

# Desarrollo temprano y defensas químicas de *Annona macrophyllata* Donn. Smith. (Annonaceae)

Iván De-la-Cruz-Chacón<sup>1</sup>  
Alma Rosa González-Esquinca<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Fisiología y Química Vegetal, Instituto de Ciencias Biológicas, Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas, Libramiento Norte Poniente 1150. Col. Lajas Maciel. C.P. 29039. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México Email: ivan.cruz@unicach.mx, aesquinca@unicach.mx

## RESUMEN

La germinación y el desarrollo de la plántula son las etapas iniciales para el establecimiento en el ecosistema de una nueva planta, durante ellas, los metabolitos secundarios (MS) son un factor clave que contribuye a la sobrevivencia vegetal. Escasas investigaciones analizan este fenómeno biológico. En este artículo se relata el estudio de MS en etapas tempranas de *Annona macrophyllata* (papausa o ilama), con miras a entender la dinámica de su biosíntesis-acumulación y su significado biológico.

**PALABRAS CLAVE:** Annonaceae, metabolismo secundario, desarrollo temprano vegetal.

## ABSTRACT

Germination and seedling development are the initial stages for the establishment of new seedling in the ecosystem. During these stages, the secondary metabolites (SM) are a key factor to get the survival of the plant. Not many studies show the significance of this biological phenomenon. In this research, the production of SM in early development of *Annona macrophyllata* (papausa o ilama) is reported, in order to understand the dynamic of biosynthesis/accumulation of SM and its role to plants.

**KEYWORDS:** Annonaceae, secondary metabolism, early development plant.

## INTRODUCCION

El desarrollo temprano de las plantas abarca la germinación de las semillas y el establecimiento de las plántulas. La germinación inicia con la absorción de agua (imbibición) y termina en *sensu stricto* cuando una parte del eje embrionario (usualmente la radícula) se extiende y atraviesa las cubiertas seminales (emergencia) (Nonogaki *et al.*, 2007). Con la emergencia radicular comienza el desarrollo de la plántula sustentado primeramente en las reservas energéticas del endospermo o los cotiledones y después en la fotosíntesis (Bewley & Black, 1994; Nonogaki, 2010).

Estas fases ontogénicas han sido estudiadas en sus aspectos genéticos, fisiológicos, metabólicos y ecológicos (figura 1). Algunas revisiones actuales de los temas son los de Nonogaki, 2010; Weibrecht *et al.*, 2011 y Bewley *et al.*, (2013). Entre los sucesos metabólicos escasamente atendidos, está el relacionado con la presencia de moléculas del metabolismo secundario, que suelen desempeñar funciones ecológicas y por lo tanto intervienen en su

establecimiento y comunicación con el ambiente en el que crecerán (Hartmann, 2008). Los metabolitos secundarios (MS), son responsables de los olores, sabores, colores y sustancias tóxicas de las plantas. Su biosíntesis es regulada en espacio y tiempo, está asociada a la fenología de la planta, al grado de desarrollo del tejido, a su papel ecológico y a los factores abióticos.

La presencia de MS durante el desarrollo temprano constituyen aportes de la planta madre o son biosintetizados *de novo*, como quiera que sea, estas moléculas especializadas representan un recurso ventajoso para las plántulas en crecimiento.

*Annona macrophyllata* ( $\equiv$  *A. diversifolia*) es una especie nativa de Mesoamérica, produce frutos agradables al paladar humano y biosintetiza MS con una riqueza estructural diversa. De ella se han aislado algunos aceites fijos y esenciales, alcaloides, terpenos y policétidos con actividades sobre líneas de cáncer humano, neurofarmacológicas, insecticidas y antimicrobianas (Pérez-Amador *et al.*, 1997; González-Esquinca, 2001; De-la-Cruz, 2001,

Schlie-Guzmán *et al.*, 2009; Luna-Cazáres y González Esquinca, 2010). En particular los alcaloides son detectados en individuos adultos y plántulas con capacidad fotosintética pero no en sus semillas, por lo que al no ser un aporte de la planta madre, deben biosintetizarse durante la germinación o el desarrollo de la plántula.

En la búsqueda de caracterizar este evento metabólico y sobre todo de encontrar la *razón de ser* de estos MS para la especie, se buscó su presencia durante el desarrollo temprano (figura 1), al mismo tiempo se realizaron bioensayos para elucidar su significado biológico.

