultando en una germinación más uniforme, lo mismo que en condiciones desfavorables (Guimarães *et al.*, 1993).

Cuadro I. Germinación (%), sincronización (U) e índice de velocidad de germinación (IVG) de las semillas de araticum tierra fría (*Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer) sometidas al condicionamiento osmótico en diferentes potenciales osmóticos y concentraciones de GA<sub>3</sub>.

Potenciales osmóticos	GA <sub>3</sub> (mg L <sup>-1</sup> )					Medias
	0	250	500	750	1000	
	PG (%)					
0	34	22	17	18	7	20 a
-0.3	27	22	14	10	11	17 ab
-0.6	15	6	10	13	18	12 bc
-0.9	18	14	5	9	6	10 c

-1.2	9	4	7	7	5	6 c
Medias	21 A	14 B	11 B	11 B	9 B	
C.V. (%)	55.10					
	U					
0	2.40	1.79	1.94	1.39	0.75	1.65 a
-0.3	2.24	2.07	1.36	1.12	0.86	1.53 ab
-0.6	1.23	0.50	0.88	1.39	1.72	1.14 abc
-0.9	1.69	1.50	0.37	0.98	0.38	0.99 bc
-1.2	0.73	0.25	0.75	0.75	0.50	0.60 c
Medias	1.66 A	1.22 AB	1.06 AB	1.13 AB	0.84 B	
C.V. (%)	62.83					
	IVG					
0	0.35 aA	0.20 abB	0.14 aBC	0.18 aBC	0.06 aC	0.19
-0.3	0.26 abA	0.24 aA	0.14 aAB	0.08 aB	0.09 aB	0.16
-0.6	0.12 cA	0.06 cA	0.08 aA	0.11 aA	0.16 aA	0.11
-0.9	0.14 bcA	0.10 bcA	0.03 aA	0.09 aA	0.05 aA	0.08
-1.2	0.06 cA	0.02 cA	0.05 aA	0.06 aA	0.04 aA	0.04
Medias	0.18	0.13	0.09	0.10	0.08	
C.V. (%)	55.85					

Medias seguidas por la misma letra, minúscula en la columna y mayúscula en la línea, no difieren entre sí por el test de Tukey a 5% de probabilidad

La obtención de resultados favorables como el condicionamiento fisiológico depende del control de los factores involucrados, como la duración del tratamiento, la temperatura, la aireación y el potencial. Además de eso, la especie, la calidad de las semillas, el secado o no después del condicionamiento, pueden también afectar el resultado (Heydecker y Gibbins, 1978; Cantliffe, 1997).

Algunas investigaciones han mostrado los efectos de la duración del periodo de condicionamiento. En este trabajo se verifica que el tiempo de condicionamiento de 176 horas no fue adecuado para la mejoría del proceso germinativo.

Penaloza y Eira (1993), trabajando con semillas de tomate, concluyeron que la interacción entre el tiempo de condicionamiento y la calidad inicial de las semillas, influyen en la respuesta al tratamiento. De este modo, el tiempo de condicionamiento es un factor que debe ser investigado para la utilización del condicionamiento osmótico en semillas de *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer.

## Conclusión

Las altas concentraciones de  $GA_3$  aumentan la velocidad de la germinación de las semillas del araticum de tierra fría (*Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer) al igual que, cuando se condicionan a bajos potenciales osmóticos, sin embargo, las combinaciones utilizadas no fueron eficaces para romper la dormancia o promover la sincronización de la germinación.

## Agradecimientos

CNPq (Beca) processo n.553428/2010-1.

## Referencias

- Bittencourt, M.L.C., Dias, D.C.F.S., Dias, L.A.S. and Araújo, E.F. 2004. Efeito do condicionamento osmótico das sementes na germinação e no crescimento das plântulas de aspargo. *Revista Brasileira de Sementes*. 26 (1): 50-56.
- Bradford, K.J. 1986. Manipulation of seed water relations via osmotic priming to improve germination under stress conditions. *Hortscience*. 21 (5): 1105-1112.
- Cantliffe, D.J. 1997. Priming and synthetic seed applications to stand establishment problems. In: Bennett, M.A. and Metzger, J.D. (Ed.). Fifth National Symposium on Stand Establishment. Columbus, Ohio. USA. Pp. 117-126.
- Campbell, C.W. and Phillips, R.L. 1994. The atemoya. Fruit crops Fact Sheet FC-64. University of Florida. Gainesville. 3 pp.
- Campbell, C.W. and Popenoe, I. 1968. Effect of gibberellic acid on seed dormancy of *Annona diversifolia* Saff. *Proceedings of the Tropical Region American Society for Horticultural Science*. 11: 33-36.
- Carvalho, L.F. de, Medeiros-Filho, S., Rossetti, A.G. and Teófilo, E.M. 2000. Condicionamento osmótico em sementes de sorgo. *Revista Brasileira de Sementes*. 22 (1): 185-192.

- Costa, P.N. 2009. Reguladores vegetais, luz e temperatura na germinação de sementes de araticum de tierra fría (*Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer). Dissertação Mestrado. Instituto de Biociências, UNESP–Universidade Estadual Paulista, Botucatu, Brasil. 78 pp.
- Gama, F. and Manica, I. 1994. Propagação. In: Manica, I. Cultivo das anonáceas: Ata, Cherimólia, Graviola. EVANGRAF. Porto Alegre, Brasil. Pp. 30-37.
- George, A.P. and Nissen, R.J. 1987. Propagation of *Annona* species, a review. *Scientia Horticulturae*. 33: 75-85.
- Guimarães, R.M., Fraga, A.C., Vieira, M.G.G.C., Silveira, J.F. and Oliveira, J.A. 1993. Efeito do condicionamento osmótico sobre a germinação e desempenho de sementes de algodão (*Gossypium hirsutum* L.) sob condições ideais e de estresse térmico e hídrico. *Ciência e Prática*. 17 (3): 215-223.
- Hadas, A. 1976. Water uptake germination of leguminous seeds under changing external water potential in osmotic solution. *Journal of Experimental Botany*. 27: 480-489.
- Heydecker, W. and Gibbins, B.M. 1978. The priming of seeds. *Acta Horticulturae*. 83: 213-223.
- Jubes, J.T., Martinez, H., Padilla, E. and Oste, C.A. 1975. Efectos de escarificacion, medio, posicion de siembra y acido gibberellico, sobre la germinacion de semillas em chirimoya (*Annona cherimolia* Mill.). *Rev. Agron. N. O. Argent*. 12 (1-2): 161-171.
- Melo, D.L.B.de, Davide, A.C., Silva, E.A.A. da, Faria, J.M.R. and Queiroz, S.E. 2007. Estudo morfo-anatômico do endosperma e embrião de sementes de *Annona crassiflora* Mart. *Revista Cerne*. in press.

- Mendonça, A.V.R., Coelho, E.A., Souza, N.A. de, Balbinot, E., Silva, R.F. da and Barroso, D.G. 2005. Efeito da hidratação e do condicionamento osmótico em sementes de pau-formiga. *Revista Brasileira de Sementes*. 27 (2): 111-116.
- Menezes, N.L. de, Espindola, M.C.G., Pasqualli, L.L., Santos, C.M.R. and Frazin, S.M. 2006. Associação de tratamentos pré-germinativos em sementes de alface. *Revista da FZVA*. 13 (1): 1-11.
- Nunes, U.R., Santos, M.R., Alvarenga, E.M. and Dias, D.C.F.S. 2000. Efeito do condicionamento osmótico e do tratamento fungicida na qualidade fisiológica e sanitária de sementes de cebola (*Allium cepa* L.). *Revista Brasileira de Sementes*. 22 (1): 239-246.
- Pawshé, Y.H., Patil, B.N. and Patil, L.P. 1997. Effect of pregermination seed treatment on the germination and vigour of seedlings in custard apple (*Annona squamosa* L.). *Annals of Plant Physiology*. 11 (2): 150-154.
- Penaloza, A.P.S. and Eira, M.T.S. 1993. Hydration-dehydration treatments on tomato seeds (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Seeds Science and Technology*. 21: 309-316.
- Pinto, A.C.Q. 1976. Influência de hormônio sobre o poder germinativo de sementes de graviola. In: Congresso Brasileiro de Fruticultura, 3. Sociedade Brasileira de Fruticultura. Rio de Janeiro, Brasil. Pp. 415-420.
- Rainer, H. 2007. Monographic studies in the genus *Annona* L. (Annonaceae): inclusion of the genus *Rollinia* A.ST.-HIL. *Annalen des Naturhistorischen Museums in Wien*. 108 B: 191-205.
- Rizzini, C.T. 1973. Dormancy in seeds of *Annona crassiflora* Mart. *Journal of Experimental Botany*. 78: 117-123.

- Scaloppi Junior, E.J. 2007. Propagação de espécies de Annonaceae com estacas caulinares. Tese Doutorado. Faculdade de Ciências Agrônômicas e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista. Jaboticabal. 92f.
- Silva, E.A.A. da, Melo, D.L.B., Davide, A.C., Bode, N., Abreu, G.B., Faria, J.M.R. and Hilhorst, H.W.M. 2007. Germination ecophysiology of *Annona crassiflora* seeds. *Annals of Botany*. 99: 823-830.
- Smet, S. de, Damme, P. Van, Scheldeman, X. and Romero, J. 1999. Seed structure and germination of cherimoya (*Annona cherimola* Mill.). *Acta Horticulturae*. 497: 269-278.
- Stenzel, N.M.C., Murata, I.M. and Neves, C.S.V.J. 2003. Superação da dormência em sementes de atemóia e fruta-do-conde. *Revista Brasileira de Fruticultura*. 25 (2): 305-308.
- Taylor, A.G., Allen, P.S., Bennett, M.A., Bradford, K.J., Burris, J.S. and Misra, M.K. 1998. Seeds enhancements. *Seed Science Research*. 8: 245-256.
- Tokunaga, T.A. 2000. A cultura da atemóia. CATI. Campinas, Brasil. 80 pp.
- Valenzuela, J.R.C. and Osório, J.D.B. 1998. Efecto del ácido giberélico y el método de siembra em la germinación de semillas y crecimiento de plántulas de anona colorada (*Annona reticulata* L.). *Revista Facultad Nacional de Agronomía*. 51 (2): 235-244.
- Vieira, M.H.P. and Irber, M. de V. 1996. Emergência e taxa de germinação em *Annona coriácea*. In: Congresso Nacional de Botânica. Sociedade Botânica do Brasil. 47°. Nova Friburgo: CD

# Fotosíntesis, índices fisiológicos y acumulación de Ca, Mg y S en plantas jóvenes de araticum de tierra fría (*Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer)

Baron, Daniel<sup>1</sup>, Ferreira, Gisela<sup>1</sup>  
Boaro, Carmen Sílvia Fernandes<sup>1</sup>, Rodrigues, João Domingos<sup>1</sup>  
Macedo, Ana Cláudia<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Botánica, Instituto de Biociencias (IB), Universidad Estadual Paulista  
Júlio de Mesquita Filho Campus de Botucatu. Distrito de Rubião Júnior s/n. Botucatu,  
São Paulo, Brasil. Caja postal: 510, Código postal: 18.618-970, fone +55-14-3811-6265.  
agroozzy@yahoo.com.br.

## Resumen

Debido a la importancia del estudio de la nutrición mineral en plantas de anonáceas para la producción de portainjertos, el presente trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto de la acumulación de los elementos minerales fósforo (P), calcio (Ca) y magnesio (Mg) en la tasa de asimilación de carbono ( $A_{net}$ ) y en los índices fisiológicos: relación de área foliar (RAF), tasa de crecimiento relativo (TCR) y tasa de asimilación neta de carbono (TAL) de las plantas jóvenes de *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer cultivadas en diferentes



fuerzas-iónicas (FI) de la solución nutritiva completa No. 2 de Hoagland y Arnon (1950). El experimento fue conducido en un invernadero de la Universidad Estadual Paulista (UNESP), Botucatu-SP, Brasil. El diseño experimental fue en bloques al azar, en esquema factorial 4 x 3 (FI x cosechas) para las mediciones de fotosíntesis, con cinco repeticiones; y de 4 x 5 (FI x cosechas) para el cálculo de los índices fisiológicos RAF, TCR y TAL, con cinco repeticiones y de 4 x 4 (FI x cosechas) para la determinación del contenido iónico de las hojas, con cuatro repeticiones. Los tratamientos: 25% FI (CEa de  $0.50 \pm 0.2 \text{ mS cm}^{-1}$ ), 50% FI (CEa de  $1.00 \pm 0.2 \text{ mS cm}^{-1}$ ); 75% FI - (CEa de  $1.5 \pm 0.02 \text{ mS cm}^{-1}$ ); 100% FI (CEa de  $2.0 \pm 0.02 \text{ mS cm}^{-1}$ ) (testigo) de la solución completa No. 2 de Hoagland y Arnon (1950). Las evaluaciones de fotosíntesis fueron realizadas utilizando un IRGA, modelo LI-6400, LI-COR. Los datos fueron sometidos a análisis de varianza y pruebas de Tukey a 5%. El cultivo en solución nutritiva con 50% FI presentó los mayores valores de acumulación de Ca, Mg y S y también mayores valores de fotosíntesis ( $A_{\text{net}}$ ) y de índices del análisis de crecimiento (TCR y TAL). Por lo que la solución con 50% FI debe ser usada en cultivo pues proporcionó la acumulación de Ca, Mg y S de la forma más benéfica para que las plantas puedan expresar mayor potencial para la asimilación de carbono.

Palabras clave: *Annonaceae*, análisis de crecimiento, fuerza iónica, fotosíntesis, acumulación iónica.

## Introducción

El intercambio gaseoso en las hojas es el proceso fisiológico más estudiado y entendido en todo el reino vegetal (Taiz y Zeiger, 2009), se sabe que los patrones fotosintéticos y de desarrollo son afectados por cambios de disponibilidad de nutrientes minerales (Larcher, 2000) debido al efecto directo de los elementos minerales en varios pasos metabólicos (Marschner, 1995; Epstein y Bloom, 2006).

El análisis de crecimiento de plantas se utiliza para evaluar las diferencias en el crecimiento de las mismas, ya sea en la genética o con

relación a los cambios ambientales y a las condiciones de cultivo a la que están sometidas (Benincasa, 2003). El análisis de crecimiento se realiza utilizando los índices fisiológicos como la razón de área foliar (RAF), tasa de crecimiento relativo (TCR) y tasa de asimilación neta (TAL) (Radford, 1967).

El análisis foliar como resultado del estado nutricional de las plantas está basado en la premisa fundamental de la existencia de correlaciones significativas entre los niveles de nutrientes encontrados en las muestras y el crecimiento o la producción de componentes del cultivo (Batalia *et al.*, 1983; Malavolta *et al.*, 1997; Brizola *et al.*, 2005).

En este estudio se evaluó el efecto de diferentes concentraciones (fuerzas iónicas) de Ca, Mg y S de la solución nutritiva No. 2 de Hoagland y Arnon (1950) en el intercambio gaseoso, índices fisiológicos y en la acumulación nutricional en las plantas de araticum de tierra fría (*Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer) en cultivo hidropónico líquido.

## Método

El experimento se llevó a cabo en un invernadero en el Departamento de Botánica perteneciente al Instituto de Biociencias (IB), Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Campus de Botucatu, SP, Brasil. Las semillas de araticum de tierra fría (*Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer) se sembraron en bandejas rellenas con vermiculita desplazada. Las plantas fueron transplantadas a botes con un volumen de aproximadamente 1.5 litros con una solución de nutrientes continuamente ventilada.

El diseño experimental fue en bloques al azar en un esquema factorial 4 x 3 (tratamiento x cosecha) y para las medidas del intercambio gaseoso, cinco repeticiones de una planta; cultivos 4 x 5 (fuerza iónica x cosecha) para el cálculo de los índices fisiológicos y cinco repeticiones de una planta y 4 x 4 (cultivos fuerza iónica x cosecha) para la determinación iónica de las hojas, con cuatro repeticiones de una planta. Los tratamientos se realizaron mediante la variación de la concentración iónica (fuerzas iónicas), de la solución nutritiva completa No. 2 de Hoagland y Arnon (1950) a partir de la dilución de la solución completa

en el agua desmineralizada al 25% a lo que se llamó el 25% FI (CEa  $0.50 \pm 0.2 \text{ mS cm}^{-1}$ ) y así sucesivamente, obteniéndose 50% FI (CEa de  $1.00 \pm 0.2 \text{ mS cm}^{-1}$ ); 75% FI (CEa de  $1.5 \pm 0.02 \text{ mS cm}^{-1}$ ); 100% FI (CEa de  $2.0 \pm 0.02 \text{ mS cm}^{-1}$ ) (testigo).

La evaluación del intercambio de gases se realizó utilizando el sistema de equipo abierto de la fotosíntesis IRGA (LI-6400, LI-COR, Lincoln, NE, USA). Estas medidas se llevaron a cabo desde las 09:00 hasta las 11:00 h en días soleados a los 63, 98 y 126 días después del trasplante (DAT). Se eligió en cada ocasión, la segunda o tercera hojas totalmente expandida y se midió la tasa de asimilación de  $\text{CO}_2$  ( $A_{\text{net}}$ ,  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), conductancia estomática ( $g$ ,  $\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) y la tasa de transpiración ( $E$ ,  $\text{mmol vapor de agua m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), adoptándose  $1700 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (PAR) de luminosidad. La eficiencia del uso del agua (WUE,  $\mu\text{mol CO}_2 (\text{mmol H}_2\text{O})^{-1}$ ) fue determinada por la relación entre  $A_{\text{net}}$  y  $E$  ( $A_{\text{net}}/E$ ), descrita por (Berry y Downton, 1982) y la eficiencia instantánea de carboxilación ( $A_{\text{net}}/C_i$ ) determinada según la metodología descrita por Von Caemmerer y Farquhar (1981).

Para el cálculo de las variables del análisis de crecimiento de plántulas de araticum de tierra fría se recolectaron a los 28, 56, 84, 112 y 140 DAT y se realizaron las medidas de área foliar, materia seca total y de la hoja para determinar los índices fisiológicos RAF, TCR y TAL a través de sus respectivas fórmulas matemáticas, de acuerdo con la recomendación de varios textos dedicados al análisis de crecimiento funcional (Radford, 1967; Magalhães, 1986; Benincasa, 2003).

La determinación de los contenidos de nutrientes de calcio (Ca), magnesio (Mg) y azufre (S) presente en las hojas a los 28, 56, 112 y 140 DAT se realizó de acuerdo a la metodología descrita por (Malavolta *et al.*, 1997). A partir de estos resultados, se hicieron los cálculos de la adecuación de las unidades, es decir, la conversión de  $\text{g/kg}^{-1}$  para  $\text{g planta}^{-1}$ , para cada elemento mineral acumulado en la planta.

Los datos fueron sometidos a análisis de varianza (ANOVA) y las medias se compararon mediante la prueba de Tukey al 5% de probabilidad ( $P \leq 0.05$ ). El análisis estadístico fue realizado utilizando el software SAS, versión 9.0 (SAS, 2002).

## Resultados y discusión

Se observó que las plantas jóvenes de araticum de tierra fría responden a diferentes fuerzas iónicas de distintas maneras, con un crecimiento mayor las plantas cultivadas en 50% FI y 75% FI, y un crecimiento menor, las plantas cultivadas en 25% FI e intermedios a los cultivados en el 100% SI. Esta afirmación se basa en diferentes herramientas fisiológicas (gráficas 1, 2 y 3) utilizadas durante el periodo experimental, en un análisis conjunto de todas las variables, las reducciones drásticas en el suministro de elementos minerales, como ocurrió con 25% FI, reduce significativamente su desarrollo, tal como ha señalado Avilán (1975) en Batista *et al.* (2003), también con anonáceas.

Sin embargo, en las soluciones con el 100% FI (lo que representa una solución estándar para las plantas), también se observa la reducción en la tasa de fotosíntesis y la acumulación de elementos minerales, que muestra así que la especie no requiere grandes cantidades de elementos minerales para expresar su potencial de desarrollo (gráfica 2). La justificación de la reducción de  $A_{net}$  y  $E$  que presentan las plantas cultivadas en 100% FI, alcanzando los valores más bajos en los 126 DAT (gráfica 3), encuentra apoyo en los trabajos de Schwarz *et al.* (2002) en plantas de tomate cultivadas en diferentes valores de conductividad eléctrica de la solución nutritiva, ya que el aumento en la conductividad eléctrica (C. E.) de la solución nutritiva puede conducir a un crecimiento vegetativo reducido, ya sea de toda la planta o las partes de ella (Schwarz y Kuchenbuch, 1997). Con respecto a las respuestas fotosintéticas, se sabe que el acceso de  $CO_2$  a las células del mesófilo ocurre a través de la apertura estomática y por tanto afectan directamente a los cambios en  $gs$   $A_{net}$  e  $E$  (Farquhar y Sharkey, 1982), además de que  $gs$  es influenciado por el ambiente (Berry y Bjorkman, 1980), el ácido abscísico (Mahouachi *et al.*, 2006) y la nutrición mineral (Von Caemmerer y Farquhar, 1981; Marschner, 1995; Epstein y Bloom, 2006; Taiz y Zeiger, 2009).

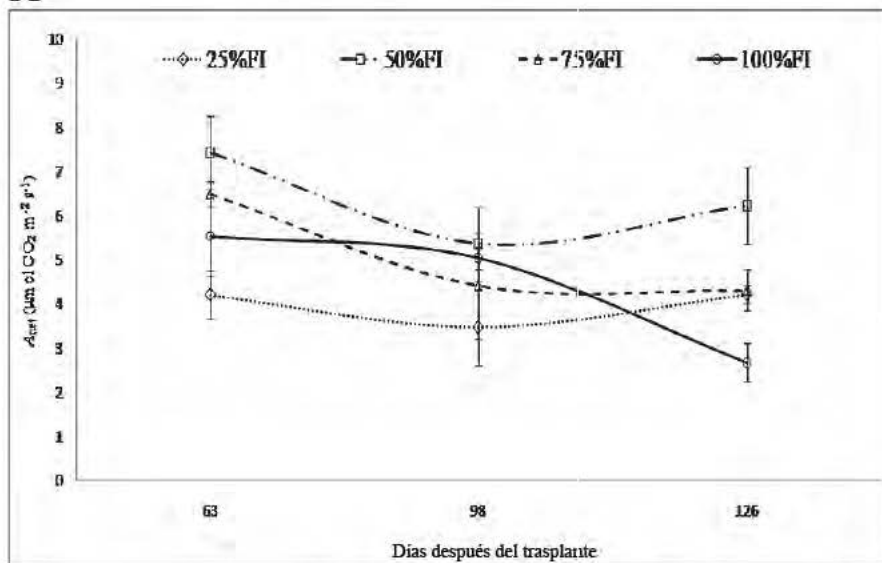
La  $A_{net}$ , de las plantas sometidas a tratamiento de 50% FI, es mayor que en los de los otros tratamientos (gráfica 1) lo que se puede atribuir a la mejor utilización de los elementos minerales suministrados. Sin embargo, se observó una disminución de la tasa de transpiración y la alta

$A_{\text{net}}$  está mediada por la actividad de Rubisco, que dio lugar a mejores WUE (gráfica 1). Debe tenerse en cuenta, por tanto, que la difusión de  $\text{CO}_2$  y la pérdida de agua por transpiración son procesos independientes (Larcher, 2000) y aunque la transpiración puede ser considerada como un “gasto necesario” asociado a la apertura estomática para permitir la difusión de dióxido de carbono del aire para la fotosíntesis (Afrousheh *et al.*, 2010) y permitir el flujo de masa de nutrientes minerales absorbidos por las raíces hasta la parte aérea (Bilger *et al.*, 1984), no siempre las magnitudes  $A_{\text{net}}$  y  $E$ , son dependientes, como se observa en este trabajo.

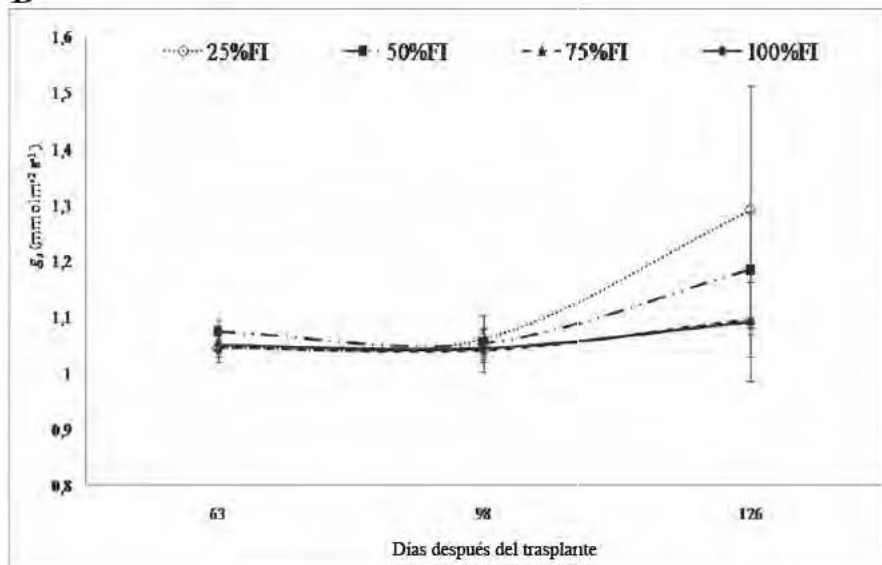
Las plantas que se mantuvieron en 25% FI presentaron los menores valores de WUE (gráfica 3), que pueden tener como consecuencia directa un efecto en la conductancia estomática de las plantas jóvenes y, posteriormente, en la actividad enzimática (Von Caemmerer y Farquhar, 1981) con consecuencias para la utilización de los nutrientes minerales (Ranjith *et al.*, 1995).

El papel del Ca en las células, es estructural y en la percepción de señales de alguna respuesta de las plantas al medio ambiente, como la regulación de los estomas (Mahouachi *et al.*, 2006; McAinsh y Pittman, 2009). Terry y Huston (1975) argumentan que la aparente falta de efecto sobre la fotosíntesis se debe a que este elemento es necesario en pequeñas cantidades para esta actividad metabólica, a diferencia de otros elementos necesarios tales como el fósforo (Terry y Ulrich, 1973a) y el potasio (Terry y Ulrich, 1973b).

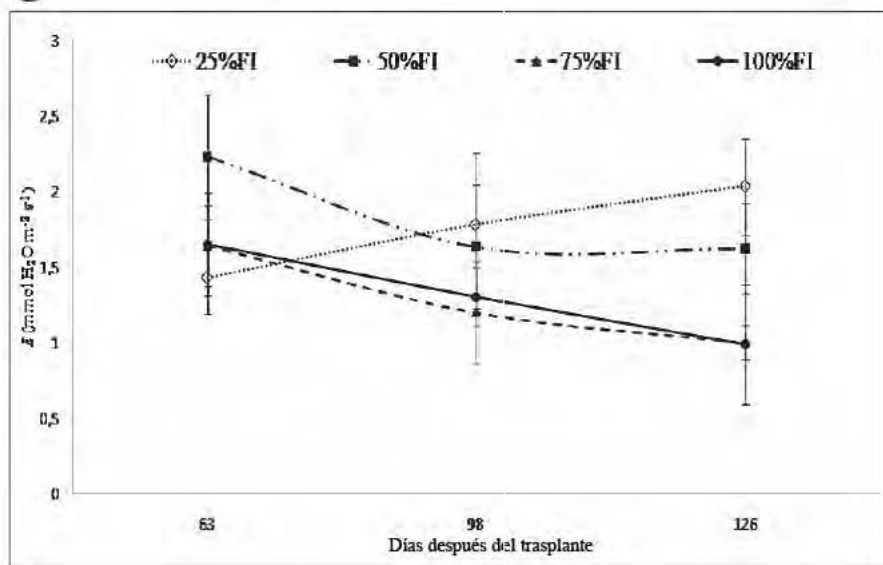
A



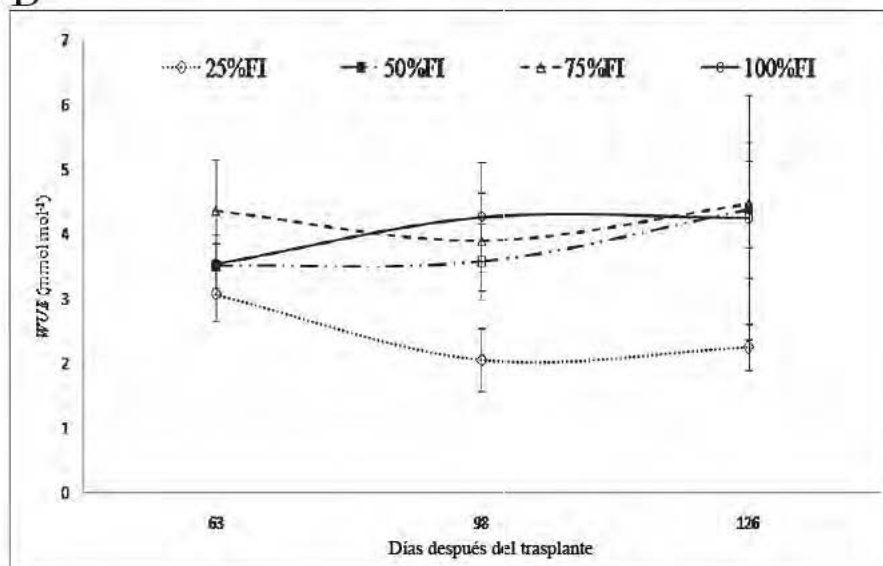
B



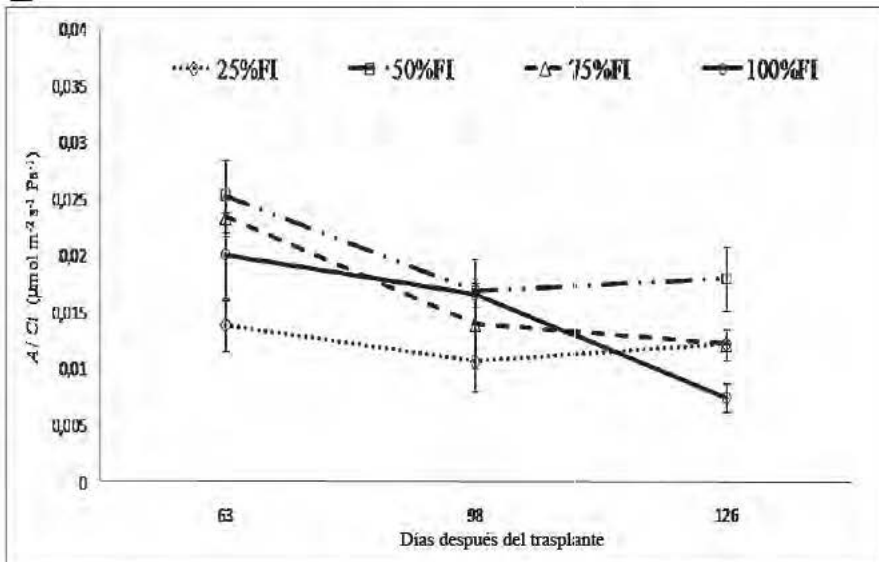
C



D



E



Gráfica 1. El intercambio de gases en las hojas de las plantas jóvenes de araticum-de-tierra-fria cultivada en cuatro diferentes fuerzas iónicas en solución nutritiva No. 2 de Hoagland y Arnon (1950) en tres diferentes edades (63, 98 y 126 días después del trasplante). Los datos son la media ( $\pm$  S.E.) y cada valor se determinó en cuatro plantas por tratamiento ( $n=4$ ) en cuatro momentos distintos de muestreo. A: tasa de asimilación neta de carbono ( $A_{net}$ ), B: conductancia estomática ( $g_s$ ), C: transpiración tasa ( $E$ ), D: eficiencia del uso del agua ( $WUE$ ), (E= eficiencia instantánea de carboxilación ( $A_{net}/C_i$ ))

El Mg acumulado en las plantas con el tratamiento de 50% de FI 112 DAT juega un papel vital en la fotosíntesis, en particular en la capacidad de promover las reacciones fotodependientes (Liu *et al.*, 2008), además de ser necesario para el apilamiento de los tilacoides, para el funcionamiento de las enzimas implicadas en la asimilación de carbono y asimilación y compartimentalización entre el almidón y azúcares (Maathuis, 2009).

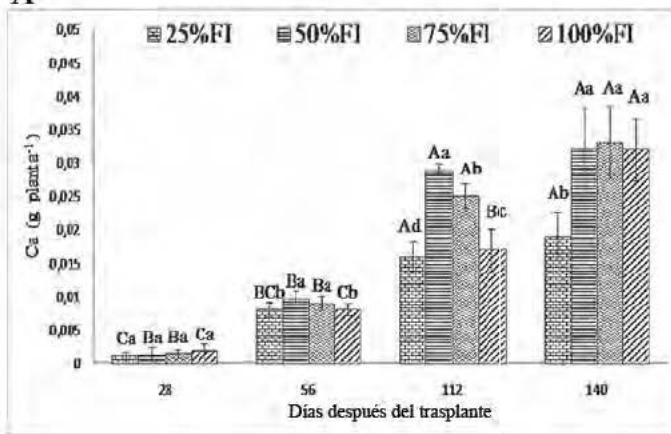
El S también es acumulado en las plantas cultivadas al 50% FI a los 112 DAT siendo responsable de la formación de sulfolípidos y general-



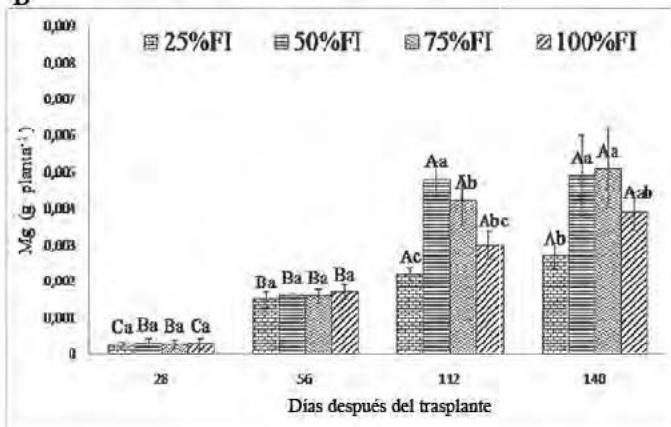
mente se encuentra en pequeñas cantidades en los tilacoides de los cloroplastos (Marschner, 1995).

Sin embargo, aunque no es clara la necesidad de estos lípidos en la membrana fotosintética, se sugiere que son esenciales para la estabilización de los componentes fotosintéticos (Hammond *et al.*, 2003). Algunas proteínas vegetales contienen azufre, como la ferredoxina, que participan en la fotosíntesis y en la formación de clorofila y las reacciones de transferencia de electrones (Hansch y Mendel, 2009).

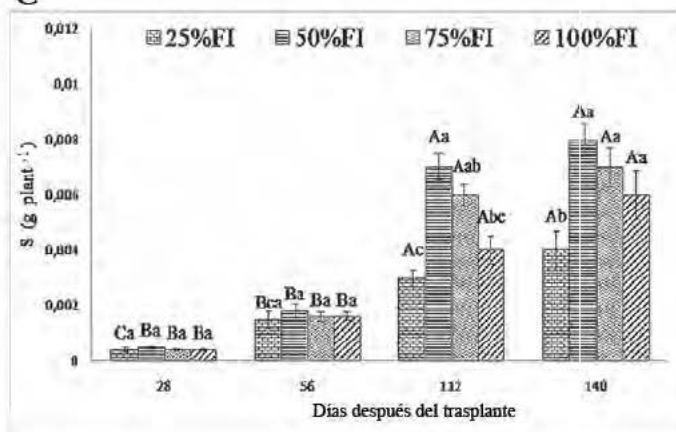
A



B



C



Gráfica 2. Concentración iónica en la hoja g.kg<sup>-1</sup> de MS (materia seca) determinada en plantas jóvenes de araticum de tierra fría cultivada en cuatro diferentes fuerzas iónicas de la solución nutritiva No. 2 de Hoagland y Arnon (1950) en cuatro temporadas diferentes (28, 56, 112 y 140 días después del trasplante-DAT). Los datos son la media ( $\pm$  SE) y el valor de cada uno se determinó en cuatro plantas por tratamiento ( $n=4$ ). A: calcio (Ca), B: magnesio (Mg), C: azufre (S). Las mayúsculas comparan los mismos periodos de la misma fuerza iónica y las minúsculas comparan la igualdad de la FI, en particular, no difieren significativamente por el test de Tukey al 5%

Justificado de esta manera el efecto de suministro adecuado de minerales para el correcto funcionamiento del proceso de fotosíntesis, se tradujo en un mayor desarrollo del cultivo como se ve en las variables de crecimiento y los índices de análisis de crecimiento (cuadro 1 y gráfica 3).

Cuadro I. Valores medios presentados por los indicadores fisiológicos (RAF, TCR y TAL) en plantas de araticum de tierra fría cultivadas a diferentes fuerzas iónicas en solución nutritiva No. 2 de Hoagland y Arnon (1950) a lo largo del tiempo de cultivo

Tratamiento / I. F.	RAF	TCR	TAL
25% FI	0.5272 ± 0.046a	0.0072 ± 0.0029b	0.0153 ± 0.0060b
50% FI	0.4949 ± 0.044a	0.0134 ± 0.0027a	0.0273 ± 0.0058a
75% FI	0.4822 ± 0.016a	0.0124 ± 0.0017ab	0.0245 ± 0.0033ab
100% FI	0.5040 ± 0.0405a	0.0121 ± 0.0025ab	0.0246 ± 0.0139ab
F	0.72	6.53	4.48
P > F	0.5569	0.0043	0.0182
C.V. (%)	11.47	21.58	25

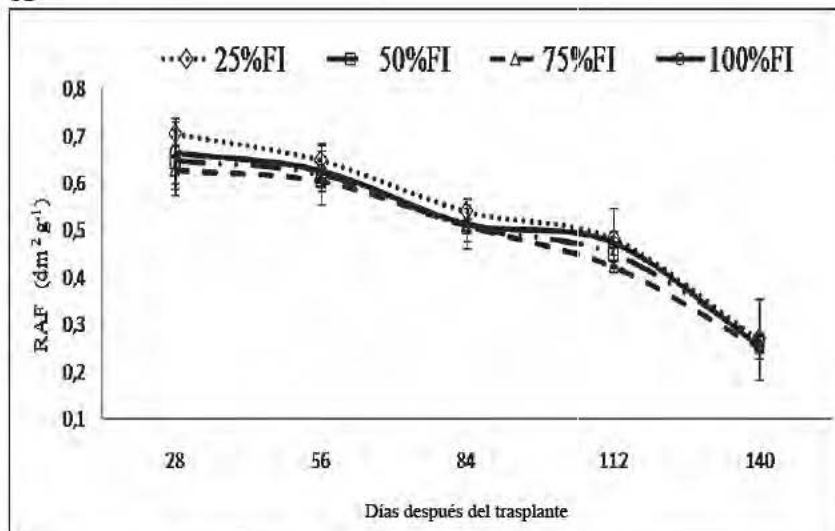
La relación de área foliar (RAF) es un índice fisiológico que expresa como el área foliar útil para la fotosíntesis. Con el crecimiento de las plantas, aumenta la interferencia de las hojas superiores en la parte inferior, lo que lleva a la reducción del área foliar estimada (David *et al.*, 2007). La RAF, por tanto, disminuyó a lo largo del experimento (140 DAT) (gráfica 3), lo que se esperaba ya que las plantas crecieron en todos los tratamientos (Benincasa, 2003).

Se observa que hubo mayor acumulación de materia seca en relación con el material pre-existente (TCR) en las plantas cultivadas en 50%, 75% y 100% FI (gráfica 3), con diferencias significativas entre los valores medios obtenidos a 50 FI% en relación al cultivo en un 25% FI (cuadro I). Así, TCR revela un comportamiento similar al descrito en la literatura, se observan valores altos en principio, con descensos posteriores (David y Boaro, 2009).

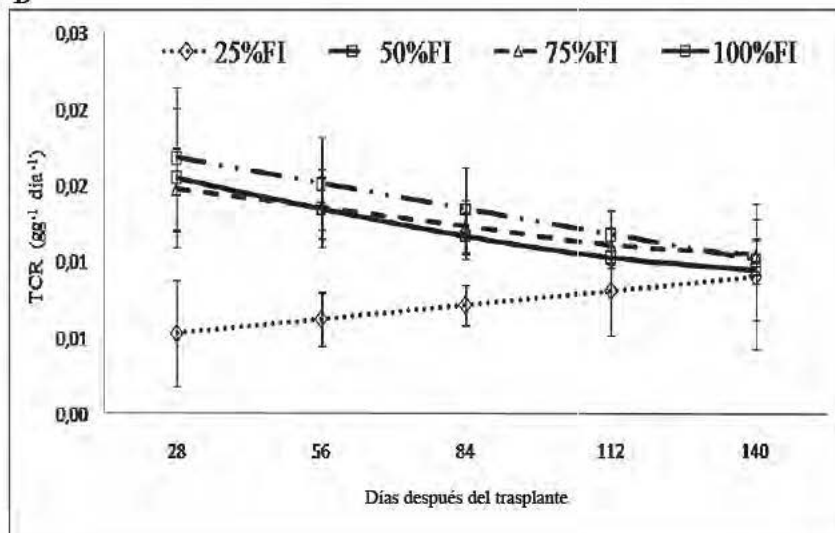
Las plantas silvestres adaptadas a suelos pobres en nutrientes, como araticum de tierra fría pueden presentar la estrategia de crecimiento conocido como tipo I (crecimiento lento) que son más eficientes en la adquisición de nutrientes que las especies cultivadas o las que se consideran invasoras (tipo II, rápido crecimiento) (Marschner, 1995). La característica más importante de las especies que tienen el tipo I es la estrategia de su baja tasa de crecimiento y el bajo uso de los nutrientes

(Chapin, 1980) incluso en condiciones de elevadas tasas de nutrientes (Fageria, 2001).

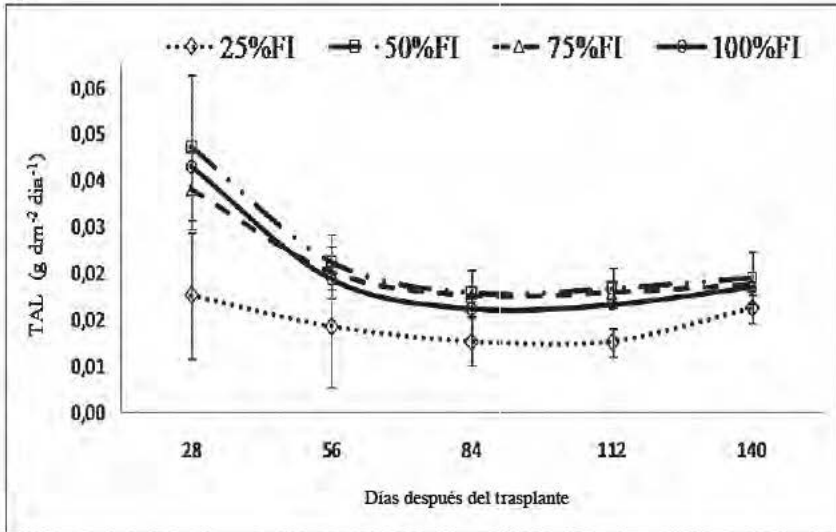
A



B



C



Gráfica 3. Índices fisiológicos de las plantas jóvenes araticum de tierra fría crecidas en diferentes fuerzas iónicas de la solución nutritiva No. 2 Hoagland & Arnon (1950). Los datos son la media ( $\pm$  SE) de cinco plantas por tratamiento ( $n=5$ ) en 5 momentos distintos de muestreo. A: relación área foliar (RAF), B: tasa de crecimiento relativo (TCR) y C: tasa neta de asimilación (TAL)

El comportamiento de la TAL presentado hasta los 140 DAT entre los tratamientos estudiados (gráfica 3) está de acuerdo con trabajos desarrollados en cultivo hidropónico con variaciones de elementos en la solución nutritiva, entre ellos David *et al.* (2007) y David y Boaro (2009) evidenciando que esta comparación fue realizada con plantas de diferentes especies.

## Conclusión

Por tanto, se concluye que las plantas jóvenes de araticum de tierra fría crecidas en 50% FI de la solución nutritiva No. 2 de Hoagland y Arnon expresan más adecuadamente el potencial fisiológico de desarrollo debido a su rusticidad.

## Agradecimientos

Agradecemos a la Coordinación de la Asistencia a la Educación Personal Superior (CAPES) por el apoyo financiero para este trabajo.



## Referencias

- Afrousheh, M., Ardalana, M., Hokmabadib, H. and Afrousheh, M. 2010. Nutrient deficiency disorders in *Pistacia vera* seedling rootstock in relation to ecophysiological, biochemical characteristics and uptake pattern of nutrients. *Sci. Hortic.* 124 (2): 141-148.
- Avilán, L.R. 1975. Efecto de la omisión de los macronutrientes en el desarrollo y composición química de la guanábana (*Annona muricata* L.) cultivada en soluciones nutritivas. *Agron. Trop.* 25 (1): 73-79.
- Bataglia, O.C., Furlani, A.M.C., Teixeira, J.P.F., Furlani, P.R. and Gallo, J.R. 1983. Métodos de análise química de plantas. Instituto Agronômico de Campinas. Campinas, Brasil. 48 pp.
- Batista, M.M.F., Viegás, I.J.M., Frazão, D.A.C., Thomaz, M.A.A. and Silva, R.C.L. 2003. Efeito da omissão de macronutrientes no crescimento, nos sintomas de deficiências nutricionais e na composição mineral em gravioleiras (*Annona muricata*, L.). *Rev. Bras. Frutic.* 25 (2): 315-318.
- Benincasa, M.M.P. 2003. Análise de crescimento de plantas (noções básicas). Funep: Jaboticabal. Brasil. 41 pp.
- Berry, J. and Bjorkman, O. 1980. Photosynthetic response and adaptation to temperature in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 31: 491-543.



- Bilger, H.W., Schreiber, U. and Lange, O.L. 1984. Comparative investigation of chlorophyll fluorescence changes and tissue necrosis methods. *Oecol.* 63 (2): 256-262.
- Brizola, R.M. de O., Leonel, S., Tecchio, M.A. y Mischan, M.M. 2005. Exportação de macronutrientes pelos ramos e frutas da figueira cultivada em função da adubação potássica. *Acta. Sci. Agron.* 27 (1): 33-37.
- Chapin, F. S. 1980. The mineral nutrition of wild plants. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 11: 233-60.
- David, E.F.S., Mischan, M.M. and Boaro, C.S.F. 2007. Desenvolvimento e rendimento de óleo essencial de menta (*Mentha x piperita* L.) cultivada em solução nutritiva com diferentes níveis de fósforo. *Biomas.* 20 (2): 15-26.
- David, E.F.S. and Boaro, C.S.F. 2009. Translocação orgânica, produtividade e rendimento de óleo essencial de *Mentha piperita* L. cultivada em solução nutritiva com variação dos níveis de N, P, K e Mg. *Rev. Bras. Plant Med.* 11 (3): 236-246.
- Epstein, E. and Bloom, A.J. 2006. Nutrição mineral de plantas, princípios e perspectivas. 2 Ed. Editora Planta: Londrina. 403 pp.
- Fageria, V.D. 2001. Nutrient interactions in crop plants. *J. Plant Nutr.* 24 (8): 1269-1290.
- Farquhar, G.D. and Sharkey, T.D. 1982. Stomatal Conductance and photosynthesis. *Ann. Rev. Plant Physiology.* 33: 317-345.
- Hammond, J.P., Bennett, M.J., Bowen, H.C., Broadley, M.R., Eastwood, D.C., May, S.T., Rahn, C., Swarup, R., Woolaway, K.E. and White, P.J. 2003. Changes in gene expression in *Arabidopsis thaliana* shoots during phosphate starvation and the potential for developing smart plants. *Plant Physiol.* 132 (2): 578-596.

- Hansch, R. and Mendel, R.R. 2009. Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl). *Curr. Opin. Plant Biol.* 12 (3): 259-66.
- Hoagland, D.R. and Arnon, D.I. 1950. The water culture method for growing plants without soils. California Agricultural Experimental Station. Berkeley, USA. 32 pp.
- Larcher, W. 2006. *Ecofisiologia vegetal*. 2 Ed. Editora Rima São Carlos. Brasil, 550 pp.
- Liu, H., Ximing, C., Riyuan, C., Shiwei, S. and Guangwen, S. 2008. Effects of magnesium deficiency on growth and photosynthesis of flowering chinese cabbage. *Acta Hort.* 767: 169-175.
- Maathuis, F.J. 2009. Physiological functions of mineral macronutrients. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12 (3): 250-258.
- Magalhães, A.C.N. 1986. Análise quantitativa de crescimento. In: Ferri, M.G. (Ed.). *Fisiologia vegetal*. Edusp. São Paulo, Brasil. Pp. 331-350.
- Mahouachi, J., Socorro, A. R. and Talon, M. 2006. Responses of papaya seedlings (*Carica papaya* L.) to water stress and re-hydration: growth, photosynthesis and mineral nutrient imbalance. *Plant Soil.* 281 (1-2): 137-146.
- Malavolta, E., Vitti, G. C. and Oliveira, S. A. 1997. Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações. 2 ed. Potáfos. Piracicaba, Brasil. 319 pp.
- Marschner, H. 1995. Mineral nutrition of higher plants. 2 ed. Academic Press. London. 889 pp.
- McAinsh, M.R. and Pittman, J.K. 2009. Tansley review: shaping the calcium signature. *New Phytol.* 181 (2): 275-294.

- Mediene, S., Jordan, M.O., Pages, L., Lebot, J. and Adamowicz, S. 2002. The influence of severe shoot pruning on growth, carbon and nitrogen status in young peach trees (*Prunus persica*). *Tree Physiol.* 22 (18): 1289-1296.
- Pinkard, E.A., Battaglia, M., Beadle, C.L. and Sands, P.J. 1999. Modeling the effect of physiological responses to green pruning on net biomass production of *Eucalyptus nitens*. *Tree Physiol.* 19 (1): 1-12.
- Radford, P.S. 1967. Growth analysis formulae: their use and abuse. *Crop Science.* 7 (3): 171-175.
- Ranjith, S.A., Meinzer, F.C., Perry, M.H. and Thom, M. 1995. Partitioning of carboxylase activity in nitrogen-stressed sugarcane and its relationship to bundle sheath leakiness to CO<sub>2</sub>, photosynthesis and carbon isotope discrimination. *Aust. J. Plant Physiol.* 22 (6): 903-911.
- SAS Institute. 2002. *The SAS system for Windows*. Ver. 9. Cary, NC.
- Schwarz, D. and Kuchenbuch, R. 1997. Growth analysis of tomato in closed recirculating systems in relation to EC-value of the nutrient solution concentration. *Acta Hort.* 450: 169-176.
- Schwarz, D., Klaring, H.P., Van Iersel, M.W. and Ingran, K.T. 2002. Growth and photosynthetic response of tomato to nutrient solution concentration at two light levels. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 127 (6): 984-990.
- Taiz, L. y Zeiger, E. 2009. *Fisiología vegetal*. 4 ed. Artmed. Porto Alegre, Brasil. 819 pp.
- Terry, N. and Huston, R.P. 1975. Effects of calcium on the photosynthesis of intact leaves and isolated chloroplasts of sugar beets. *Plant Physiol.* 55 (5): 923-927.

- Terry, N. and Ulrich, A. 1973a. Effects of phosphorus deficiency on the photosynthesis and respiration of leaves of sugar beet. *Plant Physiol.* 51 (1): 43-47.
- Terry, N. and Ulrich, A. 1973b. Effects of potassium deficiency on the photosynthesis and respiration of leaves of sugar beet. *Plant Physiol.* 51 (1): 783-786.
- Von Caemmerer, S. and Farquhar, G.D. 1981. Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves. *Planta.* 153 (4): 376-387.



# Niveles de micronutrientes, fósforo y cambios gaseosos en plantas de *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer cultivadas con variaciones en solución nutritiva

Baron, Daniel<sup>1</sup>, Ferreira, Gisela<sup>1</sup>  
Boaro Carmen Sílvia Fernandes<sup>1</sup>, Rodrigues, João Domingos<sup>1</sup>  
Mischan, Martha Maria<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Botánica, Instituto de Biociencias (IB), Universidad Estadual Paulista  
Júlio de Mesquita Filho, Campus de Botucatu. Distrito de Rubião Júnior s/n  
Botucatu, São Paulo, Brasil. Caja postal: 510, Código postal: 18.618-970  
fone +55-14-3811-6265; agroozzy@yahoo.com.br.

<sup>2</sup>Departamento de Botánica, Instituto de Biociencias (IB), Universidad Estadual Paulista  
Júlio de Mesquita Filho, Campus de Botucatu. Distrito de Rubião Júnior s/n. Botucatu,  
São Paulo, Brasil. Caja postal: 510, Código postal: 18.618-970, fone +55-14-3811-6097.

## Resumen

El efecto de los minerales en el desarrollo vegetal y en procesos fisiológicos como la fotosíntesis es bien conocido y estudiado en varias especies. Pero, la necesidad de obtener información al respecto de especies poco estudiadas y que sirven como portainjerto de buena calidad y compatible, como el araticum de tierra fría, justifican este estudio. Así, la investigación tuvo como objetivo evaluar el efecto

de diferentes fuerzas iónicas (FI) de la solución nutritiva completa No. 2 de Hoagland y Arnon (1950) en la acumulación iónica de fósforo (P), micronutrientes y en los cambios gaseosos de las hojas de plantas de *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer (araticum de tierra fría), durante 140 días. La prueba fue conducida en el invernadero del Departamento de Botánica, Universidad Estadual Paulista (UNESP), Campus Botucatu-SP, Brasil. El diseño experimental fue en bloques completamente al azar, en esquema factorial 4 x 3 (FI x cosechas) para los cambios gaseosos, con cinco repeticiones y 4 x 4 (FI x cosechas) para la determinación de los iones en las hojas, con cuatro repeticiones. Los tratamientos: 25% FI (CEa de  $0.50 \pm 0.2$  mS  $\text{cm}^{-1}$ ); 50% FI (CEa de  $1.00 \pm 0.2$  mS  $\text{cm}^{-1}$ ); 75% FI - (CEa de  $1.5 \pm 0.02$  mS  $\text{cm}^{-1}$ ); 100%FI (CEa de  $2.0 \pm 0.02$  mS  $\text{cm}^{-1}$ ) (testigo) de la solución nutritiva completa No. 2 de Hoagland y Arnon (1950). Para los cambios gaseosos fue utilizado equipamiento de sistema abierto de fotosíntesis y transpiración (IRGA, modelo LI-6400, LI-COR). Los datos fueron sometidos al análisis de varianza y prueba de Tukey a 5% de probabilidad ( $p < 0.05$ ). Los mayores valores de fotosíntesis a lo largo del tiempo fueron obtenidos con el cultivo de las plantas en 50% FI y también las mayores acumulaciones de fósforo y micronutrientes. Con los resultados se puede concluir que para el desarrollo de las plantas de araticum de tierra fría las plantas pueden ser mantenidas con 50% de la fuerza iónica de solución completa de Hoagland y Arnon.

Palabras clave: *Annonaceae*, solución nutritiva, fuerza iónica, cambios gaseosos, acululación iónica

## Introducción

El suministro adecuado de nutrientes a los cultivos es uno de los factores más importantes para incrementar su productividad, pues influyen directa y indirectamente en el metabolismo del carbono debido a su influencia sobre en el crecimiento y la morfogénesis (Fageria, 2001). Los elementos minerales actúan directamente en la fotosíntesis, pues son componentes integrales de las enzimas y pigmentos y activadores

directos del proceso fotosintético (Larcher, 2000; Taiz y Zeiger, 2009; Pinho *et al.*, 2010).

El fósforo (P) es clasificado como esencial y forma parte de distintos aspectos del metabolismo celular (Malavolta, 1980; Marschner, 1995; Epstein y Bloom, 2006). Su uso como fertilizante químico es amplio para suplir la deficiencia de los suelos en muchos países (Gentili *et al.*, 2006, Thomas *et al.*, 2006) porque realiza distintas funciones en las plantas, tales como formar parte de grupos o de grandes moléculas (DNA, RNA y fosfolípidos de las membranas), participar de la señalización celular y modificar irreversiblemente a las proteínas; es un constituyente de biominerales (de origen animal) (Marschner, 1995; Epstein y Bloom, 2006; Gaude *et al.*, 2008).

Los elementos como el boro (B), el cobre (Cu), el hierro (Fe), el manganeso (Mn), el cloro (Cl), el molibdeno (Mo), el níquel (Ni) y el zinc (Zn) son considerados micronutrientes, ya que se requieren en pequeñas cantidades en comparación con los macronutrientes (Fageria, 2002). Participan en prácticamente todas las las funciones metabólicas centrales tales como la protección celular, regulación génica, osmorregulación, la percepción de las hormonas, la transducción de señales y la fotosíntesis (Kusunoki, de 2007; Yamasaki *et al.*, 2007; Hansch y Mendel, 2009).

En cuanto al estudio de la nutrición mineral de las plantas, el suelo constituye un medio altamente complejo e interactivo para que puedan ser analizados los efectos de un nutriente en particular (Furlani *et al.*, 1999). Así, se emplean las soluciones nutritivas aereadas en cultivo sin suelo siendo la primera solución propuesta por Hoagland y Arnon en 1950, conteniendo los macro y micronutrientes necesarios para el crecimiento vegetal (De Rijcke y Schrevens, 1999; Martínez, 2002; Franco y Prado, 2006).

El objetivo de este estudio fue evaluar la productividad primaria de plantas de *Annona emarginata* bajo diferentes disponibilidades de fósforo y micronutrientes en la solución nutritiva No. 2 de Hoagland y Arnon (1950), con el fin de comprender cómo los diferentes niveles de estos elementos minerales afectan al intercambio gaseoso y la acumulación de iones en el desarrollo de la planta.



## Método

La especie araticum de tierra fría (*Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer) fue sembrada en bandejas de poliestileno, rellenas con vermiculita y cuando las plántulas presentaron 7-10 cm (altura) fueron trasplantadas a recipientes de plástico con un volumen de 1.5 L con la solución nutritiva aireada sin interrupción en el invernadero. El diseño experimental fue de bloques al azar en factorial 4 x 3 (tratamiento x cosecha) para el intercambio gaseoso, con cinco repeticiones de una planta. Los tratamientos se realizaron mediante la variación de la concentración iónica (fuerzas iónicas), de la solución nutritiva completa No. 2 de Hoagland y Arnon (1950) conforme siguen: 25% FI (CEa de  $0.50 \pm 0.2 \text{ mS cm}^{-1}$ ), 50% FI (CEa de  $1.00 \pm 0.2 \text{ mS cm}^{-1}$ ); 75% FI (CEa de  $1.5 \pm 0.02 \text{ mS cm}^{-1}$ ) y 100% FI (CEa de  $2.0 \pm 0.02 \text{ mS cm}^{-1}$ ) (testigo).

La evaluación del intercambio de gases se realizó utilizando el sistema de equipo abierto de la fotosíntesis, IRGA (LI-6400, LI-COR, Lincoln, NE, USA). Esas medidas fueron aplicadas en el periodo desde las 9:00 hasta las 11:00 h en días soleados a los 224 DAT (días después del trasplante), fueron elegidas y estandarizadas las 2<sup>a</sup> o 3<sup>a</sup> hojas completamente expandidas y se midió la tasa de asimilación de  $\text{CO}_2$  ( $A_{\text{net}}$ ,  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), conductancia estomática ( $g_s$ ,  $\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) y la tasa de transpiración ( $E$ ,  $\text{mmol el vapor de agua m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), con una PAR del  $700 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . La eficiencia del uso del agua ( $WUE$ ,  $\mu\text{mol CO}_2$  ( $\text{mmol H}_2\text{O}$ )<sup>-1</sup>) fue determinada por la relación entre  $A_{\text{net}}$  y  $E$  ( $A_{\text{net}}/E$ ), descrita por Berry y Downton (1982) y la eficiencia instantánea de carboxilación ( $A_{\text{net}}/C_i$ ) determinada según la metodología descrita por Von Caemmerer y Farquhar (1981).

Los datos fueron sometidos al análisis de variancia y las medias comparadas por la prueba de Tukey a 5% de probabilidad ( $P \leq 0.05$ ), utilizando el programa SAS (SAS institution, Cary, NC.).

## Resultados y discusión

El intercambio de gases varía entre los tratamientos, con excepción de  $WUE$  (gráfica 1). Las plantas del tratamiento 25% FI y 100% FI muestra-

ron  $A_{\text{net}}$  reducida en comparación con plantas cultivadas en 75% FI, en las que observamos los valores más altos de  $A_{\text{net}}$  (gráfica 1).

Los valores de  $A_{\text{net}}$  observados de  $5.3 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  a  $12.3 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  son característicos de especies perennes que tienen metabolismo  $C_3$ , sobre todo cuando no se refiere a las especies de hoja caduca, en el que las tasas de asimilación de carbono son menores (Reich *et al.*, 1997). Se observó otra característica típica de las plantas  $C_3$  con araticum de tierra fría, que es la sensibilidad de asimilación neta de carbono con la reducción en la conductancia estomática.

La  $g_s$  y la  $E$  de las plantas cultivadas en 75% FI no fue diferente de las plantas cultivadas en 50% FI (gráfica 1). Los promedios más altos de  $A_{\text{net}}$  y las pérdidas se obtuvieron en plantas con mayor  $g_s$  (gráfica 1). Este comportamiento también fue encontrado por Ojeda *et al.* (2004a) en plantas jóvenes de atemoya, por Higuchi *et al.* (1999) en chirimoya y Ojeda *et al.* (2004b) en guanábana.

Observamos, por tanto, que con el uso de 100% de fuerza iónica, las plantas redujeron la tasa de asimilación de  $\text{CO}_2$  (gráfica 1) debido principalmente a la baja eficiencia de carboxilación instantánea (gráfica 1). El P es crucial para mantener las reacciones de fosforilación en la asimilación de carbono (Lawlor y Cornisa, 2002), además de contribuir positivamente en otros parámetros como  $g_s$  y WUE (Bruck *et al.*, 2000).

En general nuestros datos indican que los valores de los parámetros de intercambio gaseoso y el suministro de micronutrientes están relacionados. El mismo patrón fue observado por Sotiropoulos *et al.* (2002), Papadakis *et al.* (2004) y Sheng *et al.* (2009). Según Pinho *et al.* (2010) el intercambio gaseoso depende en gran medida de la organización de pigmento-proteína requerida para el uso eficiente de la energía solar, la deficiencia de boro puede estar asociada con daños en la estructura de la membrana, provocando pérdidas en los procesos de fotosíntesis. El hecho de que  $E$  se reduce en las plantas cultivadas en 25% FI se debe principalmente a la disminución en la concentración de boro de estas plantas, ya que es ampliamente aceptado que el transporte de Boro en las plantas y  $A_{\text{net}}$  están muy influenciados por  $E$  (Sheng *et al.*, 2009). Estos autores afirman que las bajas concentraciones de boro reducen las tasas  $A_{\text{net}}$  y  $g_s$ . Se puede sugerir que tanto los estomas como otros

factores están implicados en la disminución de la tasa fotosintética en condiciones de baja concentración de boro (Yakushiji *et al.*, 1998).

El elemento Cu en concentraciones inadecuadas para la planta perjudica la cadena de transporte electrónico y al PSII (Romanowski, 2002), además de la participación directa en los mecanismos para la desintoxicación de metales pesados como fitoquelatinas, metalotioneínas o la acción antioxidante del glutatión (Nagalakshmi y Prasad, 2001). Lidon y Henriques (1991) sugieren que el efecto predominante de cobre en el arroz fue en la actividad de la rubisco. El declive de la  $A_{net}$  en las hojas maduras se asoció con una disminución en la conductancia estomática ( $g_s$ ) (Vinit-Dunand *et al.*, 2002) lo que apoya la hipótesis de que el cobre afecta principalmente al fotosistema II.

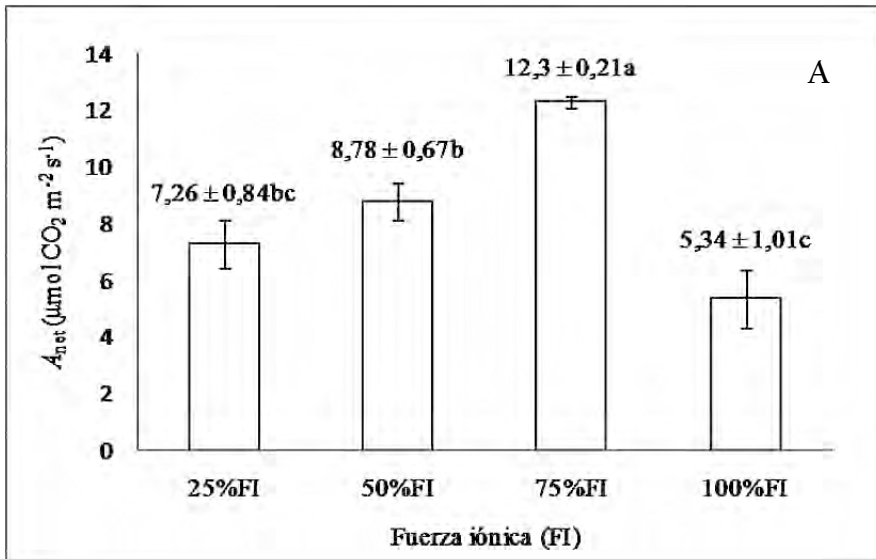
En cuanto al Fe, aunque en la literatura está bien documentado que la deficiencia de este elemento podría dañar la actividad enzimática en el estroma, relativamente pocos estudios se han centrado en las consecuencias inducidas por la deficiencia de Fe en la fotosíntesis de especies de frutas de hoja caduca (Chouliaras *et al.*, 2005). Según Bertamini *et al.* (2001) también es escasa la información en la literatura sobre el uso de bajas concentraciones de Fe en la evaluación del intercambio de gases. La deficiencia de hierro en las plantas de camote redujo los valores de  $g_s$ , lo que sugiere que este elemento tiende a mantener el equilibrio de potencial hídrico foliar (Terry, 1983). Sin embargo, en las hojas de soya con deficiencia de Fe la  $g_s$  fue mayor que en las plantas control, lo cual puede ser explicado como la pérdida de control del mecanismo estomático (Davis *et al.*, 1986).

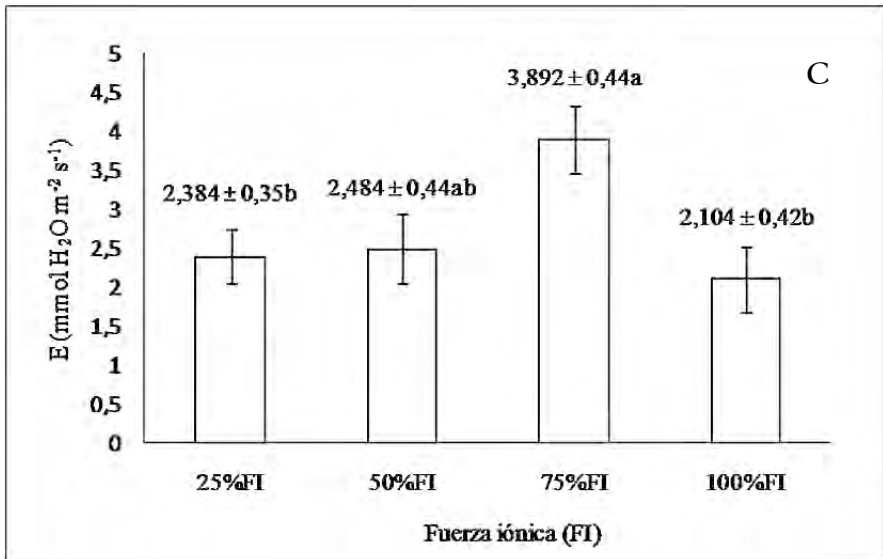
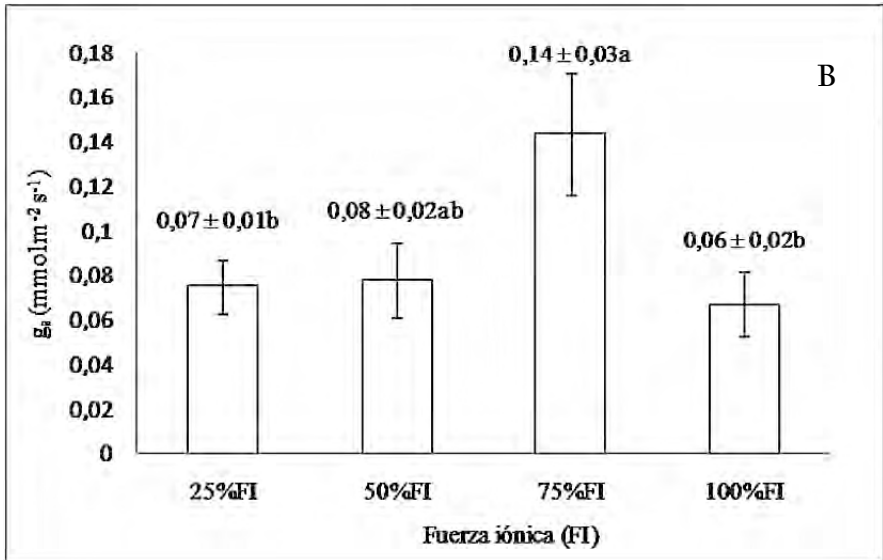
Los estudios muestran que con la ausencia de manganeso (Mn) en las hojas ocurre una disminución en las actividades fotosintéticas, en particular por el fotosistema II (PSII) (Weiland *et al.*, 1975), aunque Henriques (2004) señala que la reducción de manganeso en hojas de nuez (*Carya illinoensis* (Wangenh.) C. Koch) disminuye el número de cloroplastos, informando que no hay daños en el PSII.

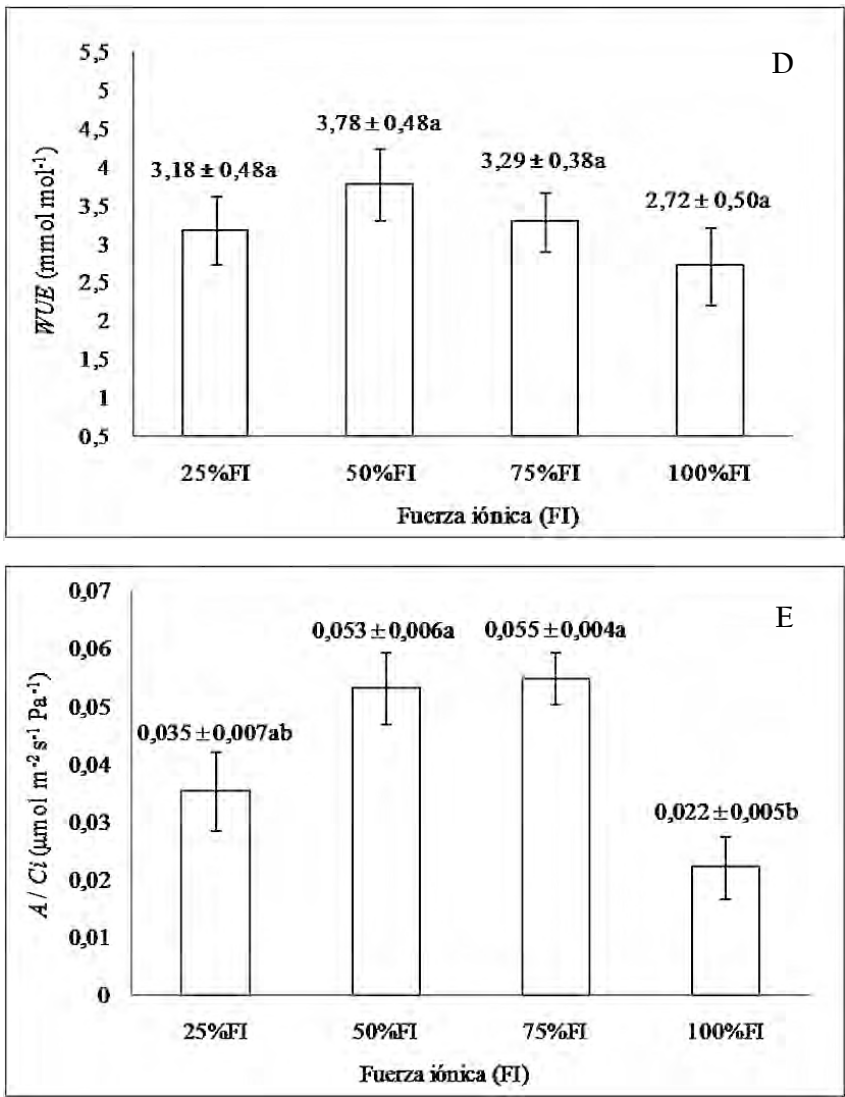
El cloroplasto es el único orgánulo que presenta el cambio estructural que se traduciría en pérdidas en la acción de las hojas con deficiencia de manganeso (Govindjee, 1975). En algunos estudios no se encontraron tales reducciones fotosintéticas, incluso en condiciones de

grave deficiencia de este elemento (Homann, 1967) y por tanto las bajas concentraciones no siempre disminuyen la capacidad fotosintética (PSII) de la hoja (Henriques, 2003). Una posible explicación sería que la planta pudiera responder, ajustando el número de cloroplastos por célula (Henriques, 2004).

Las plantas cultivadas en bajas concentraciones de zinc (Zn) pueden tener pérdidas en la fotosíntesis debido a la reducción en la concentración de clorofila, pues a pesar de que el Zn no participa directamente en la formación de clorofila, puede afectar la concentración de Fe y Mg implicados en su formación (Kaya y Higgs, 2002). La deficiencia de Zn afecta la tasa de reducción fotosintética y la conductancia estomática (Tavallali *et al.*, 2009).







Gráfica 1. Parámetros fotosintéticos de plantas jóvenes de araticum de tierra fría cultivadas en diferentes fuerzas iónicas de solución nutritiva completa No. 2 de Hoagland y Arnon (1950) en 224 DAT A: tasa de asimilación neta de carbono ( $A_{net}$ ), B: conductancia estomática (gs), C: tasa de transpiración ( $E$ ), D: eficiencia del uso del agua (WUE), E: eficiencia instantánea carboxilación ( $A_{ne} / Ci$ ). Las barras verticales indican S.E. (n= 5). Columnas seguidas por esa misma letra, no difieren en la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ )

El zinc es un componente importante de enzimas vitales y estabiliza las proteínas de membrana, muchas de las cuales están relacionadas con el ADN (Aravind y Prasad, 2004). En el girasol, la reducción de la fotosíntesis inducida por la deficiencia de zinc está asociada con una disminución de la concentración intracelular de dióxido de carbono y de gs (Sharma *et al.*, 1994). La privación de zinc puede disminuir la capacidad fotosintética de la hoja al afectar negativamente al PSII (Tavallali *et al.*, 2009).

## Conclusión

Se concluye que estos datos proporcionan una base importante para la modelización de los efectos de concentraciones de fósforo y micronutrientes a través del uso de la solución No. 2 de Hoagland y Arnon (1950) en plantas jóvenes de araticum de tierra fría. Además, las plantas que crecen en 50% y 75% FI presentaron resultados satisfactorios para el intercambio gaseoso lo que resultó en mayor desarrollo vegetal.

## Agradecimientos

Agradecemos a la Coordinación de la Asistencia a la Educación Personal Superior (CAPES) por el apoyo financiero para este trabajo.

## Referencias

- Aravind, P. and Prasad, M.N.V. 2004. Zinc protects chloroplasts and associated photochemical functions in cadmium exposed *Ceratophyllum demersum* L., a fresh water macrophyte. *Plant Sci.* 166 (5): 1321-1327.
- Arulanantham, A.R., Rao, I.M. and Terry, N. 1990. Limiting factors in photosynthesis. VI. Regeneration of ribulose 1,5-bisphosphate limits photosynthesis at low photochemical capacity. *Plant Physiol.* 93 (4): 1466-1475.
- Berry, J.A. and Downton, W.J.S. 1982. Environmental regulation of photosynthesis. In: Govindjee, E. (Ed.). *Photosynthesis*. Academic Press. New York, USA. Pp. 263-343.
- Bertamini, M., Nedunchezian, N. and Borghi, B. 2001. Effect of iron deficiency induced changes on photosynthetic pigments, ribulose-1,5-biphosphate carboxylase, and photosystem activities in field grown grapevine (*Vitis vinifera* L. cv. Pinot noir) leaves. 39 (1): 59-65.
- Bruck, H., Payne, W.A. and Sattelmacher, B. 2000. Effects of phosphorus and watersupply on yield, transpirational water-use efficiency, and carbon isotope discrimination of pearl millet. *Crop Sci.* 40 (1): 120-125.



- Chouliaras, V., Therios, I., Molassiotis, A., Patakas, A. and Diamantidis, G. 2005. Effect of iron deficiency on gas exchange and catalase and peroxidase activity in citrus. *J. Plant Nutr.* 27 (12): 2085-2089.
- Davis, T., Jolley, V., Walser, R., Brown, J. and Blaylock, A. 1986. Net photosynthesis of Fe-efficient and Fe-inefficient soybean cultivars grown under varying iron levels. *J. Plant Nutr.* 9 (3): 671-681.
- De Rijck, G. and Schrevens, E. 1999. Chemical feasibility region for nutrient solutions in hydroponic plant nutrition. *J. Plant Nutr.* 22 (2): 259-268.
- Epstein, E. and Bloom, A. 2006. Nutrição mineral de plantas: princípios e perspectivas. Planta: Londrina. 401 pp.
- Fageria, N. K. 2002. Influence of micronutrients on dry matter yield and interaction with other nutrients in annual crop. *Pesq. Agropec. Bras.* 37 (12): 1765-1772.
- Fageria, V. D. 2001. Nutrient interactions in crop plants. *J. Plant Nutr.* 24: 1269-1290.
- Franco, C.F. and Prado, R.M. 2006. Uso de soluções nutritivas no desenvolvimento e no estado nutricional de mudas de goiabeira: macronutrientes. *Acta Sci. Agron.* 28 (2): 199-205.
- Furlani, P.R., Silveira, L.C.P., Bolonhezi, D. and Faquin, V. 1999. Cultivo hidropônico de plantas. IAC: Campinas. 52 pp.
- Gaude, N., Nakamura, Y., Scheible, W.R., Ohta, H. and Dormann, P. 2008. Phospholipase C5 (NPC5) is involved in galactolipid accumulation during phosphate limitation in leaves of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 56 (1): 28-39.

- Gentili, F., Wall, L.G. and Huss-Danell, K. 2006. Effects of phosphorus and nitrogen on nodulation are seen already at the stage of early cortical cell divisions in *Alnus incana*. *Ann. Bot.* 98 (2): 309-315.
- Govindjee, B.J.T. 1975. Bioenergetics of photosynthesis. Academic Press. New York, USA. 700 pp.
- Hansch, R. and Mendel, R.R. 2009. Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl). *Current Opinion in Plant Biology.* 12 (3): 259-266.
- Henriques, F.S. 2003. Gas exchange, chlorophyll a fluorescence kinetics and lipid peroxidation of pecan leaves with varying manganese concentrations. *Plant Sci.* 165 (1): 239-244.
- Henriques, F.S. 2004. Reduction in chloroplast number accounts for the decrease in the photosynthetic capacity of manganese-deficient pecan leaves. *Plant Science* 166 (4): 1051-1055.
- Higuchi, H., Sakuratani, T. and Utsunomiya, N. 1999. Photosynthesis, leaf morphology and shoot growth as affected by temperatures in cherimoya (*Annona cherimola* Mill.) trees. *Sci. Hortic.* 80 (1-2): 91-104.
- Hoagland, D.R. and Arnon, D.I. 1950. The water: culture method for growing plants without soil. California Agricultural Experiment Station. Berkeley, USA. 32 pp.
- Homann, P. 1967. Studies on the manganese of chloroplast suspensions. *Plant Physiol.* 42 (7): 997-1007.
- Kaya, C. and Higgs, D. 2001. Response of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) cultivars to foliar application of zinc when grown in sand culture at low zinc. *Sci. Hortic.* 93 (1): 53-64.

- Kusunoki, M. 2007. Mono-manganese mechanism of the photosystem II water splitting reaction by a unique  $Mn_4Ca$  cluster. *Biochim. Biophys. Acta.* 1767 (6): 484-492.
- Larcher, W. 2006. *Ecofisiologia vegetal*. São Carlos: Rima. 550 pp.
- Lawlor, D. W. and Cornic, G. 2002. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. *Plant Cell Environ.* 25 (2): 275-294.
- Lidon, F.C. and Henriques, F.S. 1991. Limiting step on photosynthesis of rice plants treated with varying copper levels. *J. Plant Physiol.* 138: 115-118.
- Maathuis, F.J. 2009. Physiological functions of mineral macronutrients. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12 (3): 250-258.
- Malavolta, E. 1980. *Elementos de nutrição mineral de plantas. Agrônômica cereas*. São Paulo, Brasil. 252 pp.
- Marschner, H. 1995. *Mineral Nutrition of higher plants*. 2 ed. Academic Press. London. 889 pp.
- Martinez, H.E.P. 2002. *O uso do cultivo hidropônico de plantas em pesquisa*. Viçosa: Editora UFV. Brasil. 61 pp.
- Nagalakshmi, N. and Prasad, M.N.V. 2001. Response of glutathione cycle and glutathione metabolism to copper stress in *Scenedesmus bijugatus*. *Plant Sci.* 160 (2): 291-299.
- Ojeda, M., Schaffer, B. and Davies, F.S. 2004a. Flooding, root temperature, physiology and growth of two *Annona* species. *Tree Physiol.* 24 (9): 1019-1025.

- Ojeda, M., Schaffer, B. and Davies, F. S. 2004b. Soil temperature, physiology, and growth of containerized *Annona* species. *Sci. Hortic.* 102 (2): 243-255.
- Papadakis, I. E., Dimassi, N., Bosabalidis, A.M., Therios, I.N., Patakas, A. and Giannakoula, A. 2004. Effects of B excess on some physiological and anatomical parameters of 'Navelina' orange plants grafted on two rootstocks. *Environ. Exp. Bot.* 51 (3): 247-257.
- Pinho, L.G.R., Campostrini, E., Monnerat, H., Torres Neto, A., Pires, A.A., Marciano, C.R. and Soares, Y.J.B. 2010. Boron deficiency affects gas exchange and photochemical efficiency (jpi test parameters) in green dwarf coconut. *J. Plant Nutr.* 33 (3): 439-451.
- Reich, P.B., Walters, M.B. and Ellsworth, D.S. 1997. From tropics to tundra: global convergence in plant functioning. *Proc. Acad. Natl. Sci.* 94 (25): 13730-13734.
- Romanoska, E. 2002. Gas exchange functions in heavy metal stressed plants. In: Prasad, M.N.V. and Strzałka, K. Physiology and biochemistry of metal toxicity and tolerance. Kluwer Academic Publishers. The Netherlands. Pp. 260-262.
- Rotaru, V. and Sinclair, T.R. 2009. Interactive influence of phosphorus and iron on nitrogen fixation by soybean. *Environ. Exp. Bot.* 66 (1): 94-99.
- Samuelsson, G. and Öquist, G. 1980. Effects of copper chloride on photosynthetic electron transport and chlorophyll-protein complexes of *Spinacia oleracea*. *Plant Cell Physiol.* 21 (3): 445-454.
- Sandmann, G. and Böger, P. 1980. Copper-mediated lipid peroxidation processes in photosynthetic membranes. *Plant Physiol.* 66 (5): 797-800.

- SAS Institute. 2002. The SAS system for Windows, ver. 9. Cary, NC.
- Sheng, O., Song, S., Peng, S. and Deng, X. 2009. The effects of low boron on growth, gas exchange, boron concentration and distribution of 'Newhall' navel orange (*Citrus sinensis* Osb.) plants grafted on two rootstocks. *Sci. Hortic.* 121 (3): 278-283.
- Shioi, Y., Tamai, H. and Sasa, T. 1978. Effects of copper on photosynthetic electron transport systems in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 19 (2): 203-209.
- Sotiropoulos, T.E., Therios, I.N., Dimassi, K.N., Bosabalidis, A. and Kofidis, G. 2002. Nutritional status, growth, CO<sub>2</sub> assimilation and leaf anatomical responses in two kiwifruit species under boron toxicity. *J. Plant Nutr.* 25 (6): 1249-1261.
- Taiz, L. y Zeiger, E. 2009. Fisiología vegetal. Artmed. Porto Alegre, Brasil. 819 pp.
- Tavallali, V., Rahemi, M., Maftoun, M., Panahi, B., Karimi, S., Ramezani, A. and Vaezpour, M. 2009. Zinc influence and salt stress on photosynthesis, water relations, and carbonic anhydrase activity in pistachio. *Sci. Hortic.* 123 (2): 272-279.
- Terry, N. 1983. Limiting factors in photosynthesis: iron stress mediated changes in light harvesting and electron transport capacity and its effects on photosynthesis in vivo. *Plant Physiol.* 71 (4): 855-860.
- Thomas, D.S., Montagu, K.D. and Conroy, J.P. 2006. Why does phosphorus limitation increase wood density in *Eucalyptus grandis* seedlings? *Tree Physiol.* 26 (1): 35-42.

- Uribe, E.G. and Stark, B. 1982. Inhibition of photosynthetic energy conversion by cupric ion-evidence for  $\text{Cu}^{2+}$ -coupling factor I interaction. *Plant Physiol.* 69 (5):1040-1045.
- Vinit-Dunand, F., Epron, D., Alaoui-Sossé, B. and Badot, P-M. 2002. Effects of copper on growth and on photosynthesis of mature and expanding leaves in cucumber plants. *Plant Science.* 163 (1): 53-58.
- Von Caemmerer, S. and Farquhar, G.D. 1981. Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves. *Planta.* 153 (4): 376-387.
- Weiland, T., Noble, R. and Crang, R. 1975. Photosynthetic and chloroplast ultrastructural consequences of manganese deficiency in soybean. *Am. J. Bot.* 62 (5): 501-508.
- Yakushiji, H., Morinaga, K. and Nonami, H. 1998. Sugar accumulation and partitioning in Satsuma mandarin tree tissues and fruit in response to drought stress. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 123 (4): 719-726.
- Yamasaki, H., Abdel-Ghany, S.E., Cohu, C.M., Kobayashi, Y., Shikanai, T. and Pilon, M. 2007. Regulation of copper homeostasis by micro-RNA in *Arabidopsis*. *J. Biol Chem.* 282 (22): 16369-16378.



# Potasa y cambios gaseosos en plantas jóvenes de *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer cultivadas en diferentes fuerzas iónicas

Baron, Daniel<sup>1</sup>, Ferreira, Gisela<sup>1</sup>, Boaro, Carmen Sílvia Fernandes<sup>1</sup>  
Rodrigues, João Domingos<sup>1</sup>, Mischan, Martha Maria<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Botânica, Instituto de Biociencias (IB), Universidad Estadual Paulista  
Júlio de Mesquita Filho, Campus de Botucatu. Distrito de Rubião Júnior s/n. Botucatu,  
São Paulo, Brasil. Caja postal: 510, Código postal: 18.618-970  
fone +55-14-3811-6265, gisela@ibb.UNESP.br

<sup>2</sup>Departamento de Botânica, Instituto de Biociencias (IB), Universidad Estadual Paulista  
Júlio de Mesquita Filho, Campus de Botucatu. Distrito de Rubião Júnior s/n. Botucatu,  
São Paulo, Brasil. Caja postal: 510, Código postal: 18.618-970, fone +55-14-3811-6097.

## Resumen

Para los estudios de la nutrición mineral en plantas se usan soluciones nutritivas con el objetivo de garantizar su ausencia en el suelo. Además, hay una acción de los iones en los cambios gaseosos que resultan en modificaciones en el desarrollo vegetal. Así, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de diferentes fuerzas iónicas (FI) de la solución nutritiva completa No. 2 de Hoagland y Arnon



(1950) en los cambios gaseosos y en la acumulación del potasio ( $K^+$ ) en las hojas de plantas jóvenes de *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer (araticum de tierra fría). El experimento fue realizado en un invernadero en el Departamento de Botánica del Instituto de Biociencias (IB), Universidad Estadual Paulista (UNESP), Campus Botucatu-SP. El diseño experimental fue en bloques casualizados, en esquema factorial 4 x 3 (FI x cosechas) para los cambios gaseosos, con cinco repeticiones de una planta y 4 x 4 (FI x cosechas) para la determinación iónica en las hojas, con cuatro repeticiones de una planta. Los tratamientos estuvieron constituidos por la dilución de la solución completa No. 2 de Hoagland y Arnon (1950) en agua desmineralizada a 25% al que se denominó 25% FI (CEa de  $0.50 \pm 0.2 \text{ mS cm}^{-1}$ ), 50% FI (CEa de  $1.00 \pm 0.2 \text{ mS cm}^{-1}$ ); 75% FI (CEa de  $1.5 \pm 0.02 \text{ mS cm}^{-1}$ ); 100% FI (CEa de  $2.0 \pm 0.02 \text{ mS cm}^{-1}$ ) (testigo). Las evaluaciones de cambios gaseosos fueron realizadas utilizando un equipo de sistema abierto de fotosíntesis y transpiración con analizador de  $\text{CO}_2$  y vapor de agua por radiación infrarroja (IRGA, modelo LI-6400, LI-COR). Los datos fueron sometidos al análisis de variancia y prueba de Tukey a 5% de probabilidad. Las plantas jóvenes cultivadas en solución nutritiva con 50% FI presentaron los mayores índices fotosintéticos y mayores acumulaciones de potasa, con diferencia estadística de las plantas cultivadas en 25% FI. La solución nutritiva puede ser utilizada para el cultivo de esta especie en su fase joven, cuando la fuerza iónica (FI) sea ajustada al 50%.

Palabras clave: *Annonaceae*, solución nutritiva, fuerza iónica, cambios gaseosos, acumulación iónica.

## Introducción

Se sabe que para la producción de huertos comerciales de frutas, los árboles deben ser producidos por métodos asexuados, como por injertía. La especie a utilizar como portainjerto debe ser compatible con la parte aérea comercial y ser tolerante a enfermedades (Bezerra y Lederman, 1997). En este contexto *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer (araticum de tierra fría) (Rainer, 2007) ha sido evaluada con éxito en el campo,

pero empíricamente, como una alternativa de portainjerto para atemoya, guanábana y chirimoya (Kavati, 1992, Buenaventura, 1999; Tokunaga, 2005). La especie araticum de tierra fría es nativa de América del Sur (Tokunaga, 2005) y prácticamente no existe información al respecto de sus respuestas fisiológicas, especialmente en la etapa temprana de desarrollo (Baron, 2010) lo que sería importante para aumentar la producción segura de plántulas de calidad y garantizar la creciente demanda de fruta del mercado internacional de la familia botánica Annonaceae (Vargas Ramos, 1992; Bettiol Neto *et al.*, 2006, Nogueira *et al.*, 2007).

El elemento potasio ( $K^+$ ) es descrito como un elemento esencial en las reacciones metabólicas debido a su capacidad de activar muchas enzimas, además de participar directamente en las enzimas implicadas en el metabolismo del carbono, como la piruvatoquinasa, la fosfofructoquinasa y la sintetasa de ADP-glucosa del almidón (Véry y Sentenac, 2003; Lebaudy *et al.*, 2007; Szczerba *et al.*, 2009).

En la fotosíntesis, el  $K^+$  es esencial para el flujo de  $H^+$  inducido por la luz a través de la membrana tilacoidal y para establecer el gradiente de pH necesario para la síntesis de ATP (fosforilación) en analogía con la síntesis de ATP en la mitocondria (Marschner, 1995). En los cloroplastos de las hojas con deficiencia de  $K^+$  hay una actividad reducida en las enzimas del ciclo de Calvin, específicamente de la Rubisco, ya que el  $K^+$  está involucrado en diversas etapas del proceso de transducción, incluyendo estudios de unión del ARN (ARNt) con el ribosoma durante la síntesis de proteínas (Wilkinson, 1994; Basile *et al.*, 2003; Maathuis, 2009).

La hidroponía es una técnica utilizada como herramienta para resolver una amplia gama de problemas que incluyen la reducción de la contaminación del suelo, del agua subterránea, y la manipulación de los niveles de nutrientes en los sustratos (Helbel Junior, 2008). Notables, son también, otras ventajas de la tecnología de la hidroponía, entre ellas: mayor rendimiento por área, menor incidencia de plagas y enfermedades, facilidad de implementación de las prácticas culturales, mejor programación de la producción, reducción de los ciclos de cultivos debido a un mejor control del medio ambiente (Furlani *et al.*, 1999; Smethurst *et al.*, 2000; Martinez, 2002).

En este estudio, nos planteamos conocer los efectos de diferentes concentraciones de  $K^+$  (fuerzas iónicas) sobre el intercambio gaseoso, el crecimiento vegetativo y la acumulación de nutrientes en las plantas de araticum de tierra fría (*Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer).

## Método

El experimento se llevó a cabo en un invernadero del Departamento de Botánica del Instituto de Biociencias (IB), Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Campus de Botucatu, SP, Brasil. Las semillas de araticum de tierra fría (*Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer) fueron sembradas en bandejas rellenas con vermiculita desplazada. Cuando las plantas jóvenes alcanzaron un tamaño promedio de 7-10 cm (altura) fueron trasplantadas a macetas con un volumen aproximado de 1.5 litros. El diseño experimental fue de bloques al azar en factorial 4 x 3 (tratamientos x cosechas) para el intercambio de gas, con cinco repeticiones de una planta y 4 x 4 para la determinación de los iones en las hojas, con cuatro repeticiones de una planta. Los tratamientos estuvieron constituidos por variación de la concentración iónica (fuerzas iónicas), de la solución nutritiva completa No. 2 de Hoagland y Arnon (1950) a partir de la dilución de la solución en agua desmineralizada al 25% lo que se denomina 25% FI (CEa de  $0.50 \pm 0.2 \text{ mS cm}^{-1}$ ) y así sucesivamente, obteniéndose 50% FI (CEa de  $1.00 \pm 0.2 \text{ mS cm}^{-1}$ ); 75% FI (CEa de  $1.5 \pm 0.02 \text{ mS cm}^{-1}$ ) y 100% FI (CEa de  $2.0 \pm 0.02 \text{ mS cm}^{-1}$ ) (testigo).

La evaluación del intercambio gaseoso se realizó utilizando el sistema de equipo abierto de la fotosíntesis IRGA (LI-6400, LI-COR, Lincoln, NE, USA). Estas medidas se llevaron a cabo desde las 9:00 hasta las 11:00 h en días soleados a los 63, 98 y 126 DAT (días después del trasplante) en el que fueron elegidas y estandarizadas la segunda o tercera hoja totalmente expandida y se midió la tasa de asimilación  $\text{CO}_2$  ( $A_{\text{net}}$ ,  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), conductancia estomática ( $g_s$ ,  $\text{mol m}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) y la tasa de transpiración ( $E$ ,  $\text{mmol vapor de agua m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), con  $1700 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  (PAR) de luminosidad. La eficiencia del uso del agua (WUE,  $\mu\text{mol CO}_2 (\text{mmol H}_2\text{O})^{-1}$ ) fue determinada por la relación entre  $A_{\text{net}}$  y  $E$  ( $A_{\text{net}}/E$ ),

descrito por Berry y Downton (1982) y la eficiencia instantánea de carboxilación ( $A_{\text{net}}/C_i$ ) determinada según la metodología descrita por Von Caemmerer y Farquhar (1981).

La determinación de potasa (K) presente en las hojas a los 28, 56, 112 y 140 DAT se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Malavolta *et al.* (1997). A partir de estos resultados, se hicieron los cálculos de la adecuación de las unidades, es decir, la conversión de g en  $\text{g kg}^{-1}$  planta<sup>-1</sup> para cada elemento mineral acumulado en la planta.

Los datos fueron sometidos a análisis de varianza (ANOVA) y las medias se compararon mediante la prueba de Tukey al 5% de probabilidad ( $P \leq 0.05$ ). El análisis estadístico fue realizado utilizando el software SAS, versión 9.0 (SAS, 2002).

## Resultados y discusión

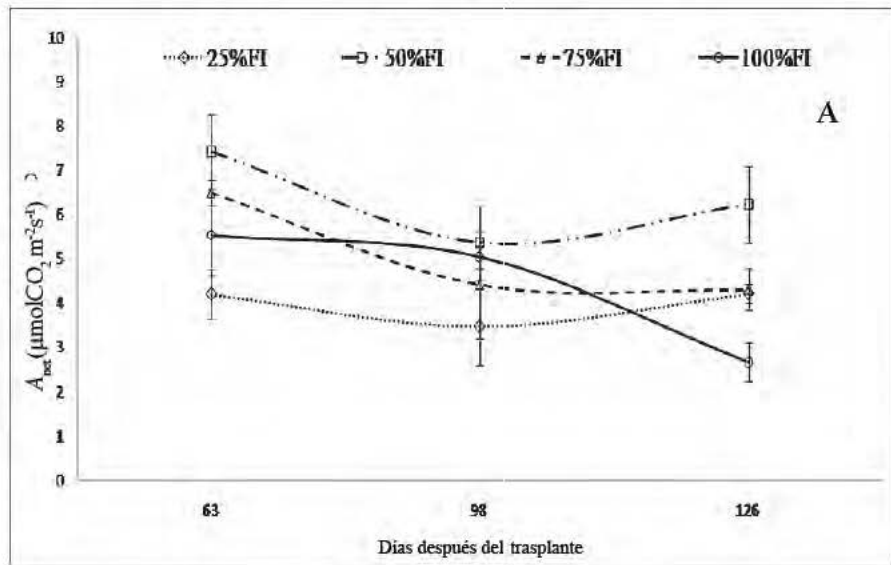
Se observó en este estudio que las plantas jóvenes de araticum de tierra fría responden a diferentes fuerzas iónicas, obteniendo un mayor crecimiento de las plantas cultivadas en 50% y 75% FI.

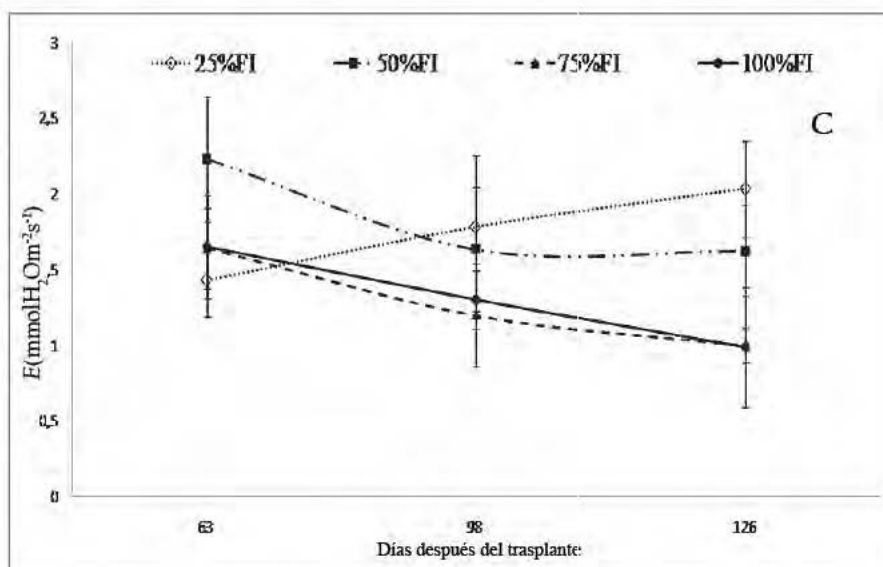
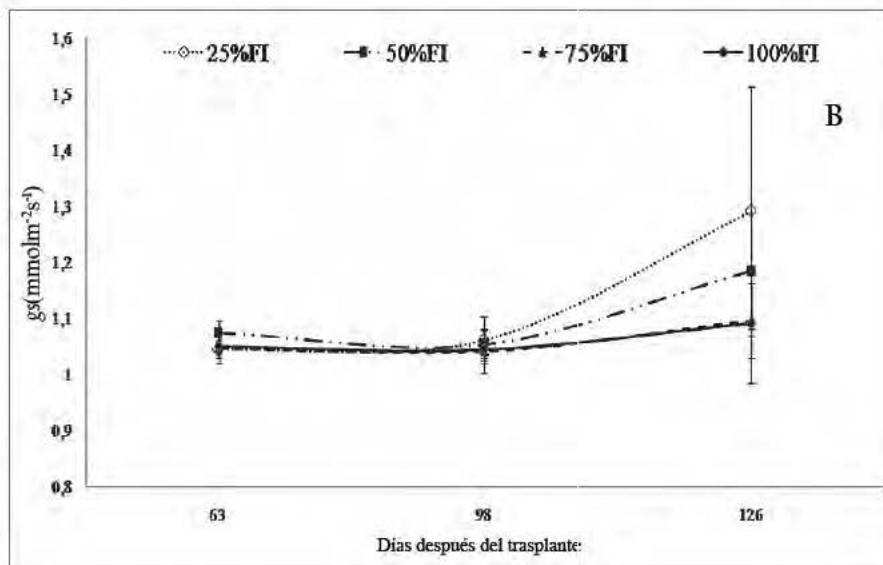
La tasa de asimilación de carbono de araticum de tierra fría cultivada en 50% FI ( $8.8 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) es similar a la observada en las plantas de *Annona squamosa* L., también mantenidas en solución de Hoagland y Arnon (1950) con fuerza iónica media ( $8.0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) (Marler y Zozor 1996). Se observa, pues, que las fuerzas iónicas de 50% y 75% de la solución nutritiva No. 2 de Hoagland y Arnon (1950) fueron más eficaces para los mecanismos relacionados con la fotosíntesis alcanzando la máxima eficiencia. Estas observaciones están de acuerdo con la propuesta de utilizar concentraciones más bajas que los patrones de concentración, tales como proponen Zheng *et al.* (2005) y Rouphael *et al.* (2008) con el uso de 50% de los macro y micronutrientes en la solución nutritiva, sin afectar el desarrollo de geranio y gerbera.