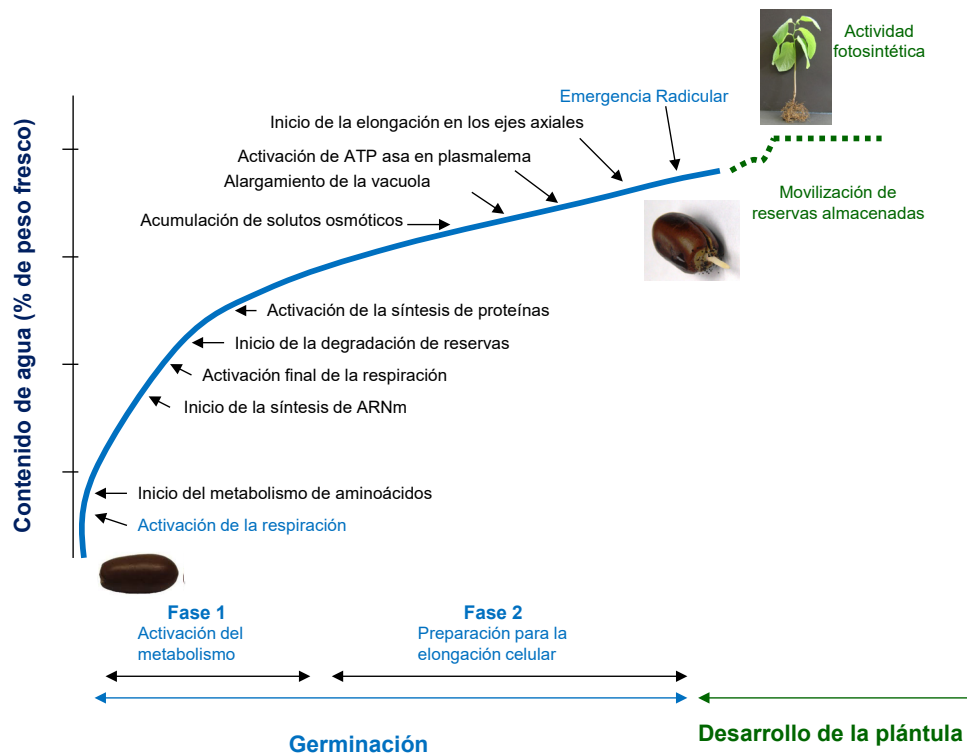


FIGURA 1

Germinación y desarrollo temprano de las plantas (Adaptado de Bove *et al.*, 2001).

## Metodología

El trabajo experimental está dividido en tres etapas: a) caracterización del desarrollo temprano de *A. macrophyllata*, b) determinación de las relaciones órgano-específicas de alcaloides durante las fases de desarrollo y c) evaluación del significado biológico de los MS.

## Caracterización del desarrollo temprano de *A. macrophyllata*.

El desarrollo temprano se tipificó empleando la escala decimal BBCH (Biologische Bundesanstalt, Bundessortenamt and Chemical Industry) que codifica numéricamente las características fenológicas del crecimiento vegetal (Hess *et*

*al.*, 1997). El código identifica 10 estadios de crecimiento principales (desde 0 hasta 9) divididos a su vez en 10 secundarios, la escala fue desarrollada inicialmente por Zadoks (1974) para describir la fenología de los cereales. En este trabajo se estudiaron 4 etapas fenológicas: *semillas secas*, *semillas en imbibición*, *emergencia radicular* y *plántulas en desarrollo*; éstas a su vez se dividieron en fases en función de la fisiología de la plántula, por lo que se estudiaron 11 fases de desarrollo y hasta 8 tejidos (embriones, hipocótilos, cotiledones, endospermos, testas, raíces, tallos y hojas).

## Obtención y cuantificación de alcaloides

El perfil químico de alcaloides fue determinado en cada tejido de cada etapa, utilizando desde 1 hasta 5 gramos

de material vegetal; los alcaloides fueron obtenidos mediante la técnica ácido-base de González-Esquinca (2001) y cuantificados por espectrofotometría a 254 nm, utilizando como estándar una curva patrón de dilución con el alcaloide lirioidenina (De-la-Cruz *et al.*, 2012). La presencia de lirioidenina fue analizada con técnicas de cromatografía de HPLC de acuerdo con De-la-Cruz y González-Esquinca (2012). Para cada tejido se realizaron 10 repeticiones.