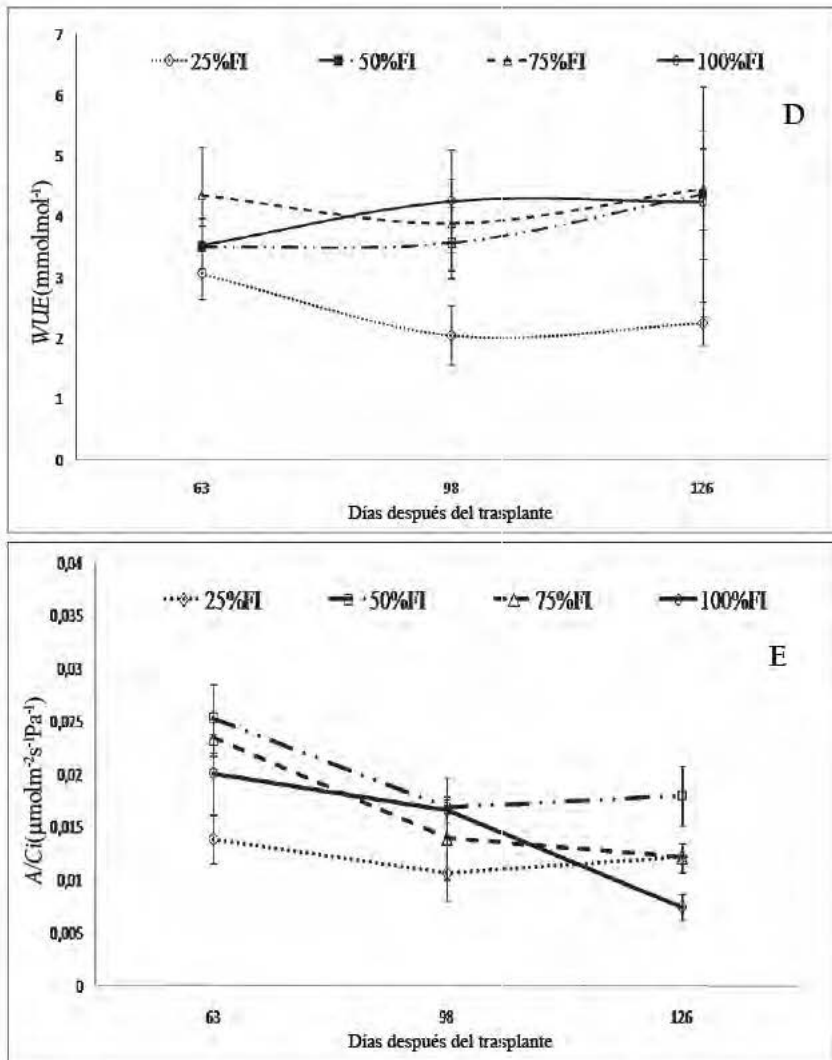
Sin embargo, cuando se tuvo una FI 100%, lo que representa una solución estándar para las plantas, se observó la reducción en la fotosíntesis y en la acumulación de elementos minerales, que muestra así que la especie no requiere grandes cantidades de elementos minerales para expresar su potencial de desarrollo. Así, la reducción de  $A_{\text{net}}$  puede

estar relacionada con el daño al aparato fotosintético y/o sistema de enzimas para la absorción de  $\text{CO}_2$ , causado por la gran cantidad de iones en el metabolismo con la reducción de la conductancia estomática (Marschner, 1995). Por otra parte, puede estar vinculada a los efectos de la salinidad del medio (Peyrano *et al.*, 1997; Guimarães, 2005; Wilson *et al.*, 2006) y la acción de los iones en el protoplasma celular (Marschner, 1995; Bezerra *et al.*, 2005).

Con el mantenimiento de las plantas en solución nutritiva con 25% FI, se observan bajas tasas de asimilación de carbono ( $A_{\text{net}}$ ) y menor eficiencia de carboxilación instantánea ( $A_{\text{net}} / C_i$ ) (gráfica 1), lo que combinado con un aumento de la transpiración, resulta en una disminución de la eficiencia del uso del agua ( $WUE$ ). Se debe mencionar que el aumento de la conductancia ( $g_s$ ) a partir de 98 DAT no influyó en un aumento en la tasa de asimilación de carbono (gráfica 1).







Gráfica 1. Intercambio gaseoso en plántulas de araticum de tierra fría crecidas en cuatro diferentes fuerzas iónicas de la solución nutritiva no. 2 de Hoagland y Arnon (1950) en tres diferentes edades (63, 98 y 126 DAT). Los datos son la media ( $\pm$  D.E) y el valor de cada uno se determinó en cuatro plantas por tratamiento ( $n=4$ ) en cuatro momentos diferentes de la evaluación. A: tasa de asimilación neta de carbono ( $A_{\text{net}}$ ), B: conductancia estomática ( $g_s$ ), C: tasa de transpiración ( $E$ ); D: uso eficiente del agua (WUE), E: eficiencia instantánea carboxilación ( $A_{\text{net}}/C_i$ ). DAT

Con relación a las respuestas fotosintéticas, se observa que el acceso de  $\text{CO}_2$  de la atmósfera hasta las células fotosintéticas del mesófilo ocurre a través de la apertura estomática y por tanto variaciones en la conductancia estomática ( $g_s$ ) afectan directamente a  $A_{\text{net}}$  y  $E$  (Raschke, 1979; Farquhar y Sharkey, 1982). Además,  $g_s$  se altera por influencia del medio ambiente (Berry y Bjorkman, 1980; Gutschick, 1997), del ácido abscísico (Farquhar y Sharkey, 1982; Mahouachi *et al.*, 2006) y de la nutrición mineral (Von Caemmerer y Farquhar, 1981; Marschner, 1995; Epstein y Bloom, 2006).

El hecho de que las tasas de asimilación de  $\text{CO}_2$  ( $A_{\text{net}}$ ) de plantas sometidas a tratamiento 50% FI fueron altas en comparación con otros tratamientos (gráfica 1) se puede atribuir a un mejor aprovechamiento de los elementos minerales suministrados, lo que resultó en un incremento de las tasas fotosintéticas de las hojas maduras o mejor capacidad fotosintética de las hojas, lo que es obtenido a largo tiempo (Aikin y Hanan, 1975; Pinkard *et al.*, 1999; Mediene *et al.*, 2002).

En las plantas mantenidas a 25% FI se observaron los valores más bajos para  $WUE$  (gráfica 1), lo que puede tener un efecto directamente en la conductancia estomática de las plantas jóvenes y, posteriormente, en las actividades enzimáticas (Von Caemmerer y Farquhar, 1981) con consecuencias en la utilización de los nutrientes minerales (Payne *et al.*, 1992; Ranjith *et al.*, 1995). La dependencia de  $WUE$  sobre el abastecimiento de agua y la nutrición en las plantas  $C_3$  se ha demostrado en varios estudios, entre ellos. Farquhar y Richards (1984) en plantas de trigo; Hubicka Farquhar (1989) en plantas de cebada; Hubicka *et al.* (1986) en plantas de maní y Virgona y Farquhar (1996) en plantas de girasol.

Existe, por tanto, un efecto directo de los nutrientes minerales en la fotosíntesis de araticum de tierra fría, la relación entre la concentración de potasio y las tasas de fotosíntesis de las hojas ha recibido menos atención en las especies de hoja caduca de árboles frutales (Basile *et al.*, 2003). Este elemento está estrechamente relacionado con la regulación estomática, la transpiración y osmorregulación (Marschner, 1995; Mahouachi *et al.*, 2006; Maathuis, 2009).

Nuestros resultados muestran que  $A_{\text{net}}$  disminuye con la menor disponibilidad de potasio suministrado por los tratamientos, lo mismo fué ob-



servados por Terry y Ulrich (1973), Bednarz y Oosterhuis (1999) y Basile *et al.* (2003) en plantas de batata, algodón y almendras, respectivamente, mientras que a partir de 56 DAT se ha observado que la acumulación de potasio en las plantas mantiene las fuerzas iónicas mostrando los valores más altos de los parámetros fotosintéticos (gráfica 1).

## Conclusión

Se concluye que estos datos proporcionan información básica sobre los efectos de diferentes concentraciones de potasio a través de la utilización de la solución nutritiva No. 2 de Hoagland y Arnon (1950) y que el uso de 50% y 75% de la fuerza iónica de los nutrientes fue satisfactorio para incrementar el intercambio gaseoso en plantas jóvenes de *araticum* de tierra fría.

## Agradecimientos

Agradecemos a la Coordinación de la Asistencia a la Educación Personal Superior (CAPES) de apoyo financiero para este trabajo.

## Referencias

- Aikin, W.J. and Hanan, J. J. 1975. Photosynthesis in the rose: effect of light intensity, water potential, water potential and leaf age. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 100 (3-4): 551-555.
- Baron, D. 2010. Desenvolvimento de plantas jovens de araticum de tierra fría (*Annona emarginata* (Schltld.) H. Rainer) cultivadas em solução nutritiva. Dissertação Mestrado. Instituto de Biociências (IB), Universidade Estadual Paulista. Botucatu, Brasil. 103f.
- Basile, B., Reidelb, E.J., Weinbaumb, S.A. and DeJong, T. 2003. Leaf potassium concentration, CO<sub>2</sub> exchange and light interception in almond trees (*Prunus dulcis* (Mill.) D.A. Webb). *Sci. Hortic.* 98 (2): 185-194.
- Bednarz, C.W. and Oosterhuis, D.M. 1999. Physiological changes associated with potassium deficiency in cotton. *J. Plant Nutr.* 22 (2): 303-313.
- Berry, J.A. and Downton, W.J.S. 1982. Environmental regulation of photosynthesis, En: Govindjee, E. (Ed.). *Photosynthesis*. Academic Press. New York, USA. Pp. 263-343.
- Berry, J. and Bjorkman, O. 1980. Photosynthetic response and adaptation to temperature in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 31: 491-543.

- Bettiol Neto, J.E., Pio, R., Bueno, S.C.S., Bastos, D.C. and Scarpare Filho, J.A. 2006. Enraizamento de estacas dos porta enxertos araticum de tierra fría (*Rollinia* sp.) e araticum mirim (*Rollinia emarginata* Schltdl.) para anonáceas. *Cienc. agrotec.* 30 (6): 1077-1082.
- Bezerra, J.E.F. and Lederman, I.E. 1997. Propagação vegetativa de anonáceas por enxertia. En: São José, A.R.; Souza, I.V.B.; Morais, O.M. and Rebouças, T.N.H. (Eds.) Anonáceas, produção e mercado (pinha, graviola, atemóia e cherimóia). DFZ/UESB. Vitória da Conquista, Brasil. Pg. 61-67.
- Bezerra, M.A., Lacerda, C.F., Prisco, J.T. and Gomes Filho, E. 2005. Crescimento e fotossíntese de plantas jovens de cajueiro anão-precoce sob estresse salino. *Rev. Bras. Eng. Agríc. Amb.* 9 (suplemento): 90-94.
- Bonaventure, L. 1999. A cultura de Cherimóia e seu híbrido, a Atemóia. Nobel. São Paulo, Brasil. 182 pp.
- Farquhar, G.D. and Richards, R.A. 1984. Isotopic composition of plant carbon correlates with water-use efficiency of wheat genotypes. *Aust. J. Plant Physiol.* 11 (6): 539-552.
- Farquhar, G.D. and Sharkey, T.D. 1982. Stomatal conductance and photosynthesis *Annu. Rev. plant Physiol.* 33: 317-345.
- Furlani, P.R., Silveira, L.C.P., Bolonhezi, D. and Faquin, V. 1999. Cultivo hidropônico de plantas. IAC. Campinas, Brasil. 52 pp.
- Guimarães, F.V. 2005. Respostas fisiológicas e bioquímicas em plantas de feijão de corda cv Pitiúba submetidas ao estresse com NaCl em diferentes concentrações de CaCl<sub>2</sub> e CaSO<sub>4</sub>. Tese Doutorado. Universidade Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, Brasil. 176 pp.

- Gutschick, V.P. 1997. Photosynthesis, growth rate, and biomass allocation In: Jackson, L.E. (Ed.). *Ecology in agriculture*. Academic Press. California, USA. 448 pp.
- Helbel Junior, C., Rezende, R., Freitas, P.S.L., Gonçalves, A.C.A. and Frissone, J.A. 2008. Influência da condutividade elétrica, concentração iônica e vazão de soluções nutritivas na produção de alface hidropônica. *Ciênc. agrotec.* 32 (4): 1142-1147.
- Hoagland, D.R. and Arnon, D.I. 1950. *The water: culture method for growing plants without soil*. California Agricultural Experiment Station. Berkeley, USA. 32 pp.
- Hubick, K.T. and Farquhar, G. 1989. Carbon isotope discrimination and the ratio of carbon gained to water lost in barley cultivars. *Plant Cell Environ.* 12 (8): 795-804.
- Hubick, K.T., Taylor, J.S. and Reid, D.M. 1986. The effect of drought on levels of abscisic acid, cytokinins, gibberellins and ethylene in aeroponically-grown sunflower plants. *Plant growth Regul.* 4 (2): 139-151.
- Kavati, R. 1992. Cultivo de atemóia. In: Donadio, L.C., Martins, A.B.G. and Valente, J.P. (Eds.) *Fruticultura tropical*. Funep. Jaboticabal. Pp. 39-70.
- Lebaudy, A., Very, A.A. and Sentenac, H. 2007. K<sup>+</sup> channel activity in plants: genes, regulations and functions. *FEBS Lett.* 581 (12): 2357-2366.
- Maathuis, F.J. 2009. Physiological functions of mineral macronutrients. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12 (3): 250-258.

- Mahouachi, J., Socorro A.R. and Talon, M. 2006. Responses of papaya seedlings (*Carica papaya* L.) to water stress and rehydration: growth, photosynthesis and mineral nutrient imbalance. *Plant and Soil*. 281 (1-2): 137-146.
- Malavolta, E., Vitti, G.C. and Oliveira, S.A. 1997. Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações. 2 ed. Potáfos. Piracicaba, Brasil. 319 pp.
- Marler, T.E. and Zozor, Y. 1996. Salinity influences photosynthetic characteristics, water relations, and foliar mineral composition of *Annona squamosa* L. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 121 (2): 243-248.
- Marschner, H. 1995. Mineral nutrition of higher plants. 2 ed. Academic Press. San Diego, USA. 889 pp.
- Martinez, H.E.P. 2002. O uso do cultivo hidropônico de plantas em pesquisa. Editora UFV. Viçosa, USA. 61 pp.
- Mediene, S., Jordan, M.O., Pages, L., Lebot, J. and Adamowicz, S. 2002. The influence of severe shoot pruning on growth, carbon and nitrogen status in young peach trees (*Prunus persica*). *Tree Physiol.* 22 (18): 1289-1296.
- Nogueira, E.A., Mello, N.T.C. and Caser, D.V. 2007. Anonáceas: do Brasil império a atemóia, frutas e derivados. Disponível em: <<http://www.ibraf.org.br/x-re/f-revista.html>> Acesso em 9 fev. 2009.
- Payne, W.A., Malcolm, D.C., Hossner, L.R., Lascao, R.J., Onken, A.B. and Wendt, C.W. 1992. Soil phosphorus availability and pearl millet water-use efficiency. *Crop Sci.* 32 (4): 1010-1015.
- Peyrano, G., Taleisnik, E., Quiroga, M., Forchetti, S.M. and Tigier, H. 1997. Salinity effects on hydraulic conductance, lignin content and peroxidase activity in tomato roots. *Plant Physiol Biochem.* 35 (5): 387-393.

- Pinkard, E.A., Battaglia, M., Beadle, C.L. and Sands, P.J. 1999. Modeling the effect of physiological responses to green pruning on net biomass production of *Eucalyptus nitens*. *Tree Physiol.* 19 (1): 1-12.
- Rainer, H. 2007. Monographic studies in the genus *Annona* L. (Annonaceae): Inclusion of the genus *Rollinia* A. St.-Hil. *Annalen des Naturhistorischen Museums in Wien.* 108 (B): 191-205.
- Ranjith, S.A., Meinzer, F.C., Perry, M.H. and Thom, M. 1995. Partitioning of carboxylase activity in nitrogen-stressed sugarcane and its relationship to bundle sheath leakiness to CO<sub>2</sub>, photosynthesis and carbon isotope discrimination. *Aust. J. Plant Physiol.* 22 (6): 903-911.
- Raschke, K. 1979. Movements using turgor mechanisms. In: Haupt, W.F. *Physiology of movements*. Ed. Springer-Verlag. Berlin. Pp. 383-441.
- Rouphael, Y., Cardarelli, M.T., Rea, E. and Colla, G. 2008. The influence of irrigation system and nutrient solution concentration on potted geranium production under various conditions of radiation and temperature. *Sci. Hortic.* 118 (4): 328-337.
- SAS Institute. 2002. *The SAS system for Windows*, ver. 9. Cary, NC.
- Smethurst, P.J. 2000. Soil solution and other soil analyses as indicators of nutrient supply: a review. *Forest Ecology and Management.* 138 (1-3): 397-411.
- Szczerbab, M.W., Britto, D.T. and Kronzucker, H.J. 2009. K<sup>+</sup> transport in plants: physiology and molecular biology. *J. Plant Physiol.* 166 (5): 447-466.

- Terry, N. and Ulrich, A. 1973. Effects of potassium deficiency on the photosynthesis and respiration of leaves of sugar beet. *Plant Physiol.* 51 (1): 783-786.
- Tokunaga, T. 2005. *A cultura da atemóia*. 2 ed. CATI. Campinas, Brasil. 80 pp.
- Vargas Ramos, V.H. 1992. Cultura da gravioleira (*Annona muricata* L.). In: Donadio, L.C., Martins, A.B.G. and Valente, J. Eds. *Fruticultura tropical*. Funep. Jaboticabal, Brasil. Pp. 127-157.
- Véry, A.A. and Sentenac, H. 2003. Molecular mechanisms and regulation of K<sup>+</sup> transport in higher plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 54: 575-603.
- Virgona, J.M. and Farquhar, G. 1996. Genotypic variation in relative growth rate and carbon isotope discrimination in sunflower is related to photosynthetic capacity. *Aust. J. Plant Physiol.* 23 (2): 227-236.
- Von Caemmerer, S. and Farquhar, G.D. 1981. Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves. *Planta.* 153 (4): 376-387.
- Wilkinson, R.E. 1994. *Plant: environment interactions*. Marcel Dekker. New York, USA. 599 pp.
- Wilson, C.S., Liu, S., Lesch, M. and Suarez, D.L. 2006. Growth response of major USA cowpea cultivars II. Effect of salinity on leaf gas exchange. *Plant Sci.* 170 (6):1095-1101.
- Zheng, Y., Graham, T.H., Richard, S. and Dixon, M. 2005. Can low nutrient strategies be used for pot gerbera production in closed-loop subirrigation? *Acta Hortic.* 691: 365-372.

# Eficiencia instantánea de la carboxilación y acumulación de nitrógeno en plantas jóvenes de araticum de tierra fría (*Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer ) cultivadas en solución nutritiva

Baron, Daniel<sup>1</sup>, Ferreira, Gisela<sup>1</sup>, Boaro, Carmen Silvia Fernandes<sup>1</sup>, Rodrigues, João Domingos<sup>1</sup> y Amaro, Amanda Cristina Esteves<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Botánica, Instituto de Biociencias (IB), Universidad Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Campus de Botucatu. Distrito de Rubião Júnior s/n. Botucatu, São Paulo, Brasil. Caja postal: 510, Código postal: 18.618-970, fone +55-14-3811-6265. [agroozzy@yahoo.com.br](mailto:agroozzy@yahoo.com.br).

<sup>2</sup>Departamento de Botánica, Instituto de Biociencias (IB), Universidad Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Campus de Botucatu. Distrito de Rubião Júnior s/n. Botucatu, São Paulo, Brasil. Caja postal: 510, Código postal: 18.618-970, fone +55-14-3811-6097.

## Resumen

La actividad de la enzima Rubisco se puede cuantificar de manera indirecta con el empleo de las variaciones de carbono obtenidas durante evaluaciones de la fotosíntesis. Además, conocer cómo las variaciones de las soluciones nutritivas afectan la acumulación de nitrógeno y también la actividad de la Rubisco, es importante para los



cultivos de portainjerto de anonáceas. De esta manera, el presente estudio tuvo por objetivo evaluar el efecto de la acumulación de nitrógeno (N) en los cambios gaseosos de las hojas en plantas jóvenes de *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer (araticum de tierra fría) cultivadas en diferentes fuerzas iónicas (FI) de la solución nutritiva completa No. 2 de Hoagland y Arnon (1950). Fue utilizado un cultivo en un invernadero del Departamento de Botánica del Instituto de Biociencias (IB), Universidad Estadual Paulista (UNESP), Campus Botucatu-SP, Brasil. El diseño experimental fue en bloques casualizados, en esquema factorial 4 x 3 (FI x cosecha) para la eficiencia instantánea de la carboxilación, con cinco repeticiones de una planta y 4 x 4 (FI x cosecha) para la determinación de N en la hoja, con cuatro repeticiones de una planta por lote. Los tratamientos fueron constituidos por 25% FI (CEa de  $0.50 \pm 0.2 \text{ mS cm}^{-1}$ ), 50% FI (CEa de  $1.00 \pm 0.2 \text{ mS cm}^{-1}$ ); 75% FI (CEa de  $1.5 \pm 0.02 \text{ mS cm}^{-1}$ ); 100% FI (CEa de  $2.0 \pm 0.02 \text{ mS cm}^{-1}$ ) (testigo) de la solución nutritiva completa No. 2 de Hoagland y Arnon (1950). Las evaluaciones de la eficiencia instantánea de carboxilación ( $A_{\text{net}}/C_i$ ) fueron calculadas por la relación entre la tasa de asimilación neta ( $A_{\text{net}}$ ) y la concentración de carbono interno en la cámara subestomática ( $C_i$ ) con el empleo de equipamiento de sistema abierto de fotosíntesis y transpiración con analizador de  $\text{CO}_2$  y vapor de agua por radiación infrarroja (IRGA, LI-6400, LI-COR). Los datos fueron sometidos al análisis de variancia y prueba de Tukey a 5% de probabilidad. Las plantas jóvenes cultivadas en 50% FI presentaron las mayores tasas de eficiencia instantánea de carboxilación. Se concluye que el nitrógeno se acumuló más en las plantas mantenidas en 50% FI que fue la variación más eficiente para la actividad de la enzima Rubisco.

Palabras clave: *Annonaceae*, solución nutritiva, fotosíntesis, análisis foliar.

## Introducción

El nitrógeno es un componente esencial de las proteínas y la clorofila, necesario para la formación de ácidos nucleicos, aminoácidos (Gorbea y Calatayud, 2010), enzimas y tilacoides (Marenco y Lopes, 2005).

La relación entre la tasa de fotosíntesis, la cantidad de N orgánico en las hojas y la eficiencia fotosintética no es constante, debido a la competencia del N con el CO<sub>2</sub> en los procesos de reducción (Evans 1989, Reich *et al.*, 1995), la función más importante de N es conformar a los grupos de aminoácidos, además de ser esencial en muchos compuestos no proteicos, tales como coenzimas, pigmentos fotosintéticos, metabolitos secundarios y poliaminas y cuando la oferta es amplia, el nitrato se deposita en la vacuola, donde participa de manera significativa en la generación de turgencia de la planta (Marschner, 1995; Maathuis, 2009).

Según Larcher (2000) existe una estrecha correlación entre el contenido de nitrógeno foliar, la cantidad de clorofila y la Ribulosa 1,5 bifosfato carboxilasa (RuBP carboxilasa). La enzima ribulosa 1,5 bifosfato carboxilasa/oxigenasa (Rubisco) es la proteína más abundante en las hojas de las plantas superiores, representando 50% de las proteínas solubles de las hojas.

La Rubisco presenta gran cantidad de N, se considera la forma de almacenamiento más grande de N orgánico en las plantas superiores y esenciales para el funcionamiento de todas las reacciones del ciclo de Calvin-Benson, por lo que el nitrógeno está estrechamente relacionado con el metabolismo fotosintético y su equilibrio es esencial para el funcionamiento de todas las reacciones del ciclo de Calvin-Benson (Salisbury Ross, 1992; Taiz y Zeiger, 2009).

El uso del análisis de hojas como diagnóstico del estado nutricional de las plantas está basado en la premisa fundamental de la existencia de correlaciones significativas entre los niveles de nutrientes encontrados en las muestras y el crecimiento o los componentes de producción del cultivo (Bataglia *et al.*, 1983; Furlani *et al.*, 1999; Brizola *et al.*, 2005). Los órganos de la planta generalmente utilizados para el análisis final son las hojas por ser el centro metabólico y el lugar en que los cambios fisiológicos son más intensos (Malavolta *et al.*, 1997).

Así, el objetivo de este estudio fue examinar los efectos de diferentes fuerzas iónicas de la solución nutritiva No. 2 Hoagland y Arnon (1950) en el intercambio de gases, en el crecimiento vegetativo y en la acumulación de nutrientes en plantas de araticum de tierra fría (*Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer.

## Método

El experimento se llevó a cabo en un invernadero del Departamento de Botánica del Instituto de Biociencias (IB), Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Campus de Botucatu, SP, Brasil. Las semillas de araticum de la tierra fría (*Annona emarginata* (Schltdl.) Rainer H.) se sembraron en bandejas de poliestireno llenas de vermiculita expandida. Cuando las plantas jóvenes presentaron un tamaño medio 7-10 cm (altura) fueron trasplantadas a macetas con un volumen de alrededor de 1.5 litros y llenadas con solución de nutrientes aireada.

Las plantas fueron cultivadas y distribuidas en bloques con cuatro tratamientos en cinco repeticiones y cada repetición consistió en una planta. Fueron realizadas 5 colectas de datos para la medición del crecimiento de las plantas, tres colectas de datos para el intercambio gaseoso de la hoja y cuatro colectas de datos para evaluar nutrientes foliares.

Los tratamientos se realizaron mediante la variación de la concentración iónica (fuerzas iónicas), de la solución nutritiva completa No. 2 de Hoagland y Arnon (1950) a partir de la dilución de la solución en el agua desmineralizada para obtener el 25% lo que se llamó 25% FI (CEa de  $0.50 \pm 0.2 \text{ mS cm}^{-1}$ ) y así sucesivamente, obteniendo 50% FI (CEa de  $1.00 \pm 0.2 \text{ mS cm}^{-1}$ ); 75% FI (CEa de  $1.5 \pm 0.02 \text{ mS cm}^{-1}$ ); 100% FI (CEa de  $2.0 \pm 0.02 \text{ mS cm}^{-1}$ ) (testigo).

La conductividad eléctrica (CE) de la solución nutritiva se monitoreó diariamente con un conductímetro de marca Digimed® modelo de CD-21, y el pH se ajustó diariamente a  $6.0 \pm 0.5$  con la ayuda de un potenciómetro de mesa, de marca Digimed® modelo DMPH 3. La solución nutritiva fue renovada cada semana o cuando los intervalos de seguridad de la solución de nutrientes cambiaba ( $\pm 0.2 \text{ mS cm}^{-1}$  del valor original utilizada en cada tratamiento). Se utilizó agua desmineralizada para el reemplazo de agua evapotranspirada.

La evaluación del intercambio de gases y la transpiración se realizó utilizando el sistema de equipo abierto de la fotosíntesis IRGA (LI-6400, LI-COR, Lincoln, NE, USA). Estas medidas se llevaron a cabo entre las 9:00 y 11:00 horas en los días soleados. Las mediciones se rea-

lizaron a los 63, 98 y 126 DAT (días después del trasplante), con la selección de cinco plantas (repeticiones) por tratamiento, de las cuales fueron elegidas y estandarizadas la segunda o tercera hojas completamente expandidas. Se analizaron las siguientes características del intercambio de gases: tasa de asimilación de  $\text{CO}_2$  ( $A_{\text{net}}$ ,  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), concentración de carbono en la cámara interna ( $C_i$ , ppm), y eficiencia instantánea de carboxilación ( $A_{\text{net}}/C_i$ ) medida por la metodología descrita por Von Caemmerer y Farquhar (1981), la adopción de  $1700 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (PAR) de iluminación.

Las determinaciones del contenido del elemento nitrógeno (N) en las hojas a los 28, 56, 112 y 140 DAT se realizaron según la metodología descrita por Malavolta *et al.* (1997). Los datos de las variables de crecimiento de las plantas sometidas a análisis de varianza (ANOVA) y las medias se compararon mediante la prueba de Tukey al 5% de probabilidad ( $P \leq 0.05$ ). El análisis estadístico fue realizado utilizando el software SAS, versión 9.0 (SAS, 2002).

## Resultados y discusión

Se observó que las plantas jóvenes de araticum de tierra fría presentan mayor crecimiento cuando son cultivadas en 50% y 75% FI, y menor cuando se cultivan en 25%. Así, las diferencias de diámetro, altura, área foliar, materia seca de hoja y tallo se observaron a partir de 112 DAT, y las plantas cultivadas en 50% fueron las que mostraron los valores más altos en comparación con los valores obtenidos con las plantas cultivadas en 25%, aunque no se diferencian de las plantas cultivadas en 75% y 100% a 112 y 140 DAT.

Pero se hacen excepciones para las plantas cultivadas en 100% ya que el peso de la materia seca total de 112 DAT es menor (cuadro 1). A los 112 DAT las plantas cultivadas en el 25% FI tuvieron la menor cantidad de hojas, en comparación con otros tratamientos, los cuales no difirieron significativamente (cuadro 1). Sin embargo, en la masa de materia seca de raíz, se observaron diferencias significativas sólo 140 DAT, con los valores más altos encontrados en las plantas cultivadas en el 50% FI, difiriendo significativamente de 25% FI. Similar comporta-

miento fue observado por Avilán (1975) y Batista *et al.* (2003) en plantas de guanábana cultivadas con diferentes niveles de nutrientes.

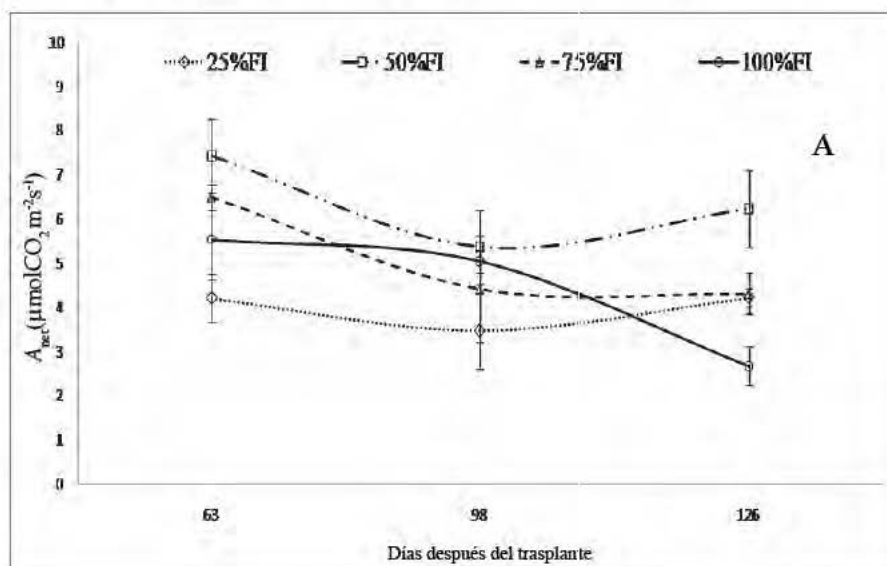
Con el mantenimiento de las plantas en solución nutritiva con 25% FI, se observaron bajas tasas de asimilación de carbono ( $A_{net}$ ) y una reducción en la eficiencia de carboxilación instantánea ( $A_{net}/C_i$ ) (gráfica 1), además, hubo acumulación de carbono interno ( $C_i$ ) (figura 3). La tasa de asimilación de  $CO_2$  de las plantas mantenidas en 50% FI fueron mayores en comparación con las demás fuerzas iónicas desde la primera evaluación. Observamos, sin embargo, la reducción de la tasa de asimilación de  $CO_2$  y la reducción de  $A_{net}/C_i$  hasta 98 días, lo que resultó en una reducción acumulada de  $A_{net}/C_i$  y pudo haber sido una consecuencia del aumento de la temperatura (gráfica 1) en el metabolismo, debido a que es una especie que tiene el metabolismo  $C_3$ , cuyo ideal es la temperatura entre 25-30°C. Sin embargo, la especie se ha adaptado rápidamente, aumentando la tasa de asimilación de carbono.

Cuadro I. Variables de crecimiento de plantas jóvenes de araticum de tierra fría cultivadas en diferentes fuerzas iónicas de la solución nutritiva completa No. 2 de Hoagland y Arnon (1950) con el tiempo. Los datos son media  $\pm$  SE y los valores fueron determinados con cinco plantas por tratamiento ( $n=5$ ) en 5 momentos diferentes de muestreo. Las letras mayúsculas iguales en cada fila y las letras minúsculas iguales en cada columna no difieren significativamente por el test Tukey al 5% ( $P \leq 0.05$ ).

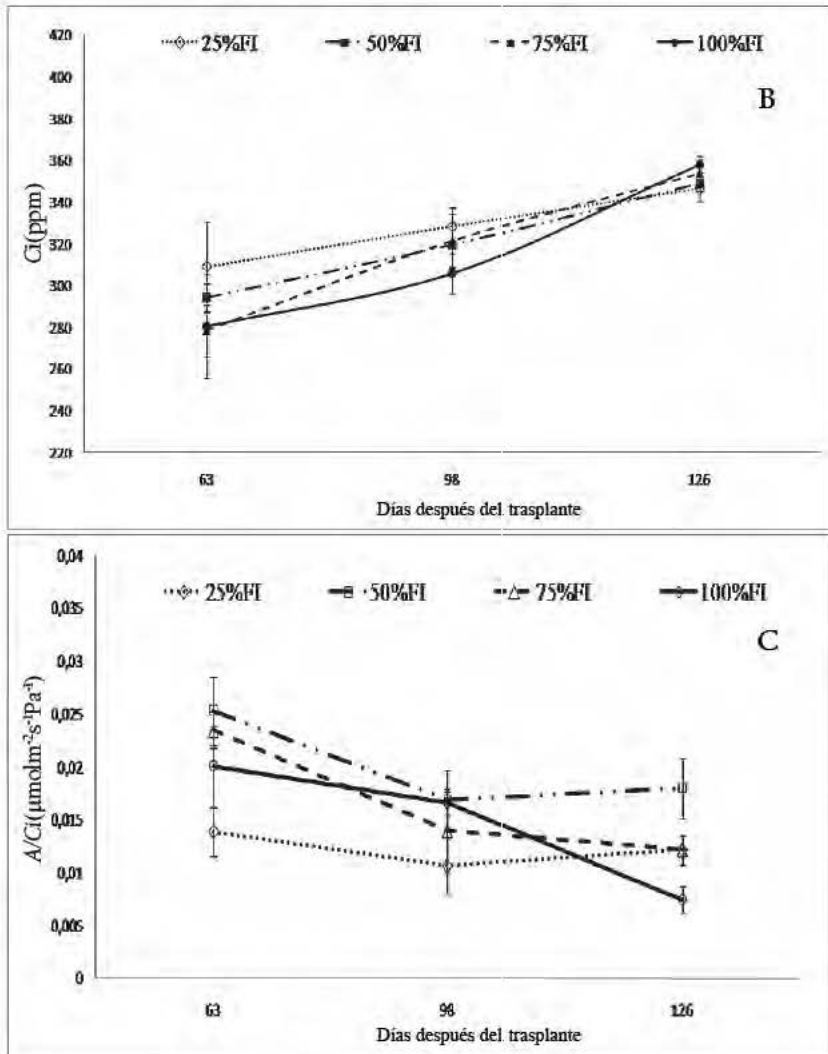
Número de hojas (fragmentos)					Diámetro (mm)			
Trat/ DAT	25%FI	50%FI	75%FI	100%FI	25%FI	50%FI	75%FI	100%FI
28	4.8 $\pm$ 0.8Ac	6.0 $\pm$ 0Ac	5.6 $\pm$ 0.6Ac	5.4 $\pm$ 0.3Ab	2.1 $\pm$ 0.05Ad	2.3 $\pm$ 0.03Ac	2.2 $\pm$ 0.07Ad	2.18 $\pm$ 0.03Ad
56	9.2 $\pm$ 0.8Bbc	14.6 $\pm$ 1.6Abc	10 $\pm$ 1.2Bbc	9.4 $\pm$ 1Bb	2.9 $\pm$ 0.03Ac	3.1 $\pm$ 0.08Abc	3.1 $\pm$ 0.01Acd	3.08 $\pm$ 0.14Ac
84	12.8 $\pm$ 2.9Bb	15.6 $\pm$ 3.7ABb	16 $\pm$ 1.3Ab	15 $\pm$ 1ABb	3.3 $\pm$ 0.07Abc	3.9 $\pm$ 0.2Ab	3.7 $\pm$ 0.25Ac	3.60 $\pm$ 0.17Ac
112	20.4 $\pm$ 0.8Ba	28.4 $\pm$ 3Aa	28 $\pm$ 3.7Aa	27.6 $\pm$ 3.6Aa	3.7 $\pm$ 0.26Bb	5.2 $\pm$ 0.41Aa	4.9 $\pm$ 0.24Ab	4.82 $\pm$ 0.3Ab
140	24.4 $\pm$ 2.4Ba	28.6 $\pm$ 1.7Aa	29.2 $\pm$ 1.9Aa	28.4 $\pm$ 4.4Aa	5.466 Ba	6.058 Aa	5.984 Aa	5.952 Aa
Altura (cm)					Masa seca del tallo (g)			
Trat/ DAT	25%FI	50%FI	75%FI	100%FI	25%FI	50%FI	75%FI	100%FI
28	7.08 $\pm$ 0.3Ab	8.3 $\pm$ 0.9Ad	8.20 $\pm$ 0.2Ad	7.50 $\pm$ 0.3Ac	0.17 $\pm$ 0.04Aa	0.19 $\pm$ 0.02Ab	0.19 $\pm$ 0.03Ab	0.19 $\pm$ 0.02Ab
56	14 $\pm$ 1.2Aa	13.9 $\pm$ 1.03Ac	13.42 $\pm$ 0.9Ac	13.18 $\pm$ 0.9Ab	0.19 $\pm$ 0.03Aa	0.21 $\pm$ 0.04Ab	0.19 $\pm$ 0.02Ab	0.19 $\pm$ 0.03Ab
84	15.6 $\pm$ 2.1Aa	19 $\pm$ 1.2Ab	18.66 $\pm$ 0.6Ab	17.98 $\pm$ 1.2Aab	0.3 $\pm$ 0.05Aab	0.32 $\pm$ 0.04Ab	0.32 $\pm$ 0.03Ab	0.32 $\pm$ 0.02Ab
112	18.46 $\pm$ 1.9Ba	24.7 $\pm$ 1Aa	22.50 $\pm$ 0.7ABa	20.32 $\pm$ 1.4ABa	0.4 $\pm$ 0.05Bb	0.71 $\pm$ 0.04Aa	0.65 $\pm$ 0.06Aa	0.36 $\pm$ 0.04Ab
140	18.60 $\pm$ 1.9Ba	25.4 $\pm$ 1.8Aa	25.04 $\pm$ 1.4ABa	21.36 $\pm$ 1.9ABa	0.44 $\pm$ 0.08Bb	0.8 $\pm$ 0.13Aa	0.66 $\pm$ 0.08ABa	0.60 $\pm$ 0.13Aa
Masa seca del tallo (g)					El peso seco de raíz (g)			

Número de hojas (fragmentos)					Diámetro (mm)			
Trat/ DAT	25%FI	50%FI	75%FI	100%FI	25%FI	50%FI	75%FI	100%FI
28	16 ± 0.43Ac	16.3 ± 1.32Ac	16 ± 0.79Ac	16.1 ± 1.16Ac	0.24 ± 0.03Aa	0.25 ± 0.03Ab	0.25 ± 0.05Ab	0.25 ± 0.03Ab
56	33.9 ± 6.7Abc	37.5 ± 3.81Ac	35.9 ± 3.01Ac	35.7 ± 8.23Abc	0.26 ± 0.03Aa	0.3 ± 0.03Ab	0.30 ± 0.05Ab	0.27 ± 0.02Ab
84	58.8 ± 10.3Aab	61.4 ± 3.4Abc	71.9 ± 2.8Ab	70.7 ± 10Aab	0.31 ± 0.04Aa	0.33 ± 0.03Ab	0.33 ± 0.04Ab	0.32 ± 0.05Ab
112	81.6 ± 3.5Ba	121 ± 10Aab	107 ± 5.5Aa	105.9 ± 6.5Aba	0.42 ± 0.12Aa	0.83 ± 0.03Aa	0.75 ± 0.03Aa	0.66 ± 0.04Aa
140	90.2 ± 3.45Ba	158.2 ± 10Aa	112.8 ± 5.5ABa	110.4 ± 6.5ABa	0.43 ± 0.05Ba	0.85 ± 0.14Aa	0.79 ± 0.06ABa	0.63 ± 0.12ABa
El peso seco de raíz (g)					Masa total seca (g)			
Trat/ DAT	25%FI	50%FI	75%FI	100%FI	25%FI	50%FI	75%FI	100%FI
28	0.21 ± 0.03Aa	0.22 ± 0.02Ac	0.22 ± 0.02Ab	0.21 ± 0.02Ab	0.61 ± 0.04Ab	0.67 ± 0.03Ab	0.65 ± 0.05Ac	0.64 ± 0.05Ac
56	0.28 ± 0.04Aa	0.29 ± 0.03Abc	0.28 ± 0.02Ab	0.29 ± 0.05Ab	0.74 ± 0.06Ab	0.79 ± 0.08Ab	0.77 ± 0.06Abc	0.75 ± 0.06Ac
84	0.32 ± 0.07Aa	0.35 ± 0.06Abc	0.35 ± 0.07Ab	0.33 ± 0.06Ab	0.93 ± 0.1Aab	1.02 ± 0.1Ab	1.03 ± 0.06Ac	0.98 ± 0.09Ac
112	0.44 ± 0.09Ba	1.01 ± 0.35Aab	0.7 ± 0.87Aa	0.69 ± 0.83Aa	1.27 ± 0.17Ca	2.41 ± 0.06Aa	2.11 ± 0.1Aa	1.71 ± 0.06Bb
140	0.448 Ba	1.014 Aa	0.873 Aa	0.831 Aa	1.32 ± 0.18Ba	2.6 ± 0.56 Aa	2.23 ± 0.14ABa	2.12 ± 0.18ABa

A pesar de que el tratamiento 100% FI es el tratamiento con las mayores cantidades de nutrientes disponibles para las plantas en solución nutritiva, no hubo pruebas de que era el más adecuado para el crecimiento vegetativo, al contrario. Al observar lo que ocurrió con las plantas cultivadas en 100% FI, parece que la baja tasa de Anet observada en este experimento y por Xu *et al.* (1995) y Schwarz *et al.* (2002) en tomate en diferentes fuerzas iónicas puede explicarse por el hecho de que el aumento en la conductividad eléctrica (CE) de la solución de nutrientes puede conducir a pérdidas en la cadena de transporte de electrones en la fotosíntesis (Marschner, 1995) con efectos negativos sobre la tasa fotosintética (Schwarz *et al.*, 2002) y reducir el crecimiento vegetativo, sea de toda la planta o de partes de ella (Gomez *et al.*, 1992; Al-Harbi, 1995, Schwarz y Kuchenbuch 1997).







Gráfica 1. Intercambio gaseoso en plántulas de araticum de fría la tierra cultivada en cuatro fuerzas iónicas con la solución nutritiva No. 2 Hoagland y Arnon (1950) en tres diferentes edades (63, 98 y 126 días después del trasplante). Los datos son la media ( $\pm$  SE) y el valor de cada uno se determinó en cuatro plantas por tratamiento (n= 4) en cuatro momentos diferentes de la evaluación. A: tasa de asimilación neta de carbono ( $A_{net}$ ), B: carbono interno (Ci), C: eficiencia de carboxilación instantánea ( $A_{net}/Ci$ )

Además, en el cultivo de 25% tenemos en cuenta los más altos valores de  $\text{CO}_2$  interno, principalmente hasta 98 DAT, lo que es una consecuencia de la baja eficiencia de la Rubisco en la carboxilación.

Cuando se analizan las interacciones significativas entre el tiempo de evaluación y diferentes fuerzas iónicas, se observa que 25% FI fue la concentración que menos promovió la acumulación de nitrógeno, diferenciando de la solución de 50% FI, que resultó con las mayores concentraciones principalmente a los 112 y 140 DAT (figura 1) sin diferir de 75% y 100% en algunas evaluaciones, lo que justifica el efecto de suministro adecuado de minerales para el correcto funcionamiento del proceso de fotosíntesis, que se tradujo en un mayor desarrollo del cultivo como se ve en las variables de crecimiento y los índices de análisis de crecimiento (cuadro 1 y figura 2).

Por tanto, las tasas de asimilación de carbono ( $A_{\text{net}}$ ) y la eficiencia de carboxilación ( $A_{\text{net}}/C_i$ ) producidos por las plantas cultivadas en 50% FI fueron en general mayores en comparación con otros tratamientos. El hecho de que la tasa de asimilación de  $\text{CO}_2$  ( $A_{\text{net}}$ ) en plantas sometidas a tratamiento con 50% muestran valores altos de FI comparado con otros tratamientos (figura 1) se puede atribuir a un mejor aprovechamiento de los elementos minerales suministrados, lo que resulta en un incremento de tasas de fotosíntesis de las hojas maduras (Aikin y Hannan, 1975; Zieslin *et al.*, 1978; Bozarth *et al.*, 1982; Mediene *et al.*, 2002).

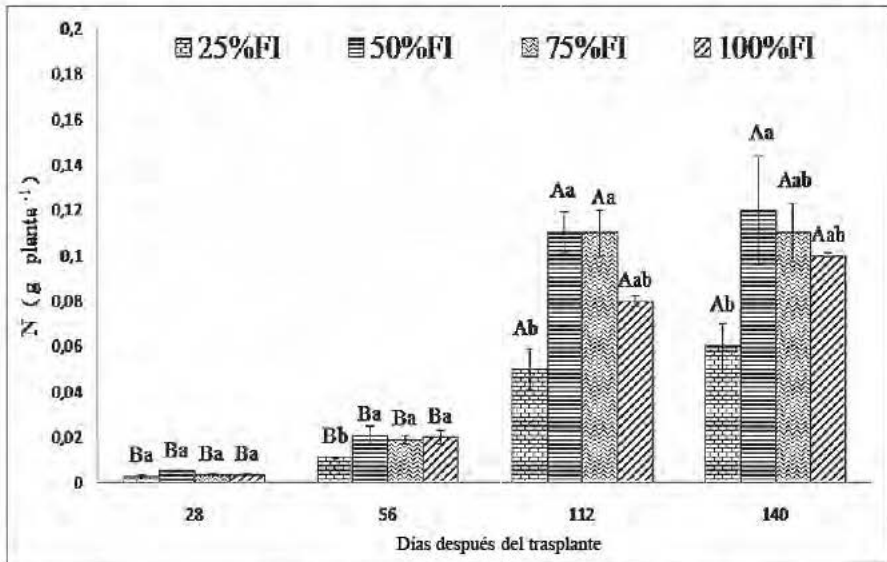


Figura 2. Concentración iónica de nitrógeno foliar (N) en  $\text{g planta}^{-1}$  determinada en plantas jóvenes de araticum de tierra fría crecidas en cuatro fuerzas iónicas con la solución nutritiva No. 2 Hoagland y Arnon (1950) en cuatro momentos diferentes (28, 56, 112 y 140 días después del trasplante). Los datos son la media ( $\pm$  SE) y el valor de cada uno se determinó en cuatro plantas por tratamiento ( $n=4$ ). Las mayúsculas comparan los mismos periodos de la misma fuerza iónica y minúsculas comparan la igualdad de la FI, en particular, no difieren significativamente según la prueba de Tukey al 5% ( $P \leq 0.05$ )

Existe, por tanto, el efecto directo del nitrógeno en la fotosíntesis de las plantas de araticum de tierra fría, que es esencial en la composición bioquímica de muchos compuestos no proteicos como coenzimas, metabolitos secundarios, poliaminas y pigmentos fotosintéticos (Marchner, 1995; Maathuis, 2009). Por otra parte, algunos estudios indican que la concentración de nitrógeno juega un papel clave en la actividad de la enzima Rubisco (Carboxilasa ribulosa bi-fosfato/oxigenasa) o en la cantidad de esta enzima, esencial para la fotosíntesis (Heitholt *et al.*, 1991; Osaki *et al.*, 1993).

De esta manera, la asimilación neta de carbono ( $A_{\text{net}}$ ) está estrechamente relacionada con el nivel de N de la hoja (Lawlor *et al.*, 1987; Sinclair y Horie, 1989; Wolfe *et al.*, 1988; Zhao *et al.*, 2005) corroborando los

resultados de este trabajo, porque la mayor acumulación de este elemento se observó al final del experimento, seguido por el aumento de las tasas de asimilación de carbono ( $A_{net}$ ) en plantas mantenidas en el 50% FI (figura 1). El nitrato y amonio (utilizados para proporcionar nitrógeno en la solución nutritiva) influyen directamente en la absorción de todos los otros iones, o están involucrados en el mantenimiento de electro-neutralidad dentro de la planta (Kotsiras *et al.*, 2002).

## Conclusión

Se concluye que las plantas jóvenes de araticum de tierra fría cultivadas en concentraciones intermedias de los nutrientes (fuerza iónica) de la solución nutritiva No. 2 de Hoagland y Arnon expresan más adecuadamente su potencial fisiológico, debido a su rusticidad y por permitir ahorros en los gastos con nutrición en los invernaderos para producción de plántulas.



## Referencias

- Aikin, W.J. and Hanan, J.J. 1975. Photosynthesis in the rose: effect of light intensity, water potential, water potential and leaf age. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 100 (3-4): 551-555.
- Al-Harbi, A.R. 1995. Growth and nutrient composition of tomato and cucumber seedlings as affected by sodium chloride salinity and supplemental calcium. *J. Plant Nutr.* 18 (7):1403-1416.
- Avilán, L.R. 1975. Efecto de la omisión de los macronutrientes en el desarrollo y composición química de la guanábana (*Annona muricata* L.) cultivada en soluciones nutritivas. *Agron. Trop.* 25 (1): 73-79.
- Bataglia, O.C., Furlani, A.M.C., Teixeira, J.P.F., Furlani, P.R. and Gallo, J.R. 1983. Métodos de análise química de plantas. Instituto Agronômico de Campinas. Campinas, Brasil. 48 pp.
- Batista, M.M.F., Viegás, I.J.M., Frazão, D.A.C., Thomaz, M.A.A. and Silva, R.C.L. 2003. Efeito da omissão de macronutrientes no crescimento, nos sintomas de deficiências nutricionais e na composição mineral em gravioleiras (*Annona muricata* L.). *Rev. Bras. Frutic.* 25 (2): 315-318.
- Bozarth, C.S., Kennedy, R.A. and Schekel, K.A. 1982. The effects of leaf age on photosynthesis in roses. *J. Am. Soc. Hort. Sci. New Phytol.* 181 (2): 275-294.

- Brizola, R.M. de O., Leonel, S., Tecchio, M.A. and Mischan, M.M. 2005. Exportação de macronutrientes pelos ramos e frutas da figueira cultivada em função da adubação potássica. *Acta Sci. Agron.* 27 (1): 33-37.
- Evans, J.R. 1989. Photosynthesis and nitrogen relationships in leaves of C<sub>3</sub> plants. *Oecologia.* 78 (1): 9-19.
- Furlani, P.R., Silveira, L.C.P., Bolonhezi, D. and Faquin, V. 1999. Cultivo hidropônico de plantas. IAC. Campinas, Brasil. 52 pp.
- Gomez, I., Navarro-Pedreno, J. and Mataix, J. 1992. The influence of saline irrigation on organic waste fertilisation on the mineral content (N, P, K, Na, Ca, and Mg) of tomatoes. *J. Sci. Food Agric.* 59 (4): 483-487.
- Gorbe, E. and Calatayud, A. 2010. Optimization of nutrition in soilless systems: A review. *Adv. Bot. Res.* 53: 1-230.
- Hoagland, D.R. and Arnon, D.I. 1950. *The water culture method for growing plants without soils.* California Agricultural Experimental Station. Berkeley, USA. 32 pp.
- Kotsiras, A., Olympios, C.M., Drosopoulos, J. and Passam, H.C. 2002. Effects of nitrogen form and concentration on the distribution of ions within cucumber fruits. *Sci. Hortic.* 95 (3): 175-183.
- Larcher, W. 2000. *Ecofisiologia vegetal.* 2 Ed. Rima. São Carlos, Brasil. 550 pp.
- Lawlor, D.W. and Cornic, G. 2002. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. *Plant Cell Environ.* 25 (2): 275-294.
- Maathuis, F.J. 2009. Physiological functions of mineral macronutrients. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12 (3): 250-258.

- Malavolta, E., Vitti, G.C. and Oliveira, S.A. 1997. Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações. 2 ed. Potáfos. Piracicaba, Brasil. 319 pp.
- Marenco, R.A.; Gonçalves, J.F.C. and Vieira, G. 2001. Photosynthesis and leaf nutrient contents in *Ochroma pyramidae* (Bombacaceae). *Photosynthetica*. 39 (4): 539-543.
- Marschner, H. 1995. Mineral nutrition of higher plants. 2 ed. Academic Press. London. 889 pp.
- Mediene, S., Jordan, M.O., Pages, L., Lebot, J. and Adamowicz, S. 2002. The influence of severe shoot pruning on growth, carbon and nitrogen status in young peach trees (*Prunus persica*). *Tree Physiol.* 22 (18): 1289-1296.
- Pinkard, E.A., Battaglia, M., Beadle, C.L. and Sands, P.J. 1999. Modeling the effect of physiological responses to green pruning on net biomass production of *Eucalyptus nitens*. *Tree Physiol.* 19 (1): 1-12.
- Reich, P.B., Kloeppel, B.D., Ellsworth, D.S. and Walters, M.B. 1995. Different photosynthesis-nitrogen in deciduous hardwood and evergreen coniferous tree species. *Oecologia*. 104 (1): 24-30.
- Salisbury, F.B. and Ross, W.C. 1992. Carbon dioxide fixation and carbohydrate synthesis. Plant physiology. Wadsworth Publishing. Belmont, USA. 682 pp.
- Schwarz, D. and Kuchenbuch, R. 1997. Growth analysis of tomato in closed recirculating systems in relation to EC-value of the nutrient solution concentration. *Acta Hort.* 450: 169-176.
- Schwarz, D., Klaring, H.P., Van Iersel, M.W. and Ingran, K.T. 2002. Growth and photosynthetic response of tomato to nutrient solution concentration at two light levels. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 127 (6): 984-990.



- Sinclair, T.R. and Horie, T. 1989. Leaf nitrogen, photosynthesis, and crop radiation-use efficiency: A review. *Crop Sci.* 29 (1): 90-98.
- Taiz, L. y Zeiger, E. 2009. Fisiología vegetal. 4 ed. Artmed. Porto Alegre, Brasil. 819 pp.
- Von Caemmerer, S. and Farquhar, G.D. 1981. Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves. *Planta.* 153 (4): 376-387.
- Wolfe, D.W., Henderson, D.W., Hsiao, T.C. and Alvino, A. 1988. Interactive water and nitrogen effects on senescence of maize. II - Photosynthetic decline and longevity of individual leaves. *Agron. J.* 80 (6): 865-870.
- Xu, H-l., Gauthier, L. and Gosselin, A. 1995. Effects of fertigation management on growth and photosynthesis of tomato plants grown in peat, rockwool and NFT. *Sci. Hortic.* 63 (1-2): 11-20.
- Zhao, D., Reddy, K.R., Kakani, V.G., Read, J.J. and Koti, S. 2005. Selection of optimum reflectance ratios for estimating leaf nitrogen and chlorophyll concentrations of field-grown cotton. *Agron. J.* 97 (4): 89-98.
- Zieslin, N., Kirscholtza, J. and Mo, Y. 1978. Effect of night temperature and growing practices on the winter yield of roses. *Sci Hortic.* 8 (4): 363-370.

## VI. *Annona muricata* L.



Foto: Lourdes Ochoa Guzmán



# Incidencia de enfermedades en el cultivo de guanábana (*Annona muricata* L.) en Tabasco

González-Arias, L.<sup>1</sup>, Castelán-Estrada, M.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Programa Anonáceas SEDAFOP, Gobierno del Estado de Tabasco.

<sup>2</sup>Campus Tabasco, Colegio de Postgraduados.

## Introducción

Las enfermedades que atacan a los frutales tropicales resultan de gran impacto económico debido a las pérdidas que ocasionan en el rendimiento y calidad de la cosecha. El conocimiento de los agentes causales que infectan a estas especies, es la primera condición requerida para establecer estrategias de control de las patologías en las plantaciones comerciales (Tun, 1998). En el caso de la guanábana, la enfermedad de mayor importancia para el cultivo es la Antracnosis, ya que es la más frecuente en las zonas de cultivo y disminuye la producción y la calidad del fruto (Lavalle, 1986). El patógeno responsable es el hongo *Colletotrichum gloeosporioides* Penz., que se presenta en plántulas y plantas adultas atacando tallos, ramas, hojas, flores y frutos, que ocasiona una disminución notoria en el rendimiento de frutos (Lavalle, 1986). Sin embargo, existen otras patologías que pueden afectar la sani-

dad del cultivo de la guanábana, mismas que varían de una región a otra dependiendo de las condiciones ambientales y del manejo agronómico de las plantaciones. Para determinar cuáles patologías afectan a este cultivo en una región dada es necesario hacer estudios cuantitativos y cualitativos para identificar al agente causal. En Tabasco no se habían realizado estos trabajos, por ello el objetivo de este estudio fue determinar la incidencia de enfermedades que se presentan en el cultivo de guanábana en este estado.

## Método

### *Ubicación del área de estudio*

La investigación de campo se realizó en cuatro plantaciones de guanábana, localizadas en los municipios de Comalcalco, Huimanguillo, Teapa y Macuspana, que forman parte de las regiones Chontalpa y La Sierra, del estado de Tabasco. Este último se sitúa entre las coordenadas 17°15'00" a 18°38'08" de latitud Norte y 90°38'08" a 94°07'00" de longitud Oeste (Palma-López y Cisneros, 2000). Las principales características de las plantaciones en las cuales se llevó a cabo esta investigación son:

**Las Liliás.** Se ubica en la finca Las Liliás del gobierno del estado de Tabasco, en el km 42+000 de la carretera Villahermosa-Teapa, en la ranchería Manuel Buelta y Rayón, en el municipio de Teapa. Presenta clima Af(m) cálido húmedo con lluvias todo el año. Precipitación del mes más seco mayor de 60 mm y % de precipitación invernal menor a 18 (INEGI, 2001), con temperatura media anual desde 25.4°C hasta 26.9°C (INEGI, 1986). La plantación tiene seis hectáreas de guanábana, con los clones 8, 9, 10, 12, 72, y 17728, provenientes de Costa Rica. Su establecimiento se realizó en marco real, a una distancia de siembra de 6 x 6 m, con densidad de 277 plantas por hectárea.

**Caobanal.** Se ubica en la ranchería Caobanal Ia. Sección, en el municipio de Huimanguillo. Presenta clima Af(m) cálido húmedo con lluvias todo el año. Precipitación del mes más seco mayor de 60 mm y % de precipitación invernal menor a 18 (INEGI, 2001), con temperatura media anual de 26.2 °C (INEGI, 1993). Tiene dos hectáreas de guanábana.

vana, establecidas con los clones 9, 10, 12 y 17728, de 5 años de edad. La plantación se realizó en marco real, a una distancia de siembra de 5 x 5 m, con 400 plantas por hectárea.

**Monte Largo.** Se localiza en el rancho La Esperanza, en la ranche-ría Monte Largo, la. Sección, en el municipio de Macuspana. Presenta clima Af(m) cálido húmedo con lluvias todo el año. Precipitación del mes más seco mayor de 60 mm y % de precipitación invernal menor a 18 (INEGI, 2001), con temperatura media anual 25.6°C (INEGI, 1994). Cuenta con una hectárea de guanábana de los clones 10 y 12, de 7 años de edad. Su establecimiento se realizó en marco real, a distancias de 6 x 6 m, con 277 plantas por hectárea.

**Oriente.** Se ubica en la ranchería Oriente 2ª. Sección, en el munici-pio de Comalcalco. Con clima Am(f), cálido húmedo con abundantes lluvias en verano. Precipitación del mes más seco menor de 60 mm y % de precipitación invernal mayor a 10.2 (INEGI, 2001). Plantación con hectárea de guanábana criolla, de 10 años de edad aproximadamente. Su establecimiento se realizó en marco real, a distancias de 5 x 5 m, con densidad de 400 plantas por hectárea, se encuentra asociada con palma de coco y toronja.

### *Caracterización climática del área de estudio*

Se emplearon los registros de temperaturas y precipitación de las esta-ciones meteorológicas de Teapa, Platanar, Macuspana y Comalcalco, las cuales son las más cercanas a los sitios de estudio. Se graficaron las temperaturas media mensual y la precipitación mensual acumulada de cada estación meteorológica del periodo de estudio (desde octubre de 2000 hasta Julio de 2001). Estos datos sirvieron para calcular las tem-peraturas medias de las época de lluvias, nortes y seca. Asimismo, a partir de los datos de precipitación mensual acumulados se obtuvo la precipitación anual media y se determinó su distribución durante el periodo de muestreo; así como su influencia sobre la incidencia y seve-ridad de las enfermedades en el cultivo de guanábana.

La época de lluvias es un periodo muy húmedo de junio a octubre, que presenta las máximas precipitaciones en septiembre-octubre (des-

de 650 hasta 1,100 mm), es decir, alrededor de 45% de la precipitación anual; en este lapso las lluvias son copiosas, vespertinas, presentándose lluvias máximas que alcanzan 300 mm en 24 horas.

La época de nortes es un periodo húmedo de noviembre a enero, durante el cual se presentan lluvias de tipo ciclónico de baja intensidad y duración prolongada.

La época seca va de febrero a mayo, con lluvias entre 40 y 100 mm, que están por debajo de la demanda evaporativa de la atmósfera, lo que origina un déficit de humedad en los cultivos que ocasiona disminución de los rendimientos (Saldaña, 2002).

### *Diseño experimental y variables*

Considerando la pendiente del terreno, cada sitio fue dividido en tres bloques, ubicando una repetición en cada bloque. Para la toma de datos de cada tratamiento (plantación) se seleccionaron al azar 10 árboles como unidades experimentales (UE), con una repetición por bloque, haciendo un total de 30 árboles por sitio (cuadro 1). El análisis de datos se hizo mediante ANOVA, bajo un diseño de bloques completos al azar, con cuatro tratamientos y tres repeticiones.

Las variables de observación fueron los síntomas visuales, evaluados mediante la severidad e incidencia de diferentes enfermedades en hojas, flores y frutos en desarrollo, en tres temporadas por sitio.

Cuadro 1. Tratamientos para observar la presencia de enfermedades en el cultivo de guanábana en plantaciones de Tabasco

TRATAMIENTO	PLANTACIÓN	REPETICIONES
T1	Las Liliás	3
T2	Caobanal	3
T3	Montelargo	3
T4	Oriente	3

## *Muestreos*

Se realizaron tres muestreos en cada sitio de estudio, correspondiendo cada uno a las temporadas de lluvia, norte y seca. Los muestreos fueron dirigidos a plantas enfermas con síntomas en hojas, rama, tallos, flor y frutos, en cada plantación y periodo, se colectó material vegetal enfermo (cuadro 2). Las muestras colectadas se pusieron en bolsas de polietileno etiquetadas y se trasladaron para su análisis en el Laboratorio de Fitopatología del Campus Tabasco.

Cuadro 2. Órganos de la planta muestreados por temporada, para determinar la presencia de enfermedades en guanábana, en Tabasco

ÉPOCA	FECHA DE MUESTREO	ÓRGANOS
Norte	Enero de 2001	Hojas, ramas, tallos, frutos
Seca	Marzo de 2001	
Lluvia	Julio de 2001	

## *Aislamiento de patógenos*

El tejido enfermo se separó por síntomas, se cortaron en pequeños trozos y se desinfectaron por inmersión en una solución de hipoclorito de calcio al 1% durante 30 segundos, posteriormente se lavaron tres veces con agua destilada estéril. En la cámara de flujo laminar se eliminó el exceso de agua de los cortes de tejido sobre un filtro estéril. Los trozos de tejido desinfectados se sembraron en medio de cultivo PDA en cajas Petri. A las 48 horas de incubación en oscuridad y a temperatura del laboratorio se observó el crecimiento de hongos, se procedió a su aislamiento tomando pequeños cortes de la orilla para resembrarlos en medio PDA para su identificación. Los hongos aislados se montaron en portaobjetos con lacto-fenol azul, se observaron al microscopio compuesto y se identificaron utilizando las claves de Barnett (1972).



### ***Incidencia y severidad de enfermedades***

En cada plantación se muestrearon 10 árboles por bloque; 30 árboles por plantación. En cada uno se evaluó la severidad de las enfermedades mediante la estimación visual del porcentaje de área foliar dañada. Los resultados se expresaron en porcentaje de severidad de superficie foliar por sitio y época.

Asimismo, se evaluó la incidencia en frutos en desarrollo, para ello se cuantificó el total de frutos formados y el total de frutos enfermos. Obteniéndose datos globales de la observación de 30 árboles por sitio. Los resultados se expresaron en porcentaje de incidencia por plantación y época, mediante la siguiente ecuación;

$$Iaf = \frac{fe}{ft} 100$$

Donde:

Iaf= incidencia de antracnosis en fruto; fe= fruto enfermo; ft= frutos totales.

## **Resultados y discusión**

### ***Precipitaciones y temperaturas por temporada***

Para la finca Las Liliás, las temperaturas medias fueron 27.2°C en la época de lluvia, 23°C en la época de nortes y 26.5°C en la época de seca. En el sitio Caobanal, las temperaturas medias fueron de 24.3°C en la época de lluvias, 20.7°C en la época de nortes y 23.3°C en la época de seca. En la plantación Monte Largo, las temperaturas promedio fueron de 29.7°C en la época de lluvias, 27.6°C en la época de nortes y 28.7°C en la época de seca. En el sitio Oriente las temperaturas promedio fueron de 24.4°C en la época de lluvias, 18.8°C en la época de nortes y 22°C en la época de seca. Según los registros en las zonas de estudio, la temperatura no es limitante para el desarrollo del cultivo de guanábana; esto concuerda con Hernández (1985), quien señala que temperaturas medias anuales entre 22°C a 28°C son adecuadas para el cultivo.

La precipitación anual fue de 2,562.4 mm, 2993,4 mm, 2,761.8 mm, 1,825 mm en Las Liliás, Caobanal, Monte Largo y Oriente, respectivamente. De acuerdo a los requerimientos del cultivo (Hernández, 1985), la precipitación es suficiente, pero se presenta una estación seca marcada. La precipitación de las zonas de estudio rebasa la mínima y óptima requerida; las más altas se observan en Caobanal, y representan una limitante debido a la alta humedad relativa, que favorece enfermedades fungosas. La Antracnosis se presenta comúnmente durante la época de lluvias o en periodos de alta humedad ambiental ([www.ecuarural.gov.ec/](http://www.ecuarural.gov.ec/), 2001) y puede desarrollarse en un rango de temperaturas desde 15.5° hasta 35.0°C (Lavalle, 1986).

### ***Enfermedades de la guanábana en Tabasco***

Las enfermedades registradas durante el periodo desde enero hasta julio del 2001 que comprendió las tres épocas climáticas típicas de Tabasco (nortes, seca y lluvias), en los cuatro agrosistemas estudiados, fueron tres: la antracnosis causado por el hongo *Colletotrichum gloeosporioides* que provoca manchas foliares y ataca directamente al fruto (figura 1); la Mancha Blanca de la Hoja causado por *Macrophoma* sp; y la Mancha del Ápice de la Hoja, a la cual se encontró asociado el hongo *Pestalotia* sp. (cuadro 3).



Figura 1. Daño por Antracnosis (*C. gloeosporioides*) en hoja (a) y frutos de guanábana criolla (b); fruto de guanábana clonal (c)

La antracnosis se presentó de manera endémica en los cuatro agro-sistemas estudiados durante las tres épocas climáticas, con excepción de Monte Largo en la época de nortes (en el follaje) y de Las Liliás en el fruto. A nivel de hoja se presentaron necrosis de color café oscuro, concéntricas, de bordes bien definidos y de tamaño variable desde 0.3 hasta 2.0 cm de diámetro. Dichas lesiones se unen formando grandes áreas necróticas que abarcan hasta el 25% de la superficie foliar. Estas lesiones inician en el ápice de las hojas jóvenes, así como en el limbo y sobre la nervadura central de la hoja, ocasionando deformación (figura 1a).

La antracnosis en el fruto se presentó en los materiales criollos y clones, siendo el primer material más susceptible. El síntoma principal consiste en lesiones que van desde 0.3 hasta 1 cm, las cuales durante la evolución de la enfermedad se unen formando grandes áreas necróticas que abarcan hasta la cuarta parte de los frutos grandes ( $\pm 3$  kg) y cubren en su totalidad a frutos pequeños ( $< 500$ g); también se puede presentar en la unión del pedúnculo y en el ápice.

Cuadro 3. Patógenos foliares registrados en cuatro agrosistemas y tres épocas climáticas, en diversos clones de guanábana (*Annona muricata* L.) cultivados en Tabasco

Agroecosistema	Época		
	Nortes	Seca	Lluvias
Las Liliás Clones 8, 9, 10, 12, 72, 17728	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> . <i>Macrophoma</i> sp.	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> .	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> .
Caobanal Clones 9, 10, 12, 17728	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> . <i>Pestalotia</i> sp.	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> .	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> . <i>Macrophoma</i> sp.
Monte Largo Clones 10, 12	<i>Pestalotia</i> sp. <i>Macrophoma</i> sp.	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> . <i>Macrophoma</i> sp.	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> .
Oriente Tipos criollos	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> . <i>Pestalotia</i> sp. <i>Macrophoma</i> sp.	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> .	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> . <i>Macrophoma</i> sp.

Otro síntoma observado fue el punteado de la hoja, el cual se encontró en hojas adultas. Este síntoma se presenta como pequeñas lesiones necróticas, visibles tanto por el haz como por el envés de la hoja, de color café oscuro y de aproximadamente 1 mm de diámetro; cuando el daño es severo provoca defoliación de la planta.

Asimismo, se observaron los síntomas en las puntas de las ramas en las cuatro plantaciones, como necrosis de los renuevos, secándolos por completo, dando un aspecto arruinado de la planta, esta enfermedad también se observó en tallo, donde la necrosis se presentó en la corteza, como áreas muertas de tejido hundidas y de color café oscuro presentando un tamaño que va desde 0.5 hasta 1.5 cm, asociado con la muerte de la rama y desgajamiento de la rama a nivel de la lesión.

En lo que respecta a la enfermedad foliar Mancha Blanca se observó en plantas de las cuatro plantaciones estudiadas. A estos daños se encontró asociado el hongo *Macrophoma* sp. Las lesiones se presentaron en hojas viejas, en forma de áreas necróticas a lo largo de la hoja, con bordes bien definidos de color café oscuro, desde 0.3 hasta 1.0 cm de diámetro, visibles por el haz y envés (figura 2). Una enfermedad con

síntomas semejantes ha sido reportada en Costa Rica para este cultivo, sin embargo, se reporta como agente causal al hongo *Phaeosphaeria* sp. (Elizondo, 1989). Razón por la cual este resultado tiene que ser verificado mediante pruebas de patogenicidad mediante aplicación de los postulados de Koch.



Figura 2. Hojas de guanábana dañadas por *Macrophoma* sp. (a) y *Pestalotia* sp. (b)

Finalmente, los síntomas observados en mancha del ápice de la hoja de donde se aisló *Pestalotia* sp., se caracterizaron como manchas café claro que van desde la punta hacia la parte central de la hoja, tienen bordes bien definidos de color crema, sobre las cuales se aprecian los acérvulos subepidermales de color negro. Las lesiones ocupan desde el 10 hasta el 60% de la hoja, una característica de esta enfermedad es que se le encuentra en hojas más viejas (figura 2b). Este organismo no se encuentra reportado causando daño a este cultivo, por lo que se recomienda la realización de pruebas de patogenicidad. En este estudio se concluye que sí existen variaciones en la incidencia de enfermedades, que se relacionan con la época climática y el agrosistema, principalmente para la antracnosis. Estos resultados confirman lo señalado por Lavalley (1986), que describe a dicha enfermedad como la más frecuente.

### ***Severidad de la Antracnosis en hojas y su incidencia en frutos***

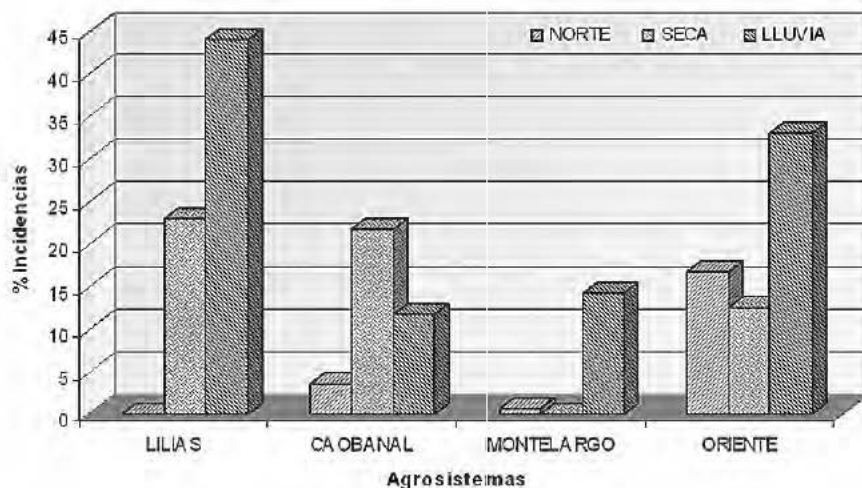
La antracnosis se manifestó en los cuatro sitios con el síntoma de necrosis de la hoja, distribuida con una severidad variable entre las épocas mues-

treadas. Los mayores porcentajes de severidad (49.0 y 11.4%) se registraron en la plantación Oriente, tanto en la época seca como al inicio de las lluvias respectivamente, a diferencia de la época de nortes con sólo 2.25% de severidad. En orden de importancia se registró con un 7.6 y 6.6% en la plantación de Las Liliás en la época de lluvia y nortes respectivamente y 3.1% en la época seca, y con un 5.2% de severidad en Monte Largo en época de seca, y los porcentajes de severidad en las épocas de lluvia y norte se mantuvieron de 0.9 a 0%, respectivamente. Para la finca Caobanal los porcentajes de severidad fueron igualmente bajos (3.3, 1.7 y 0.25%) en la época de seca, lluvia y nortes, respectivamente (cuadro 4).

Cuadro 4. Severidad de la antracnosis (%) en hoja en el cultivo de guanábana, en tres épocas y cuatro plantaciones en Tabasco

AGROSISTEMA	Épocas		
	Nortes	Seca	Lluvias
Las Liliás	6.6	3.1	7.6
Caobanal	0.25	3.3	1.7
Monte Largo	0.0	5.2	0.9
Oriente	2.25	49.0	11.4

Los porcentajes de incidencia de antracnosis del fruto de guanábana que se presentaron en la época de nortes variaron desde 3.6 hasta 16.6%, época que coincide con la etapa de floración y el inicio de formación del fruto en las plantaciones Caobanal, Monte Largo y Oriente. En la época seca, el porcentaje de incidencia de antracnosis en fruto varió desde 12.5 hasta 23% de la producción que coincide con el desarrollo de frutos. En la época de lluvias la incidencia fue mucho mayor que en las dos anteriores y varió de 11.6 a 44.0% de incidencia en frutos próximos a su cosecha (gráfica 1 y cuadro 5).



Gráfica 1. Porcentaje de incidencia de antracnosis del fruto de guanábana en diferentes épocas climáticas en cuatro agrosistemas en Tabasco

Cuadro 5. Porcentaje de incidencia de antracnosis del fruto de guanábana en diferentes épocas climáticas en cuatro plantaciones en Tabasco

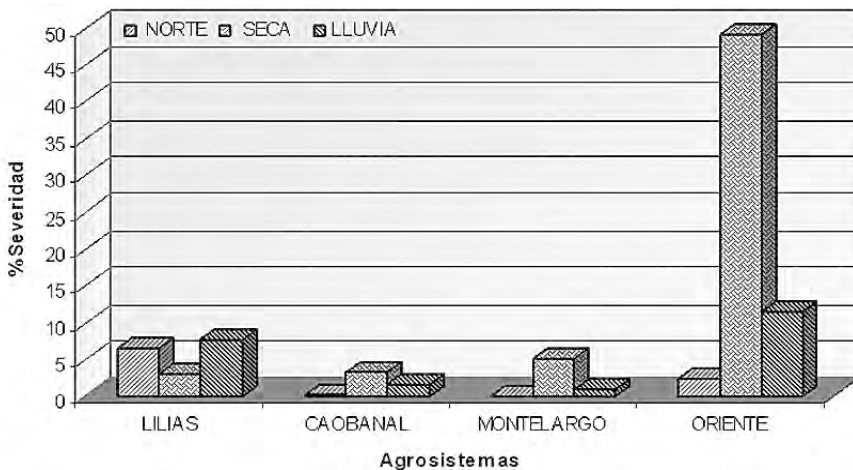
Sitio	Época climática								
	Nortes			Seca			Lluvias		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C
Las Liliás	0	0	0.0	26	6	23.0	9	4	44.0
Caobanal	166	6	3.6	37	8	21.6	103	12	11.6
Montelargo	42	0	0.6	100	0	0.0	28	4	14.2
Oriente	18	3	16.6	8	1	12.5	3	1	33.0

A= total de frutos; B= frutos necrosados; C= % de incidencia

Los valores más altos de antracnosis del fruto se registraron al inicio de las lluvias, lo cual coincide con Acosta (2002) quien reporta que la antracnosis se presenta comúnmente durante la época de lluvias, favoreciendo el desarrollo y alta incidencia de *C. gloeosporioides* la alta humedad ambiental y temperaturas. Acosta (2002), menciona que durante

las lluvias ligeras, los conidios de *Colletotrichum gloeosporioides* tienden a depositarse alrededor del pedicelo y después son redistribuidos sobre la superficie de los frutos, este mismo autor reporta que en frutos grandes el patógeno normalmente no se desarrolla inmediatamente, ya que forma infecciones latentes y los síntomas se desarrollan una vez que el fruto empieza a madurar, condición que se presenta en esta época.

En general, los resultados obtenidos de la alta incidencia de antracnosis de la hoja en la plantación Oriente, durante la época seca (marzo) y lluvias (julio) (gráfica 2), se debe a que es una plantación establecida con materiales criollos, los cuales son muy susceptibles a esta enfermedad, y además coincide con la presencia de hojas jóvenes; de acuerdo con Acosta (2002), esta es una fase susceptible donde la severidad de la antracnosis es mayor.



Gráfica 2. Severidad de antracnosis de la hoja de guanábana en diferentes épocas climáticas, en cuatro agrosistemas en Tabasco

## Conclusión

En el cultivo de guanábana en Tabasco se detectaron tres enfermedades en las plantaciones en campo. Los agentes causales de las enfermedades son: *Colletotrichum gloeosporioides* (Antracnosis); *Macrophoma* sp. (Mancha Blanca de la Hoja) y *Pestalotia* sp. (Mancha del Ápice de la Hoja).



Se determinó que la antracnosis es la principal enfermedad de la guanábana en Tabasco, al estar presente en las plantaciones durante todo el periodo de observación y en mayor frecuencia. La antracnosis causa pérdidas directas de hasta 44% del total de frutos producidos por árbol, sobre todo en la época de lluvias. La Antracnosis tiene mayor incidencia sobre los materiales criollos que sobre los clones introducidos.

## Referencias

- Acosta, R. M. 2002. La antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz.) del mango (*Mangifera indica* L.) cv. Haden: patogenicidad, control químico, manejo y epidemiología. Tesis de Doctorado. Colegio de Postgraduados. Montecilo, Edo. de México, México. 131 pp.
- Barnett, H.L. and Hunter, B.B. 1972. Illustrated genera of imperfect fungi. Burgess Publishing Company. Minneapolis, Minnesota. 260 pp.
- Camacho, CH.W. 2000. Modelación y simulación para el drenaje de tierras, en la planicie aluvial del estado de Tabasco, México. Tesis de doctorado. Facultad de Agronomía, UANL. Nuevo León, México. 130 pp.
- <http://www.ecuarural.gov.ec/ecuagro/paginas/tecno/Guanábana.htm>. 2001.
- Lavalle, V.J.A. 1986. Evaluación del daño que causan las principales enfermedades en el fruto de la guanábana (*Annona muricata* L.) en Sihochac, Campeche. Tesis de Licenciatura. Colegio Superior de Agricultura Tropical. Especialidad: Parasitología Agrícola. Cárdenas, Tabasco. 55 pp.
- Palma-López D.J. y Cisneros D., J. 2000. Plan de uso sustentable de los suelos de Tabasco. 2ª Ed. ISPROTAB-Fundación Produce Tabasco-Colegio de Postgraduados. Villahermosa, Tabasco, México. 118 pp.

- Reyes, C.M.E. 2000. El barrenador del fruto *Talponia batesi* Heinrich (Lepidoptera: Tortricidae) en chirimoyo *Annona cherimola* Mill. Tesis de Maestría en Ciencias. Especialidad: Entomología y Acarología. Colegio de Postgraduados. Montecillo, México. 45 pp.
- Saldaña H., M. I. 2002. Diagnóstico de la pudrición de la raíz del papayo causada por *Phytophthora* sp, en la Chontalpa y Centro, Tabasco. Tesis de Maestría en Ciencias. Programa: Producción de cultivos tropicales. Colegio de Postgraduados. H. Cárdenas, Tabasco, México. 110 pp.
- Tún S., J.M. 1998. Manejo integrado de enfermedades en frutales tropicales alternativos. En: Memorias del curso Producción de Frutales Tropicales Alternativos. Centro de Investigación y Graduados Agropecuarios. Instituto Tecnológico Agropecuario No. 2. Conkal, Yucatán. México. 161 pp.

# Incidencia por estrato arbóreo de *Bephratelloides cubensis* A. y *Cerconota anonella* S. en frutos de *Annona muricata* L. con diferente manejo en Veracruz, México

Ruiz-Montiel, Cesar y Flores-Peredo, Rafael

Instituto de Investigaciones Forestales, Parque Ecológico El Haya, Antigua Carretera Xalapa-Coatepec, Universidad Veracruzana, Xalapa, Veracruz, México, teléfono y fax: +012288121357. ruizmon@gmail.com

## Resumen

Los insectos barrenadores, constituyen las principales plagas asociadas al cultivo del guanábano al demeritar drásticamente la calidad y el valor comercial de los frutos. El complejo *Bephratelloides* (Hymenóptera: Eurytomidae) y *Cerconota* (Lepidóptera: Oecophoridae) son dos de las principales plagas que atacan árboles de *Annona muricata* al mermar desde un 60 hasta el 100% la producción de frutos, siendo aún escaso el conocimiento de su etología, mismo que permitiría la aplicación de mejores técnicas para su control. Evaluamos el efecto del estrato arbóreo y la aplicación o no de plaguicidas sobre la incidencia de *Bephratelloides cubensis* y *Cerconota anonella* en frutos de *Annona muricata*. Durante mayo-julio 2009, colectamos frutos de dos estratos

arbóreos en 4 plantaciones del centro del estado de Veracruz, México sujetas a diferente manejo. Registramos en laboratorio 335 individuos emergidos (100%). La incidencia de *B. cubensis* y *C. anonella* fue diferente por tipo de manejo. *B. cubensis* con manejo (62.08%) vs sin manejo (34.02%), *C. anonella* con manejo (0%) vs sin manejo (3.8%). Entre estratos, *B. cubensis* emergió en mayor proporción en frutos del estrato bajo (66.86%) vs el estrato alto (29.25%), para *C. anonella* la emergencia no fue diferencial. La aplicación de plaguicidas resultó ineficiente en el control de *B. cubensis* al desarrollar la mayoría de su ciclo biológico en el interior de la semilla. Contrariamente, para *C. anonella* fue eficaz, al dejar expuestos sus huevos hasta por 23 días. No obstante, los plaguicidas a largo plazo generan resistencia y dañan potencialmente la microfauna, siendo otras técnicas menos dañinas como el embolsado de frutos o el uso de plantas repelentes más eficaces en el control de estas plagas. En el estrato bajo se genera menor temperatura y mayor humedad, dos características demandadas por *B. cubensis* para el desarrollo de su ciclo biológico (20°C y 80% de humedad) y que relacionan el por que su mayor emergencia en este sitio. Contrariamente *C. anonella* se presentó en ambos estratos, al demandar condiciones menos marcadas que *B. cubensis* (23°C y 60% humedad). El control de factores como la temperatura y humedad mediante podas controladas podría resultar una estrategia preventiva y poco costosa en el manejo integral de estas plagas, aunado al uso de técnicas menos dañinas y con gran eficacia (>80% de efectividad).

Palabras clave: *control, insectos plaga, manejo integral, microclima, resistencia*

## Introducción

El guanábano, es un árbol nativo de América Tropical apreciado en los trópicos de Centro y Sudamérica al ser el néctar y la pulpa de sus frutos de gran demanda y valor comercial en los mercados internacionales (Cruz *et al.*, 2002). El guanábano, cuenta con múltiples propiedades medicinales como las antitumorales, parasiticidas y antidiarreicas así como las bioinsecticidas (Alali *et al.*, 1998; Santos-Pimienta *et al.*, 2003),

que han favorecido la extensión de su cultivo en diversos países. En México, su cultivo abarca una superficie de 5,915 has distribuidas en los estados de Nayarit, Colima, Sinaloa, Campeche, Chiapas, Tabasco, Yucatán, Puebla, Jalisco, Michoacán, Guerrero, Oaxaca y Veracruz (Vidal, 1994; Vidal y Nieto, 1997; Hernández-Fuentes *et al.*, 2008). Nayarit, es el principal productor con 1860 has sembradas que aportan el 20% de la producción anual generada en el país (Cruz *et al.*, 2002). Veracruz con 860 has contribuye con el 6% (Vidal y Nieto, 1997), siendo los municipios de Actopan, Emiliano Zapata, Alto Lucero, Tlapacoyan, Martínez de la Torre y las localidades de Tlacotepec de Mejía, Totutla y Soledad de Doblado las principales zonas productoras de guanábano en el estado (Sánchez, 1995).

No obstante en México como en otros países, la extensión y el cultivo del guanábano son limitados por factores como la carencia de variedades mejoradas, el desconocimiento de problemas fitosanitarios, la baja producción de frutos y principalmente el ataque de plagas y enfermedades (Granadino y Cave, 1994; Coto y Saunders, 2001; Cruz *et al.*, 2002). Los insectos barrenadores de flores y frutos constituyen las principales plagas de este cultivo al demeritar drásticamente la calidad y el valor comercial de los frutos y provocar la antracnosis causada por el hongo *Colletotrichum gloeosporoides* (Boscan y Godoy, 1989). Tres son consideradas las principales plagas que atacan árboles de *Annona muricata* y de la familia Annonaceae, *Talponia batesi* H. (Lepidóptera: Tortricidae) o palomilla barrenadora del fruto, el complejo *Bephratelloides* (Hymenóptera Eurytomidae) o barrenador de las semillas y el complejo *Cerconota* (Lepidóptera: Oecophoridae) o broca del fruto (Boscan y Godoy, 1989; Bustillo y Peña, 1992; Peña y Bennet, 1995; Micheletti *et al.*, 2001; Peña *et al.*, 2002). Estas plagas llegan a mermar desde un 60 hasta el 100% la producción de frutos siendo primordial el estudio de su biología, etología y mecanismos de control (Corrales-Moreira, 1995; Braga-Sobrinho *et al.*, 1999; Broglio-Micheletti *et al.*, 2001; Hernández-Fuentes 2008).

En México, el impacto de estas plagas ha orillado a productores a usar plaguicidas para su manejo y control, mismos que han demostrado ser ineficientes al propiciar la aparición de insectos resistentes y

contaminar el suelo (Peña y Nagel, 1988; Brechelt, 2004), en diversos cultivos se han realizado hasta seis aplicaciones por año sin lograr un control efectivo (Hernández-Fuentes *et al.*, 2008). Por ello, la búsqueda de alternativas menos dañinas en el control de plagas es una estrategia viable. En los últimos años, los impactos generados por estas plagas han propiciado que las investigaciones enfocadas al control eficiente de insectos barrenadores de anonáceas constituyan una prioridad en países como Costa Rica, Venezuela, Colombia, Trinidad y Tobago, Estados Unidos, Puerto Rico, Brasil y México (Castañeda-Vildozola, 2000). El uso y colocación de trampas a diferentes estratos arbóreos por ejemplo, ha permitido determinar el momento oportuno para iniciar el monitoreo de huevecillos, la emergencia de larvas y adultos y las densidades de diversos insectos barrenadores en diferentes estratos arbóreos (inferior, medio y superior), permitiendo así la aplicación de mejores estrategias de control (McNeil, 1991).

En México, este tipo de estudios se han llevado a cabo con el barrenador del frijol (*Elasmopalpus lignosellus* Zeller) (Lepidóptera: Pyralidae) (Loera *et al.*, 1995); los barrenadores de semillas de aguacate (*Conotrachelus perseae* Barber y *C. aguacatae* B.) (Coria-Avalos, 1999); del amaranto (*Hipolixus truncatulus*) (Coleóptera: Curculionidae) y (*Amauroliza abnormalis*) (Díptera: Agromyzidae) (Torres-Saldaña *et al.*, 2004) y en el daño por trips sobre frutos de aguacate Hass (Ascensión-Betanzos *et al.*, 1999), documentándose un mayor impacto sobre el estrato inferior de los árboles, debido al desarrollo de la pupa en el suelo y la posterior colonización de adultos a las partes bajas del árbol (Coria-Avalos, 1999), el menor grosor de los tallos (Torres-Saldaña *et al.*, 2004) y la presencia de maleza con altas densidades de insectos (Ascensión-Betanzos *et al.*, 1999). Este efecto es desconocido para insectos plaga del guanábano, al ser el conocimiento de su biología y etología un campo aún poco explorado.

Determinamos la incidencia de *Bephratelloides cubensis* A. y *Cerconota anonella* S. en frutos de *Annona muricata* L. de plantaciones con diferente manejo de la zona centro del estado de Veracruz, México. Formulamos las siguientes preguntas: ¿Es diferente la incidencia de *B. cubensis* y *C. anonella* en frutos de *A. muricata* procedentes de plantaciones con

diferente manejo (con y sin fumigación)?, ¿es diferente la incidencia de *B. cubensis* y *C. anonella* en frutos de *A. muricata* de dos estratos arbóreos (alto y bajo)? Planteamos la siguiente hipótesis: la incidencia de *B. cubensis* y *C. anonella* será mayor en frutos del estrato bajo e indistinta por tipo de manejo.

## Método

### *Sitio de estudio*

Consideramos 4 plantaciones de guanábano con y sin manejo (aplicación de plaguicidas) en la zona centro del estado de Veracruz, México. Éstas se ubicaron en las localidades de La Esperanza (19° 28' 15" N, 96° 33' 54" O, 173 msnm) y Paso de Varas (19° 25' 44" N, 96° 31' 36" O, 102 msnm) municipio de Actopan, Veracruz; La Cumbre (19° 23' 26" N, 96° 38' 42" O, 360 msnm) municipio de Emiliano Zapata, Veracruz y Blanca Espuma (19° 34' 50" N, 96° 41' 12" O, 700 msnm) municipio de Alto Lucero, Veracruz. En La Esperanza el marco de plantación es de 30 árboles cada 9 m en 800 m<sup>2</sup>, la vegetación circundante es de chico Zapote (*Manilkara zapota*) y mango (*Manguijera indica*), en Paso de Varas es de 5 x 5 m con 16 árboles en 200 m<sup>2</sup>, la vegetación circundante es de malanga (*Xanthosoma sagittifolium*) y mango (*M. indica*), el clima en ambas es húmedo (Am) (García 1988) y suelos feosem, no cuentan con manejo. En La Cumbre el marco de plantación es de 7 x 5 con 20 árboles en 300 m<sup>2</sup>, la vegetación circundante es de *Citrus sinensis*, el clima es templado húmedo (Csa) (García 1988), suelos luvisol y rendzina, no se aplica manejo. En Blanca Espuma el marco de plantación es de 5 x 5, 5 x 6 y 6 x 6 m, con 1750 árboles en 5.5 has asociados a cultivos de mango (*Manguijera indica*) y pepino (*Cucumis sativus*), el clima es templado regular (Cs) (García, 1988), suelo feosem, se realizan aplicaciones preventivas de malation y diazinon.

### *Selección de sitios, árboles y colecta de frutos*

Durante marzo del 2009 localizamos en 4 localidades del centro del estado de Veracruz, México 4 plantaciones de guanábano con diferente



manejo (con y sin aplicación de plaguicida) y con indicios de plagas. En cada una se seleccionaron cuatro árboles con potencial de producción de frutos. Cada árbol fue dividido en dos estratos (alto y bajo), considerando la base de la primer fronda como el punto mas bajo y la punta del árbol como el más alto, el valor promedio delimitó los dos estratos. Durante el periodo productivo mayo-julio 2009 se realizaron 32 visitas a las plantaciones donde se colectaron por estrato arbóreo frutos de *Annona muricata* con indicios de daño por plagas (Castañeda-Vildizola, 2000), mismos que fueron guardados en bolsas de plástico y etiquetados para su traslado a laboratorio.

### ***Incidencia de Bephratelloides y Cerconota***

En laboratorio, los frutos fueron depositados en bandejas plásticas por procedencia, estrato y fecha cubiertas por tul para evitar el escape de los insectos emergidos (Borrór y White, 1970; Peña *et al.*, 2002). Revisamos las bandejas diariamente. Los insectos emergidos fueron registrados y separados por procedencia, estrato, especie y sexo.

### ***Análisis estadístico***

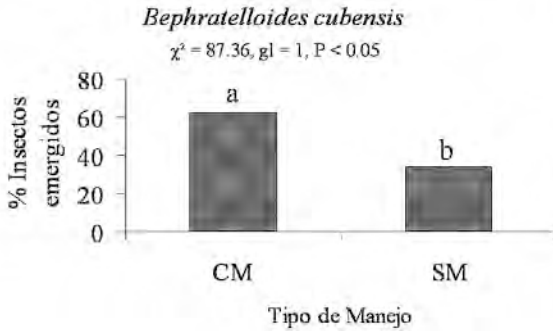
Las diferencias en la incidencia de *B. cubensis* y *C. anonella* en frutos de *A. muricata* de plantaciones con diferente manejo y de diferente estrato arbóreo se evaluaron a través de una prueba de  $X^2$  para cada especie (Zar, 1999).

## **Resultados y discusión**

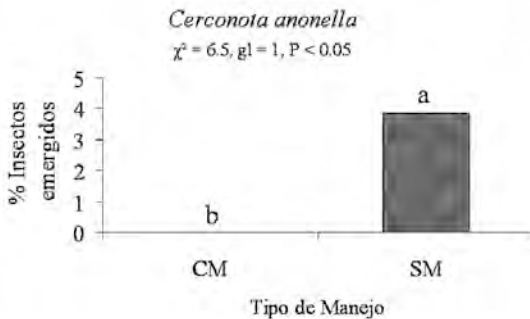
Registramos 335 individuos emergidos en frutos de *A. muricata* de las especies *B. cubensis* y *C. anonella* que representaron el 100%.

La incidencia de *B. cubensis* y *C. anonella* fue diferente en frutos de *A. muricata* procedentes de plantaciones con diferente manejo ( $\chi^2 = 87.36$ ,  $gl = 1$ ,  $P < 0.05$ ;  $\chi^2 = 6.5$ ,  $gl = 1$ ,  $P < 0.05$ ), gráficas 1 y 2. En frutos de plantaciones con manejo emergieron en mayor proporción individuos de *B. cubensis* (62.08%) vs. en frutos sin manejo (34.02%). Para *C. anonella* y en

frutos sin manejo emergieron un 3.8% de individuos no registrándose emergencias en frutos de plantaciones con manejo.

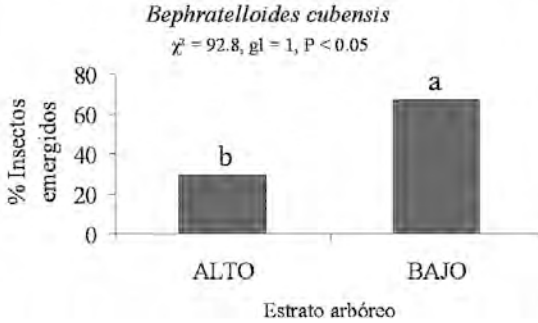


Gráfica 1. Diferencias obtenidas en el porcentaje de individuos emergidos de *B. cubensis* en frutos de *A. muricata* procedentes de plantaciones con y sin manejo del centro del estado de Veracruz, México. CM, con manejo; SM, sin manejo. Las letras desiguales indican diferencias significativas



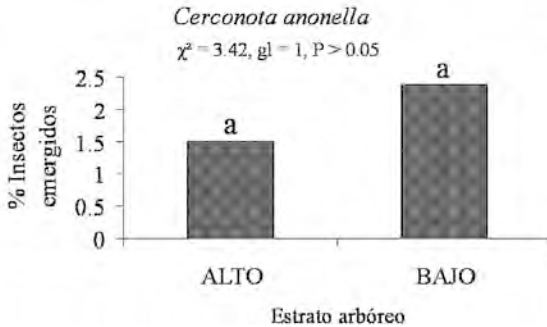
Gráfica 2. Diferencias obtenidas en el porcentaje de individuos emergidos de *C. anone-lla* en frutos de *A. muricata* procedentes de plantaciones con y sin manejo del centro del estado de Veracruz, México. CM, con manejo; SM, sin manejo. Las letras desiguales indican diferencias significativas

La incidencia de *B. cubensis* fue diferente en frutos de *A. muricata* de dos estratos arbóreos ( $\chi^2 = 92.8, gl = 1, P < 0.05$ ). El 66.86% de individuos emergieron en frutos del estrato bajo, el 29.25% en frutos del estrato alto, gráfica 3.



Gráfica 3. Diferencias obtenidas en el porcentaje de individuos emergidos de *C. cubensis* en frutos de *A. muricata* procedentes de dos estratos arbóreos del centro del estado de Veracruz, México. Las letras desiguales indican diferencias significativas

Para *C. anonella* no se registraron diferencias entre los individuos emergidos en frutos de dos estratos arbóreos ( $\chi^2 = 3.42, \text{gl} = 1, P > 0.05$ ). En frutos del estrato alto emergió el 1.49% de individuos, en frutos del estrato bajo el 2.38%, gráfica 4.



Gráfica 4. Porcentaje de individuos emergidos de *C. anonella* en frutos de *A. muricata* procedentes de dos estratos arbóreos de plantaciones ubicadas en la zona centro del estado de Veracruz, México. Las letras desiguales no indican diferencias significativas

Para *B. cubensis*, los resultados soportan lo señalado por Peña y Nagel (1988) que documentan la ineficiencia de los insecticidas en el con-

trol y erradicación de esta avispa. *B. cubensis*, desarrolla la mayoría de su ciclo biológico en el interior de la semilla, no siendo susceptible a plaguicidas de contacto aplicados en el exterior de los frutos (Moura y Vieira, 1997; Brechelt, 2004). Dicho efecto, es reportado también para *Bephratelloides pomorum* en plantaciones de guanábano en Brasil (Pereira *et al.*, 1998). De acuerdo a Vargas (1996) la aplicación indiscriminada de plaguicidas genera a lo largo del tiempo la resistencia de los insectos. En Blanca Espuma es común esta actividad, factor que pudo influenciar la mayor emergencia de individuos resistentes. *B. cubensis* se desarrolla dentro de la semilla, Peña y Nagel (1988) señalan que la aplicación indiscriminada de químicos penetran el sistema interno del árbol propiciando la sobrevivencia y emergencia de individuos resistentes al efecto de los plaguicidas.

La aplicación indiscriminada de plaguicidas favorece la desaparición de insectos y microorganismos involucrados en procesos de polinización, fertilidad del suelo y en el control biológico natural (Pérez, 1997; Coto y Saunders, 2001), a su vez, propician la carencia de nutrientes lo que favorece la propagación de la antracnosis (Mora y Bogantes, 1991). El suelo cultivado con altas cantidades de plaguicidas puede perder hasta el 80% de los microorganismos que lo habitan a una profundidad de 1 m (Peña y Nagel, 1988; Mass y García, 1990). Así, el uso de plaguicidas en plantaciones debe concebirse como el último recurso a emplearse en el control de plagas debiéndose realizar su aplicación en forma limitada.

*C. anonella* no emergió en plantaciones con manejo. Ésta palomilla en el proceso de oviposición queda expuesta en su estadio de huevo y larva hasta por 23 días siendo susceptible al efecto de químicos aplicados para su control (Bustillo y Peña, 1992; Moura y Vieira, 1997; Pereira *et al.*, 1998). Este hecho, pudo relacionar el porqué no se registraron individuos en frutos de plantaciones con aplicación de plaguicidas. Broglio *et al.* (2000) señalan que *C. anonella* puede también presentar resistencia a diversos plaguicidas aplicados al fruto como el triclorfón. Así, la aplicación indiscriminada de plaguicidas genera a lo largo del tiempo resistencia de los insectos causando un mayor impacto hacia los cultivos ya establecidos (Vargas, 1996; Rodríguez y Silva, 2003). En frutos de

plantaciones sin manejo registramos una menor incidencia de *C. anonella*. La aislada presencia de frutos en los árboles así como la asociación de éstos con otros frutales pudieron disminuir el impacto de esta plaga como lo documenta Caneira y Bezerril (1993). En plantaciones comerciales sujetas a manejo el número de frutos tiende a ser mayor como lo es también la presencia de plagas.

Registramos una mayor emergencia de *B. cubensis* en el estrato bajo, para *C. anonella* la emergencia de individuos no fue diferencial entre estratos. La dinámica, incidencia, fluctuación y densidad poblacional de insectos plaga pueden estar asociados a áreas específicas de un árbol (Loera *et al.*, 1995; Pérez, 1997; Urias *et al.*, 2007), siendo esta asociación influenciada por factores como el tamaño del árbol, condición de vigor/estrés, componentes químicos atractivos y defensivos, densidad total de plantas, estructura florística y condiciones climáticas y microclimáticas (Price, 1997; Hanks, 1999). Para los barrenadores del amaranto (*Hipolixus truncatulus*) (Coleóptera: Curculionidae) y (*Amauroliza abnormalis*) (Díptera: Agromyzidae), Torres *et al.* (2004) reportan un mayor daño en las partes inferiores de los árboles debido a que en esta zona el grosor de los tallos es menor. Loera *et al.* (1995) reportan la misma conducta para el barrenador del frijol *Elasmopalpus lignosellus* (Zeller) (Lepidóptera: Pyralidae), al capturar un mayor número de individuos en trampas dispuestas a 0.5 m del suelo, o sea en el estrato inferior. Similarmente, Ascensión *et al.* (1999) documentan un mayor daño por trips hacia áreas inferiores del follaje del aguacate (65%) debido a la presencia de maleza cercana con altas densidades de insectos.