#### Cuantificación de aminoácido precursores

Los precursores biosintéticos (tirosina y fenilalanina) para alcaloides se extrajeron por el método de Brückner y Westhasur (2003) y se cuantificaron por cromatografía líquida adaptando los métodos de Holme & Woods (2002) y Perkin Elmer (2007). El análisis en HPLC se realizó en un equipo Perkin-Elmer serie 900 UV-Vis, en una columna de fase reversa spheri 5RP18 (de un tamaño de 100 x 4.6 mm y con un diámetro de partícula de 5 micras).

#### Evaluación del papel biológico de los MS de *A. macrophyllata*

Considerando los antecedentes antimicrobianos de los alcaloides y la observación de que las semillas en imbibición y sin germinar son infestadas por fitopatógenos, se aislaron e identificaron dos fitopatógenos de semillas contaminadas y sobre ellos se determinó la actividad antifúngica de extractos alcaloidales, así también se evaluó en concentraciones seriadas (desde 1 hasta 400 uM) al alcaloide lirioidenina, constituyente mayoritario de los extractos. La actividad antifúngica de lirioidenina se determinó mediante la técnica concentración mínima en macrodilución (NCCLS, 1997) y la de los extractos por inhibición del metabolismo de glucosa (Riesselman *et al.*, 2000).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### Caracterización del desarrollo temprano

Las etapas evaluadas del desarrollo temprano abarcaron la germinación (BBCH: 0), en todas sus fases (BBCH: 00-09) y el desarrollo de plántulas con hojas (BBCH: 1) en las fases BBCH: 10 a 16 (cuadro 1).

Las **semillas secas** (BBCH: 00) son de 2 x 1 cm de largo por ancho con una cubierta dura formada por la testa, el tegmen y el tapón micropilar. El embrión es diminuto (3-5 mm), basal, localizado en la región micropilar, son distinguibles en él la radícula y los cotiledones (figura 2A). El endospermo es abundante y ruminado (González-Esquinca *et al.*, 2015).

La **imbibición** (ingesta de agua) sucede rápidamente por toda la testa y micrópilo (Ferreira *et al.*, 2014) (BBCH: 01 – 02; figura 2B-C), originando un incremento en el volumen de la semilla y una coloración oscura de la testa, los embriones permanecen sin cambio aparente. La fase I de la imbibición, es un fenómeno totalmente físico e independiente de la viabilidad de la semilla (Bewley & Black 1994; Ferreira *et al.*, 2014). A los **cinco días de la imbibición** (BBCH: 03; figura 11D) el embrión crece cerca de dos veces y algo del endospermo circundante a él se torna blando y blanquecino, una señal del inicio de la movilización de reservas, esta es la fase II de la imbibición (Bewley & Black 1994). A los **diez días de imbibición** (BBCH: 04; figura 2E), el crecimiento del embrión es muy visible (9 mm), la movilización de reservas se extiende a todo el plano del endospermo (aspecto blanquecino) que rodea el embrión. Exteriormente se observan rupturas en la cubierta de la semilla en la región micropilar sin que aún haya protrusión radicular, este punto es un marcador morfológico para señalar el inicio de la Fase III de la imbibición (Nonogaki *et al.*, 2007).

La **emergencia de la radícula** (raíz primaria) sucede entre los 12-15 días, a los 13 (en promedio), la radícula mide ~1 cm (BBCH: 05; figura 2F), esta emergencia es causada por el alargamiento de las células de la zona de elongación del embrión, cuya presión de turgencia permite la expulsión del tapón micropilar. El endospermo se hace blando en diferentes planos y los cotiledones todavía de color crema crecen longitudinalmente abarcando casi la totalidad de la semilla y al mismo tamaño que el eje embrionario. En este punto termina la germinación e inicia el desarrollo de las plántulas, un periodo de crecimiento vegetativo sustentado en las reservas del endospermo. Tres días después de la emergencia radicular (16 días desde la imbibición), la **radícula** alcanza **2-cm** de longitud (BBCH: 06; figura 2G), y se observa un color rosa-rojizo en el hipocótilo, los cotiledones ocupan gran parte del endospermo que a su vez reduce su volumen. Cuando la **radícula** tiene **5-cm** de longitud (20 días; BBCH: 07), el hipocótilo es totalmente rojizo y en la parte alta de la radícula se desarrollan entre tres y siete raíces secundarias (figura 2H). Los cotiledones siguen dentro del endospermo ocupando todo el plano horizontal.