La maleza genera características microclimáticas favorables para los insectos plaga, vinculadas con sus actividades de desarrollo y reproducción (Andrews, 1989). De acuerdo a Boscan y Godoy (2004) en cultivos de guanábana la maleza puede favorecer la mayor densidad de *B. cubensis* y *C. anonella* al influir en las características microambientales demandadas por estas especies. La maleza es común en las plantaciones de guanábano estudiadas, hecho que pudo influir en la mayor emergencia de *B. cubensis* en frutos del estrato inferior, al propiciar características microambientales aptas para esta especie. La temperatura y humedad influyen fuertemente en la selección de sitios por insectos barrenadores,

al tener un efecto sobre la sobrevivencia de huevos y el desarrollo de sus larvas (Coscollá, 1980; Hanks, 1999), y en el desarrollo de los frutos (Worrell 1994). Los árboles pueden generar de acuerdo a su estructura la existencia de diferentes microambientes (Lawton, 1983). El estrato superior, por ejemplo, recibe mayor radiación solar y mayor flujo de aire, factores involucrados a la desecación de los huevos y larvas, al vuelo y la diseminación de insectos (Coscollá, 1980). En el estrato bajo, las temperaturas son menores por la sombra que proyectan la copa de los mismos y la humedad relativa generada por la evaporación del agua absorbida por el suelo (Halverson y Smith, 1974; Bonan, 2008). *B. cubensis* desarrolla su ciclo biológico en sitios con temperaturas de 20°C y una humedad relativa del 80% (Bustillo y Peña, 1992) lo cual nos permite inferir el porqué la mayor emergencia de esta avispa en frutos del estrato bajo.

La incidencia de *C. anonella* no fue diferencial entre estratos arbóreos. Bustillo y Peña (1992) y Pereira *et al.* (2003) señalan que el ciclo biológico de esta especie se desarrolla a temperaturas desde 23 hasta 25°C y a una humedad relativa del 60%. Estas características pudieron favorecer la ocupación indiferencial de *C. anonella* en ambos estratos, al ser menos marcada su necesidad de una alta humedad relativa, mayor en zonas bajas del árbol y demandada por *B. cubensis*. La mayoría de insectos plaga desarrollan su ciclo biológico a temperaturas entre los 20 a 35°C y una humedad relativa > 70%, temperaturas > 35°C pueden causar la evapotranspiración del agua de sus cuerpos y causar su desecación (Clark *et al.*, 1967; Wigglesworth, 1974; Child, 2007). Para *C. anonella* la necesidad de humedad relativa es menor, los adultos de esta especie son de hábitos nocturnos permaneciendo en el día ocultos en el follaje del árbol (Cruz *et al.*, 2002) así son menos susceptibles al ataque de depredadores y a la radiación solar. No obstante, existen registros diurnos de la presencia de esta palomilla revoloteando sobre el follaje de los árboles (Boscan y Godoy, 2004).

Así, el clima y las variables que lo conforman constituyen elementos que en los últimos años han tomado gran importancia para el entendimiento de la ecología de insectos plaga (Estay *et al.*, 2009). Cuando la temperatura toma valores extremos puede reducir las poblaciones de insectos, al bajar la humedad relativa y favorecer la desecación de los

huevos. Por ello una adecuada poda en cultivos de guanábano podría constituir una estrategia adecuada y poco costosa para el control preventivo de plagas. Al incrementarse la temperatura por el mayor paso de luz entre las ramas y al reducirse la humedad (< 85%) el desarrollo y la presencia de enfermedades disminuiría (Zárate, 1981; Caneira y Bezerril, 1993). El exceso de follaje genera sombra y propicia la inadecuada maduración de frutos haciéndolos propensos al ataque de plagas que prefieren frutos pequeños (Evangelista *et al.*, 1999). La humedad tiene también gran influencia sobre las poblaciones de insectos, siendo posible reducirla mediante la eliminación de las malezas (NAS, 1969) o mediante podas controladas.

## Conclusión

La aplicación de plaguicidas es ineficiente para el control de *B. cubensis* y a largo plazo puede causar resistencia de *B. cubensis* y *C. anonella* incrementando su daño. *C. anonella* es susceptible a la aplicación de plaguicidas, sin embargo, estos impactan negativamente los suelos reflejándose en la disminución de la producción de frutos a largo plazo. *B. cubensis* emerge en mayor proporción en el estrato bajo al existir las características microclimáticas demandadas por esta especie. Contrariamente, la incidencia de *C. anonella* fue indiferencial al no ser sus demandas microclimáticas tan marcadas como para *B. cubensis*. El manejo de las condiciones micro-climáticas como la humedad, luz y temperatura mediante la realización de podas controladas puede constituir una estrategia viable para el control integral de plagas del guanábano.

## Referencias

- Alali, F., Kaakeh, W., Bennett, G. and McLaughlin, L. 1998. Annonaceous acetogenins as natural pesticides: potent toxicity against insecticide-susceptible and-resistant German cockroaches (Diptera: Blattellidae). *J Econ Entomol.* 91 (3): 641-649.
- Andrews, K.L. 1989. Introducción a los conceptos del manejo integrado de plagas. En: Andrews, K.L. y Quesada, J.R. (Eds.). Manejo integrado de plagas inséctiles en la agricultura: estado actual y futuro. Departamento de Protección Vegetal, Escuela Agrícola Panamericana. El Zamorano, Honduras. Pp. 3-20.
- Ascención-Betanzos, G., Bravo-Mojica, H., Gónzalez-Hernández, H., Johansen-Naime, R. M. y Becerril-Román, A.E. 1999. Fluctuación poblacional y daño de trips en aguacate Hass. *Revista Chapingo (Serie Horticultura)*. 5:291-296.
- Bonan, G.B. 2008. Forest and climate change: forcings, feedbacks, and the climate benefits of forest. *Science*. 13 (320): 1444-1449.
- Borror, D.J. and White, R.E. 1970. A field guide to the insects of America North of Mexico. Houghton Mifflin. USA. Pp. 266-267.
- Boscan, N. y Godoy, F. 2004. Principales insectos plaga de las anonáceas en Venezuela. *INIA Divulga*. 1: 63-70.



- Boscan, D.M.M. y Godoy, F.J. 1989. Distribución geográfica de *Talponia* sp., *Cerconota anonella* spp. y *Bephratelloides* sp. perforadores de flores y frutos de Guanábana en Venezuela. *Agronomía Tropical*. 39 (4-6): 319-323.
- Braga-Sobrinho, R., Bandeira, C.T. and Mesquita, A.L.M. 1999. Occurrence and damage of sour sop pests in Northeast Brazil. *Crop Prot.* 18: 539-541.
- Brechelt, A. 2004. El Manejo ecológico de plagas y enfermedades. Red de acción en plaguicidas y sus alternativas para América Latina. República Dominicana. 36 pp.
- Broglio-Micheletti, S.M.F., Berti-Filho, E., Silveira-Neto, S. and Bar-do, G.V.D.S. 2001. Damage evaluation of *Cerconota anonella* (Sepp.) (Lepidoptera: Oecophoridae) in fruits of Graviola (*Annona muricata* L.). *Rev Bras Frut.* 23 (1): 74-77.
- Bustillo, A.E. and Peña, J.E. 1992. Biology and control of the *Annona* fruit borer *Cerconota anonella* Sepp (Lepidoptera: Oecophoridae). *Fruits*. 47 (1): 81-84.
- Caneira, J.D.S. y Bezerril, E.F. 1993. Controle das brocas dos frutos (*Cerconota annonella*) e das sementes (*Bephratelloides macullicolis*) da graviola no planalto da ibiapaba. *An Soc Entomol Bras.* 22 (1): 155-160.
- Castañeda-Vildizola, A. 2000. Insectos barrenadores de anonáceas. Fundación Salvador Sánchez Colín. CICTAMEX. Coatepec Harinas, México. Folleto No. 327. 43 pp.
- Child, R.E. 2007. Insect damage as a function of climate. In: Padfield, T. and Borchersen, K. (Eds). *Museum Microclimates*. National Museum of Denmark. Pp. 57-60.
- Clark, L.R., Geier, P.W., Hughes, R.D. and Morris, R.F. 1967. The ecology of insect populations. Methuen & Co. Ltd. London. 232 pp.

- Cruz, C.J.G., Torres, P.A.L., Delgado, J.C.M., Domínguez, M.V., Martínez, P.D. y Franco, M.O. 2002. El guanábano. Agronomía y usos de frutos tropicales. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 177 pp.
- Coria-Ávalos, V.M. 1999. Ciclo de vida, fluctuación poblacional y control del barrenador de la semilla del aguacate (*Conotrachelus perseae* Barber y *C. aguacatae* B.) (Coleóptera: Curculionidae) en Ziracuaretiro, Michoacán, México. *Revista Chapingo (Serie Horticultura)*. 5: 313-318.
- Corrales-Moreira, G. 1995. Identificación y cuantificación de daños ocasionados por plagas insectiles de la Anona (*Annona cherimola* Mill). En: Memorias del II Congreso Centroamericano y del Caribe y Tercero Costarricense de Entomología. San José, Costa Rica. pp. 81.
- Coscollá, R. 1980. Incidencia de los factores climatológicos en la evolución de las plagas y enfermedades de las plantas. *Bol. Serv. Plagas*. 6: 123-139.
- Coto, D.A. y Saunders, R.E. 2001. Insectos plaga de la guanábana (*Annona muricata*) en Costa Rica. *Manejo Integrado de Plagas*. 61: 60-68.
- Estay, S.A., Lima, M. and Labra, F.A. 2009. Predicting insect pest status under climate change scenarios: combining experimental data and population dynamics modeling. *J Appl Entomol*. 1-9.
- Evangelista L., S., Aldana, L.L. y Valdés, E.M. 1999. Tabla de vida de *Bephratelloides cubensis* (Hymenoptera: Eurytomidae) bajo condiciones de laboratorio. En: Memorias del II Congreso Internacional de Anonáceas. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México. Pp. 209-216.
- García, E. 1988. Modificaciones al sistema Koppen-García (para adaptarlo a las condiciones de la República Mexicana). Offset Larios. México D.F. 219 pp.

- Granadino, C.A. y Cave, R.D. 1994. Inventario de artrópodos y hongos patógenos de *Annona spp.* en 4 localidades de Honduras. *Turrialba*. 44 (3): 129-139.
- Halverson, H.G. and Smith, J.L. 1974. Controlling solar light and heat in a forest by managing shadow sources. USDA Forest Service Research, USA. 14 pp.
- Hanks, L.M. 1999. Influence of the Larval host plant on reproductive strategies of cerambycid beetles. *Annu Rev Entomol.* 44: 483-505.
- Hernández-Fuentes, L.M., Bautista-Martínez, M., Carrillo-Sánchez, J.L., Sánchez-Arroyo, H., Urías-López, M.A. y Salas-Araiza, M.D. 2008. Control del barrenador de las semillas, *Bephratelloides cubensis* Ashmead (Hymenoptera-Eurytomidae) en guanábana *Annona muricata* L. (Anonales: Anonaceae). *Acta Zoológica Mexicana (nueva serie)*. 24 (001): 199-206.
- Lawton, J.H. 1983. Plant architecture, and the diversity of phytophagous insects. *Annu Rev Entomol.* 28: 23-39.
- Loera, J., Lynch, R. y Rodríguez, R. 1995. Uso de trampas con feromona en el muestreo del pequeño barrenador del frijol *Elasmopalpus lignosellus* (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae). *Agronomía Mesoamericana*. 6: 75-79.
- Mass, J.M. y García, O.F. 1990. La conservación de los suelos en zonas tropicales: el caso de México. *Ciencia y Desarrollo*. 15 (90): 21-36.
- McNeil, J.N. 1991. Behavioral ecology of pheromone-mediated communication in moths and its importance in the use of pheromone traps. *Annu Rev Entomol.* 36: 407-430.
- Micheletti, B.F.S.M., Santos de Melo, A.G., Sousa, B. and Leite-Gomez, F. 2001. Controle de *Cerconota anonella* (Sepp.) (Lep. Oecophoridae)

e de *Bephratelloides pomorum* (Fab.) (Hym: Eurytomidae) em frutos de Graviola (*Annona muricata* L.). *Rev Bras Frut.* 23 (3): 722-725.

Mora, J. y Bogantes, A. 1991. Combate químico de la enfermedad antracnosis del guanábano (*Annona muricata*) en vivero. *Investigación Agrícola.* 4 (1): 11-13.

Moura, L.J.C. y Vieira L., J.B. 1997. Manejo integrado das pragas da gravioleira. In: *Memoria. Anonaceas producao e mercado* (Pinha, Graviola, Atemóia e Cherimólia) Universidade Estadual do Sudoeste de Bahía. Brasil. Pp. 214-221.

National Academy of Sciences. 1969. Insect pest management and control. Principles of plant and animal pest control. Vol. 3. Washington D.C., USA. 508 pp.

Peña, J. E., Nadel, H., Barbosa-Pereira, M. and Smith, D. 2002. Pollinators and pest for *Annona* sp. In: Peña, J.E.L., Sharp, J.L. and Wysoki, M. (Eds). *Tropical fruit pests and pollinators: biology, economic, natural enemies and control.* CABI International Publishing. Pp. 197-221.

Peña, J.E. and Bennett, D. 1995. Arthropods associated with *Annona* spp in the Neotropics. *Fla Entomol.* 78 (2): 329-349.

Peña, J.E. and Nagel, J. 1988. Effectiveness of pesticides against two tropical fruit pests. *Proceedings. Fla. State of Horticulture Society.* 101: 249-251.

Pereira, M.J.B., Dos Anjos, N. y Eiras, A.E. 1998. Cortejo y cópula en la broca de la semilla de guanábana *Bephratelloides pomorum* (Hymenóptera: Eurytomidae). *Revista de Biología Tropical.* 46 (1): 105-108.

Pérez, M.I. 1997. Principales métodos biotécnicos empleados en el control de plagas. *Bol. S.E.A.* 20: 127-140.

- Price, P.W. 1997. Insect ecology. 3 ed. John Wiley and Sons Inc. New York, USA. 607 pp.
- Rodríguez, J.C. y Silva, G. 2003. Manejo de la resistencia a los insecticidas. En: Silva, G. y Hepp, R. (Eds). Bases para el manejo racional de insecticidas. Universidad de Concepción FIA. Chillán, Chile. Pp. 261-290.
- Santos-Pimenta, L.P., Pinto, G.B., Takahashi, J.Á., Silva, L.G.F. and Boaventura, M.A.D. 2003. Biological screening of Anonaceous Brazilian medicinal plants using *Artemia salina* (Brine shrimp test). *Phytomedicine*. 10: 209-212.
- Sánchez, R.M. 1995. Estudio de mercado de *Annona muricata* en la zona centro del estado de Veracruz México. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 118 pp.
- Torres-Saldaña, G., Trinidad-Santos, A., Reyna-Trujillo, T., Castillo-Juárez, H., Bautista-Martínez, M. y De León-González, F. 2004. Barración del tallo de amaranto por *Hipolyxus truncatulus* (Coleóptera: Cucurionidae) y *Amauromiza abnormalis* (Díptera: Agromyzidae). *Acta Zoológica Mexicana (Nueva Serie)*. 20 (1): 131-140.
- Uriás L., M.A., Salazar, G. y Johansen, N.R. 2007. Identificación y fluctuación poblacional de especies de trips (Thysanóptera) en aguacate Hass en Nayarit, México. *Revista Chapingo (Serie Horticultura)*. 13 (1): 49-54.
- Vargas, R. 1996. Resistencia a plaguicidas de plagas agrícolas. *Tierra Adentro*. 8: 50-52.
- Vidal H., L. y Nieto, A.D. 1997. Diagnóstico técnico y comercial de la guanábana en México. En: Memorias del I Congreso Internacional de Anonáceas. Universidad Autónoma Chapingo. México. Pp. 1-17.

- Vidal H., L. 1994. Importancia y distribución de las anonáceas en México. En: Memoria VII Curso de Actualización Frutícola "La fruticultura y sus perspectivas para el siglo XXI". Fundación Salvador Sánchez Colín. CICTAMEX. Coatepec, Harinas, México. Pp. 1-17, 80-101.
- Wigglesworth V., B. 1974. Insect physiology. Chapman and Hall.
- Worrell D., B., Carrington C., M.S. and Huber D., J. 1994. Growth maturation, and ripening of soursop (*Annona muricata* L.) fruit. *Sci Hortic.* 57 (1-2): 7-15.
- Zar J., H. 1999. Biostatistical analysis. 4th Edition. Prentice-Hall, Inc. Upper Saddle River. NJ.
- Zárate, R. 1981. Principales problemas fitosanitarios del guanábano (*Annona muricata* L.) y medidas preliminares de control. En: Zárate, R. (Ed). Producción de frutales en el Valle del Cauca. Trabajo de Promoción Profesor. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional. Palmira, Colombia. 98 pp.



# Nuevo reporte de incidencia de *Acantocephala femorata* F. (Hemíptera: coreidae) y *Euphoria leucographa* G. & P. (Coleóptera: melolonthidae) en frutos de *Annona muricata* L. en Veracruz, México.

Ruiz-Montiel, Cesar<sup>1</sup>, Illescas-Riquelme, Carlos Patricio<sup>1</sup>,  
Flores-Peredo, Rafael<sup>1</sup>, Vidal-Hernández, Librado<sup>2</sup>,  
Domínguez-Espinosa, Paola Ivett<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Investigaciones Forestales, interior parque ecológico El Haya  
antigua carretera Xalapa-Coatepec, Veracruz, México. ruizmon@hotmail.com

<sup>2</sup>Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad Veracruzana. Xalapa, Veracruz, México.

## Resumen

La guanábana (*Annona muricata* L.), es uno de los frutos más apreciados en los trópicos de Centro y Sudamérica por su excelente sabor y valor comercial. Sin embargo, su producción en varios países se ve limitada por el ataque de plagas y enfermedades (Castañeda, 2000). En México y Veracruz, *Bephratelloides cubensis* (Hymenóptera: Eurytomidae) y *Cerconota anonella* (Lepidóptera: Oecophoridae) son dos de las principales plagas que afectan este cultivo (Castañeda, 2000), no obstante, otras familias como Lycaenidae, Coreidae, Coccidae, Pseudo-



coccidae, Tingidae, Membracidae, etc., causan también daño (Castañeda, 2000; Hernández *et al.*, 2005; Illescas Riquelme, 2009). El incremento de áreas de siembra en Veracruz y el deficiente manejo fitosanitario han favorecido el daño causado por plagas, ocasionando pérdidas relevantes derivadas de la mala calidad de los frutos (Castañeda, 2000). Evaluamos durante enero hasta diciembre del año 2009 y mediante colectas de insectos *in situ* la entomofauna veracruzana asociada a frutos de *A. muricata* de plantaciones comerciales, árboles de lindero y traspatio en comunidades ubicadas entre los 102 y 920 msnm de los municipios de Actopan, Emiliano Zapata, Teocelo y Alto Lucero. Registramos la presencia de *Acantocephala femorata* y *Euphoria leucographa*, compartiendo nichos en las diferentes comunidades entre los 170 hasta 700 msnm, con excepción de Cerro Gordo donde sólo se presentó el Hemíptero. Las ninfas y adultos de *A. femorata* al insertar el estilete generan aros necróticos por el ataque de hongos oportunistas ocasionando malformaciones y/o la pudrición del fruto. Los adultos de *E. leucographa* raspan la cáscara para alimentarse de pulpa, dejándola. No evaluamos el daño secundario, pero existen reportes de otros Coreidos en Nayarit (Hernández *et al.*, 2005), proyectando la importancia de esta familia como potenciales plagas. La presencia del Melolonthido puede deberse a que las larvas de esta especie se alimentan de los depósitos de detritus de hormigas del género *Atta* (Morón, 1997), muy abundantes en la zona de estudio.

Palabras clave: *chinche, escarabajo, daño mecánico, guanábana.*

## Introducción

La familia Annonaceae está conformada aproximadamente por 2,300 especies (Peña *et al.*, 2002) pero únicamente cuatro géneros contienen especies de importancia frutícola: *Annona*, *Rollinia*, *Uvaria* y *Asimina* (Cañizares, 1996). El género *Annona* tiene como centro de origen el Neotrópico e incluye varios árboles frutales de importancia económica con alrededor de 110 especies (Peña *et al.*, 2002).

De este conjunto, cinco son sobresalientes y dignas de recibir atención en al área frutícola, estas son chirimoya (*Annona cherimola* Mill.),

guanábana (*A. muricata* L.), saramuyo (*A. squamosa* L.), anona (*A. reticulata* L.), papause (*A. diversifolia* Saff.) y el híbrido Atemoya (*A. cherimola* x *A. squamosa*) (Morton, 1987; Nakasone y Paull, 1998). En México el guanábano (*A. muricata*) es uno de los frutales más apreciados debido a su excelente sabor y valor comercial (Vidal, 1994; Castañeda, 2000). Se distribuye en los estados de Nayarit, Colima, Veracruz, Campeche, Chiapas, Michoacán, Tabasco, Yucatán, Puebla, Jalisco, Guerrero y Oaxaca (Vidal, 1994).

El incremento de este cultivo se ha realizado bajo un deficiente manejo fitosanitario y con propagación de plantas provenientes de semillas lo que implica heterogeneidad en la floración y por ende en la fructificación, favoreciendo además la incidencia de plagas y enfermedades que ocasionan pérdidas relevantes derivadas de la mala calidad de los frutos (Vidal, 1994; Castañeda, 2000). En México las especies de insectos, *Bephratelloides cubensis* (Hymenóptera: Eurytomidae) y *Cerconota anonella* (Lepidóptera: Oecophoridae) son consideradas las principales plagas de *A. muricata* (Evangelista *et al.*, 1997; Castañeda, 2000).

Así, en el Estado de Veracruz, se han reportado estos insectos provocando severos daños en los frutos de guanábana, alcanzando hasta el 100 y 20% de incidencia, respectivamente (Illescas, 2009).

Del mismo modo diferentes insectos, pertenecientes a las familias Lycaenidae, Curculionidae, Coreidae, Coccidae, Pseudococcidae, Tingidae y Membracidae, eventualmente causan daños en los frutos de esta planta al incrementar sus poblaciones por diversos factores (Peña y Bennett 1995; Hernández *et al.*, 2005).

De esta manera se han encontrado dos nuevas incidencias en los frutos de *A. muricata*, por parte de *Acanthocephala femorata* (Hemiptera) y *Euphoria leucographa* (Coleoptera), especies que se alimentan de estos frutos y que eventualmente comparten el recurso de manera simultánea. *A. femorata* es un insecto de carácter polífago que se distribuye en diferentes nichos ecológicos siendo una plaga importante en algunos cultivos en Estados Unidos como haba, durazno y algunos cítricos (Burke *et al.*, 1994; Nuessly *et al.*, 2004).

Por su parte, *E. leucographa* tiene una amplia distribución entre el sur de los Estados Unidos y Guatemala, en ambientes ubicados entre el

nivel del mar y los 1,600 m de altitud. Los adultos se alimentan con secreciones azucaradas de tallos, frutos y flores de varias plantas silvestres y cultivadas sin reporte anterior sobre *A. muricata*. Sus larvas viven en el suelo con bastante materia orgánica, y al parecer no se alimentan de raíces (Morón 2009, comunicación personal). También existen reportes que en el estado juvenil, habitan en los depósitos de detritus de hormigas del género *Atta mexicana* (Morón *et al.*, 1997).

Este trabajo tuvo como objetivo determinar la presencia de *A. femorata* y *E. leucographa* como parte del complejo fitófago que incide en *Annona muricata*.

## Método

Para determinar la presencia de *A. femorata* y *E. leucographa* en frutos de *A. muricata*, se realizaron monitoreos quincenales desde enero hasta diciembre del 2009, para plantaciones comerciales, árboles de lindero y de traspatio, en comunidades de los municipios de Actopan, Emiliano Zapata, Teocelo y Alto Lucero (centro del estado de Veracruz) ubicados entre los 102 y los 920 msnm (cuadro 1). Al encontrar la presencia de insectos se llevaron a cabo observaciones de conducta *in situ* y se determinaron los daños causados en los frutos. Posteriormente se colectaron especímenes para su identificación taxonómica.

Cuadro 1. Comunidades donde se llevaron a cabo los muestreos

Municipio	Comunidad	msnm
Actopan	Parada Varón	102
	Paso de Varas	102
	Buenos Aires	113
	San José	143
	La Bandera	170
	La Esperanza	173
Emiliano Zapata	Tamarindo	160
	Rinconada	252
	La Cumbre	360
	Cerro Gordo	594
	Miradores	886
Alto Lucero	Blanca Espuma	700
Teocelo	Tejería	920

La identificación taxonómica de *Acantocephala femorata* fue realizada por el Dr. César Ruíz Montiel y la de *Euphoria leucographa* por el Dr. Miguel Ángel Morón Ríos.

## Resultados y discusión

*A. femorata* estuvo presente en las comunidades de La Bandera (N 19° 27' 32,2"; O 96° 64' 15,1"), La Esperanza (N 19° 28' 17,9"; O 96° 33' 56,7"), Cerro Gordo (N 19° 26' 06,9"; O 96° 42' 07,1"), Miradores (N 19° 27' 96"; O 96° 46' 20") y Blanca Espuma (N 19° 34' 50"; O 96° 41' 12"). De acuerdo a las observaciones realizadas en campo se determinó que, tanto ninfas como adultos, prefieren frutos cercanos a la madurez fisiológica. Estos hemípteros atacan los frutos, insertando su aparato bucal perforador-chupador usando su saliva para disolver la pulpa, la cual forma una mezcla que posteriormente es succionada y digerida. De dicha perforación se genera un aro necrótico, alrededor del orificio, que impide el desarrollo del fruto en la parte afectada. Es así que el tejido sano sigue creciendo en torno a esta área alterando su forma natural y por consecuencia disminuyendo su valor comercial.

En lo que respecta a *E. leucographa* se encontró su incidencia en frutos de las comunidades de La Bandera (N 19° 27' 32,2"; O 96° 64' 15,1"), Miradores (N 19° 27' 96"; O 96° 46' 20") y Blanca Espuma (19° 34' 50"; O 96° 41' 12"). Se observó que los adultos de *E. leucographa* dañan el fruto, cuando éstos raspan su cáscara para alimentarse de la pulpa, dejándola expuesta y susceptible al ataque de otros insectos secundarios y diversos patógenos, por lo que su valor comercial decrece.

Por el momento estos insectos no representan un problema grave debido a que sus índices poblacionales son relativamente bajos. Sin embargo, en conjunto con el gran complejo de fitófagos asociados a la guanábana dentro de la zona de estudio, llegan a contribuir en la gran problemática fitosanitaria existente en relación con este cultivo.

En este caso la incidencia de *A. femorata* es de importancia debido a que éste se alimenta del fruto en todos sus estadios. Asimismo, existen reportes de otro Coreido, del género *Leptoglossus*, como plaga importante de guanábana en el Estado de Nayarit (Hernández *et al.*,

2005), por lo que el seguimiento de las poblaciones de estos insectos es requerido.

Por otro lado, los daños causados por *E. leucographa* son directos y se deben principalmente a su modo de alimentación, ya que expone la pulpa al medio lo que permite la proliferación de patógenos o la entrada de insectos oportunistas o secundarios. Su presencia en las zonas de estudio pueden deberse a la relación con hormigas del género *Atta*, ya que como lo reportan Deloya y Morón (1997) los estados larvarios del Melolontido se alimentan de sus depósitos de detritos.

## Conclusión

La presencia de *A. femorata* y *E. leucographa* en los sistemas de cultivo de guanábano puede representar una limitante más en el control del complejo de plagas y sobre todo coadyuvar en la disminución de la producción del cultivo.

## Referencias

- Burke, H.R., Jackman, J.A. and Rose, M. 1994. Insects associated with woody ornamental plants in Texas. Dep. Entomol. Texas A&M University. 168 pp.
- Cañizares, A.J. 1996. Las frutas anonáceas. Edición FrutiCuba/66. La Habana, Cuba. 63 pp.
- Castañeda, V.A. 2000. Insectos barrenadores de anonáceas. Fundación Salvador Sánchez Colín. CICTAMEX, S.C. Coatepec Harinas, México. 42 pp.
- Deloya, C. y Morón, M.A. 1997. Cetoniinae. En: Morón, M.A., Ratcliffe, B.C. y Deloya, C. Atlas de los escarabajos de México. Coleóptera: Lamellicornia Vol. I. Melolonthidae. CONABIO-Sociedad Mexicana de Entomología, A.C. México. pp. 177-203.
- Evangelista, L.S., Aldana L., L.L. y Valdés, E.M. 1997. Estudio del barrenador de la semilla de la guanábana *Bephratelloides cubensis* Ashmead (Hymenóptera: Eurytomidae). En: I Congreso Internacional de Anonáceas. Chapingo, México. pp. 264-271.
- Hernández, F., Bautista, L., Carrillo, N., Urias, J. y Sánchez, M. 2005. Guanábana: principales plagas y su manejo. Fundación Produce Nayarit y Junta Local de Sanidad Vegetal. Costa Chila-Compostela, Nayarit, México. 35 pp.

- Illescas R., C.P. 2009. Plagas en frutos del género *Annona* existentes en la zona centro del estado de Veracruz. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Agrícolas. Universidad Veracruzana. Campus Xalapa. Veracruz, México. 72 pp.
- Morón, M., Ractcliffe, B. y Deloya, C. 1997. Atlas de los escarabajos de México: Coleóptera: Lamellicornia Vol. 1. Familia Melolonthidae. Subfamilias Rutelinae, Dynastinae. CONABIO-Sociedad Mexicana de Entomología, A.C. México. 280 pp.
- Morton, J.F. 1987. Fruits of warm climates. Ed. Curtis F. Dowlin. U.S.A. 507 pp.
- Nakasone H.Y. y Paull, R.E. 1998. *Annonas*. En: Nakasone H.Y. y Paull, R.E. (Eds). Tropical fruits. CAB International. Reino Unido. Pp. 45-75.
- Nuessly, G.S., Hentz, M.G., Beiriger, R. and Scully, B.T. 2004. Insects associated with faba bean, *Vicia faba* (Fabales: Fabaceae), in southern Florida. *Florida Entomologist*. 87 (2): 204-211.
- Peña, J.E. y Bennett, F. 1995. Arthropods associated with *Annona* spp in the Neotropics. *Florida Entomologist*. 78 (2): 329-349.
- Peña, J.L., Nadel, H., Pereira B., M. and Smith, D. 2002. Pollinator and pests for *Annona* species. In: Peña, J.L., Sharp L.L. and Wysoki, M. (Eds.). Tropical fruit pests and pollinators: biology, economics, natural enemies and control. CABI International Publishing. Pp. 197-221.
- Vidal, H.L. 1994. Importancia y distribución de las anonáceas en México. En: Memoria VII Curso de Actualización frutícola La Fruticultura y sus perspectivas para el siglo XXI. Fundación Salvador Sánchez Colín. CICTAMEX, S.C. Coatepec Harinas, México. Pp. 80-101.

# No-preferencia de *Anastrepha ludens* y *A. obliqua* (díptera: tephritidae) a frutos de guanábana (*Annona muricata* L.): parte I

Hernández Fuentes, Luis Martín<sup>1</sup>, Urías López, Mario Alfonso<sup>1</sup>,  
Castañeda Vildozola, Alvaro<sup>2</sup> y Ramos Barreto, Carlos<sup>3</sup>.

<sup>1</sup>Inifap / Campo Experimental Santiago Ixcuintla, km. 6. Entronque a Santiago Ixcuintla  
Carret. Internacional México-Nogales. C.P. 63300  
Santiago Ixcuintla, Nayarit. hernandez.luismartin@inifap.gob.mx

<sup>2</sup>Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Fitomejoramiento, Facultad de  
Ciencias Agrícolas. Universidad Autónoma del Estado de México, Campus El Cerrillo,  
Toluca, Estado de México, C.P. 50200, México.

<sup>3</sup>Grupo Bioquímico Mexicano S.A. de C.V. Blvd. Jesús Valdez Sánchez # 2369  
Saltillo, Coahuila, México.

## Resumen

Las moscas de la fruta MF (Díptera: Tephritidae), provocan daños directos al infestar los frutos e indirectos al limitar la comercialización de éstos. El objetivo de este estudio fue determinar, en condiciones naturales e inducidas, si *A. muricata* es hospedero de *Anastrepha*. Se realizaron muestreos de 15,130 frutos de *A. muricata* en huertos y centros de acopio, no se observaron frutos con larvas de *Anastrepha*. Se



colectaron larvas de *Neosilba* sp, *Optatus palmaris* y *Bephratelloides cubensis*. En infestaciones inducidas *A. obliqua* y *A. ludens* no ovipositaron en frutos de *A. muricata*, en cambio en mango emergieron 7 adultos, cinco de *A. obliqua* y dos de *A. ludens*.

Palabras clave: *Anastrepha*, *Annona muricata*, no-preferencia

## Introducción

Las moscas de la fruta pertenecen al orden Díptera y a la familia Tephritidae, destacan por su importancia económica y cuarentenaria los géneros *Anastrepha*, *Rhagoletis*, *Dacus*, *Toxotripa* y *Ceratitis* (Aluja, 1993). Son una plaga que afecta casi todos los frutales que se cultivan en el mundo, provocan daños directos ya que las larvas se alimentan en el interior de frutos de un gran número de plantas, muchas de ellas son especies cultivadas, además de ello, provocan daños indirectos al limitar la comercialización de frutas provenientes de áreas con presencia de esta plaga hacia zonas libres. Esta familia se puede encontrar en regiones templadas, tropicales y subtropicales de todo el mundo (Hernández *et al.*, 2010), su gran capacidad de adaptación, les permite proliferar en casi cualquier ambiente (Aluja, 1993). El género *Anastrepha* se relaciona con 270 especies de plantas hospederas, las cuales en su gran mayoría requieren confirmación ya que éstas provienen de registros dudosos (Norrbom y Kim, 1998); al respecto, Hernández y Aluja (1993) publican un listado de especies en las cuales se consideraron sólo registros de infestaciones naturales y concluyen que sólo 39.8% presenta esta condición; afirman, además, que numerosos registros de hospederos no son confiables. Hernández (2007) después de realizar una revisión detallada del género *Anastrepha* en algunas colecciones entomológicas de México, consigna 37 especies en 30 de los 32 estados del país, menciona también una compleja relación con sus hospedantes registrados. La norma internacional NRMF 30 “Directrices para determinar y designar el estatus de una fruta o verdura como hospedante de moscas de la fruta (Díptera: Tephritidae)” de la Organización Norteamericana de Protección a las Plantas (NAPPO, 2008) define a un fruto como:

**Hospedante condicional:** Fruta o verdura que es hospedante o no hospedante bajo condiciones permisivas o restrictivas definidas, respectivamente (por ejemplo, estado de madurez, otras condiciones fisiológicas o condiciones físicas),

**Hospedante natural:** Infestación de una fruta o verdura por una plaga de plantas en la naturaleza (por ejemplo, plantas naturales, cultivadas y/o no manejadas) y la población de la plaga de la planta se mantiene en la fruta o verdura,

**No hospedante natural:** No hay una infestación de la fruta o verdura por una plaga de plantas en la naturaleza (por ejemplo, plantas naturales, cultivadas y/o no manejadas) y la población de la plaga de la planta no se mantiene en la fruta o verdura.

Un fruto u hortaliza se considera hospedero de moscas de la fruta si la hembra deposita los huevos, estos eclosionan y emerge la larva, la cual a su vez se alimenta y desarrolla para pasar al estado de pupa de la cual emerge finalmente el adulto (Amstrong, 1994); si el insecto no completa su desarrollo hasta el estado adulto o si lo hace y éste no es capaz de reproducirse, entonces un fruto no puede considerarse hospedero (Follet y Hennessey, 2007). La captura de un adulto de *Anastrepha* en un huerto de un determinado frutal no indica que éste sea hospedante (Aluja *et al.*, 1987); se deben realizar estudios que demuestren tal hecho, identificación del hospedante y del insecto por especialistas en el tema. Las plantas hospederas son aquellas en las cuales el insecto completa su desarrollo normal en condiciones naturales (Hanson, 1983). En estudios tendientes a definir la preferencia de moscas de la fruta, es importante mencionar el estado biológico del insecto observado y la forma de colecta. Algunos estudios se han realizado con el objetivo de determinar el estatus hospedante de diversos frutales, por ejemplo en *Citrus sinensis* cultivar Valencia y *C. paradisi* cultivar Ruby Red al realizar infestaciones controladas con *A. fraterculus* en laboratorio y en campo, no se observaron daños en *C. sinensis*, en *C. paradisi* emergieron dos adultos, sin embargo su periodo de vida fue desde 1 hasta 3 días, tiempo limitado para llegar a la madurez sexual (Aluja *et al.*, 2003); en otro estudio al evaluar la susceptibilidad del aguacate cultivar Hass a *A. ludens*, *A. serpentina* y *A. striata* en condiciones de laboratorio, infestaciones

forzadas en campo y condiciones naturales, no se detectaron daños en estas dos últimas condiciones, en laboratorio, en cambio, el aguacate cultivar Hass sí fue hospedero de estas especies con una relación directa de infestación al tiempo transcurrido después del corte (Enkerlin *et al.*, 1993); posteriormente, Aluja *et al.* (2004) observaron daños por *A. ludens* en aguacate Hass bajo condiciones de infestación forzada en jaulas de campo; sin embargo, no hubo emergencia de adultos.

La familia de las anonáceas incluye alrededor de 2,300 especies, de éstas el género *Annona* representa cerca de 110 y es el que más importancia económica tiene, las especies comercialmente más conocidas son *A. muricata*, *A. cherimola*, *A. squamosa* y *A. reticulata* (Granadino y Cave, 1997; Peña *et al.*, 2002) y cuyo centro de origen es el Neotrópico (León, 1968). En México, la guanábana (*A. muricata*) se ha convertido en un frutal tropical con gran potencial comercial, llegando a figurar, en algunos estados, entre los cinco frutales más importantes en superficie cultivada (Hernández *et al.*, 2008; SIAP, 2009). Actualmente, México ocupa el primer lugar a nivel mundial y Nayarit figura como el principal productor a nivel nacional de guanábana (Cruz *et al.*, 2002); se reportan 2,719 ha, de las cuales 2,029 ha se ubican en Nayarit (SIAP, 2007); otros autores reportan 5,916 ha (Vidal y Nieto, 1997, modificado por Cruz *et al.*, 2002). Cualquiera que sea la superficie, la guanábana se ha convertido en el cuarto frutal más importante en Nayarit en cuanto a superficie cultivada se refiere. La producción de este cultivo se ve limitada por la falta de variedades mejoradas (Granadino y Cave, 1997) y conocimiento de plagas y enfermedades asociadas (Hernández *et al.*, 2006, 2008; Peña *et al.*, 2002, 2003; Coto y Saunders, 2001). Al realizar colectas de insectos, revisión de literatura y mediante la obtención de información de colecciones entomológicas en distintos países Peña y Bennet (1995) consignan 296 especies asociadas a *Annona* spp, de estas 96 se reportan para *A. muricata* y entre ellas se mencionan a *A. striata* en México, Perú y Venezuela y *Ceratitidis capitata* en México y Brasil, no obstante, los autores no indican si estas especies fueron capturadas en su estado adulto dentro del huerto o en su estado larval en frutos. Por otro lado, Hernández *et al.* (2006), realizaron colectas de insectos asociados a *A. muricata* en algunos estados de México y no observaron frutos con

daños por *Anastrepha* spp. Por su parte, en México, Aluja (1993) menciona que el daño de *A. ludens* hacia frutos de guanábana se presenta como “casos muy raros” sin indicar índices de infestación (mosca / trampa / día) y menos aún consignar frutos infestados. Se presentan registros históricos de *Anastrepha* para 23 especies de plantas hospederas, entre las cuales se encuentran especies de la familia Annonaceae, sin embargo no se confirma el ataque a frutos (Aluja *et al.*, 1987), coincide con lo anterior Hernández (2007), el cual al consultar diversas publicaciones, concluye que existen algunas fuentes con registros dudosos del ataque de *A. ludens* en *Annona cherimola*, *A. reticulata*, *A. squamosa* y *A. serpentina* en *A. glabra*, las cuales requieren estudios de confirmación. Zucchi (2007), por su parte, presenta una revisión de las especies de *Anastrepha*, su distribución y hospederos en Brasil, entre los hospedantes reportados incluye *Annona crassiflora*, no obstante, no menciona sin ésta fue colectada en estado adulto o en larva dañando frutos. De la misma manera, Morales y González (2007), presentan una relación de 55 especies de *Anastrepha* en Venezuela, entre los hospedantes señalados no se incluye a alguno de la familia Annonaceae.

En una investigación que Aluja *et al.* (1987) realizaron en Chiapas, México, al colocar trampas Mcphail cebadas con proteína hidrolizada en hospedantes naturales y árboles de *A. muricata*, a diferencia de los primeros en esta última no observaron capturas de *Anastrepha*; otro estudio realizado por Aluja *et al.* (1998) para determinar los parasitoides y hospederos de moscas de la fruta en algunas zonas de México, no reporta daños por *Anastrepha* en frutos de *A. muricata*; asimismo, Aluja *et al.*, (2000) en investigaciones realizadas durante nueve años para determinar la distribución y hospederos de Díptera: Tephritidae en Veracruz, México, no observaron frutos de *A. muricata* atacados por estos insectos.

Jiménez (2004) realizó observaciones en infestación forzada en laboratorio y muestreo de 8,455 frutos de guanábana con el objetivo de observar si ésta era atacada por *Anastrepha* spp en Nayarit, México; al respecto no encontró frutos con larvas de este insecto y concluyó que la guanábana era infestada por *A. ludens* sólo en condiciones forzadas, sin determinar la sobrevivencia y reproducción del adulto. De la mis-

ma manera, en muestreos de frutos de *A. muricata* durante más de 15 años por personal técnico de la campaña contra moscas de la fruta del Comité Estatal de Sanidad Vegetal en Nayarit, México no se han observado daños por *Anastrepha* spp. La comercialización de este frutal en México para consumo en fresco hacia zonas de baja prevalencia y libres de moscas de la fruta del género *Anastrepha* presenta restricciones establecidas en la NOM-023-FITO-1995, NOM-075-FITO-1997 y Circular 091. Dada la falta de información categórica que indique la situación de *A. muricata* como hospedero de *Anastrepha*, se realizó el presente estudio con el único objetivo de determinar, mediante muestreo de frutos e infestación inducida en campo, si *A. muricata* es atacado por *Anastrepha*.

## Método

Las observaciones fueron realizadas con base en lo sugerido por Cowley *et al.* (1992), Aluja *et al.* (2008) y la NMRF 30 (NAPPO, 2008), se consideró también lo realizado por Aluja *et al.* (2003, 2004) y Jiménez (2003).

### ***Material biológico y cámaras de emergencia de adultos***

Las especies utilizadas fueron *A. ludens* y *A. obliqua*, el material biológico fue proporcionado por La Dirección General de Sanidad Vegetal a través de la planta productora de moscas de la fruta (Moscafrut) ubicada en Metapa de Domínguez, Chiapas, México; éstas fueron enviadas en estado de pupa próximas a emerger. Las pupas fueron colocadas en una jaula de emergencia de 40 cm por lado, con las paredes de acrílico y tapa de tela organza, se utilizó una jaula para cada especie. A los tres días de recibido el material emergió 92% de *A. ludens* y 87% de *A. obliqua*. Los adultos hembras y machos fueron mantenidos en estas jaulas durante 13 días a temperatura y humedad relativa de 27.94°C y 84.1 %, respectivamente. Para alimentarlos, se colocaron tres pedazos de algodón en la parte superior de la jaula, uno de ellos humedecido con una solución de 5 g azúcar, 2 mL de miel de abeja, 2 mL de jugo de mango, 1 mL de proteína hidrolizada y 10 mL de agua; otro con proteína hidrolizada y el tercero sólo con agua embotellada. Al octavo día de emergidos se in-

trodujo un fruto de mango de la variedad Ataulfo en la jaula de *A. obliqua* y un fruto de naranja en *A. ludens*. Lo anterior con el fin de estimular la actividad sexual y oviposición.

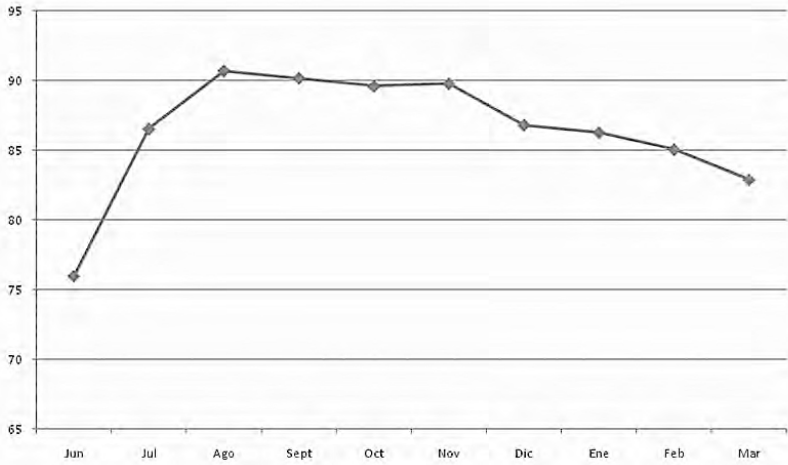
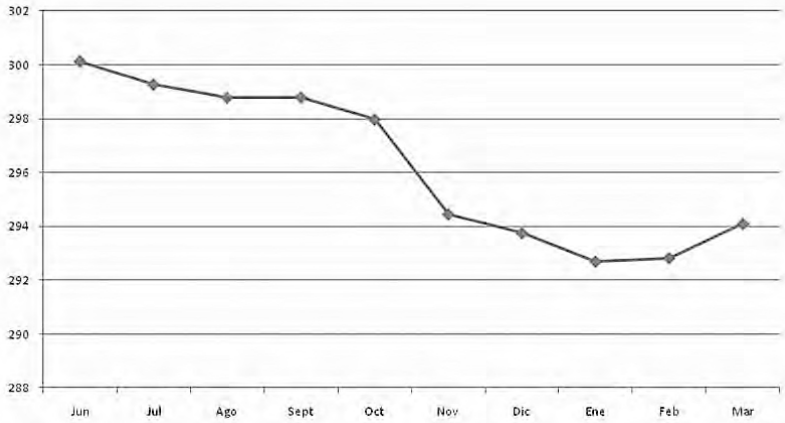
### ***Infestación natural***

Se muestrearon frutos cada ocho días durante dos ciclos de producción. Los muestreos se hicieron en huertos de la principal zona productora de guanábana en Nayarit ubicados en el municipio de Compostela en los terrenos ejidales de Altavista, El Capomo, El Tonino y El Divisadero, también se muestrearon frutos con la misma periodicidad en centros de acopio ubicados en las localidades de Las Varas y Puerta de la Lima del mismo municipio. En campo, se seleccionaron frutos sanos próximos a cosecha y frutos con síntomas de pudrición aún adheridos al árbol. De acuerdo con Follet y Hennessey (2007), el tamaño de muestra ( $n$ ) de frutos con base en un nivel aceptable de sobrevivencia de insectos ( $p_u$ ) y 95% de confianza, se estima con la ecuación:

$$n = \lceil \log(1-0.95) / \log(1-p_u) \rceil$$

Si consideramos  $p_u = 0.0001$ , se requieren muestrear 29,955.82 frutos, cantidad difícil de lograr si tomamos en cuenta el tamaño de frutos de guanábana, por lo anterior, en este ensayo se consideró  $p_u = 0.0002$ , lo cual nos indicó 14,977.16 frutos a muestrear.

Paralelo al muestreo de frutos de guanábana y en la misma zona, se colectaron frutos de hobos (*Spondia spp*) y mango de diferentes variedades, éstos fueron disectados cuidadosamente y aquéllos donde se observaron larvas de Díptera se colocaron en cajas de poliuretano a temperatura y humedad relativa ambiental, se utilizó arena mezclada con aserrín en relación 1:1 como sustrato de pupación. Diariamente se revisaron las cajas para observar y colectar los adultos emergidos. Las observaciones se realizaron de junio desde 2009 hasta marzo de 2010 (gráficas la y lb).



Gráficas 1a y 1b. Variación de la temperatura (K) y humedad relativa (%) (1b) ocurridos durante las observaciones desde junio de 2009 hasta marzo de 2010. Datos tomados de la estación climática El Capomo perteneciente a la red de estaciones agroclimáticas del INIFAP

### ***Infestación inducida***

El estudio se realizó en un huerto comercial, ubicado en los terrenos del ejido de Altavista, cuyas coordenadas geográficas son: 21° 05' 54.95"

N y 105° 09' 59.92" O a 118 msnm. Se seleccionaron cuatro árboles de *A. muricata* en los cuales se observaron frutos próximos a cosecha y frutos de menor desarrollo, los árboles se cubrieron totalmente con jaulas de tela organza. Se utilizaron 20 hembras y 20 machos de cada especie contenidas en las cámaras de emergencia 13 días después de emergidos. Previo a ello se disectaron 10 hembras bajo microscopio estereoscópico para observar la presencia de huevos. En cada jaula se introdujeron cinco pares de cada especie. Dentro, los insectos permanecieron 54 horas, los frutos de guanábana en los cuales se observó alguna actividad de las hembras se identificaron para cosecharlos posteriormente. Los tratamientos fueron dos, 1) árboles sólo con frutos de guanábana y 2) árboles con frutos de guanábana en los cuales se colocaron sobre las ramas ocho mangos de la variedad Tommy Atkins como hospedero natural en cada árbol. Estos fueron cosechados de un huerto certificado como temporalmente libre de moscas de la fruta. Cada árbol se consideró una repetición. Se tomaron datos de humedad relativa y temperatura ocurridos durante las observaciones. Al final se cosecharon los frutos de guanábana próximos a maduración y se colocaron en jaulas para observar la posible emergencia de larvas y adultos de *A. ludens* y *A. obliqua*. Lo mismo se realizó con los frutos de mango. Las observaciones se hicieron durante el mes de octubre de 2009.

## Resultados y discusión

### *Infestación natural*

En total, se muestrearon 6,712 frutos (5.23 t) de guanábana en huertos comerciales y 8,418 frutos (7.18 t) en centros de acopio, dando un total de 15,130 frutos. Los frutos muestreados presentaron en promedio 12.3°Brix y 25.77% de materia seca. En los frutos muestreados se observaron 118 larvas del orden Coleóptera, las cuales se colocaron en cámaras de pupación, de estas emergieron 92 adultos del picudo de las anonáceas (*Optatus palmaris*), insecto reportado anteriormente por Castañeda *et al.* (2009), también se observaron larvas del barrenador de las semillas (*Bephratelloides cubensis* Ashmead), en este caso, el insecto pupa



dentro de la semilla, posteriormente emerge en busca de frutos para ovipositar (Peña *et al.*, 2002; Hernández *et al.*, 2008).

Se colectaron 16 frutos de guanábana con larvas de Díptera, éstas se colocaron en cámaras de pupación a temperatura ambiental con sustrato formado por arena y aserrín en mezcla de 1:1, en total emergieron 21 adultos de *Neosilba sp.* (Díptera: Lonchaeidae), de éstas se depositaron cinco ejemplares en la Colección Entomológica del Colegio de Postgraduados Campus Montecillo. No se observaron frutos de *A. muricata* dañados por alguna especie de *Anastrepha*; resultados similares obtuvo Jiménez (2003) al realizar muestreo en campo de 8,455 frutos (7.9 t) en Nayarit, México. De otros frutos se muestrearon 240 mangos y 318 hobos (*Spondias spp.*). En estos últimos se encontraron larvas de *Anastrepha spp.*, las cuales se colocaron en cámaras de emergencia para obtener los adultos, emergieron 35 adultos de *A. obliqua* (cuadro 1).