A los ~25 días desde la imbibición se observan **plántulas con primordio foliar** (BBCH: 11; figura 2I), la germinación es epigea y curva según la clasificación de Duke (1969), además de criptocotiledonar (De Vogel, 1980), ya que los cotiledones no emergen totalmente de la envoltura seminal, la parte expuesta parece fotosintetizar. El hipocótilo (8-10 cm) es marrón en la parte superior y

rojizo en la media. La raíz es axonomorfa (raíz pivotante) de 8-10 cm, con varias raíces secundarias (15-30) que se extienden principalmente desde la base del cuello. Aún hay reservas energéticas en el endospermo.

A los ~30 días se observan **plántulas con 2-hojas** fotosintéticas (BBCHH: 12; figura 2J), el tallo presenta un epicótilo de ~3 cm, color verde, mientras que el hipocótilo no aumenta en longitud (8-10 cm), pero sí en grosor (8 mm), con rastros de color rojo-marrón en su parte basal, se conservan parte de los cotiledones dentro del endos-

permo totalmente agotado, el sistema radicular aumenta en raíces terciarias (40-60), a su vez también ramificadas. Esta fase indica la independencia de la plántula de las reservas del endospermo.

A los ~60 días desde la imbibición se observan **plántulas con seis hojas** fotosintéticas (BBCHH: 16; figura 2K). La plántula alcanza una altura de ~16 cm. El sistema radicular presenta finas y abundantes raíces (60-80). Las hojas son solo una de las dos tipos de hojas de un individuo adulto. El endospermo junto con los cotiledones se ha desprendido.

Etapas	Escala BBCH	Fases de desarrollo (días)	Eventos Morfofisiológicos
<b>Semilla seca</b> Figura 2A	00	Semilla seca (0)	Embrión rudimentario, endospermo ruminado.
<b>Imbibición</b> figura 2 B-E	01	1 día de imbibición	Inicio de la imbibición de la semilla. Fase I de imbibición.
	02	2 días de imbibición	Imbibición de la semilla en proceso. Fase I de imbibición.
	03	5 días de imbibición	Imbibición completa. Inicio del metabolismo en la periferia cercana al embrión. Fase II de la imbibición.
	04	10 días de imbibición	Embrión en crecimiento. Ruptura de la testa. Movilización de reservas alrededor del embrión. Fase III de imbibición
<b>Emergencia radicular</b> figura 2 F-H	05	1cm de radícula (13-15)	Emergencia de la radícula. Fin de la germinación. Movilización de reservas extendida a todo el endospermo.
	06	2 cm de radícula (16-18)	Diferenciación del eje embrionario en radícula e hipocótilo
	07	5 cm de radícula (20-21)	Inicio de la formación de raíces secundarias. Hipocótilo desarrollado, rojizo. Cotiledones todavía encerrados.
<b>Plántula</b> figura 2 I-K	11	Con primordio foliar (25-26)	Cotiledones parcialmente abiertos y con fotosíntesis. Epicótilo y primer par de hojas verdaderas sin abrir y separadas del ápice del tallo. Raíz ramificada.
	12	Con dos hojas (30-32)	Primer par de hojas con su tamaño final. Fotosíntesis en cotiledones y hojas. Remanentes de endospermo agotado. Independencia de la plántula.
	16	Con 6 hojas (60-64)	Seis hojas con su tamaño final de color verde oscuro, sistema radicular desarrollado. Endospermo y cotiledones desprendidos. Crecimiento vegetativo.

CUADRO 1

Caracterización del desarrollo temprano de *A. macrophyllata* (De-la-Cruz, 2012)

Ajustado acorde a la escala BCH. Hess *et al.*, 1997. Weed Research 37: 433-441.

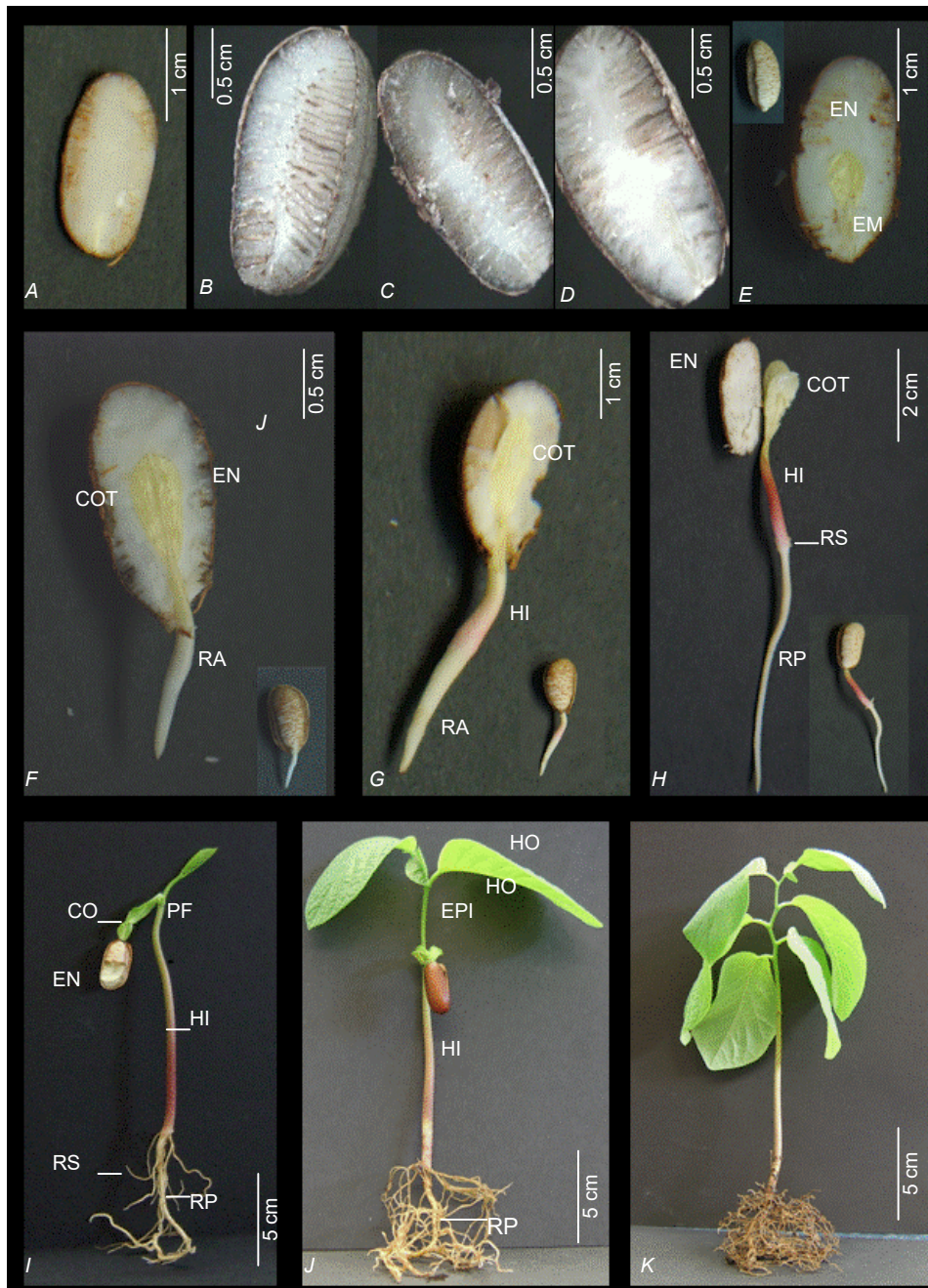


FIGURA 2

Proceso de germinación y desarrollo de *Annona macrophyllata*. A) Sin imbibición, B) 1 día en imbibición, C) 2 días en imbibición, D) 5 días en imbibición, E) 10 días en imbibición, F) Semillas con 1 cm de radícula, G) Semillas con 2 cm de radícula, H) Semillas con 5 cm de radícula, I) Plántula con primordio foliar, J) Plántula con 2 hojas, K) Plántula con 6 hojas. COT: Cotiledón; EN: Endospermo, EM: Embrión, EPI: Epicótilo, HO::Hoja, HI: Hipocótilo, PF: primordio foliar, RP: Raíz principal, RS: Raíz secundaria.