Cuadro 1. Muestreo de frutos hospedantes de *Anastrepha spp.* y emergencia de adultos

Hospedante	Frutos disectados	Especies colectadas	
		<i>A. ludens</i>	<i>A. obliqua</i>
Hobo	318	0	35
Mango	240	0	0
	Total	0	35

### *Infestación inducida*

Se cosecharon en total 43 frutos de guanábana, en seis de los cuales ocurrió alguna actividad de las hembras de ambas especies. Después de 41 días de observación no emergieron larvas ó adultos de *Anastrepha*, Jiménez (2003) obtuvo resultados similares en jaulas de campo, en jaulas de laboratorio, en cambio, observó emergencia de adultos de *A. ludens*. Por su parte, Stone (1942) enlista una serie de hospederos de *Anastrepha*, incluye sólo aquellos frutos en los cuales se observó infestación en campo y en los puntos de venta, en total menciona 90 especies en las cuales no incluye a *A. muricata*. De los frutos de mango, emergieron 7 adultos, cinco de *A. obliqua* y dos de *A. ludens* (especies identificadas y deposita-

das en el Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria de la Dirección General de Sanidad Vegetal)(cuadro 2). En diversas revisiones de literatura que consignan gran variedad de especies de plantas hospederas de moscas de la fruta (Stone, 1942; Norrbom y Kim, 1988; Peña y Bennett, 1995; Peña *et al.*, 2002; Zucchi, 2007), se observa que estos reportes han sido mediante citas de artículos anteriores los cuales a su vez citan autores anteriores, lo mismo ocurre con revisiones de colecciones entomológicas, donde se consigna al adulto de *Anastrepha* sin determinar si este fue encontrado dañando en condiciones naturales a la planta en cuestión.

Cuadro 2. Emergencia de adultos de *A. obliqua* y *A. ludens* en frutos de mango y guanábana con infestación inducida

Frutos	Frutos observados	Adultos emergidos	
		<i>A. ludens</i>	<i>A. obliqua</i>
Guanábana	43	0	0
Mango	32	2	5
	Total	2	5

## Conclusión

Con base en los resultados obtenidos, y a la definición de hospedero natural, podemos concluir que *A. muricata* no es hospedero de *A. ludens* y *A. obliqua*.

## Agradecimientos

Se agradece infinitamente la participación del Dr. Jesús Romero Nápoles y al personal técnico del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria por la identificación de los insectos colectados; asimismo, a la Fundación Produce Nayarit y Junta Local de Sanidad Vegetal San Pedro-Compostela por el apoyo económico brindado para la realización de esta investigación. Especial reconocimiento merecen los productores de guanábana en Nayarit por lo aportación de frutos para muestreo.



## Referencias

- Aluja, S.M. and Mangan, R.L. 2008. Fruit fly (Díptera: Tephritidae) host status determination: critical conceptual, methodological and regulatory considerations. *Annu. Rev. Entomol.* 53: 473-502.
- Aluja, S.M. 2004. Nonhost status of commercial *Persea americana* 'Hass' to *Anastrepha ludens*, *Anastrepha obliqua*, *Anastrepha serpentina* and *Anastrepha striata* (Díptera: Tephritidae) in Mexico. *J. Econ. Entomol.* 9 (2): 293-309.
- Aluja, S.M., Pérez, S.D., Macias, O.R., Piñero, J., McPherson, B. and Hernández, O.V. 2003. Nonhost status of *Citrus sinensis* cultivar valencia and *C. paradise* cultivar ruby red to Mexican *Anastrepha fraterculus* (Díptera: Tephritidae). *J. Econ. Entomol.* 96 (6): 1693-1703.
- Aluja, S.M., López, M., Piñero, J., Ruíz, C., Zuñiga, A., Piedra, E., Díaz F., and Sivinski, J. 2000. New host plant and distribution records in Mexico for *Anastrepha* spp., *Toxotrypana curvicauda* Gerstaecker, *Rhagoletis zoqui* Bush, *Rhagoletis* sp., and *Hexachaeta* sp. (Díptera: Tephritidae). *Proc. Entomol. Soc. Wash.* 102: 802-815.
- Aluja, S.M., Piñero, J. y Sivinski, J. 1998. Reporte técnico final, proyecto CONABIO: inventario e identificación de reservorios de parasitoides nativos de moscas de la fruta (Díptera: Tephritidae) en el estado de Veracruz. México D.F. 94 pp.

- Aluja, S.M. 1993. Manejo integrado de la mosca de la fruta. Ed. Trillas. México, D. F. 251 pp.
- Aluja, S.M., Cabrera, M., Rios, E., Guillén, J., Celedonio, H., Hendrichs J. and Liedo, P. 1987. A survey of the economically important fruit flies (Diptera: Tephritidae) present in Chiapas and few other fruit growing regions in México. *Florida Entomologist* 70:321-329.
- Armstrong, J.W. 1994. Commodity resistance to infestation by quarantine pests. En: Sharp, J.L and Hallman, G.J. Quarantine treatments for pests of food plants. Westview Press, Boulder, CO. Pp. 199-211.
- Castañeda, V.A., Nava, D.C., Hernández, F.L.M., Valdez, C J. and Colunga, T.B. 2009. New host record and geographical distribution of *Optatus palmaris* Pascoe 1889 (Coleoptera: Curculionidae) in Mexico. *Acta Zoológica Mexicana (n. s.)*. 25 (3): 663-666.
- Coto, D.A. y Saunders, J.L. 2001. Insectos plaga de la guanábana (*Annona muricata*) en Costa Rica. *Manejo Integrado de Plagas*. 61: 60-68.
- Cowley, J.M., Baker, R.T. and Harte, D.S. 1992. Definition and determination of host status for multivoltine fruit fly (Diptera: Tephritidae) species. *J. Econ. Entomol.* 85: 312-17.
- Cruz, C.J.G., Torres, L.P.A., Delgado, M.J.C., Domínguez, V.M., Martínez, P.D. y Franco, M.O. 2002. El guanábano: agronomía y usos de frutos tropicales. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 177 pp.
- Dirección General de Sanidad Vegetal (DGSV). 2004. Circular 091. 18 de mayo de 2004. México, D. F.
- Diario Oficial de la Federación (DOF). 1999. Norma Oficial Mexicana NOM-023-FITO-1995, Por la que se establece la Campaña Nacional contra Moscas de la Fruta. 11 de febrero de 1999. México, D.F.

- Diario Oficial de la Federación (DOF). 1998. Norma Oficial Mexicana NOM-076-FITO-1997, Por la que se establecen los requisitos y especificaciones fitosanitarias para la movilización de frutos hospederos de moscas de la fruta. 23 de abril de 1998. México, D.F.
- Enkerlin, H.W., Reyes, J.F., Bernabe, A.A., Sánchez, P.J.L., Toledo, J.A. y Aluja, S.M. 1993. El aguacate Hass como hospedante de tres especies de *Anastrepha* (Díptera: Tephritidae), en condiciones forzadas y naturales. *Agrociencia Serie Protección Vegetal*. 4 (3): 329-357.
- Follet, A.P. and Hennessey, M.K. 2007. Confidence limits and sample size for determining nonhost status of fruits and vegetable to tephritid fruit flies as a quarantine measure. *J. Econ. Entomol.* 100 (2): 251-257.
- Granadino, C.A. and Cave, R.D. 1997. Within-tree distribution of seven insect pests of soursop (*Annona muricata*) in Honduras. *Ceiba*. 38 (2): 161-166.
- Hanson, F.E. 1983. The behavioral and neurophysical basis of food-plant selection by lepidopterous larvae. In: Amahd, S. *Herbivorous Insects: host seeking behavior and mechanism*. Academic. New York, USA. Pp. 2-23.
- Hernández, O.V., Guillén, A. J. y López, L. 2010. Taxonomía e identificación de moscas de la fruta de importancia económica en América. En: Montoya, P., Toledo, J. y Hernández, E. (Eds.). *Moscas de la fruta: fundamentos y procedimientos para su manejo*. S y G editores. México, D. F. 49-80 pp.
- Hernández, F.L.M., Bautista, M.N., Carrillo, S.J.L., Sánchez, A.H., Urías, L.M.A. y Salas, A.M.D. 2008. Control del barrenador de las semillas, *Bephratelloides cubensis* Ashmead (Hymenoptera: Eurytomidae) en guanábana, *Annona muricata* L. (Annonales: Annonaceae). *Acta Zoológica Mexicana* n.s. 24 (1): 199-206.

- Hernández, O.V. 2007. Diversidad y biogeografía del género *Anastrepha* en México. En: Hernández O.V. (Ed.). Moscas de la fruta en Latinoamérica (Díptera: Tephritidae): diversidad, biología y manejo. S y G editores. México. 53-76 pp.
- Hernández, F.L.M., Bautista, M.N., Carrillo, S.J.L., Urias, I.M.A. y Sánchez, A.H. 2006. El guanábano: sus plagas y su manejo. Colegio de Postgraduados-Fundación Produce Nayarit, México. 34 pp.
- Hernández, O.V. y Aluja, S.M. 1993. Listado de especies del género neotropical *Anastrepha* (Díptera: Tephritidae) con notas sobre su distribución y plantas hospederas. *Folia Entomológica Mexicana*. 88: 89-105.
- Jiménez, C.M.E. 2003. Situación de la guanábana como huésped de *Anastrepha* spp. en Nayarit. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, Edo. de México. México.
- León, J. 1968. Fundamentos botánicos de los cultivos tropicales. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. San José, Costa Rica.
- Morales, P. y González, E. 2007. El género *Anastrepha* Schinner y su importancia económica en frutales de Venezuela. En: Hernández, O.V. (Ed.). Moscas de la fruta en Latinoamérica (Díptera: Tephritidae): diversidad, biología y manejo. S y G editores. México. 27-52 pp.
- NAPPO. 2008. Directrices para determinar y designar el estatus de una fruta o verdura como hospedante de moscas de la fruta (Díptera: Tephritidae). NRMF No. 30. NAPPO. Ottawa, Canadá.
- Norrbom, A.L. y Kim, K.C. 1988. A list of the reported host plants of the species of *Anastrepha* (Díptera: Tephritidae). United States Department of Agriculture. *Aphis*. 81 (52): 1-114.

- Peña, J.E. 2003. Insectos polinizadores de frutales tropicales: no solo las abejas llevan la miel al panal. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología*. 69: 6-20.
- Peña, J.E., Nadel, H., Barbosa, P.M. and Smith, D. 2002. Pollinators and pest of *Annona* species. In: Peña, J.E., Sharp L. and Wysoki, M. (Eds.). *Tropical fruit pests and pollinators: biology, economic importance, natural enemies and control*. CABI Publishing. Pp. 197-220.
- Peña, E.J. and Bennett, F.D. 1995. Arthropods associated with *Annona spp.* in the neotropics. *Florida Entomologist*. 78 (2): 329-349.
- SIAP. 2007, 2009. Sistema de información agroalimentaria y pesquera. SAGARPA. México. En línea: <http://www.siap.gob.mx>.
- Stone, A. 1942. The fruit flies of the genus *Anastrepha*. U.S. Dep. Agric. Misc. Publ. No. 439.
- Zucchi, A.R. 2007. Diversidad, distribución y hospederos del género *Anastrepha* en Brasil. En: Hernández, O.V. (Ed.), *Moscas de la fruta en Latinoamérica (Díptera: Tephritidae): diversidad, biología y manejo*. S y G editores. México. Pp. 77-100.





# Las acetogeninas, ¿más que inhibidores del transporte electrónico?

Domínguez-Martínez, Verónica<sup>1</sup>, Andrade Domínguez, Andrés<sup>2</sup>, Trejo Hernández, Abigail<sup>2</sup>, Coria Gil, Norma<sup>3</sup> y Martínez Vázquez, Mariano<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Biología de la Universidad Veracruzana, Campus Xalapa  
Circuito Aguirre Beltrán s/n, Xalapa, Ver. vdominguez@uv.mx

<sup>2</sup>Centro de Ciencias Genómicas, UNAM, Av. Chamilpa s/n, Cuernavaca, Mor.

<sup>3</sup>Facultad de Agronomía de la Universidad Veracruzana.  
Camino a Peñuela s/n, Orizaba, Ver.

<sup>4</sup>Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México  
Circuito Interior s/n, Ciudad Universitaria, México. D. F.

## Resumen

Las acetogeninas se reportan como potentes inhibidores del Complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial (González-Coloma *et al.*, 2001). Habiendo demostrado que su toxicidad se presenta por simple contacto con los organismos blanco (Martínez Navarro, 2008) se ha ensayado su efecto frente a levaduras mutantes. Tenemos evidencia de que las acetogeninas presentes en un extracto metanólico de semillas de *Annona muricata* afectan la morfogénesis y estructuras

externas de insectos como *Blatella periplaneta* (Martínez Navarro, 2008) y *Anastrepha ludens* (Domínguez Martínez *et al.*, 2009). Nos proponemos analizar el daño causado por extractos ricos en acetogeninas, a cepas de levadura mutadas en los genes *CHS1*, *CHS2*, involucrados en la biosíntesis de quitina durante la formación del septo entre células madre y yemas de levadura, como un primer abordaje para demostrar la acción “pleiotrópica” de la anona. En los bioensayos utilizamos cepas “knock-outs” de *Saccharomyces cerevisiae* (YKO MATa Strain Collection, Open Biosystems), las cuales se cultivaron en medio líquido YPD con o sin extracto rico en acetogeninas. Realizamos cinéticas de crecimiento para evaluar el efecto de estas moléculas en el tiempo de duplicación de cada cepa. Mediante microscopía óptica evaluamos cambios como elongación celular, formación no apical de yemas y células hijas unidas a la célula madre (con septos notables), se tomaron como anomalías relacionadas con la morfogénesis. El crecimiento de las cepas *chs1Δ* y *chs2Δ* no se vio afectado por el extracto, aunque se observaron alteraciones en la formación de septos, lo que causó la formación de agregados y alta frecuencia de células madre unidas a la yema. Esta morfología es atribuible a alteraciones en la formación de la pared celular. A diferencia de las células *yrr1Δ* expuestas (Domínguez Martínez *et al.*, 2009), las células *chs1Δ* y *chs2Δ* no forman pseudohifas, lo que sugiere que las vías de afectación son diferentes entre la cepa *yrr1Δ* y las mutantes *chs1Δ* y *chs2Δ*. Las acetogeninas no sólo afectan el transporte electrónico mitocondrial, sino también algunos genes de la síntesis de quitina, lo que se demuestra por el impacto causado en la gemación y morfogénesis de *S. cerevisiae*, principalmente en mutantes *CHS* y *CHD*. Esto explica el daño previamente observado a pupas de *Aedes aegypti*, y adultos de *Blatella periplaneta* y *Anastrepha ludens*.

## Introducción

Conocidas por su alta toxicidad, las acetogeninas son policétidos formados a partir del acetyl-CoA a través de la ruta del acetato-malonato (Luna Cazáres *et al.*, 2003), y se han caracterizado solamente en el género *Persea* y en la familia Annonaceae. Se han propuesto como productos

bioactivos para múltiples fines, pero es precisamente esa alta toxicidad lo que limita su uso biomédico.

Las acetogeninas están formados por una cadena alifática de entre 32 y 34 C, y se caracterizan por tener un anillo  $\gamma$ -lactona (saturado o insaturado,) producto de la modificación del carboxilo terminal. La cadena carbonada puede tener entre uno y tres anillos tetrahidrofuranos (THF)(Alali *et al.*, 1999) o tetrahidropirano (Bermejo *et al.*, 2005), y radicales oxigenados (hidroxilos, cetonas y epóxidos, figura 1) con dobles o triples enlaces.

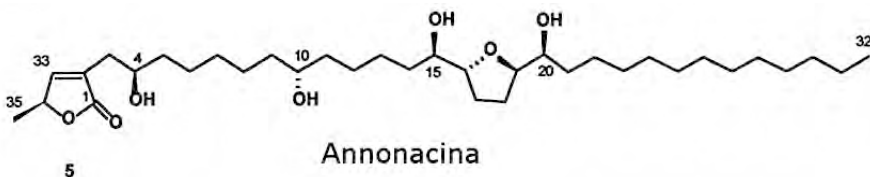


Figura 1. Estructura de una acetogenina (annonacina) mono THF

Por su bioactividad, destacan algunas acetogeninas como potentes inhibidores de células cancerosas, a una dosis eficaz media ( $DE_{50}$ ) menor a  $10^{-12}$  mg/mL (menor que la del taxol, un diterpeno de *Taxus brevifolia*) aun para células resistentes a adriamicina, cuya dosis letal es de hasta  $10^9$   $\mu$ g/mL (Alali *et al.*, 1999), y en consecuencia, unas 1,000 veces menos potente que la acetogenina.

Varias ACG como asimicina, parviflorina, silvaticina, bullatacina, anomontacina y gigantetrocina-A son notables agentes insecticidas, mejores que el piretroide sipermetrina, o que el clorpirifos (compuesto fosforado), la hidrametilnona (derivada de amidinohidrazaona), o los carbamatos proporxur y bendiocarb (Alali, *op. cit.*). Las ACG con dos anillos THF y con grupos OH adyacentes son agentes tóxicos por contacto (más que antialimentarios) para el mosquito de la fiebre amarilla (He *et al.*, 1997). La escuamocina es tóxica para los coleópteros y homópteros (*Leptinotarsa decemlineata* y *Myzus persicae*). Como antialimentarios de larvas de *Spodoptera frugiperda* (Lepidóptera: Noctuidae) se han reportado nueve ACG de *A. cherimola*, destacando entre ellas la escuamocina, que es letal para el

100% de las larvas a una dosis de 50 µg/g de dieta (González Coloma *et al.*, 2002). Para larvas de *Aedes aegypti*, se reporta una mortalidad del 65% con 20 µg/mL de rolliniastatina (Londerhausen *et al.*, 1991). La toxicidad de las ACG se debe a su capacidad para inhibir el transporte de electrones de la membrana interna mitocondrial, a nivel de la NADH deshidrogenasa (ubiquinona oxido reductasa, Complejo I o NADH deshidrogenasa (figura 2) (Degli Esposti *et al.*, 1994). Este es el punto de acción de la rotenona, la piericidina A y capsaicina (Londershausen *op. cit.*; Guadaño *et al.*, 2000) y del 1-metil-4-fenil piridinium (MPP).

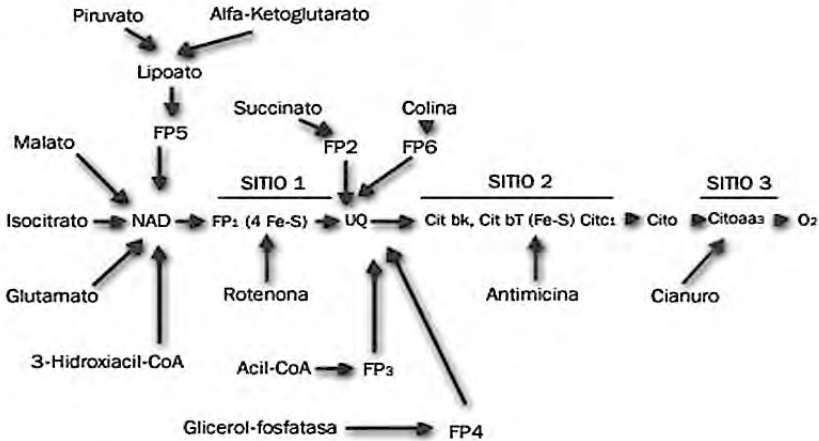


Figura 2. Sitios de acción propuestos para las acetogeninas y otros inhibidores de la enzima NADH-ubiquinona oxidoreductasa

Por su alta toxicidad, la annonacina, se ha probado en diferentes modelos biológicos, incluyendo el tumor de agallas de plantas, mitocondria de rata, líneas celulares cancerosa y líneas murinas, neuronas de embrión de rata, partículas sub mitocondriales (PSM) de bovino, larvas de *Spodoptera sp* y *L. decemlineata* (Luna Cázares *et al.*, 2003), y en todos ellos se corroboró que la acción es a nivel del Complejo I. Al inhibir la NADH oxidasa mitocondrial de células cancerosas, las acetogeninas, y en especial la annonacina inducen apoptosis por la vía de caspasa 3 y Bax- Bad, estancando tales células en la fase G<sub>1</sub> (Yuan *et al.*, 2003).

Dado el amplio espectro de toxicidad las acetogeninas resultan de gran importancia económica, tanto para el sector agrícola, pecuario y aun biomédico, ya que pueden dañar insectos tales como los mosquitos de los géneros *Aedes* y *Anopheles*, *Pediculus humanus*, *Pulex irritans*, *Cimex lectularius* y *Blattella germanica* (Alali *et al.*, 1998; Bobadilla *et al.*, 2002), entre otros. La toxicidad se atribuye a un efecto antialimentario, comparable al mostrado por la rotenona, y superior al causado por extractos del árbol del Nim (*Azadirachta indica*). Pero hay evidencias recientes (Domínguez-Martínez *et al.*, 2003) de que basta el contacto externo para afectar, por ejemplo, a las pupas de *Aedes aegypti* (figura 3), cuya morfogénesis resulta severamente alterada:

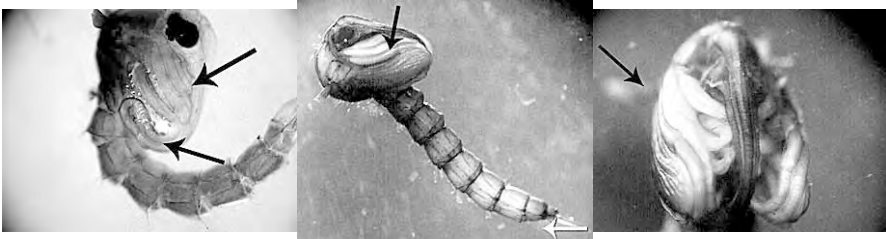


Figura 3. Pupas de *A. aegypti*. Se muestra la morfología normal (izquierda): un cuerpo curvado, los primordios de las alas (flecha superior), y debajo de ellas las patas. Comparando (en medio), una pupa expuesta a extractos de acetogeninas. Se observa el cuerpo recto, paletas natatorias incompletas (flecha blanca), desarrollo defectuoso de las patas (flecha superior) y alas, lo que es más notable en el acercamiento ventral (imagen a la derecha), en que se hacen evidente además, la exposición anómala de la futura trompa por separación de las estructuras (tomado de Domínguez Martínez *et al.*, 2003)

Nuestro grupo de trabajo ha demostrado que los extractos de semilla de *A. muricata*, ricos en acetogeninas, causan la destrucción de estructuras quitinosas de adultos de *Blattella periplaneta* (Martínez Navarro, 2008), como el protolabio, el exoesqueleto y las patas, cuando se les mantiene en frascos impregnados con acetogeninas (figura 4).

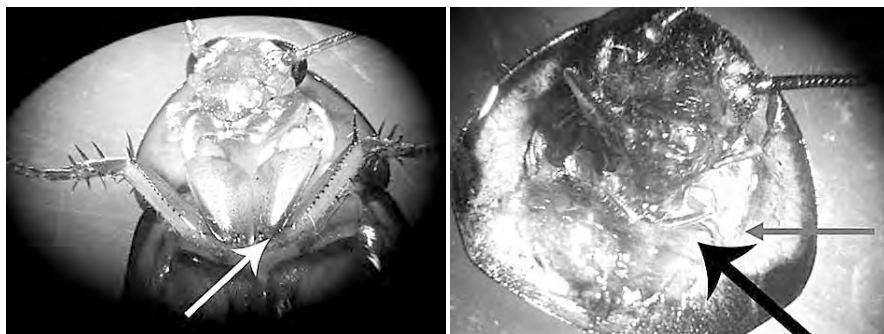


Figura 4. Daños observados en un individuo adulto de *Blatella sp.* A la izquierda se muestra el organismo intacto (la flecha señala el protolabio, y las patas son claramente visibles). A la derecha el mismo individuo, luego de exposición al extracto. Ha perdido las patas y el protolabio ya no presenta su estructura original (flecha); tampoco conserva las antenas (Tomado de Martínez Navarro *et al.*, 2008)

Varios autores proponen una estrecha correlación entre la toxicidad de una acetognina y la longitud del espaciador entre la lactona y el (o los) anillos THF, siendo el óptimo un total de 13 átomos de C entre estos elementos (figura 1). La inserción de un anillo no afecta la actividad mientras no reduzca la longitud del espaciador. Esto puede deberse a que la cadena principal de metilenos se pliega alrededor del THF, principalmente en las ACG bis-THF, generándose una alta polaridad alrededor del anillo THF (Takada *et al.*, 2000). Se requiere la presencia de la lactona para la acción conjunta con el THF sobre el Complejo I (Hamada *et al.*, 2004). En orden decreciente, las acetogeninas con anillos bis-THF adyacentes son más potentes que las que no los tienen, pero éstas superan a las mono THF.

Según el modelo propuesto por Abe *et al.* (2008), el anillo THF hidroxilado y la lactona se unen simultáneamente a dos sitios del Complejo I, modelo que explica el requerimiento del espaciador de 13C para que la ACG alcance tales sitios. Dado que los THF forman puentes de hidrógeno, actúan como anclas hidrofílicas que sostienen el espaciador sobre los lípidos del lado interno de la membrana, mientras la lactona interactúa con un sitio de la misma membrana interna. Esto explica la bioactividad de las ACG, y que la exposición de animales de laboratorio

o seres humanos a dichas ACG puede causar enfermedades neurodegenerativas, como algunas formas del mal de Alzheimer y de Parkinson.

Si el mecanismo de daño causado por acetogeninas consiste en la inhibición del Complejo I mitocondrial, resulta importante ensayar su efecto en levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*), pues sus mitocondrias (como las de algunas plantas y hongos) carecen del Complejo I, pero a cambio poseen enzimas NADH-deshidrogenasa alternas, llamadas NADH-ubiquinona-6-oxidorreductasas de tipo II, o NADH deshidrogenasas insensibles a rotenona (NDH-2). En las levaduras, el NADH reducido en el citosol y dentro de la mitocondria se utiliza por dos NADH deshidrogenasas externas (NDE1 y NDE2) y una NADH deshidrogenasa interna (NDII) (Rivera Pérez *et al.*, 2005). Esta última reacciona específicamente con el NADH, pero puede emplear *in vitro* diferentes aceptores de electrones, como la ubiquinona-2, la ubiquinona-6 (que es el aceptor de electrones endógeno o natural) el 2,6-diclorofenolindofenol y el ferricianuro.

Aunque catalizan la misma reacción que el Complejo I de la cadena respiratoria clásica mitocondrial, las NADH oxidorreductasas tipo II no contribuyen a la generación de gradientes protónicos transmembranales.

En las levaduras también hay transhidrogenasas de NADH (Rivera Pérez *et al.*, 2005) y una lanzadera de glicerol-3-fosfato deshidrogenasa, por la cual el NADH es oxidado a NAD, y los electrones sirven para reducir el fosfato de dihidroxicetona a glicerol-3-fosfato por la enzima Gpd1p del citosol. Tal es la eficacia de las NADH ubiquinona oxidorreductasas de levadura, que se usan para recuperar la oxidación de NADH en células de mamífero cuyo Complejo I mitocondrial es defectuoso (debido a mutación en el gen mitocondrial que codifica para NDH4 (Seo *et al.*, 2000).

Estas enzimas alternas se encuentran en las cadenas respiratorias de bacterias como *Escherichia coli* y arqueas (ej. *Acidianus ambivalens*), así como en organismos eucariontes (hongos) y plantas (Rivera Pérez, *op. cit.*). Su función es crucial, ya que dan versatilidad al metabolismo celular y adaptabilidad a las condiciones ambientales del organismo al que pertenecen.



Al exponer cepas mutantes de levadura a extractos de semilla ricos en acetogeninas hemos observado alteraciones en la morfología celular, notables principalmente durante la gemación, proceso en el que es muy importante la síntesis de quitina, de manera que esta vía metabólica pudiera estar involucrada en un efecto pleiotrópico de las acetogeninas.

Entre los genes involucrados en la síntesis de quitina, está la familia CHS, formada al menos por 7 miembros, cuyo producto es la enzima quitin-sintetasa, de la cual hay al menos 3 miembros (sintetasas I, II y III), que catalizan la transferencia de N-acetilglucosamina (GlcNAc) a la quitina, principalmente durante la reparación (CHS1) o formación (CHS2) del septo primario durante citocinesis. La enzima Chs3p cataliza la síntesis de la mayor parte de quitina de la pared celular, y une la quitina al extremo no reductor de 1,3-b glucano formando los enlaces  $\beta$ -1,4 (Ono *et al.*, 2000).

La transcripción del gen CHS1 es activada por el factor de apareamiento (*mating factor*), y se sabe que el producto de Chs1p se encarga de reparar la quitina dañada balanceando la actividad quitinasa. La enzima del gen CHS2 es regulada por Cdk1p durante la mitosis. La enzima III es requerida para la síntesis de la mayor parte de la quitina de la pared celular y del anillo de quitina durante la emergencia de la yema, así como para la formación de quitosanas de la pared de esporas. La enzima III es reclutada hacia el cuello de las yemas por CHS4. Durante el crecimiento vegetativo se ha reportado la participación de varios activadores de Chs3p, como Bni4p, Shc1p y Skt5p.

El nivel de expresión de Chs2p está regulado durante el ciclo celular, y la proteína producida se localiza en el cuello de la yema al final de la mitosis, momento en que se degrada. La proteína de Chs3p es estable y forma un anillo en la superficie de la yema emergente, acumulándose entonces en la célula madre. Se requieren varios factores celulares, incluyendo los productos de los genes *CHS4*, *CHS5*, *CHS6*, *MYO2* y *TIG1* (Ono *et al.*, 2000)

Relacionados con el metabolismo de quitina, están los genes para la enzima quitin-desacetilasa (CDA1 y CDA2, o YLR308W). CDA2, junto con Cda 1p está involucrado en la biosíntesis del quitosano (variante desacetilada de la quitina), componente de la pared de la ascospora,

mismo que le da rigidez a tal pared. La mutación de ambos genes permite la formación de células viables, ya que su función es redundante. El fenotipo distintivo es la falta de fluorescencia de las esporas, debido a defectos en los residuos de di-tirosina en la pared externa de la ascospora. Las esporas mutantes son sensibles a enzimas hidrolíticas, éter y choque térmico (Christodoulidou *et al.*, 1996).

La levadura resulta así un organismo de estudio excepcional para evaluar el efecto de las acetogeninas, particularmente por las alteraciones que estas causan en la metamorfosis de pupas de *A. aegypti* y en ninfas y adultos de *B. periplaneta*, puesto que se involucran alteraciones en el metabolismo de quitina, al igual que en levaduras. En el caso de los insectos estudiados, los daños observados corresponden a estados metamórficos no susceptibles a los antialimentarios como el Abate (insecticida organofosforado usado para el control por los Servicios de Salud oficiales), y durante los cuales la síntesis de quitina es esencial, por lo que consideramos posible que estén involucrados mecanismos diferentes (aunque posiblemente relacionados) al bloqueo de transporte electrónico. Para estudiar esta posibilidad, se seleccionaron mutantes en los genes *CDA* (*CDA1* y *CDA2*, variantes que codifica la enzima quitin-desacetilasa no funcional) y, simultáneamente con la cepa BY4741 Mat a (“silvestre”), se expusieron a las acetogeninas, para analizar alteraciones durante el crecimiento de las cepas en medio de cultivo líquido.

## Método

Los extractos de semilla ricos en acetogeninas se prepararon según la metodología descrita en Domínguez-Martínez *et al.* (2003).

Las cepas “knock-outs” de *S. cerevisiae* (YKO MATa Strain Collection, Open Biosystems) y la cepa silvestre BY4741 Mat a se cultivaron en medio YPD (extracto de levadura al 1%, peptona al 2% y dextrosa al 2%). Los cultivos se colocaron en matraces (o tubos de ensayo para determinaciones de absorbancia), adicionando 50 µl/mL de extracto rico en acetogeninas. Se incluyeron cultivos control sin tal extracto. En cada matraz se inocularon volúmenes adecuados (20-50 µL) de cultivos de 18 h, suficientes para alcanzar una absorbancia (540 nm) inicial

de 0.05. Los matraces y tubos se incubaron en un baño a 32°C con agitación constante.

Para analizar posibles alteraciones en la replicación, se siguió el incremento de la población a diferentes tiempos, usando dos parámetros: el registro de la absorbancia a 540 nm, y el peso seco celular, para lo cual se tomaron alícuotas de 3 mL del mismo medio, a cada tiempo, se centrifugación a 4°C y 8,000 rpm, se eliminó el sobrenadante, y los tubos se secaron a 40°C luego de lo cual los tubos se pesaron en una balanza analítica (hasta 1 décima de mg).

De cada tiempo de muestreo se prepararon frotis que se tiñeron con azul de metileno al 0.1% en agua, a fin de detectar células muertas, considerando que sólo aquellas levaduras cuya membrana estuviera dañada, son susceptibles de tinción. Los frotis se observaron al microscopio compuesto (40X), en busca de alteraciones en la morfología celular. Los cambios como elongación celular, formación no apical de yemas, células hijas unidas a la célula madre, células unidas por septo visible o formación de estructuras precursoras de formas invasivas (células madre con más de una yema alargada que permanece unida a la madre, ver figuras 6 y 7), se tomaron como anomalías morfológicas. Se analizaron 5 campos por preparación. Se muestran los más representativos.

La confiabilidad de los resultados se evaluó mediante determinación de la media y desviación estándar para 3 repeticiones de cada cultivo (tomando células originales, dado que la levadura tiene alta capacidad de regeneración y salteo de las mutaciones) de las correspondientes mutantes y la cepa control, en referencia a cultivos idénticos sin extracto.

## Resultados y discusión

En la figura 5 se muestra la morfología normal (a) de la cepa silvestre BY4741 Mat a y la mutante *cdal*Δ (b), luego de 3 h de incubación a 32°C en medio YPD. Hay células solas, ovoides, de tamaño constante. La mayoría presentan una yema apical, que es el fenotipo normal.

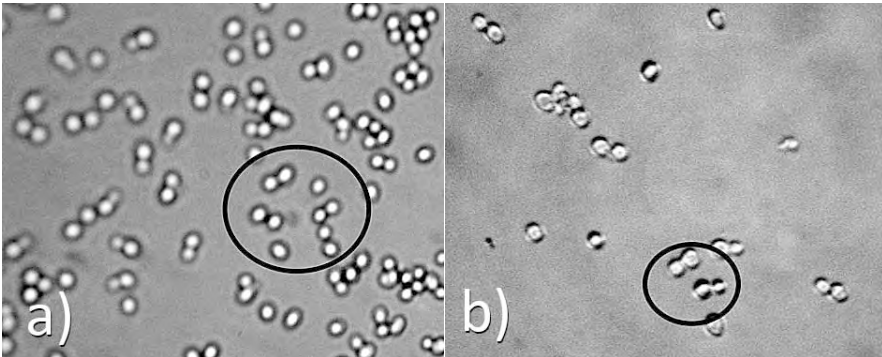


Figura 5a. Morfología de la cepa silvestre BY4741 Mat a no expuestas a acetogeninas. A la derecha (figura 5b) se muestra la mutante *cda1Δ* en medio YPD (mismo tiempo de cultivo que BY4741). Es notable la menor densidad celular en esta última. En círculos se destacan células en gemación

En presencia del extracto y a las 5 h de cultivo, la cepa BY4741 presenta gemación y aumento de la densidad poblacional, lo que indica que la sustancia no impide la replicación ni alteraciones al ciclo celular, que se reflejan en el crecimiento del cultivo (figura 6).

Sin embargo se encuentran numerosas células madre con más de una yema unida, lo que demuestra alteraciones en la gemación (figura 6, círculos oscuros). Esta anomalía confirma que los septos (notables entre algunas yemas y su célula madre, destacados con flechas en la figura 6) no se forman correctamente (lo que impide la liberación), o bien que hay deficiencias en la formación de la pared. En ambas estructuras se requiere la síntesis de quitina (Ono, *op. cit.*), para cuya síntesis esta cepa no debería tener dificultad alguna (ver más adelante).

Hay varios agregados, que reiteran anomalías (cuadros). Algunas células hijas emergen lejos del ápice, y son ligeramente alargadas (círculos blancos), como si se fuera a proseguir con desarrollo invasivo, que no llega a formar pseudohifas (las que si se observaron en la cepa *yrr1Δ*; Domínguez-Martínez *et al.*, 2009) típicas de etapas invasivas de levaduras y hongos del ambiente.

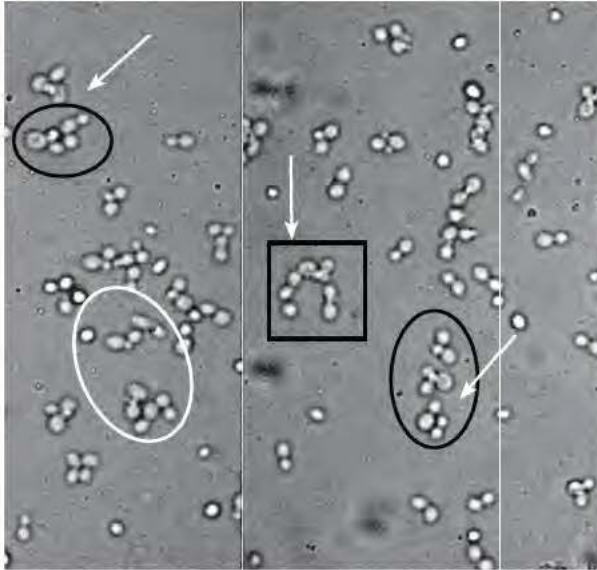


Figura 6. Cepa silvestre expuesta por 5 h al extracto

La cepa *cdalΔ* bajo las mismas condiciones, presenta una ligera disminución en la densidad celular (figura 7), aunque no hay células muertas, pero sí un número mayor de células unidas en todos los tiempos de observación. Hay muchas células en gemación, pero en mayor proporción las que tienen yemas múltiples (2 o 3) unidas a la madre (círculos oscuros). Se distinguen claramente algunos septos entre madre y yema (flecha). Algunas de las yemas son muy alargadas (círculos blancos) y/o en posición no apical, semejando nuevamente el inicio de procesos de invasión. El tamaño celular es muy variable.

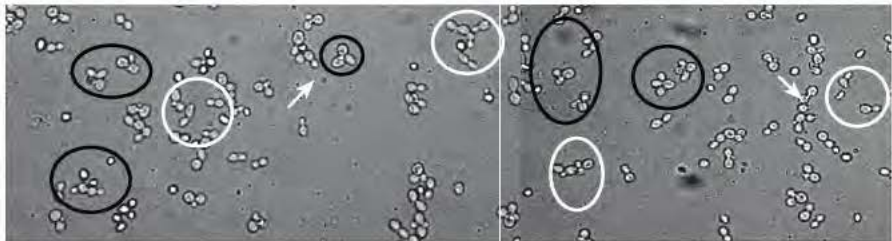


Figura 7. Mutante *cdalΔ* expuesta por 5 h a la anonacina

Conviene resaltar que si la exposición es a mayor proporción del extracto respecto al medio de cultivo (75, y 150  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ), o se mantienen por tiempos mayores a 18 h, se observan daños más severos, aun en la cepa silvestre (figura 8): las madres con más de una hija, (círculos oscuros) y con yemas no apicales (cuadro) son frecuentes, así como los agregados. Las hijas son alargadas (círculos claros). También hay células en gemación de gran tamaño (flecha), pero si bien las alteraciones morfológicas se acentúan, no se detecta ningún incremento en la mortandad (la densidad celular es grande y no hay células azules), lo que habla de la capacidad de adaptación de las células, aun a costa de impacto en la morfología.

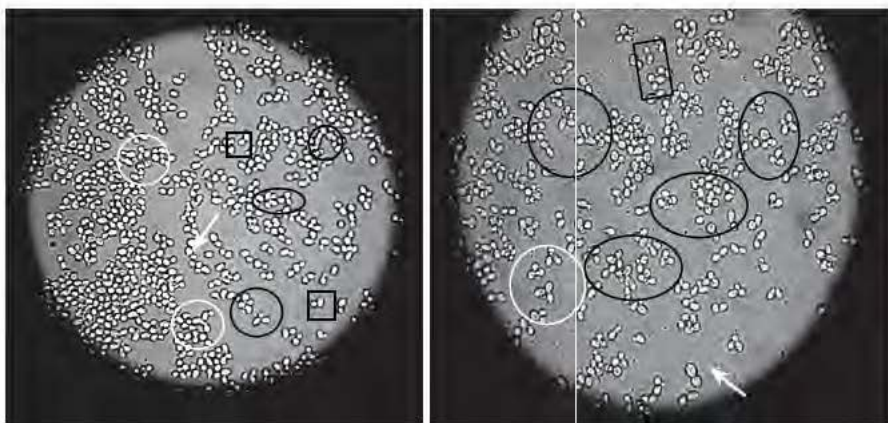


Figura 8. Células silvestres expuestas por 18 h a 75  $\mu\text{L}$  (izquierda) y 150  $\mu\text{L}$  (derecha) de anonacina por mililitro de cultivo

Todos los fenotipos encontrados, son clara confirmación de alteraciones de la gemación, en la cual participan tanto los genes de formación de pared, como los que codifican para la quitina sintetasa y quitina desacetilasa. Los defectos en la formación y resolución del septo (observable como células madre con más de una hija, y los agregados) involucran a la enzima quitina sintetasa, principalmente la producida por *Chsp2* y su regulador, *Chsp3* (Ono *op. cit.*) así como los productos de los genes de quitina desacetilasa (Christodoulidou *op. cit.*), cuya función es relevante en la libración de la yema, la cual requiere tanto la formación de septos

funcionales, como de la síntesis de la nueva pared, cuyo componente principal es la quitina. Sin embargo, la regulación involucra a genes como *FLO8*, lo que explica la formación de células madre con múltiples yemas unidas, aun en la cepa no mutada (figuras 6 y 8). Este fenotipo es inesperado en las cepas YKO Mat a, las cuales son isogénicas de la cepa BY4741-Mat-a. Está reportado que esta cepa no puede formar pseudohifas y que no presenta crecimiento invasivo debido, precisamente, a una mutación en el gene *FLO8* (Liu H. *et al.*, 1996), de modo que las anomalías son evidencia de que las acetogeninas tienen efectos pleiotrópicos, no necesariamente causados por déficit de ATP.

Tras el mecanismo de adaptación descrito (alteraciones morfológicas y de gemación, más que muerte celular) subyacen procesos moleculares a estudiar, como la regulación transcripcional de los genes mencionados, y cascadas de transducción de señales involucradas al menos, en el ciclo celular (como MAPK, vía a la que pertenece *FLO8*).

Las alteraciones morfológicas observadas de ninguna manera se pueden atribuir a daños relacionados con la presencia de deshidrogenasas alternativas, puesto que las levaduras no deben ser sensibles a las acetogeninas. Esto constituye un argumento más a favor de que las acetogeninas no son únicamente agentes desacoplantes.

## Conclusiones

Los extractos de acetogeninas provenientes de guanábana dañan las vías de diferenciación y metamorfosis, no sólo en culícidos y otros insectos (cucaracha doméstica), sino en organismos como la levadura, que requieren la biosíntesis de quitina para su desarrollo.

Las acetogeninas alteran la morfogénesis de *S. cerevisiae* de la cepa de levadura BY4741 MAT a, afectando genes de la síntesis de quitina, lo que constituye una evidencia de que el daño previamente observado a *Aedes aegypti*, *Blatella periplaneta* y *Anastrepha ludens* no sólo se debe a bloqueo del transporte de electrones y al consecuente déficit en los niveles de ATP.

El uso de cepas mutantes de levadura (BY4741 MAT a) como “organismos modelo” es adecuado, ya que en este trabajo resultó útil para demostrar que las acetogeninas:

1. No solamente bloquean el transporte electrónico mitocondrial (a nivel del Complejo I, como la rotenona), sino que
2. Afectan vías relacionadas con la biosíntesis de quitina, dado que mutantes relacionadas con esta vía desarrollan fenotipos anormales, lo que demuestra que el gen alterado está afectado por las acetogeninas.
3. Dado que las cepas usadas son haploides y no deben formar pseudohifas ni hacer crecimiento invasivo, las alteraciones morfológicas mostradas sugieren que están implicados genes como *FLO8*, que a su vez es miembro de la cascada de transducción de MAPK, relacionada con el ciclo celular (y con la gemación normal).

## Agradecimientos

Las cepas usadas en este trabajo fueron gentilmente proporcionadas por el Dr. Sergio Encarnación del Centro de Ciencias Genómicas, UNAM. El Dr. Mariano Martínez Vázquez del Instituto de Química, UNAM, realizó la determinación de acetogeninas de los extractos bioactivos. El trabajo es parte del proyecto del UVERCAEC022, financiado por PROMEP/SESI.





## Referencias

- Abe, M., Kenmochi, A., Ichimaru, N., Hamada, T., Nishioka, T. and Miyoshi, T. 2004. Essential structural features of acetogenins: role of hydroxy groups adjacent to the bis-THF rings. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14 (3): 779-782.
- Alali, F.Q., Liu, X.X. and McLaughlin, J.L. 1999. Annonaceous acetogenins: recent progress. *J. Nat. Prod.* 62: 504-540.
- Bermejo, A., Figadère, B., Zafra-Polo, M.C., Barrachina, I., Estornell, E. and Cortes, D. 2005. Acetogenins from annonaceae: recent progress in isolation, synthesis and mechanisms of action. *Nat Prod Rep.* 22 (3): 269-303.
- Bobadilla, A.M., Zavaleta, E.G., Gil, F.F. y Pollak, V.L. 2002. Efecto bioinsecticida del extracto etanólico de las semillas de *Annona cherimolia* Miller (chirimoya) y *A. muricata*, Linnaeus (guanábana), sobre larvas del IV estadio de *Anopheles sp.* *Rev. Peru Biol.* 9 (2): 64-73.
- Christodoulidou, A., Bouriotis, V. and Thireos, G. 1996. Two sporulation-specific chitin deacetylase-encoding genes are required for the ascospore wall rigidity of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 271 (49): 31420-31425.
- de Vries, S., Van Witzenburg, R., Grivell, L.A. and Marres, C.A.M. 1992. Primary structure and import pathway of the rotenone-insensitive

NADH-ubiquinone oxidoreductasa of mitochondria from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* 203: 587-592.

Degli Esposti, M.A., Ghelli Ratta, M., Cortes, D. and Estornell, E.E. 1994. Natural substances (acetogenins) from the family *Annonaceae* are powerful inhibitors of mitochondrial NADH dehydrogenase (Complex I). *Biochem J.* 301: 161-167.

Domínguez Martínez, Verónica G., Andrade Domínguez, A., Trejo Hernández, A., Ortega Jiménez, R. 2009. Estudio del mecanismo de daño por acetogeninas usando *Saccharomyces cerevisiae* como modelo eucarionte. XVI Congreso de Bioenergética y Biomembranas. Boca del Río, Veracruz. México. Pp 11-17. <http://www.smb.org.mx/>

Domínguez-Martínez, V.G., Collar Gómez, E., Atzín García, J. and Chimalpopoca, F.L. 2003. Pupicidal activity of annonacin for *Aedes aegypti* (L.) (Díptera, Culicidae). *Folia Entomológica Mexicana.* 42 (3): 349-358.

González-Coloma, A., Guadaño, A., de Inés, C., Martínez-Díaz, R. and Cortes, D. 2002. Selective action of acetogenin mitochondrial Complex I inhibitors. *Z Naturforsch.* 57c: 2018-1034.

Guadaño, A., Gutiérrez, C., de la Peña, E., Cortes, D. and González-Coloma, A. 2000. Insecticidal and mutagenic evaluation for two annonaceous acetogenins. *J. Nat. Products.* 63: 773-776.

Hamada, T., Ichimaru, N., Abe, M., Fujita, D., Kenmochi, A., Nishioka, T., Zwischer, K., Brandt, U. and Miyoshi, H. 2004. Synthesis and inhibitory action of novel acetogenin mimics with bovine heart mitochondrial complex I. *Biochemistry.* 43: 3651-3658.

He, K., Zhao, G.X., Shi, G., Zeng, L., Chao, J.F. and McLaughlin, J.L. 1997. Additional bioactive annonaceous acetogenins from *Asimina triloba* (Annonaceae). *Bioorg Med Chem.* 5 (3): 501-506.

- Liu, H., Styles, C.A. and Fink, G.R. 1996. *Saccharomyces cerevisiae* S288C has a mutation in FLO8, a gene required for filamentous growth. *Genetics*. 144 (3): 967-978.
- Londerhausen, L., Leicht, M.W., Lieb, F., Moeschler, H. and Weiss, H. 1991. Molecular mode of action of annonacines. *Journal of Pest Sciences*. 33 (4): 427-433.
- Luna Cázares, L.M., González E., A.R. y de la Cruz C., I. 2003. Actividad insecticida de *Annona diversifolia* sobre *Culex pipiens quinquefasciatus*. Memorias del V Congreso Mexicano de Etnobiología. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Estado de México. México. Pp. 99.
- Martínez Navarro, A.C. 2008. Estudio del mecanismo de acción de una acetogenina de *Annona muricata* en cucaracha (*Blattella periplaneta*). Tesis de Licenciatura. Universidad Veracruzana.
- Ono, N.T., Yabe, M., Sudoh, T., Nakajima, Yamada-Okabe, T., Arisawa, M. and Yamada-Okabe, H. 2000. The yeast Chs4 protein stimulates the trypsin sensitive activity of chitin synthase 3 through an apparent protein-protein interaction. *Microbiology*. 146: 385-391.
- Rivera Pérez, R.E., Juárez, O., Matus Ortega, M.G. y Pardo, J.P. 2005. Efecto de las quinonas sobre la NADH deshidrogenasa interna mitocondrial de *Saccharomyces cerevisiae*. Memorias del XIV Congreso de Bioenergética y Biomembranas. Sociedad Mexicana de Bioquímica, A.C. Oaxaca, Oaxaca, México. Pp. 1-7.
- Seo, B.B., Wang, J., Flotte, T.R., Yagi T. and Matsuno-Yagi, A. 2000. Use of the NADH-quinone oxidoreductase (NDII) gene of *Saccharomyces cerevisiae* as a possible cure for complex I defects in human cells. *J Biol Chem*. 275: 37774 -37778.

- Takada, M., Kuwabara, H., Nakato, A., Tanaka, H., Iwamura, Y. and Miyoshi, H. 2000. Definition of crucial structural factors of acetogenines, potent inhibitors of mitochondrial complex I. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1460: 302-310.
- Yuan, S.S., Chang, H.L., Chen, H.W., Yeh, Y.T., Kao, Y., Lin, K.H. and Wu, J. 2003. Annonacin, a mono-tetrahydrofuran acetogenin, arrest cancer cells at the G1 phase and causes cytotoxicity in a Bax and caspase-3 related pathway. *Life Sciences*. 72: 2853-2861.
- Abe, M., Kenmochi, A., Ichimaru, N., Hamada, T., Nishioka, T. and Miyoshi, T. 2004. Essential structural features of acetogenins: role of hydroxy groups adjacent to the bis-THF rings. *Bioorg. Med.Chem. Lett.* 14 (3): 779-782.
- Rivera Pérez, R.E., Juárez, O., Matus Ortega, M.G. y Pardo, J.P. 2005. Efecto de las quinonas sobre la NADH deshidrogenasa interna mitocondrial de *Saccharomyces cerevisiae*. Memorias del XIV Congreso de Bioenergética y Biomembranas. Sociedad Mexicana de Bioquímica, A.C. Oaxaca, Oaxaca, México. Pp. 1-7.
- Seo, B.B., Wang, J., Flotte, T.R., Yagi T. and Matsuno-Yagi, A. 2000. Use of the NADH-quinone oxidoreductase (NDII) gene of *Saccharomyces cerevisiae* as a possible cure for complex I defects in human cells. *J Biol Chem*. 275: 37774 –37778.
- de Vries, S., Van Witzenburg, R., Grivell, L.A. and Marres, C.A.M. 1992. Primary structure and import pathway of the rotenone-insensitive NADH-ubiquinone oxidoreductasa of mitochondria from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem*. 203: 587-592.
- Ono, N.T., Yabe, M., Sudoh, T., Nakajima, Yamada-Okabe, T., Arisawa, M. and Yamada-Okabe, H. 2000. The yeast Chs4 protein stimulates the trypsin sensitive activity of chitin synthase 3 through an apparent protein-protein interaction. *Microbiology*. 146: 385-391.

- Christodoulidou, A., Bouriotis, V. and Thireos, G. 1996. Two sporulation-specific chitin deacetylase-encoding genes are required for the ascospore wall rigidity of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 271 (49): 31420-31425.
- Liu, H., Styles, C.A. and Fink, G.R. 1996. *Saccharomyces cerevisiae* S288C has a mutation in FLO8, a gene required for filamentous growth. *Genetics.* 144 (3): 967-978.



# Formación de la unión del injerto en guanábano (*Annona muricata* L.).

Vidal Hernández, Librado<sup>1</sup>, Ruiz Bello, Romeo<sup>1</sup>  
López Moctezuma, Héctor<sup>1</sup>, Ruiz Montiel, César<sup>2</sup>  
Vidal Martínez, Nayelli Ayatzol<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Ciencias Agrícolas, Campus Xalapa,  
Universidad Veracruzana

<sup>2</sup>Instituto de Genética Forestal. Universidad Veracruzana  
Email: lvidal152@hotmail.com

## Resumen

El guanábano (*Annona muricata* L.), pertenece a la familia de las Annonaceae y es la especie más importante, ampliamente distribuida en el trópico. La formación de la unión del injerto involucra procesos que incluyen muerte de células en la intersección, adhesión de los componentes del injertos, formación de callo, puente cambial, diferenciación de callo y el establecimiento y continuidad del cámbium vascular. La deshidratación de los tejidos se realizó a través de enjuagues con etanol al 50%, 70%, 96%. Para la infiltración e inclusión las muestras se cubrieron con glicolmetacrilato y etanol absoluto (50:50 v/v); (70: 30 v/v) y glicolmetacrilato (100%). Las primeras divisiones



celulares fueron observadas entre los 3 y 6 días después de la injertación, estas divisiones se iniciaron en el portainjerto. Todas las divisiones sucesivas ocurren entre 6 y 15 días después del injertado. A los 60 días se observó la formación de una unión de callo. La actividad de las células cambiales fue restaurada y la unión aparece como una cicatriz a los 90 días. Estas nuevas células cambiales producen nuevos tejidos vasculares, xilema hacia el interior y floema hacia el exterior, estableciendo así una conexión vascular entre la púa y el portainjerto requisito fundamental para el éxito de la unión del injerto.

Palabras claves: *Unión del injerto, puente cambial, cambium vascular y cicatrización*

## Introducción

El guanábano (*Annona muricata* L.), pertenece a la familia de las *Annonaceae* y es la especie más importante, ampliamente distribuida en el trópico. Regularmente se propaga por la vía sexual, esto conduce a poblaciones muy heterogéneas, por lo que hay necesidad de conservar ciertas características genéticas y solo se logra a través del método de injerto. La formación de la unión del injerto involucra la fusión de dos unidades inicialmente independientes dentro de un sistema coherente. Los estudios anatómicos en la formación de la unión del injerto en plantas perennes han demostrado que los procesos involucrados son similares en las diferentes especies de árboles frutales. Esos procesos ha sido investigado durazno (Scaramuzzi, 1952), en manzano (Robitaille y Carlson, 1970; Soumelidou *et al.*, 1994). Los procesos incluyen muerte de células en la intersección, adhesión de los componentes del injertos, formación de callo, puente cambial, diferenciación de callo y el establecimiento y continuidad del cámbium vascular. Soule (1971), describe los procesos de la formación de la unión del injerto en mango y esta ocurre en cuatro etapas: Precallo, callo, puente cambial y la cicatrización de la unión. El grado de compatibilidad en combinaciones de injerto fue determinado de acuerdo a Mosse y Herrero (1951) por investigaciones de estructura anatómica en la unión del injerto en 4 grupos:

Unión perfecta: La línea entre los tejidos del injerto puede apenas ser vista en ambas corteza y tejidos de madera y en la unión del injerto está libre de una capa necrótica

Unión buena: La línea entre el sector injertado puede ser visto pero la corteza y tejidos de madera son continuos.

Unión de injerto con corteza no continua: Los tejidos de madera y la unión del injerto, es como en el segundo grupo, sin embargo los tejidos de la corteza y la unión del injerto no es continua, presentando una capa de corcho de color oscuro en la intersección del injerto.

Unión del injerto con tejidos de corteza y madera no continuo: La madera es como en el grupo 2. Células del parénquima vital no lignificado es hallado en tejidos de madera que pueden también ser vistas en un anillo con un año de edad.

Cuando se realizan experimentos para probar la eficiencia de un determinado tipo de injerto, normalmente no se consideran las características morfológicas y anatómicas de la especie a pesar de que diversos autores han demostrado que es común encontrar plantas cuyo cámbium vascular posee irregularidades morfológicas, falla sectoriales o que presentan un periodo de letargo en la cual la actividad meristemática es prácticamente nula. El tejido más importante que participa en la unión del injerto y la regeneración de tejido vascular es el cámbium, tejido meristemático que debe ser estudiado para conocer su actividad morfológica y anatómica. En guanábano, se ha observado un bajo rendimiento de los injertos, esto a pesar de las habilidades y experiencia del injertador. Se desconoce que factor (es), son los responsables de este comportamiento.

## Objetivo

El objetivo principal fue estudiar la secuencia de eventos en la cicatrización de la unión de injerto en guanábano.

## Método

### *Localización del experimento*

Este trabajo se realizó en condiciones de vivero en el Campo Experimental “La Bandera” perteneciente a la Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad Veracruzana, ubicado en Actopan, Veracruz. Su localización geográfica es: 19° 31' de Latitud Norte y 96° 36' de Longitud Oeste y 400 msnm. De acuerdo con la clasificación de Köppen modificada por García (1988) el clima es del tipo Aw<sup>o</sup>(w)(i<sup>1</sup>), corresponde a un clima caliente subhúmedo, con régimen de lluvias en verano. La temperatura promedio es de 24.5 °C y un promedio de precipitación anual de 1026 mm.

### *Injerto*

Las plántulas fueron obtenidas de semillas de frutos de árboles criollos de la región. Las semillas fueron depositadas en semilleros y después de 60 días fueron ubicadas en un vivero para su desarrollo. Ocho meses después alcanzaron el diámetro apropiado para su injertación. El proceso del injertado se realizó el 7 de febrero de 2004. El método empleado fue el enchapado lateral con púas subterminal, descrito por Vidal (1993).

### *Muestreo y microtecnia*

La recolección de la muestra se realizó con base a un calendario de muestreo (Cuadro 1).

Cuadro 1. Periodo de muestreos de la unión del injerto del guanábano en la fase de campo

1°	Muestreo	9 de febrero	2004
2°	Muestreo	11 de febrero	2004
3°	Muestreo	13 de febrero	2004
4°	Muestreo	15 de febrero	2004
5°	Muestreo	17 de febrero	2004
6°	Muestreo	19 de febrero	2004
7°	Muestreo	21 de febrero	2004
8°	Muestreo	24 de febrero	2004
9°	Muestreo	9 de marzo	2004
10°	Muestreo	16 de marzo	2004
11°	Muestreo	25 de marzo	2004
12°	Muestreo	2 de abril	2004
13°	Muestreo	9 de abril	2004
14°	Muestreo	9 de mayo	2004

Se recolectaron dos muestras por cada fecha de muestreo. Las muestras consistieron únicamente de la zona de unión de cada uno de los injertos. Se tomaron 6 cm de longitud de la zona de unión de injerto. Cada una de las secciones de unión se sumergió en una mezcla de glutaraldehído y Buffer de Fosfato, de esta manera las muestras se transportaron al laboratorio. La deshidratación de los tejidos se realizó a través de enjuagues con etanol al 50%, 70%, 96% y finalmente con etanol absoluto al 100%. Cada una de estas fases tuvieron un intervalo de 24 h. La infiltración e inclusión se realizó de la siguiente manera: las muestras se colocaron en pequeños viales de 6 mL de capacidad. Estos se cubrieron con glicolmetacrilato y etanol absoluto (50:50 v/v); (70: 30 v/v) y glicolmetacrilato (100%) por una semana respectivamente. Las muestras ya infiltradas se depositaron en cápsulas de gel # 00 a las que se le agregó la mezcla de glicolmetacrilato y peróxido de benzoilo (99:1 v/v) (Ruzin, 1999), éstas se dejaron reposar por dos días. Posteriormente se colocaron dentro de una estufa a 40°C por 48 horas. Para el proceso de montaje y corte, las muestras se colocaron sobre pequeños trozos de madera con ayuda de ciano-crilato, luego se procedió a los cortes

anatómicos. Con un micrótopo rotatorio Marca Leica 2125RT las secciones de muestras fueron cortadas a un grosor de 10  $\mu\text{m}$ . Los cortes se depositaron sobre portaobjetos y éstos se colocaron sobre una plancha a 40°C por 15 min, para el proceso de secado de las muestras. La tinción de las muestras se realizó con azul de toluidine y posteriormente éstas se montaron con resina sintética y xilol. Las observaciones se realizaron en un fotomicroscopio y éstas se analizaron posteriormente.

## Resultados y discusión

La afinidad entre el portainjerto y el injerto representa una serie de reacciones bioquímicas, fisiológicas y morfológicas en plantas injertadas. Cuando esta afinidad es con respecto a la compatibilidad, se observa una interacción positiva y un desarrollo armónico entre el portainjerto e injerto. Una vez realizado el injerto y en pleno contacto el cámbium vascular de la púa y del portainjerto, se inicia la división celular del parénquima para formar callo en ambos componentes en la región cambial. Por esta razón, es importante la presión hecha a través del amarre con el plástico, esto permite la firme unión de ambos cámbium de los componentes restaurando la actividad cambial de manera normal. Sobre la sobrevivencia del injerto, la yema terminal inició la brotación entre los 12 y 15 días después de la injertación. Se observó un renuevo prematuro de la yema, esto ocurrió cuando la unión cambial no había sido establecida. Esto podría ser un indicador confiable de la unión cambial, estableciéndose con ello un éxito en la injertación. Las primeras divisiones celulares fueron observadas entre los 3 y 6 días después de la injertación, estas divisiones se iniciaron principalmente en el portainjerto. La formación del callo después de la injertación usualmente ocurre primero en el portainjerto y más tarde en el injerto. Esto quizá se atribuya a las diferencias en las condiciones fisiológicas que prevalece en el injerto y portainjerto, como un resultado en donde el injerto ha sido completamente aislado de fuentes nutrimentales y agua, en tanto que el portainjerto permanece como una planta funcional. La principal característica anatómica en una sección transversal en tallo de joven de guanábano esta ilustrado en la (figura 1).

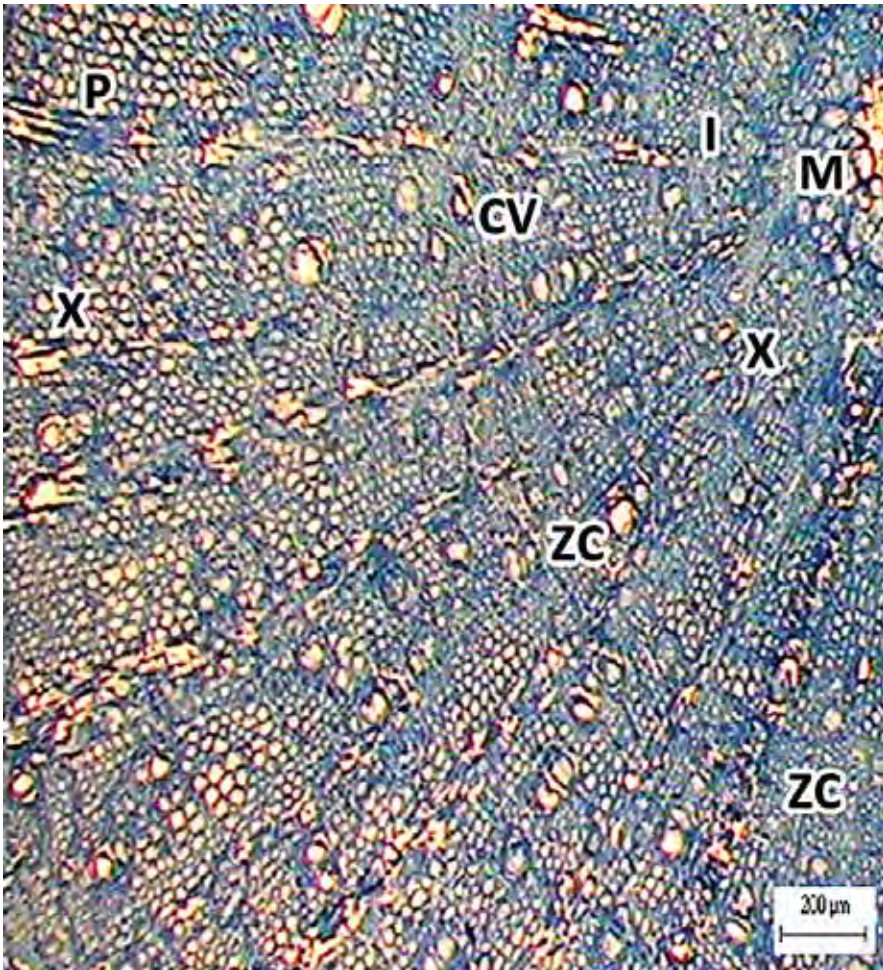


Figura 1. Corte transversal de la unión del injerto del guanábano 3 días después de la injertación. M: Médula; X: Xilema; F: Floema; ZC: Zona de conexión; CV: Cámbium Vascular; I: Injerto; P: Portainjerto

La unión del injerto en ambos componentes, estuvo bien ensambladas, un buen contacto se estableció entre el injerto y el portainjerto. Todas las divisiones celulares sucesivas ocurren entre 6 y 15 días después del injertado, esto condujo a la formación de un callo entrecruzado entre los dos componentes. Los primeros 15 días después de la

injertación se observó la formación de una unión de callo. Fragmentos de células lesionadas durante la operación dieron origen a la formación de una capa necrótica sobre la intersección de la unión. Los estudios en la formación de la unión del injerto en guanábano han revelado algunas observaciones interesantes sobre la división celular del callo en ambos componentes. La exposición de los tejidos vivos de la plantas por efecto de la remoción del material alrededor de la zona de afectación durante el proceso de la injertación, estimula la formación de callo. Reemplazando el tejido que ha sido removido y asentando firmemente el sitio de unión, restaurando nuevamente la actividad normal. Las células de parénquima se entremezclan, luego se presenta una diferenciación de las células del parénquima del callo en nuevas células cambiales conectándose con el cámbium original del portainjerto y de la púa, para finalmente producir tejidos vasculares por el nuevo cámbium, permitiendo así el paso de nutrimentos y agua entre el portainjerto y la púa (Simons y Chu, 1985). Células diferenciadas e inmaduras presentes en la zona de intersección fueron distorsionadas, presumiblemente como resultado de la presión durante el amarre del injerto. El daño celular contribuyó a la formación de la capa necrótica sobre el corte de la intersección. Al principio de la formación del callo fragmentado la capa necrótica fue gradualmente absorbida y con el tiempo esta desapareció. Stoddard y McCully (1979), refirieron a la muerte de células, material entre los componentes del injerto como la “capa necrótica” y Copes (1969) la llamó “capa de contacto”.

Es evidente que este tipo de estructura es de ocurrencia normal en el desarrollo de la unión del injerto. Se cree que está formada de pared celular y otros desechos según varios autores.

La presencia ocasional de las células del callo en la capa necrótica indica que las condiciones en la capa no es detrimental sobre el desarrollo del callo. De los diversos nombres atribuidos a la capa, la “capa necrótica” parece más apropiada, además la capa en guanábano consistió de muerte de células y remanente de citoplasma, el término también indica la poca participación activa en la formación de la unión. La capa necrótica desapareció y fue absorbida presumiblemente por la proliferación de callo durante el proceso de la formación de la unión

(Stoddard y McCully, 1979). Todos los tejidos vivos fueron dañados durante el proceso de la injertación e involucrados en la formación del callo. La primera división celular en respuesta a las lesiones fue observada 6 días después de la injertación y se observó en ese mismo sitio células del parénquima cortical y células de los radios del floema en el portainjerto (figura 2).

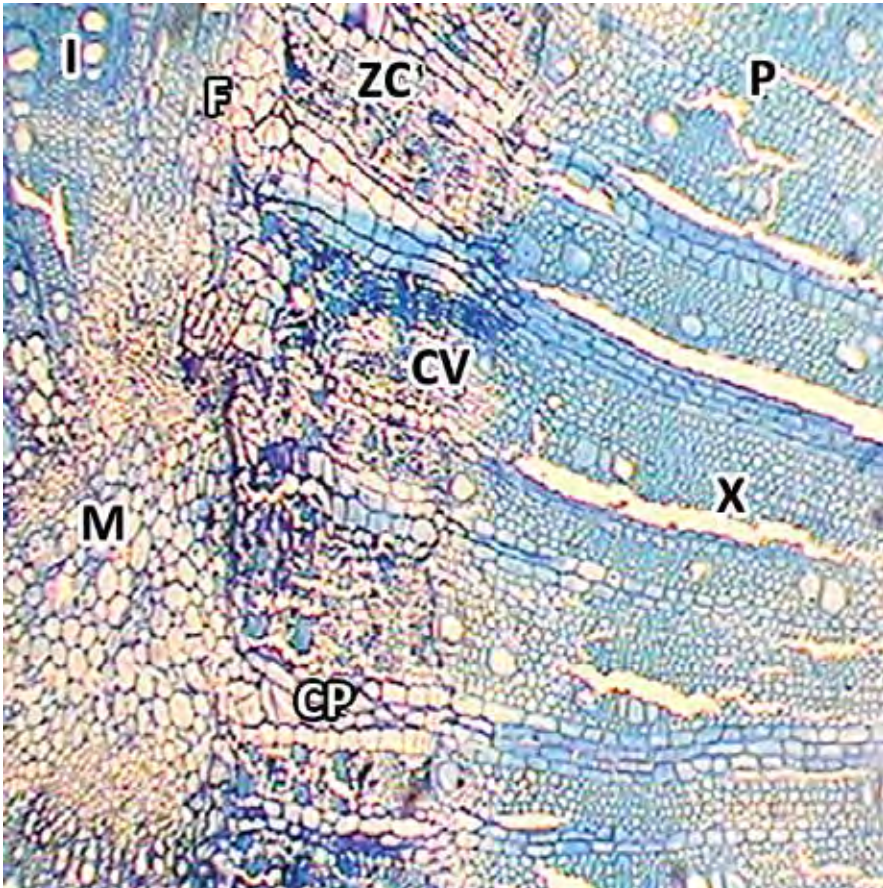


Figura 2. Corte transversal de la unión del injerto del guanábano 6 días después de la injertación. M: Médula; X: Xilema; F: Floema; ZC: Zona de conexión; CV: Cámbium Vascular; CP: Células del parénquima; I: Injerto; P: Portainjerto



Los estímulos que causaron la reacción en la superficie lesionada se extendieron más allá de la herida y las células de la médula también empezaron a alargarse y a dividirse en respuesta a las heridas. Más tarde el callo fue formado por células inmaduras del xilema secundario cerca del corte de la intersección de los componentes del injerto, así como de los radios celulares. Más callo fue producido y el tejido necrótico fue desapareciendo hacia dentro de la intersección del injerto/portainjerto hasta hacer contacto con el tejido necrótico opuesto o tejido de callo. La fusión de callo del portainjerto e injerto fue obstruida en áreas localizadas por esos fragmentos de tejidos necróticos. Después de 37 días se observó un buen establecimiento de filas de células de callo, este se presentó perpendicular al corte original. Ese puente en la unión de la corteza se extendió hacia la zona de la médula (figura 3). El injerto fue realmente expandido a los 37 días después de la injertación y mucho tiempo después con la continuidad vascular una vez prendido. Estas observaciones concuerdan con Herrero (1951) quién observó una capa de tejido no diferenciado en la unión del injerto entre ciruelo (*Prunus* spp) y pera (*Pyrus* spp) aun así los árboles fueron normales por muchos años.

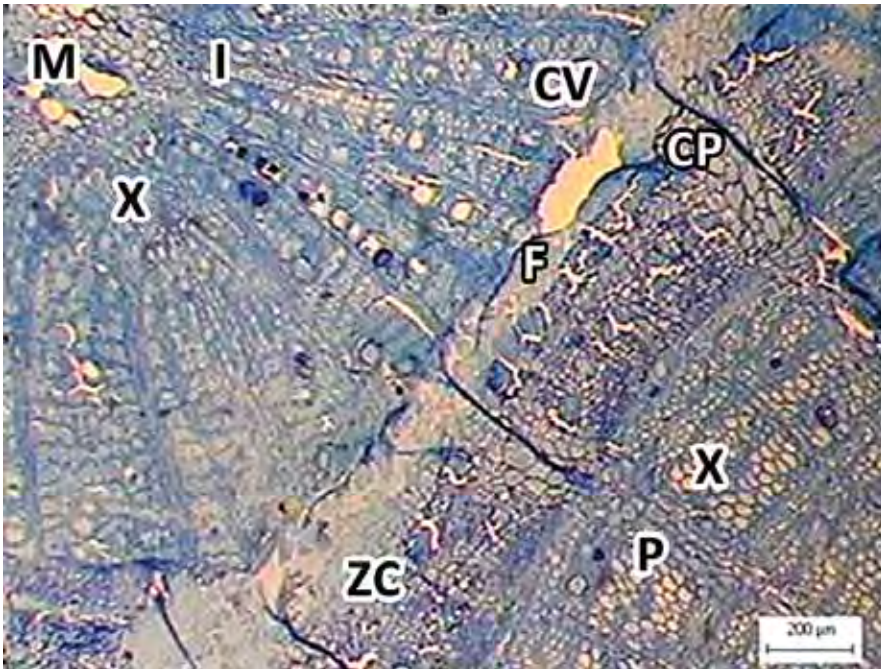


Figura 3. Corte transversal de la unión del injerto del guanábano 37 días después de la injertación. M: Médula; X: Xilema; F: Floema; ZC: Zona de conexión; CV: Cámbium Vascular; CP: Células del parénquima; I: Injerto y P: Portainjerto

Repetidas divisiones periclinales acompañadas con la expansión celular resultaron en la formación de un abanico en la región del callo consistente en diversas columnas de células a menudo originado en la médula debajo de la superficie de la herida. Como la proliferación del callo procedió, el espacio entre el cámbium vascular del injerto y del portainjerto fue rellenado con mezcla de callo. La extensión del cámbium vascular permaneció desde el borde hacia el final de la separación del viejo cámbium vascular de ambos componentes, y este fue continuo hasta restaurarse 60 días después. El cámbium vascular demostró haber contribuido muy escasamente en la producción del callo en este estudio. Estas observaciones están de acuerdo con Mergen (1954), quien observó que la mayor parte del callo fue producido por tejidos fuera de la zona del cámbium vascular. Buck (1954), sugirió que el cámbium

vascular no contribuyó en el proceso de cicatrización del callo. La formación de callo en células de radios del xilema ha sido reportada en *Pinus elliotii* (Mergen, 1954) y *P. ponderosa* (Harris y Barnett, 1975). Copes (1969), observó que el desarrollo del callo en *Pseudotsuga menziesii* estuvo asociado principalmente a los radios y las células del parénquima del floema localizados en la zona de entrecruzamiento y a las células cribosas no funcionales. Barnett y Weatherhead (1988) observaron en injertos de coníferas que el callo se originó de las células de radios del parénquima, así como del cámbium vascular. En contraste Braun (1958) y Fuji y Nito (1972) observaron que el callo fue producido principalmente por el cámbium vascular.

El establecimiento de la unión cambial a través del callo entre el portainjerto e injerto estuvo acompañado por la formación de una peridermis cubriendo el corte de la intersección. La peridermis es importante durante la formación del injerto, además protege a la unión contra parásitos invasores y otros efectos externos (Copes, 1969). Además la continuidad vascular entre el injerto y portainjerto asegura un sistema más eficiente para el transporte de agua y nutrimentos entre ambas partes; 60 días después la capa necrótica fue totalmente eliminada y la línea del injerto fue borrada por el callo en la intersección (figura 4).

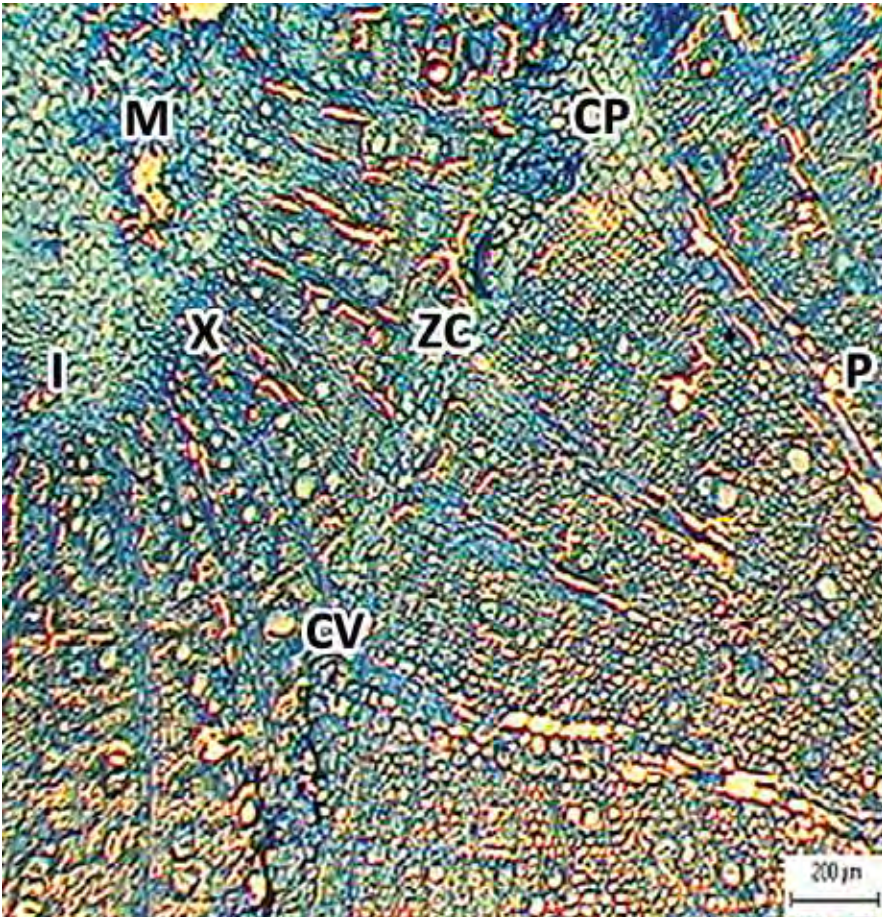


Figura 4. Corte transversal de la unión del injerto del guanábano 60 días después de la injertación. M: Médula; X: Xilema; F: Floema; ZC: Zona de conexión; CV: Cámbium Vascular; CP: Células del parénquima; I: Injerto y P: Portainjerto

La actividad de las células cambiales fue restaurada y la unión aparece como una cicatriz a los 90 días. Estas nuevas células cambiales producen nuevos tejidos vasculares, xilema hacia el interior y floema hacia el exterior, estableciendo así una conexión vascular (figuras 5 y 6).

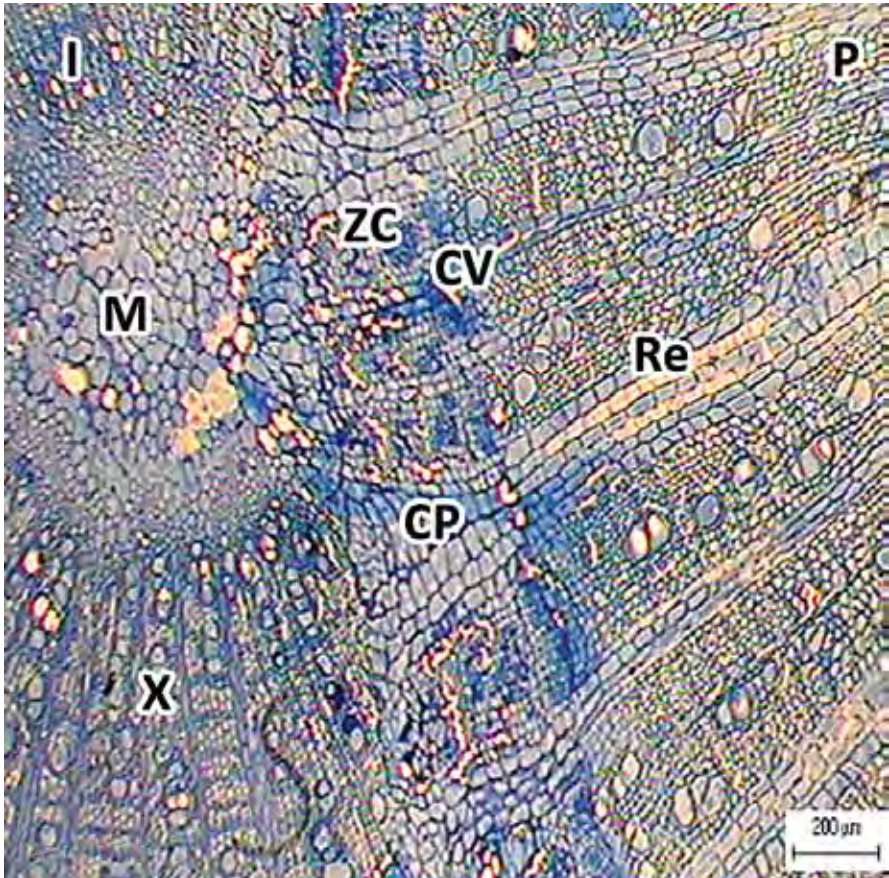


Figura 5. Corte transversal de la unión del injerto del guanábano 90 días después de la injertación. M: Médula; CV: Cambium Vascular; X: Xilema; I: Injerto; P: Portainjerto; ZC: Zona de conexión; CP: Células del parénquima y Re: Radios expandidos

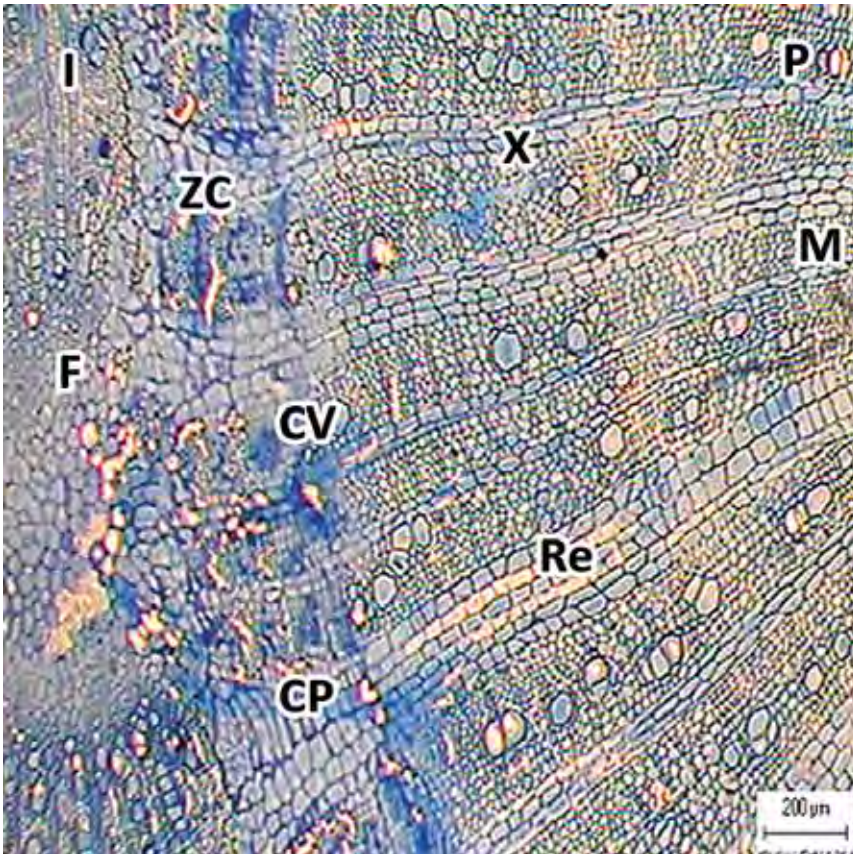


Figura 6. Corte transversal de la unión del injerto del guanábano 90 días después de la injertación. M: Médula; X: Xilema; F: Floema; ZC: Zona de conexión; CV: Cámbium Vascular; CP: Células del parénquima; I: Injerto; P: Portainjerto y Re: Radios expandidos

## Conclusiones

1. Inicialmente se observó una capa necrótica en la zona de intersección, presumiblemente ocasionada por la operación durante los corte en ambos componentes, esta capa con el tiempo fue absorbida por la formación del callo en esa zona, quedando aislada dentro del nuevo tejido.

2. Se observó una división celular activa y continua de las células del parénquima, esto dio origen a una proliferación de callo que cubrió los espacios entre el cámbium vascular del injerto y del portainjerto.
3. Se observó que la formación del callo no fue limitada por algún tejido en particular. La médula fue un sitio de formación de callo, así como los radios y las células del parénquima del floema localizadas en la zona de conexión. Este resultado confirma la totipotencia de las células parenquimatosas.
4. La formación de callo después de la injertación usualmente ocurrió primero en el portainjerto y más tarde en el injerto.
5. Posterior a la formación del callo, producto de las divisiones celulares se presentó la diferenciación celular, para formar el tejido vascular que comprende al xilema y floema.
6. El cámbium vascular demostró haber contribuido muy escasamente en la producción de callo en este estudio.

## Referencias

- Barnett, J.R and Weatherhead, I. 1988. Graft formation in Sitka spruce: A scanning electron microscope study. *Annls of Botany*. 61: 581-587.
- Braun, H. J. 1958. Die normalen verwachsungsvorgange nach Pfropfung von Laubbaumen II. Verfahren des seitlichen anplattens und der kopulation. *Zeitschrift für Botanik*. 46: 309-380.
- Buck, G. J. 1954. The histology of the bud graft union in roses. *Journal of Science*. 28 (4): 587-602.
- Copes, D. L. 1969. Graft union formation in Douglas-fir. *American Journal of Botany*. 56: 285-289.
- Fuji, T and Nito, N. 1972. Studies on the compatibility of grafting fruit trees. I. Callus fusion between the rootstock and scion. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*. 41: 1-10.
- García, E. 1988. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Koopen. Instituto de Geografía. UNAM. 246 pp.
- Harris, J.M and Barnett, J.R. 1975. Differential callus nodules in resin pockets of *Pinus ponderosa* Laws. *Journal of Forestry Science*. 5: 226-229.



- Herrero, J. 1951. Studies of compatible and incompatible graft combinations with special reference to hardy fruit trees. *Journal of Horticultural Science*. 26: 186-237.
- Mergen, F. 1954. Anatomical study of slash pine graft unions. *Journal of the Florida Academy of Science*. 17 (4): 237-245.
- Mosse, B. and Herrero, J., 1951. Studies on incompatibility between some pear and quince grafos. *Jour. Hort. Sci.* 26 (3): 240-245.
- Robitaille, H. A. and Carlson, R. 1970. Graft union behaviour of certain species of malus and prunus. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 95: 113-1134.
- Ruzin, S. E. 1999. Plant microtechnique and microscopy. Oxford University Press. pp. 61-69.
- Scaramuzzi, F. 1952. Le basi istogenetiche dell'innesto 'ad occhio'. Ricerche sul Pesco. *Annali dell' Istituto Sperimentale Agronomico*. 6: 517-537.
- Simons, R.K and Chù, M.C. 1985. Graft union characteristics of M26 apple rootstock combined with 'Red Delicious' strains. Morphological and anatomical development. *Scienttia Hort.* 25: 48-59.
- Soule, J. 1971. Anatomy of the bud-union in mango (*Mangifera indica* L.). *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 96: 380-383.
- Stoddard, F.L., and McCully, M.E. 1979. Histology of the development of the development of the graft union in pea roots. *Canadian Journal of Botany*. 57: 1486-1501.

Soumelidou, K., Battey, N.H., John, P. and Barnett, J.R. 1994. The anatomy of the developing bud union and its relationship to dwarfing apple. *Annals of Botany*. 74: 605-611.

Vidal H, L. 1993. La Guanábana. Publicación Técnica Num. 2. Facultad de Ciencias Agrícolas. Zona Tuxpan. Universidad Veracruzana. Veracruz, México. 16 pp.



## VII. *Annona purpurea* Moc. & Sessé ex Dunal



Foto: Alejandro Martínez Mena



# *Annona purpurea* Moc. & Sessé ex Dunal y su actividad ansiolítica

Rejón-Orantes, José del Carmen<sup>1</sup>,  
González-Esquinca, Alma Rosa<sup>2</sup>,  
Roldan Roldan, Gabriel<sup>3</sup>, Pérez de la Mora, Miguel<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio Experimental de Farmacobiología  
Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Chiapas

<sup>2</sup>Laboratorio de Fisiología y Química Vegetal  
Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas

<sup>3</sup>Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina  
Universidad Nacional Autónoma de México

<sup>4</sup>Departamento de Biofísica, Instituto de Fisiología Celular  
Universidad Nacional Autónoma de México

## Resumen

Las plantas del género *Annona* se emplean como recursos herbolarios por diversas culturas. En México, la *Annona purpurea* se emplea con fines curativos; el jugo del fruto en ayunas sirve para la lepra, la semilla es insecticida y la raíz vermífuga (Martínez, 1982, citado por González 1996); el jugo del fruto se usa contra fiebres y resfriados (Del Amo, 1979; Mendieta y Del Amo, 1981). Se estudió la acti-

vidad farmacológica de los extractos alcaloidal total y hexánico de raíz de *Annona purpurea* mediante las pruebas de laberinto elevado en forma de +, hipnosis inducida por pentobarbital, campo abierto y rotarod, así mismo se evaluó su toxicidad. En el laberinto elevado en forma de + ambos extractos no incrementaron la entrada de los animales a los brazos abiertos del laberinto ni el tiempo de permanencia en ellos. En contraste, inyectados intraperitonealmente tuvieron efecto en la conducta de los animales en la prueba de hipnosis inducida por pentobarbital, el extracto hexánico extendió sus efectos en la actividad locomotriz y la coordinación motora y demostró tener su  $DL_{50}$  con la dosis de 50 mg/Kg. El extracto alcaloidal no modificó estas dos pruebas, tampoco fue tóxico.

En conclusión, los resultados anteriores sugieren que los extractos alcaloidal y hexánico carecen de actividad ansiolítica, no obstante poseen efectos depresores en el SNC y que probablemente dichos efectos estén mediados a nivel del sitio de unión de las benzodiazepinas en el receptor  $GABA_A$ , ya que la annomontina, presente en el extracto alcaloidal tiene efectos a este nivel.

Palabras clave: *Annona purpurea*, extractos, efecto ansiolítico

## Introducción

Los extractos de anonas de diferentes órganos son usados en la medicina tradicional, algunos de ellos por sus efectos en el sistema nervioso central (SNC). Los frutos y las infusiones obtenidas de las semillas, las hojas y la corteza se les atribuyen propiedades sedativas, hipnóticas y ansiolíticas (Bourne y Egbe, 1979; Gupta, 1995; Hasrat *et al.*, 1997; Caparros-Lefebvre y Elbaz, 1999). Entre las actividades biológicas de este género sobre el SNC se documenta su efecto sobre sistemas de receptores  $GABA$ érgicos, serotoninérgicos y dopaminérgicos. De estos trabajos, se sabe que la administración de los extractos etanólicos de hojas de la *Annona diversifolia* y *Annona muricata* a ratones reduce significativamente la incidencia de las convulsiones y la mortalidad inducidas por pentilnetetrazol (PTZ) (González-Trujano *et al.*, 1998; N'Gouemo *et al.*, 1998);

en otras pruebas los resultados obtenidos con extractos de *A. diversifolia*, demuestran que el tiempo de sueño se prolonga cuando se realiza la prueba de hipnosis inducida por pentobarbital y afecta la coordinación motriz en las pruebas del rodillo rodante y nado forzado, indicando un efecto depresor en el SNC (Morais *et al.*, 1998), estos hallazgos llevaron al aislamiento de una cetona alifática, la palmitona, obtenida del extracto de las hojas de esta planta, que demostró ser la responsable de al menos uno de sus efectos, el anticonvulsivo, aunque el mecanismo de acción de la palmitona no está esclarecido, se sugiere que podría estar involucrado al receptor GABA<sub>A</sub> (González-Trujano, 2001).

También se demostró que el extracto hexánico (EH) de las hojas de *Annona cherimola* tiene efectos ansiolíticos en dos modelos no condicionados para estudiar la ansiedad en ratones; en la prueba de la caja luz / oscuridad y en la de enterramiento defensivo, este efecto fue bloqueado en ambas pruebas por la administración de picrotoxina, un antagonista específico de los receptores GABA<sub>A</sub> y fue sinergizado en la prueba de enterramiento defensivo por la administración de mucinol, un agonista de los receptores GABA<sub>A</sub> concluyendo que el efecto ansiolítico del EH de las hojas de *Annona cherimola* está mediado por una interacción con el sistema de receptores GABA<sub>A</sub> (López-Rubalcava, 2006). Estas referencias aunadas a las etnobotánicas generaron el interés para estudiar los posibles efectos ansiolíticos de la *Annona purpurea*, conocer sus moléculas bioactivas y tratar de esclarecer el o los mecanismos neuronales que explicarían su efecto.

## Método

La raíz de la *A. purpurea* fue recolectada en septiembre de 2005, en Hermenegildo Galeana, municipio de Ocozocoautla, estado de Chiapas, México y depositada con el no. 26580 en el herbario Eizi Matuda (HEM) de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas.

### *Extracto alcaloidal total*

La extracción de alcaloides totales se realizó de acuerdo al procedimiento reportado por González-Esquinca (2001). Para este propósito se se-



caron y molieron finamente 2,500 g de raíces a temperatura ambiente. El material obtenido se impregnó con una solución saturada de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , y se le dejó secar a temperatura ambiente. Los alcaloides fueron extraídos agitando este material por una hora con 900 mL de  $\text{CHCl}_3$ , el proceso de extracción fue repetido una vez más y al final ambas extracciones combinadas fueron filtradas y concentradas a un volumen de 500 mL. El extracto clorofórmico concentrado fue lavado con agua destilada (500 mL/3 veces) y extraído dos veces con 2,000 mL de HCl 1N en cada ocasión. La fase ácida resultante de ambas extracciones fue alcalinizada (pH 9.5) con una solución saturada de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  y extraída nuevamente con 1,500 mL de  $\text{CHCl}_3$ . Finalmente, el extracto cloroformico obtenido en esta última extracción fue secado con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro y concentrado por evaporación a 45°C. El rendimiento obtenido fue de 1.1 g de alcaloides totales. Todos los pasos fueron monitoreados con el reactivo de Dragendorff.

### ***Extracto hexánico***

100 g de raíz molida de *A. purpurea* se empacaron en cartuchos de papel filtro que se colocaron en un soxhlet y se extrajeron a reflujo con hexano durante 8 h continuas. Posteriormente se filtró y el extracto hexánico obtenido se secó con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro y se concentró por evaporación a 45°C.

### ***Animales***

Se trabajó con ratones machos BALB/c de entre 25 hasta 30 g de peso. Los animales fueron criados en el Bioterio de la Facultad de Medicina de la UNAM, se hospedaron en grupos de 6 animales en cajas de polí-carbonato (44x21x21) y fueron mantenidos a temperatura de 21°C, con ciclos luz-oscuridad de 12:12 h, agua y comida a libre disposición.

### ***Evaluación conductual***

Los extractos fueron suspendidos en polietilenglicol 400 + ácido cítrico (4 g/5 mg) en 10 mL de  $\text{H}_2\text{O}$ . Todos los compuestos utilizados en este

estudio fueron inyectados por la vía intraperitoneal (i.p.) a un volumen por dosis de 10 mL/Kg. Los animales del grupo control recibieron una cantidad igual del vehículo. Se utilizaron grupos desde 5 hasta 7 ratones en todos los experimentos.

Los experimentos conductuales fueron llevados a cabo en ausencia del experimentador en un cuarto sonoamortiguado, con la luz y la temperatura controlada, con facilidades para la videograbación. En todos los casos la cámara de video fue colocada por encima de los aparatos de evaluación conductual, con excepción de la prueba de caja luz / oscuridad y la plataforma agujereada donde fue colocada en un plano horizontal. Todas las evaluaciones fueron realizadas entre las 10:00-14:00 h. Todos los aparatos de las pruebas fueron lavados con detergente después de cada prueba. La constitución de los grupos de experimentación y de evaluación de conducta fue hecha al azar por un observador quien no conocía las condiciones experimentales.

### ***Toxicidad***

Diferentes dosis de los extractos fueron administrados por la vía i.p.; para los alcaloides totales fueron de 3.2, 12.5, 25 y 50 mg/Kg y para los hexánicos de 0.39, 1.56, 3.6, 12.5, 25, 50 y 100 mg/Kg. La mortalidad de los ratones fue registrada por 48 h (Morais *et al.*, 1998).

### **Pruebas conductuales**

#### ***Prueba de campo abierto***

Este método es usado para evaluar la actividad exploratoria del ratón (Archer, 1973), es posible determinar la disminución o incremento en la actividad locomotriz. Se realiza en una caja de vidrio (con paredes y piso transparente de 48 x 48 x 30 cm) cuyo piso está dividido con líneas pintadas de color negro formando cuadros de 12 x 12 cm, el ratón fue colocado en el centro de la caja y su actividad se registró por un periodo de 5 min. Un observador ciego a los tratamientos registró el número veces que las líneas fueron cruzadas (actividad locomotriz horizontal) y los

alzamientos (número de veces que el ratón permaneció erecto sobre sus patas traseras, actividad locomotriz vertical) (Silvania *et al.*, 2004). Para descartar una posible influencia de los tratamientos sobre la actividad locomotriz, una disminución en el número de líneas cruzadas o de alzamientos, se consideró como una disminución en la actividad locomotriz.

### ***Prueba del rodillo rodante***

La integridad de la coordinación motriz fue valorada con el aparato del rodillo rodante. Los ratones fueron previamente entrenados a permanecer en el rodillo rodante (3 cm de diámetro), rotando a una velocidad de 8 rpm, durante 3 min. Para la prueba los animales se colocaron en el rodillo rodante y se contaron las caídas que el ratón experimentó durante la prueba (3 min) (Sugimoto *et al.*, 2008).

### ***Prueba de hipnosis inducida por pentobarbital***

El potencial efecto sedativo de las sustancias en estudio fue evaluado estudiando sus efectos sobre las acciones hipnóticas del pentobarbital. El pentobarbital fue administrado (42 mg/Kg, i.p.) 30 min después de la inyección de las sustancias en estudio. Fue estudiada tanto la latencia, considerada como el tiempo transcurrido desde la administración del pentobarbital a la pérdida del reflejo de enderezamiento, así como la duración del sueño, evaluado como el tiempo que transcurre desde la pérdida hasta la recuperación del reflejo de enderezamiento (González-Trujano, 2001).

### ***Prueba del laberinto elevado en forma de +***

El laberinto utilizado en este trabajo es similar al utilizado por Lister (1987) para medir la actividad ansiolítica en el ratón. El laberinto consistió de dos brazos abiertos (30 cm x 5 cm) y dos cerrados (30 cm x 5 cm x 15 cm), que se interceptan en una plataforma central (5 cm x 5 cm). El laberinto se construyó con acrílico blanco opaco y elevado del piso a una altura de 40 cm. Los brazos abiertos contaron con un peque-

ño borde (2 mm) que se extendió a lo largo de su periferia. Al inicio de la prueba el ratón se colocó en la plataforma central viendo hacia un brazo abierto, y se registró durante cinco minutos el número de entradas y el tiempo de permanencia en los brazos abiertos. Una entrada dentro de un brazo del laberinto fue considerada únicamente cuando las cuatro patas del ratón fueron colocadas dentro del brazo respectivo (Pellow *et al.*, 1985). Se calculó el porcentaje del tiempo de permanencia en los brazos abiertos (Tiempo en brazos abiertos/tiempo en brazos abiertos + cerrados x100). Se ha demostrado que la disminución de la actividad exploratoria a los brazos abiertos es causada por un miedo innato de los roedores a los espacios abiertos debido a la ausencia de estímulos tigmotácticos (Grundmann *et al.*, 2008; Treit *et al.*, 1993) y que el uso de compuestos ansiolíticos incrementa la actividad exploratoria y el tiempo de permanencia en los brazos abiertos.

### Análisis estadístico

Los resultados fueron evaluados usando la prueba de ANOVA de una vía, seguida de la prueba poshoc de Newman-Keuls para comparaciones múltiples cuando fue requerido. Los resultados son expresados como la media  $\pm$  SEM de 5-7 ratones por grupo. Un valor de alfa de  $P < 0.05$  fue considerado estadísticamente significativo. Los parámetros fueron procesados usando el software GraphPad Prism statistical.

### Resultados

#### *Extracto alcaloidal total*

##### *Toxicidad*

Con dosis de 3.2, 12.5, 25 y 50 mg/Kg i.p. no se registró ninguna mortalidad a las 48 h de administradas.

### *Prueba de campo abierto*

Con el extracto alcaloidal total no se observaron diferencias significativas tanto en el número de líneas cruzadas ( $F_{4,25}=1.314$ ;  $P > 0.05$ ) como en el número de alzamientos (rearrings) ( $F_{4,25}=1.017$ ;  $P > 0.05$ ) entre los ratones tratados (3.2, 12.5, 25 y 50 mg/K) y aquéllos a los que sólo se les administró el vehículo (cuadro 1).

Cuadro 1. Efectos de la administración (i.p.) del extracto alcaloidal total sobre la locomoción del ratón en la prueba de campo abierto

Tratamientos mg/Kg	Número líneas cruzadas	Número de alzamientos
Vehículo	92.8± 11.3	17.1± 5.4
3.12	129.1± 18.1	26.6 ± 5.8
12.5	81.1± 21.2	17.5 ± 6.8
25.0	73.1± 17.5	11.1± 4.4
50.0	82.8± 25.0	11.8 ± 7.6

Los resultados son expresados como la media ± SME; N= 5-7 para cada grupo

### *Prueba del rodillo rodante*

Ninguna dosis del extracto alcaloidal total (3.2, 12.5, 25 y 50 mg/Kg) indujo cambios ( $F_{4,25}=0.4167$ ;  $P > 0.05$ ) en el número de caídas de los animales del rodillo utilizado en esta prueba cuando los resultados fueron comparados con el grupo control (cuadro 2).

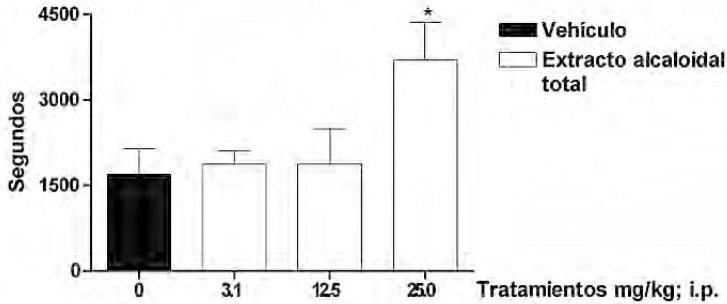
Cuadro 2. Efectos de la administración (i.p.) del extracto alcaloidal total sobre la coordinación motora de el ratón en la prueba del rodillo rodante

Tratamientos mg/Kg	Número de caídas
Vehículo	0.1 ± 0.1
3.12	0.6 ± 0.3
12.0	1.0 ± 1.0
25.0	1.0 ± 0.6
50.0	1.0 ± 0.6

Los resultados son expresados como la media ± SME; N= 5-7 para cada grupo

### *Prueba de hipnosis inducida por pentobarbital*

Con la dosis de 25 mg/Kg el extracto alcaloidal total prolongó el tiempo de hipnosis inducida por pentobarbital ( $F_{3,16}=3.321$ ;  $P < 0.05$ )(gráfica 1), no tuvo efectos sobre el periodo de latencia ( $F_{3,16}=0.4067$ ;  $P > 0.05$ ).



Gráfica 1. Efectos del extracto alcaloidal total sobre el tiempo de sueño en la prueba de hipnosis inducida por pentobarbital. Los resultados son expresados como la media  $\pm$  SEM. El extracto alcaloidal total incrementó la duración del sueño. \* $P < 0.05$  comparado con el grupo del vehículo. ANOVA de una vía seguida de la prueba de Newman-Keuls para comparaciones múltiples.  $N = 5$  por cada grupo

### *Laberinto elevado en forma de +*

Con todas las dosis administradas del extracto alcaloidal total (3.2, 12.5, 25 y 50 mg/Kg), no se observaron diferencias significativas en la conducta del ratón, tanto en el número de entradas ( $F_{4,25}=0.4495$ ;  $P > 0.05$ ) como en el tiempo de permanencia (%) en los brazos abiertos del laberinto) ( $F_{4,25}=0.5517$ ;  $P > 0.05$ ) y aquéllos a los que sólo se les administró el vehículo (cuadro 3).

Cuadro 3. Efectos de la administración (i.p.) del extracto alcaloidal total en la prueba del laberinto elevado en forma de +

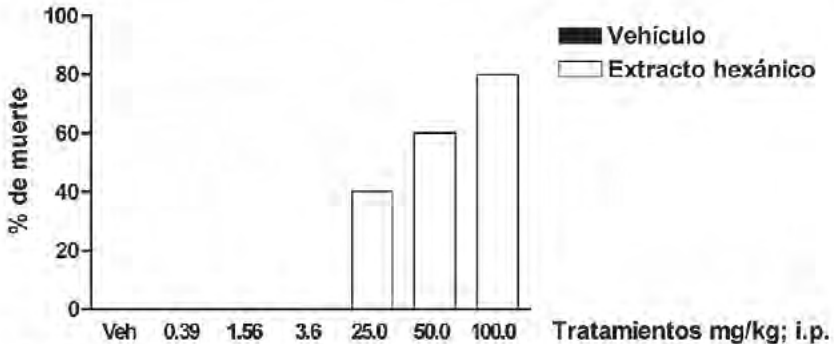
Tratamientos mg/Kg	Entradas a los brazos abiertos	Permanencia en los brazos abiertos (%)
Vehículo	11,33± 1,453	34,35± 6,561
3.2	11,33± 2,616	49,42± 13,18
12.5	8,333± 2,917	50,42± 16,88
25	8,000± 2,449	44,37± 14,67
50	10,67± 2,539	62,30± 14,69

Los resultados son expresados como la media ± SME; N= 5-7 para cada grupo.

### *Extracto hexánico*

#### *Toxicidad*

Con la dosis de 25 mg/Kg se registra la  $DL_1$  (dosis a la que se presenta la muerte del primer ratón), la  $DL_{50}$  se observa con 50 mg/Kg (gráfica 2).

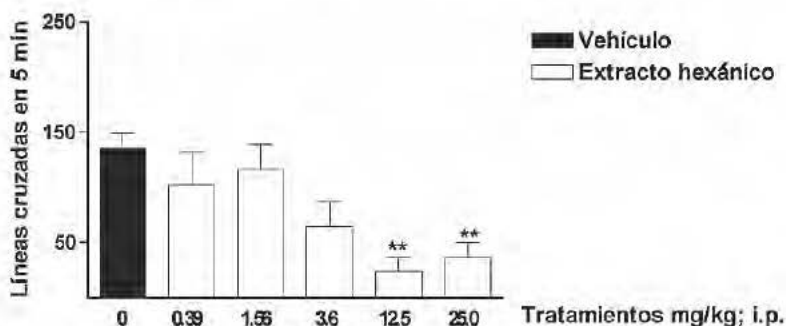


Gráfica 2. Porcentaje de animales muertos en 48 h en la prueba de toxicidad aguda con el extracto hexánico. N= 5 ratones por cada grupo

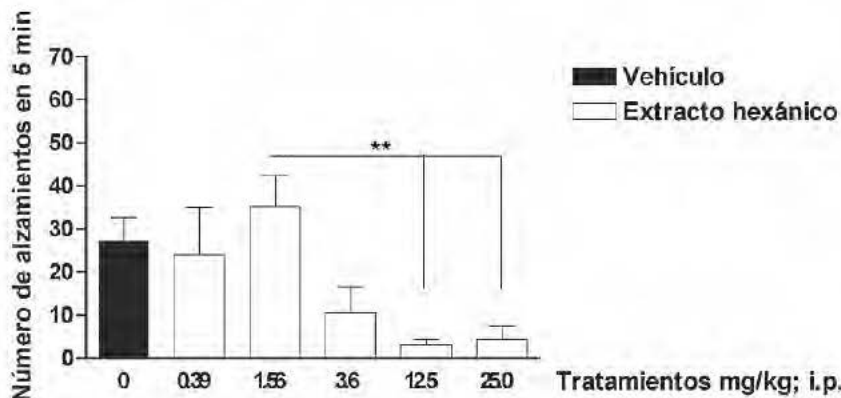
#### *Prueba de campo abierto*

Con el extracto hexánico se observaron diferencias significativas tanto en el número de líneas cruzadas (gráfica 3) ( $F_{5,33} = 5.358$ ;  $P < 0.05$ ) como en el número de alzamientos (rearings) (gráfica 4) ( $F_{5,33} = 4.893$ ;  $P < 0.05$ ).

entre los ratones tratados (12.5 y 25 mg/kg) y aquéllos a los que sólo se les administró el vehículo.



Gráfica 3. Efectos del extracto hexánico sobre la actividad locomotriz horizontal en la prueba de campo abierto. Se representa la media  $\pm$  SEM. El extracto hexánico disminuyó la actividad locomotriz en comparación al grupo control. \*\* $P < 0.01$ . ANOVA de una vía seguida de la prueba de Newman-Keuls para comparaciones múltiples.  $N = 5-7$  ratones por grupo

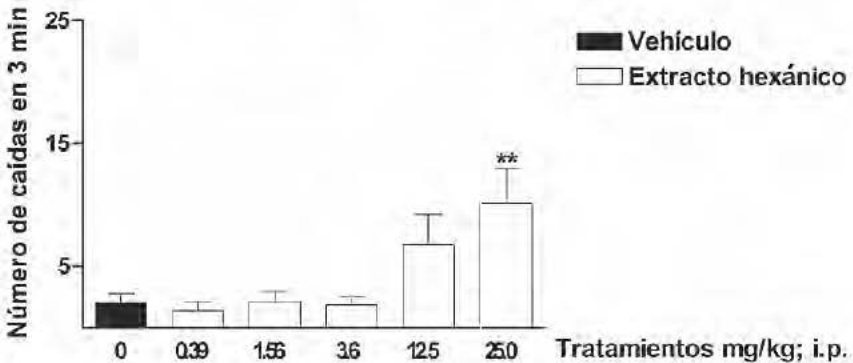


Gráfica 4. Efectos del extracto hexánico sobre la actividad locomotriz vertical en la prueba de campo abierto. Se representa la media  $\pm$  SEM. El extracto hexánico disminuyó el número de alzamientos, representando la actividad locomotriz vertical. \*\* $P < 0.01$ . ANOVA de una vía seguida de la prueba de Newman-Keuls para comparaciones múltiples.  $N = 5-7$  ratones por grupo



### *Prueba del rodillo rodante*

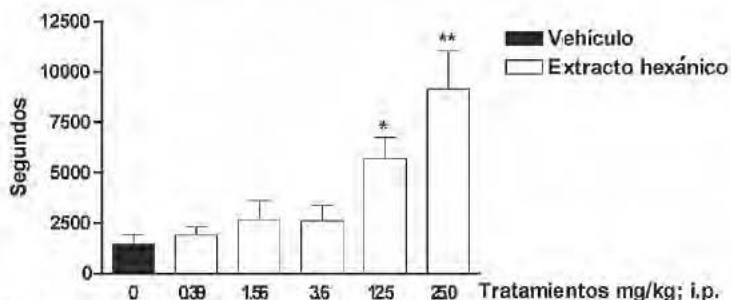
El extracto hexánico (25 mg/Kg) indujo cambios ( $F_{5,34} = 4.293$ ;  $P < 0.05$ ) en el número de caídas de los animales del rodillo cuando los resultados fueron comparados con el grupo control (gráfica 5).



Gráfica 5. Efectos del extracto hexánico sobre la coordinación motora de el ratón en la prueba del rodillo rodante. Se representa la media  $\pm$  SEM. El extracto hexánico aumentó el número de caídas, indicando pérdida de la coordinación motriz. \*\* $P < 0.01$ . ANOVA de una vía seguida de la prueba de Newman-Keuls para comparaciones múltiples. N= 5-7 ratones por grupo

### *Prueba de hipnosis inducida por pentobarbital*

Con las dosis de 12.5 y 25 mg/Kg el extracto hexánico prolongó el tiempo de hipnosis inducida por pentobarbital ( $F_{5,29} = 7.636$ ;  $P < 0.05$ ) (gráfica 6), no tuvo efectos sobre el periodo de latencia ( $F_{5,29} = 0.4067$ ;  $P > 0.05$ ).



Gráfica 6. Efectos del extracto hexánico sobre el tiempo de sueño en la prueba de hipnosis inducida por pentobarbital. Los resultados son expresados como la media  $\pm$  SEM. El extracto hexánico incrementó la duración del sueño. \*  $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  comparado con el grupo del vehículo. ANOVA de una vía seguida de la prueba de Newman-Keuls para comparaciones múltiples.  $N = 5-6$  por cada grupo

### *Laberinto elevado en forma de +*

Con todas las dosis administradas del extracto hexánico (0.39, 1.56, 3.6, 12.5, 25 mg/Kg), no se observaron diferencias significativas en la conducta del ratón, tanto en el número de entradas ( $F_{5,33} = 1.629$ ;  $P > 0.05$ ) como en el tiempo de permanencia (%) en los brazos abiertos del laberinto ( $F_{5,33} = 0.7963$ ;  $P > 0.05$ ) y aquellos a los que solo se les administró el vehículo (cuadro 4).

Cuadro 4. Efectos de la administración (i.p.) del extracto hexánico en la prueba del laberinto elevado en forma de +

Tratamientos mg/Kg	Entradas a los brazos abiertos (%)	Permanencia en los brazos abiertos (%)
Vehículo	4.333 $\pm$ 1.476	22.53 $\pm$ 8.578
0.39	10.20 $\pm$ 4.042	53.30 $\pm$ 14.02
1.56	8.000 $\pm$ 2.828	34.80 $\pm$ 11.39
3.6	3.429 $\pm$ 1.288	38.94 $\pm$ 14.73
12.5	3.429 $\pm$ 1.716	48.59 $\pm$ 17.07
25.0	3.571 $\pm$ 1.360	4.69 $\pm$ 24.69

Los resultados son expresados como la media  $\pm$  SME:  $N = 5-7$  para cada grupo

## Discusión

Con el extracto alcaloidal total (EAT) y las dosis utilizadas, no se registró ninguna muerte de ratones, lo que sugiere que careció de efectos tóxicos a corto plazo (48 h), demostrando tener un margen de seguridad amplio, estando la  $DL_1$  (dosis en la que se presenta la primer muerte) por arriba de 50 mg/Kg. Con la dosis de 25 mg/Kg se prolongó el tiempo de sueño en la prueba de hipnosis inducida por pentobarbital, cuantificado por el lapso entre la pérdida y recuperación del reflejo de enderezamiento (gráfica 1), sin modificar el tiempo de latencia de esta prueba. Estos resultados sugieren que el EAT puede tener propiedades sedantes o depresoras del SNC (Morais *et al.*, 1998). Sin embargo, no se puede descartar que este efecto pudiera darse por el incremento de la vida media del pentobarbital, ya que está documentado que algunos extractos de otras plantas (*Helietta apiculata*) tienen la capacidad de inhibir al citocromo P-450 dependiente de monooxigenasas que está involucrado en el metabolismo del pentobarbital (Goloukova *et al.* 1998; Jakovljevic *et al.*, 2002a; Jakovljevic *et al.*, 2002b). Además, el EAT, no modificó las actividades exploratorias del ratón (actividad locomotriz horizontal y vertical), ni la coordinación locomotriz, evaluadas en las pruebas de campo abierto y rodillo rodante respectivamente (cuadros 1 y 2). Asimismo, fue incapaz de mostrar actividad ansiolítica en la prueba del laberinto elevado en forma de + (LEFM) (cuadro 3).

Con el extracto hexánico (EH), la prueba de toxicidad (la cual se evaluó, cuantificando el número de ratones muertos en 48 h a partir de la administración) indica una toxicidad a partir de la dosis de 25 mg/Kg, donde se presentó la muerte del primer ratón. La  $DL_{50}$  se registra aproximadamente con 50 mg/Kg (gráfica 2), estos resultados ponen de manifiesto que el EH es muy tóxico comparado con el EAT, el que no presentó ninguna muerte de ratones a igual dosis. La actividad motora espontánea del ratón con las dosis de 12.5 y 25 mg/Kg (evaluada en la prueba de campo abierto, cuantificada por el número de líneas cruzadas en la superficie de la caja de la prueba, como por el número de veces que el ratón se levanta apoyando sus patas traseras al piso y las delanteras a una de las paredes) se encuentra significa-

tivamente disminuida (gráficas 3 y 4). Aunado a esto hay una pérdida de la coordinación locomotriz con la dosis de 25 mg/Kg (con la prueba del rodillo rodante, medido por el incremento en el número de caídas que el ratón experimentó durante la prueba) (gráfica 5). Además se prolongó el tiempo de sueño, con las dosis 12.5 y 25 mg/K en la prueba de hipnosis inducida por pentobarbital (considerada por un incremento significativo en el tiempo que el ratón tarda en recuperar a partir de la pérdida, el reflejo de enderezamiento) (gráfica 6). Estos resultados juntos indican que el EH produce sedación y un efecto depresor sobre el SNC. Sin embargo, aunque mostró una clara tendencia con las dosis de 0.39 y 1.56 mg/Kg incrementando el número de entradas de los ratones a los brazos abiertos en la prueba del LEFM no hubo diferencias significativas contra el grupo control, semejantes resultados se observaron en el porcentaje de permanencia en estos brazos (cuadro 4). A pesar de sus propiedades sedantes y depresoras sobre el SNC, carece de actividad ansiolítica.

## Conclusiones

Los resultados sugieren que ambos extractos el EAT y el EH, poseen efectos depresores sobre el SNC. El EH evidenció un efecto depresor en mayor magnitud. No obstante, el EAT, no presentó datos de toxicidad a la misma dosis en que el EH manifiesta su  $DL_{50}$ . El margen de seguridad del EAT evidentemente fue mayor que el EH.

En el EAT se detectaron dos alcaloides, uno de ellos se aisló, purificó e identificó como annomontina el cual demostró propiedades ansiolíticas y el segundo alcaloide la liriodenina, se encuentra presente en la mayoría de los EAT obtenidos de diferentes especies de anonas, el cual posee efectos depresores en el SNC.



## Referencias

- Bourne, R.K. and Egbe, P.C. 1979. 1999. A preliminary study of the sedative effects of *Annona muricata* (soursop). *West Indian Med J.* 28: 106-110.
- Caparros-Lefebvre, D. and Elbaz, A. Possible relation of atypical parkinsonism in the French West Indies with consumption of tropical plants: a case-control study. Caribbean Parkinsonism Study Group. *Lancet.* 354 (9175): 281-286.
- Goloukova, T.D., Heckler, E., Rates, S.M., Henriques, J.A. and Henriques, A.T. 1998. Inhibition of cytochrome P450-dependent monooxygenases by an alkaloid fraction from *Helietta apiculata* markedly potentiates the hypnotic action of pentobarbital. *J Ethnopharmacol.* 60: 141-148.
- González-Esquinca, A.R. 2001. Contribución al estudio del género *Annona* (Annonaceae) análisis filoquímico de tres especies del estado de Chiapas. Tesis de Doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- González-Trujano, M.E., Navarrete, A., Reyes, B., Cedillo-Portugal, E. and Hong E. 2001. Anticonvulsant properties and bio-guided isolation of palmitone from leaves of *Annona diversifolia*. *Planta Med.* 67 (2): 136-141.

- González-Trujano, M.E., Navarrete, A., Reyes, B. and Hong, E. 1998. Some pharmacological effect of leaves of *Annona diversifolia* on the central nervous system in mice. *Phytotherapy research*. 12: 1-3.
- Gorman, J.M., Hirschfeld, R.M. and Ninan, P.T. 2002. New developments in the neurobiological basis of anxiety disorders. *Psychopharmacology Bulletin*. 36 (2): 49-67.
- Grundmann, O., Nakajima, J.I., Seo, S. and Butterweck, V. 2006. Anti-anxiety effects of *Apocynum venetum* L. in the elevated plus maze test. *Journal of Ethnopharmacology*. 110: 406-411.
- Gupta, M.P. 1995. In: Gupta, M.P. (Ed) 270 Plantas medicinales iberoamericanas. Cytel. pp 26-28.
- Hasrat, J.A., Bruyne, T., Backer, J.P., Vauquelin, G. and Vlietinck, A.J. 1997. Isoquinoline derivatives isolated from the fruit of *Annona muricata* as 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonists in rats: unexploited antidepressive (Lead) products. *J. Pharm. Pharmacol.* 49: 1145-1149.
- Jakovljevic, V., Raskovic, A., Popovic, M. and Sabo, J. 2002a. The effect of celery and parsley juices on the pharmacodynamic activity of drugs involving cytochrome P450 in their metabolism. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 27: 153-156.
- Jakovljevic, V., Raskovic, A., Popovic, M., Sabo, J. and Bursac, M. 2002b. The effect of methoxsalene of hypnotic and subhypnotic doses of pentobarbital. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 27: 149-151.
- Lister, R.G. 1990. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. *Pharmacol Ther.* 46 (3): 321-40.

- López-Rubalcava, C., Piña-Medina, B., Estrada-Reyes, R., Heinze, G. and Martínez-Vázquez, M. 2006. Anxiolytic-like actions of the hexane extract from leaves of *Annona cherimolia* in two anxiety paradigms: Possible involvement of the GABA/benzodiazepine receptor complex. *Life Sciences*. 78: 730 – 737.
- Morais, L.C., Barbosa-Filho, J.M. and Almeida, R.N. 1998. Central depressant effects of reticuline extracted from *Ocotea duckei* in rats and mice. *J Ethnopharmacol*. 62 (1): 57-61.
- N'Gouemo, P., Koudogbo, B., Tchivounda, H.P., Akono-Nguema, C. and Etoua, M.M. 1997. Effects of ethanol extract of *Annona muricata* on pentylenetetrazol-induced convulsive seizures in mice. *Phytotherapy Research*. 11 (3): 243-245.
- Silvania, M.M., Macedo, D.S., Melo, C.T., Monteiro, A.P. and Rodriguez, A.C. 2004. Central activity of hydroalcoholic extracts from *Erythrina velutina* and *Erythrina mulungu* in mice. *J Pharm Pharmacol*. 56: 389–393.
- Sugimoto, Y., Furutani, S., Itoh, A., Tanahashi, T., Nakajima, H., Oshiro, H. and Sun, S., Yamada, J. 2008. Effects of extracts and neferine from the embryo of *Nelumbo nucifera* seeds on the central nervous system. *Phytomedicine*. 15: 117–24.
- Treit, D., Menard, J. and Royan, C. 1993. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav*. 44 (2): 463-469.





VIII. *Duguetia colombiana* Maas



# Actividad leishmanicida y antioxidante de compuestos hemisintéticos de *Duguetia colombiana* Maas (Annonaceae).

Sáez, Alex<sup>1,2</sup>, Robledo, Sara<sup>3</sup>, Rojano, Benjamin<sup>4</sup>, Cortés, Diego<sup>5</sup>, Sáez, Jairo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Química, Química de Plantas Colombianas, Universidad de Antioquia, A.A: 1226, Medellín, Colombia. <sup>2</sup>GIPAB, Departamento de Ingeniería de Procesos, Universidad EAFIT, Medellín, Colombia. [asaesz@eafit.edu.co](mailto:asaesz@eafit.edu.co)

<sup>3</sup>PECET, Universidad de Antioquia, A.A: 1226, Medellín, Colombia.

<sup>4</sup>Laboratorio Ciencia de los Alimentos, Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, A.A: 3840.

<sup>5</sup>Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia. Vicent Andres Estelles s/n, 46100 Burjassot, Valencia, Spain.

## Abstracts

Five known compounds of bark of *Duguetia colombiana* were obtained. 2,4,5-trimethoxystyrene was most abundant compound which react by cross metathesis with others styrenes for obtain several stilbenes, most of them were very active against axenics amastigotes of *Leishmania Vianna panamensis*, (strain UA140 epirGFP) but too citotoxic against human promonocitic celular line U937 to be conside-

red. CM2 and CM7 exhibited the highest leishmanicidal activity with  $CE_{50}$  de 10.3-25.7 ( $\mu\text{g/ml}$ ) against intracelulars forms and low citotoxicity ( $CL_{50}$  82.6 -  $>200(\mu\text{g/ml})$ ) respectively. The dimere of the natural compound has the best general antioxidant behavior with 83267 TEAC - DPPH activity ( $\mu\text{mol Trolox/mol}$  of compound), TEAC - ABTS activity, 391677 ( $\mu\text{mol Trolox/mol}$  of compound) and a reducing capacity of 12108 mg a.a/100 g compound (FRAP assay).

Palabras clave: *Annonaceae*, *Duguetia*, *Cross metathesis*, *leishmaniasis*, *antioxidantes*

## Introducción

Dentro de la familia Annonaceae, el género *Duguetia*, está formado por 93 especies, de las cuales 89 son neotropicales y cuatro de África (Maas, 2003). En Colombia, se encuentran reportadas 27 especies del género *Duguetia*. En las diferentes especies de *Duguetia*, se han reportado diversos compuestos como terpenoides en el caso de un sesquiterpenoide bactericida de *Duguetia grabriuscula* (Máximo, 1997); estirenos bioactivos de *D. panamensis* (Wang, 1988); aceites esenciales de *D. furfuracea*, *D. flagellaris*, *D. asterotricha* y *D. grabriuscula* (Maximo, 1997; Jurgens, 2000; Fehine, 2002; Carollo, 2005); flavonoides de *D. bahiensis* (Santos, 2000), neolignanós (Aiba, 1975) y alcaloides, especialmente con núcleos isoquinolínicos con diversas actividades entre ellas actividad como antioxidantes (Pérez, 2004).

La especie evaluada, *Duguetia colombiana* sólo se ha encontrado en el cañón del Río Claro, municipio de San Luis (Antioquia) y en Carare, Valle del Río Magdalena en Santander a elevaciones entre 325-500 m. Fue descrita por Maas. Se caracteriza por ser árboles desde 5 hasta 17 m de alto, con un diámetro entre 15 hasta 25 cm de hojas delgadas, flores amarillas y frutos con semilla ovoide que se producen a través del año (Maas, 1996). Esta planta no presenta reportes etnobotánicos, fitoquímicos ni de actividad biológica, lo que despierta gran interés científico. Dado el estireno mayoritario Dcl (2,4,5-trimetoxiestireno) obtenido de *D. colombiana*, se plantea una reacción de Cross Metathesis con pérdida de una

molécula de etileno, en donde en todos los casos exitosos, se obtuvo el estilbeno (*E*) tanto del heterodímero como del homodímero del reactivo. Los productos de reacción se codifican con el prefijo de “CM por Cross Metathesis”. Dado el interés biológico de los estilbenos, se han desarrollado diversas estrategias de síntesis pero la más exitosa hasta ahora es la cross metathesis utilizando un complejo de Rutenio desarrollado por Grubbs (Chang, 1998; Dias, 1998; Sanford, 1998; Trnka, 2001; Lo, 2007). En la actualidad, los más usados son los catalizadores de Grubbs de primera y segunda generación y más recientemente Grubbs-Hoveyda. Por esta metodología se han obtenido estereoselectivamente diversos estilbenos, entre los que se destacan *trans*-Resveratrol y derivados con muy buena eficiencia en la mayoría de los casos, los mejores resultados se logran especialmente usando catalizador de Grubbs de segunda generación (Chang, 2002; Ferré-Filmon, 2004, 2005; Velder, 2006; Taber, 2003, 2006).

## Método

Los puntos de fusión fueron medidos sin corrección en un Aparato Büchi (Tottoli B-210). Para el análisis por cromatografía en capa delgada (CCD) se usaron placas (Merck 60 F<sub>254</sub> 0.2 mm); en cromatografía de columna se usó sílica gel 60 (Merck 0.063-0.200 mesh). Los compuestos en CCD fueron revelados con una mezcla de ácido sulfúrico en ácido acético (1:9) y calentada a 100-105°C. Los espectros IR fueron medidos en un espectrofotómetro PERKIN ELMER con un sistema RX I FT-IR, usando discos de KBr. Los espectros ultra violeta visible (UV-Vis) fueron obtenidos disolviendo en metanol (MeOH) en un espectrofotómetro JENWAY 6405. Los espectros de RMN <sup>1</sup>H (400 MHz y 600 MHz) y RMN <sup>13</sup>C (100 MHz) se realizaron todos en CDCl<sub>3</sub>, y fueron grabados en un equipo Bruker AMX 400 y Bruker AM 600, usando tetrametilsilano (TMS) como estándar interno.

## Material vegetal

La corteza de *Duguetia colombiana* Maas, fue colectada en el cañón del Río Claro, municipio de San Luis (Antioquia) e identificada por el biólogo Alvaro Cogollo Pacheco. Una muestra del espécimen con radicado número 008277 se encuentra depositada en el herbario del Jardín Botánico Joaquín Antonio Uribe (JAUM) de Medellín (Colombia).

## Ensayos de actividad

**Actividad leishmanicida.** A los compuestos hemisintéticos estilbenoides al igual que Dc1 se les evaluó *in vitro* la actividad leishmanicida en amastigotes axénicos e intracelulares de *L. (V.) panamensis* (Cepa UA140 epirGFP) (Robledo *et al.*, 2005).

**Citotoxicidad.** Se determinó la citotoxicidad de compuestos usando células U937 con el colorante tetrazolium (MTT) (Mosmann, 1983; Weniger *et al.*, 2001).

**Actividad atrapadora del radical libre DPPH•.** (Brand-Williams, 1995; Sánchez *et al.*, 1998; Choi, 2000).

**Ensayo frap (ferric reducing/antioxidant power).** (Benzie y Strain, 1996).

**Ensayo de decoloración con el radical catiónico ABTS••.** Este ensayo es denominado también método TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity Assay) (Re *et al.*, 1999).

**Extracción y purificación.** 2,380 g de corteza seca y molida de *Duguetia colombiana* se extrajeron por percolación con éter de petróleo. El solvente se evaporó obteniéndose 51.99 g de extracto, el cual fue sometido a diversas columnas cromatográficas (flash y por gravedad), eluyéndose con mezclas de hexano:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (95:5, 80:20, 70:30) y finalmente recristalizando con hexano se obtuvieron 2.20 g de Dc1 (0.09%) como mayoritario; 0.25 g de Dc2 (0.011%), obtenido como un aceite amarillo rojizo; 10 mg de Asaraldehído Dc3 como minoritario (0.0004%) y el sólido amorfo Pachypofilina Dc4 con 99 mg (0.0042%).

**Extracción de alcaloides.** El material de la corteza previamente desengrasado, se humecta con hidróxido de amonio al 5% y se extrae

repetidas veces obteniéndose, 12.2 g de alcaloides totales, lo que representa un 0.51% del material seco. Estos se fraccionaron por cromatografía de columna flash sobre sílica gel (350 g, 8 x 80 cm); eluyendo por gradiente con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y metanol se obtuvieron 73 mg de la oxoaporfina *O*-Metilmoschatolina Dc5 (0.0031%), los cuales cristalizaron como agujas rojizas, identificado por diferentes técnicas espectroscópicas.

**Estilbenos derivados del 2, 4,5-trimetoxiestireno (Dc1).**

**Reacción de cross metathesis.** Como metodología general, se disuelven 0.2 mmol de 2,4,5-trimetoxiestireno (compuesto Dc1, cuadro 2) en tolueno seco con 2.0 mmol del estireno o compuesto a acoplar y 5 mol% de catalizador de Grubbs II (Chang, 2002; Ferre-Filmon, 2005; Velder, 2006).

**Reacción de demetilación.** Se realiza según la metodología descrita por Yang en 1996, (Yang, 1996). El compuesto Dihidroxiado (CM9: (E)-3,3'-dihidroxiestilbeno) se obtuvo con un rendimiento del 90%.

**Reacción de hidrogenación.** Se disuelven 25 mg del compuesto CM7 (3,3'-Dimetoxiestilbeno) en metanol y se le adicionan 13 mg de carbono / paladio en atmósfera de  $\text{H}_2$ , durante 60 minutos a temperatura ambiente, la reacción procede con un rendimiento del 94% obteniéndose el compuesto (CM10: 1,2-Di (3-Metoxifenil) Etano).

## Resultados y discusión

Del extracto de éter de petróleo, usando la corteza de *D. colombiana*, se aislaron cuatro compuestos, los cuales se identificaron como 2,4,5-trimetoxiestireno (Dc1) como mayoritario, 3,4,5-trimetoxiestireno (Dc2), asaraldehído (Dc3) y el bisnorlignano pachypofilina (Dc4), reportado por primera vez en este género. Después del proceso para la purificación de alcaloides de la misma corteza, se aisló un quinto compuesto identificado como *O*-metilmoschatolina. Estos compuestos fueron caracterizados por MS, RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  y se ilustran en la figura 1.



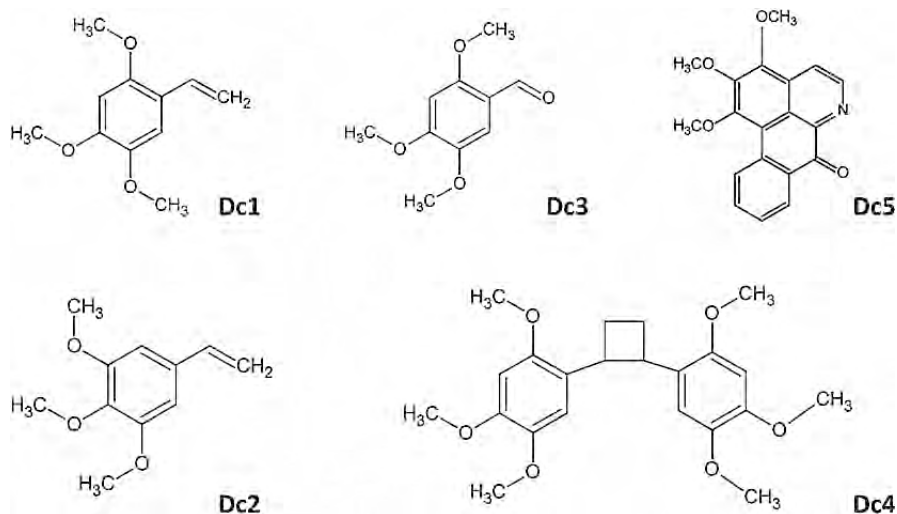


Figura 1. Compuestos de *Duguetia colombiana*

**Hemisíntesis de derivados del 2,4,5-trimetoxiestireno (Dc1).** Según la reacción ilustrada en la figura 2, se utilizaron los compuestos ilustrados en la figura 3, para dimerizarlos con Dc1, formando los estilbenos homodímeros y heterodímeros correspondientes, cuyos productos se muestran en la cuadro 1.

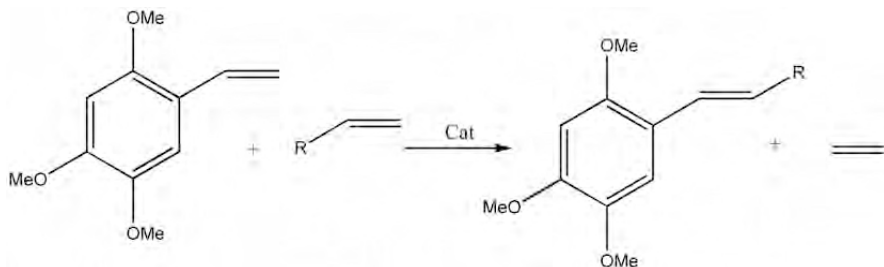


Figura 2. Reacción esperada de Cross Metathesis con Dc1

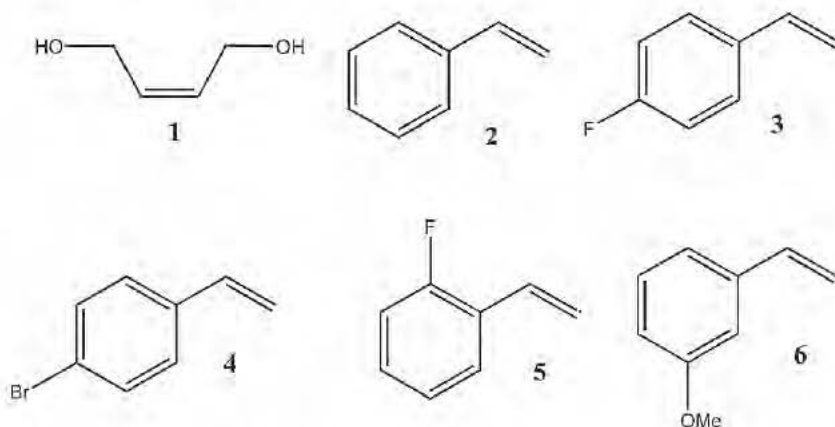
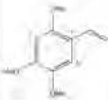


Figura 3. Compuestos utilizados para acoplar a DcI

Cuadro I. Estilbenos obtenidos en reacción de Cross Metathesis

Reactivo 1	Rvo 2	Producto 1			Producto 2		
		Cpto	R <sup>+</sup>	R <sup>-</sup>	Cpto	R <sup>+</sup>	R <sup>-</sup>
	1	-	No RxN	No RxN	-	No RxN	No RxN
	2	<b>CM1</b>	2,4,5-(OMe) <sub>3</sub>	H	-	H	H
	3	<b>CM2</b>	2,4,5-(OMe) <sub>3</sub>	4-F	<b>CM3</b>	4-F	4-F
	4	-	No RxN	No RxN	-	No RxN	No RxN
	5	<b>CM4</b>	2,4,5-(OMe) <sub>3</sub>	2-F	<b>CM5</b>	2-F	2-F
	6	<b>CM6</b>	2,4,5-(OMe) <sub>3</sub>	3-OMe	<b>CM7</b>	3-OMe	3-OMe
	Dc1	<b>CM8</b>	2,4,5-(OMe) <sub>3</sub>	2,4,5-(OMe) <sub>3</sub>	-	-	-

A pesar que algunos autores sugieren que la sustitución metoxilica en la posición *orto* produce un Complejo Intermediario quelato carbono, que es inactivo (Velder, 2006), en este trabajo se muestra que a las condiciones de concentración de catalizador y temperatura usadas, se pueden obtener los dímeros deseados.

En reacciones posteriores, el homodímero del compuesto 6, o sea el compuesto CM7 se demetiló, obteniéndose el 3,3'-Dihidroxiestilbeno, también se tomó este homodímero como objetivo de análisis del efecto

del doble enlace, por lo que se hidrogenó el enlace *trans*, obteniéndose el 1,2-Di-(3-Metoxifenil) etano.

### *Actividad biológica de los compuestos hemisintéticos de Duguetia colombiana*

#### Actividad leishmanicida de Dc1 y estilbenos hemisintéticos de *Duguetia colombiana*

A los compuestos se les realizaron evaluaciones *in vitro* de citotoxicidad sobre la línea celular promonocítica humana U937, así como de actividad leishmanicida en amastigotes axénicos e intracelulares de *Leishmania panamensis* (cepa UAI40 epirGFP) utilizando el micrométodo enzimático MTT para la citotoxicidad y efectividad en amastigotes axénicos y citometría de flujo para los amastigotes intracelulares. Los resultados ilustrados en el cuadro 2, son expresados como la concentración Letal 50 (CL<sub>50</sub>) para citotoxicidad y como concentración efectiva 50 (CE<sub>50</sub>). El índice de selectividad (IS) se calculó dividiendo la actividad citotóxica entre la actividad leishmanicida (IS = CL<sub>50</sub> / CE<sub>50</sub>). Se utilizaron Anfotericina y Glucantime como fármacos de control.

Cuadro 2. Actividad citotóxica y leishmanicida de Dc1 y hemisintéticos de *D. colombiana*

Compuesto	CL <sub>50</sub> (µg/ml) X ± SD	CE <sub>50</sub> (µg/ml) X ± SD		IS Amastigotes axénicos
	U937	Amastigotes axénicos	Amastigotes intracelulares	
<b>CM1</b>	11.1 ± 0.8	7.5 ± 1.4	ND	1.5
<b>CM2</b>	82.6 ± 5.8	>100.0	10.3 ± 0.7	< 0.8
<b>CM3</b>	39.8 ± 2.4	17.5 ± 3.5	13.4 ± 3.7	2.3
<b>CM4</b>	4.2 ± 0.3	10.0 ± 2.4	ND	0.4
<b>CM5</b>	> 200.0	>100.0	72.9 ± 11.2	< 2.0
<b>CM6</b>	3.4 ± 1.8	7.7 ± 0.5	ND	0.4
<b>CM7</b>	> 200.0	35.3 ± 10.0	25.7 ± 3.4	> 5.7
<b>CM8</b>	25.3 ± 0.5	>100.0	ND	0.3
<b>CM9</b>	7.2 ± 1.0	16.5 ± 1.0	ND	0.4
<b>Dc1</b>	27.1 ± 3.8	>100.0	64.8 ± 5.1	0.3
Anfotericina	38.8 ± 2.2	0.05 ± 0.01	0.04 ± 0.01	776
Glucantime	>1000.0	> 1000.0	6.8 ± 0.5	< 1

ND: No determinado

Los compuestos CM3 y CM2 presentan muy buena actividad contra amastigotes intracelulares y axénicos de *L. panamensis*, aunque muestran una toxicidad moderada. Los compuestos CM4, CM9, CM6 y CMI mostraron ser muy activos contra formas axénicas pero también mostraron ser muy tóxicos. Debido a la alta toxicidad mostrada, no se pudieron evaluar contra formas intracelulares. Por otra parte el compuesto CM7 posee buena actividad contra formas intracelulares y la más baja toxicidad.

### Actividad antioxidante de Dc1 y estilbenos hemisintéticos de *Duguetia colombiana*

En el cuadro 3, se observan los resultados de los ensayos antioxidantes de los compuestos utilizados como antioxidantes primarios.

Cuadro 3. Actividad Antioxidante de compuestos y hemisintéticos de *Duguetia colombiana*

COMPUESTO	TEAC-DPPH μmol Trolox/mol cpto ± SD	TEAC-ABTS μmol Trolox/mol cpto ± SD	FRAP mg a.a./100g cpto ± SD
Dc1	2756±138	16994±850	6039±61
CM1	3472±174	10824±541	5807±52
CM2	9153±458	16832±842	13904±167
CM3	2996±150	3465±173	ND
CM4	5390±270	15776±789	5390±270
CM5	2778±139	2223±111	ND
CM6	4383±219	11817±591	5997±87
CM7	1025±51	2497±125	ND
CM8	<b>83267±4163</b>	<b>391677±19584</b>	<b>12108±234</b>
CM9	4369±218	<b>1309731±65487</b>	ND
CM10	3612±	8754±438	ND

De estos resultados se puede observar que el mejor comportamiento antioxidante general se da para el dímero de Dc1 (Compuesto CM8), que por su alta metoxilación, podría establecer hiperconjugaciones que ayuden a su actividad como antioxidante primario.

En el caso del compuesto CM10, contrario a lo esperado la saturación del puente etilénico incrementó más de dos veces la actividad antioxidante tanto en DPPH como en ABTS, lo que permite discutir que la insaturación, interfiere en el mecanismo como antioxidante, inhibiendo la transferencia de electrones al sustrato oxidante.

Es claro que al demetilar el CM7, la actividad debe incrementarse, lo que es natural al permitirse la transferencia de un protón fenólico, lo que es importante notar es que en el medio ABTS, el incremento es de tres órdenes de magnitud, lo que conlleva a probar que el mecanismo antioxidante prevaleciente es de transferencia de protones.

## Conclusiones

La especie *Duguetia colombiana* de la familia Annonaceae, posee diversos metabolitos secundarios, en bajas cantidades, pero en donde se destaca uno en especial. En el extracto etéreo de corteza se aisló el estireno trimetoxilado mayoritario (2,4,5-trimetoxiestireno) con un 0.09% en base seca; en este mismo extracto se encontraron además el isómero 3,4,5-Trimetoxiestireno con un 0.011%, el minoritario 2,4,5-Trimetoxibenzaldehído con un 0.0004% y el bisnorlignano pachypofilina con un 0.0042%. Además, encontramos después del proceso de purificación de alcaloides la oxoaporfina *O*-Metilmoschatolina con un 0.0031%.

Con el compuesto mayoritario (Dc1), dadas sus características estructurales y su cantidad, se prepararon derivados hemisintéticos tipo estilbenoides mediados por una reacción de Cross Metathesis con catalizador de Grubbs de segunda generación, en donde se obtuvo siempre estereoselectivamente el isómero (*E*). Se obtuvieron 10 estilbenoides en total, con buenos rendimientos.

Se registraron por primera vez los compuestos 4'-Fluor-2,4,5-Trimetoxiestilbeno y el compuesto 2'-Fluor-2,4,5-trimetoxiestilbeno

Se tomó al compuesto estilbenoide CM6 como modelo al que se le hizo una demetilación y una hidrogenación con el fin de evaluar estos cambios en su actividad como antioxidante, es importante anotar que el compuesto hidrogenado presentó mejor capacidad antioxidante que su análogo insaturado.

El mejor comportamiento antioxidante general, es decir, el que mantiene buena actividad en todos los métodos usados, se da para el dímero de Dcl, que es un estilbeno hexametoxilado el cual podría establecer hiperconjugaciones que ayuden a su actividad como antioxidante primario.

La mejor actividad antioxidante en la metodología ABTS la presentó el 2,2'-dihidroxiestilbeno, suponiendo un mecanismo de transferencia protónica (HAT) en dicha actividad.

El compuesto CMI presenta la mejor actividad leishmanicida sobre amastigotes axénicos, al aumentar la sustituciones en el segundo anillo baja esta actividad.

La posición del Flúor en *para* (CM2) y *orto* CM4 afecta considerablemente la citotoxicidad, CM2 es un buen candidato a leishmanicida dado que presenta la mejor actividad sobre amastigotes intracelulares y baja citotoxicidad, aunque curiosamente presenta baja actividad sobre amastigotes axénicos.



## Referencias

- Aiba, C. J., Gottlieb, O.R. and Maia, J.G.S. 1975. XXVII Anual Meeting of Sociedade Brasileira Para Progresso da Ciencia. Belo Horizonte, Brasil. Pp. 105.
- Carollo, C., Hellmann, A. and De Siqueira, J. 2005. Sesquiterpenoids from the essential oil from leaves of *Duguetia furfuracea* (Annonaceae). *Biochem. Systematics & Ecol.* 33 (6): 647-649.
- Chang, S., Jones, L., Wang, C., Henling, L.M. and Grubbs, R.H. 1998. Synthesis and characterization of new ruthenium-based olefin metathesis catalysts coordinated with bidentate Schiff-base ligands. *Organometallics*. 17: 3460-3465.
- Chang, S., Youngim, N., Jung, S.H., Eunjung, C. and Shin, J.L. 2002. A short and efficient synthetic approach to hydroxy (E)-stilbenoids via solid-phase cross metathesis. *Tetrahedron Letters*. 43 (41): 7445-7448.
- Fechine, I., Navarro, V., Da-Cunha, V., Silva, M., Maia, J. and Barboza-Filho. 2002. Alkaloids and volatile constituents from *Duguetia flagellaris*. *J. Biochem. Syst. Ecol.* 30: 267.
- Ferré-Filmon, K., Delaude, L., Demonceau, A. and Noels, A.F. 2004. Catalytic methods for the synthesis of stilbenes with an emphasis on their phytoalexins. *Coordination Chemistry Reviews*. 248: 2323-2336.



- Ferré-Filmon, K., Delaude, L., Demonceau, A. and Noels, A.F. 2005. Stereoselective synthesis of (E)-hydroxystilbenoids by ruthenium-catalyzed cross metathesis. *Eur. J. Org. Chem.* 15: 3319-3325.
- Lo, C., Cariou, R., Fischmeister, C. and Dixneuf, P.H. 2007. Simple ruthenium precatalyst for the synthesis of stilbene derivatives and ring-closing metathesis in the presence of styrene initiators. *Adv. Synth. Catal.* 349: 546-550.
- Maas, P.J. 1996. *Duguetia colombiana*. *Bot. Jahrb. Syst.* 118 (2): 192-195. f. 3.
- Maas, P.J., Lubbert, Y., Westra, T. and Chatrou, L.W. 2003. *Duguetia* (*Annonaceae*). Flora neotrópica. Monografía 88. New York Botanical Garden Press. USA.
- Maas, P.J., Menega, L. and Westra, T.H. 1994. Studies in Annonaceae. XXI. Index to species and infrageneric taxa of neotropical Annonaceae. *Candollea.* 49: 389-481.
- Máximo, J., Correa, C. and Diamantino, M.A. 1997. Bioactive sesquiterpenoid from *Duguetia glabriuscula*. *Fitoterapia.* LXVIII: 89.
- Pérez, E., Sáez, J., Blair, S., Franck, X. and Figadere, B. 2004. Isoquinoline alkaloids from *Duguetia vallicola* ítem bark with antiplasmodial activity. *Letters in Organic Chemistry.* 1 (1): 102-104.
- Sanford, M.S., Henling, L.M. and Grubbs, R.H. 1998. Synthesis and reactivity of neutral and cationic ruthenium (II) Tri (pyrazolyl) borate alkylidenes. *Organometallics.* 17: 5384-5389.
- Santos, D. and Salatino, M. 2000. Foliar flavonoids of *Annonaceae* from Brazil: taxonomic significance. *Phytochemistry.* 55: 551.
- Taber, D. and Frankowski, K. 2003. Grubbs's catalyst in paraffin: an air stable preparation for alkene metathesis. *J. Org. Chem.* 68: 6047-6048.

- Taber, D. and Frankowski, K. 2006. Grubbs's cross metathesis of eugenol with cis-2-butene-1,4-diol to make a natural product. An organometallic experiment for the undergraduate Lab. *J. Chem. Ed.* 83 (2): 236.
- Trnka, T.M. and Grubbs, R.H. 2001. The development of olefin metathesis catalysts: an organometallic success story. *Acc. Chem. Res.* 34: 18-29.
- Velder, J., Ritter, S., Lex, J. and Schmalz, H-G. 2006. A simple access to biologically important trans-stilbenes via Ru-catalyzed cross metathesis. *Synthesis*. 2: 273-278.
- Wang, W., Ma, W.-W., McLaughlin, J.L. and Gupta, M.P. 1988. 2,4,5-trimethoxystyrene, bioactive component of the bark of *Duguetia panamensis*. *Journal of Natural Products*. 51 (2): 382-384.
- Yang, Z., Perry, B. and Mukherjee, J. 1996. Fluorinated benzazepines: 1. Synthesis, radiosynthesis and biological evaluation of a series of substituted benzazepines as potential radiotracers for positron emission tomographic studies of dopamine D-1 receptors. *Nuclear Medicine and Biology*. 23: 793-805.



## *Rectoría*

Ing. Roberto Domínguez Castellanos  
RECTOR

Mtro. José Francisco Nigenda Pérez  
SECRETARIO GENERAL

C.P. Miriam Matilde Solís Domínguez  
AUDITORA GENERAL

Lic. Adolfo Guerra Talayero  
ABOGADO GENERAL

Mtro. Pascual Ramos García  
DIRECTOR DE PLANEACIÓN

Mtro. Florentino Pérez Pérez  
DIRECTOR ACADÉMICO

Mtro. Jaime Antonio Guillén Albores  
DIRECTOR DE EXTENSIÓN UNIVERSITARIA

Dr. Eduardo E. Espinosa Medinilla  
DIRECTOR DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

Lic. Ricardo Cruz González  
DIRECTOR DE ADMINISTRACIÓN

L.R.P. Aurora Evangelina Serrano Roblero  
DIRECTORA DE SERVICIOS ESCOLARES

Mtra. Brenda María Villarreal Antelo  
DIRECTORA DE TECNOLOGÍAS DE INFORMACIÓN

Lic. Noé Fernando Gutiérrez González  
DIRECTOR DEL CENTRO UNIVERSITARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN

## *Dependencias de Educación Superior*

Mtro. Jesús Manuel Grajales Romero  
DIRECTOR DE OFERTA EDUCATIVA REGIONALIZADA

Mtra. Érika Judith López Zúñiga  
DIRECTORA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN Y ALIMENTOS

Dr. Ernesto Velázquez Velázquez  
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

C.D. Jaime Raúl Zebadúa Picone  
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS ODONTOLÓGICAS Y SALUD PÚBLICA

Mtro. Martín de Jesús Ovalle Sosa  
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS HUMANAS

Ing. Francisco Félix Domínguez Salazar  
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE INGENIERÍA

Antrop. Julio Alberto Pimentel Tort  
DIRECTOR DEL CENTRO DE ESTUDIO SUPERIORES EN ARTES

Mtro. Carlos Gutiérrez Alfonzo  
DIRECTOR DEL CENTRO DE ESTUDIOS SUPERIORES DE MÉXICO Y CENTROAMÉRICA (CESMECA)

Dra. Silvia Guadalupe Ramos Hernández  
DIRECTORA DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN GESTIÓN DE RIESGOS Y CAMBIO CLIMÁTICO

Lic. Diego Martín Gámez Espinosa  
COORDINADOR DEL CENTRO DE LENGUAS

Dr. Alejandro Nettel Hernanz  
RESPONSABLE DEL CAMPUS DEL MAR



**Colección  
Jaguar**



**UNICACH**

# Anonáceas

Plantas antiguas, estudios recientes

Se terminó de imprimir en el mes de noviembre de 2011, con un tiraje de 75 ejemplares, en los talleres de Desarrollo Gráfico Editorial, S.A. de C.V. Teléfono: (55) 5-605-81-75, México, D.F. El diseño tipográfico estuvo a cargo de Víctor Miguel Sosa Aguilar, la corrección de Luciano Villarreal Rodas y el cuidado de la edición de la Oficina Editorial de la UNICACH, durante el rectorado del Ing. Roberto Domínguez Castellanos.

Las anonáceas son una familia primitiva de Angiospermas que no sólo tiene interés desde el punto de vista evolutivo, sino también porque agrupa especies con frutos comestibles, flores aromáticas y porque despliegan una potente actividad biológica. Este libro compendia estudios de este tipo de algunas de sus especies.

Es un trabajo colectivo derivado de las presentaciones del IV Congreso Internacional y V Nacional de Anonáceas realizado en Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México.