### Alcaloides durante el desarrollo temprano de *A. macrophyllata*

No se encontraron alcaloides en las semillas secas, se detectan hasta avanzada la imbibición, su abundancia aumenta sustancialmente en las etapas de emergencia radicular y de plántula. Estos MS se presentan en diferentes órganos y en distintos tiempos (dinámica de acumulación) (cuadro 2).

La presencia de alcaloides es evidente en los endospermos a los cinco días de imbibición ( $0.05 \text{ mg.g}^{-1}$ ), la abundancia en este tejido aumenta progresivamente hasta alcanzar su punto más alto en la fase de radícula de 2 cm ( $0.673 \text{ mg.g}^{-1}$ ), para luego disminuir hasta 80% ( $0.133 \text{ mg.g}^{-1}$ ) durante las dos etapas subsecuentes (cuadro 2). En las radículas-raíces, los alcaloides aumentan constantemente a partir de que la radícula emerge y hasta que las plántulas desarrollan 6 hojas, con rendimiento de hasta  $3.383 \text{ mg.g}^{-1}$ . Esta dinámica progresiva sucedió también con los hipocótilos-tallos, desde que este tejido se diferencia

(2 cm de radícula) hasta las plántulas con 6 hojas ( $2.208 \text{ mg.g}^{-1}$ ). Algo similar fue observado en las hojas en las tres fases estudiadas, pero con cantidades veinte veces menores ( $0.05 \text{ mg.g}^{-1}$ ). Los cotiledones solo presentaron alcaloides en dos fases (5 cm de radícula y primordio foliar) y en proporciones desde 16 hasta 37 veces menos ( $0.20$  y  $0.09 \text{ mg.g}^{-1}$  respectivamente) que los otros tejidos.

La producción de alcaloides se caracterizó por presentar dominancias temporales en los distintos tejidos; inicialmente los endospermos (fases de 1 y 2 cm de radícula) tuvieron la abundancia más alta, cerca de dos veces más que los otros; después los hipocótilos en las fases de 5 cm de radícula y primordio foliar acumularon hasta casi dos y nueve veces más que los endospermos y radículas respectivamente; finalmente las raíces en las plántulas con 2 y 6 hojas contuvieron hasta dos y veinte mayor proporción de alcaloides que los tallos y hojas respectivamente. Los cotiledones y las hojas siempre tuvieron menos cantidad de alcaloides.

Etapas	Semilla seca	Imbibición				Emergencia radicular			Plántula		
		0 días	1 y 2 días	5 días	10 días	1 cm de radícula	2 cm de radícula	5 cm de radícula	Primordio foliar	2 hojas	6 hojas
Fases	0 días	1 y 2 días	5 días	10 días	1 cm de radícula	2 cm de radícula	5 cm de radícula	Primordio foliar	2 hojas	6 hojas	
Escala BBCH	00	01 y 02	03	04	05	06	07	11	12	16	
Días	0	1, 2	5	10	13	16	20	25	30	60	
Testa	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0			
Endospermos	0.0 d	0.0 d	$0.102 \pm 0.01$ cd	$0.128 \pm 0.03$ cd	$0.354 \pm 0.11$ Ab	$0.673 \pm 0.09$ Aa	$0.217 \pm 0.1$ Bbc	$0.133 \pm 0.03$ Ccd			
Embriones		0.0	0.0	0.0							
Radículas-Raíces					$0.192 \pm 0.03$ Ac	$0.408 \pm 0.04$ Bbc	$0.412 \pm 0.14$ Bab	$0.716 \pm 0.06$ Bbc	$2.244 \pm 0.7$ Abc	$3.383 \pm 1.50$ Aa	
Hipocótilos-Tallos						$0.373 \pm 0.14$ Bd	$0.7208 \pm 0.4$ Abc	$1.258 \pm 0.24$ b	$1.047 \pm 0.43$ Bbc	$2.208 \pm 0.40$ ABa	
Cotiledones					0.0	0.0 c	$0.20 \pm 0.1$ Ba	$0.09 \pm 0.1$ Cab	0.0 Cc		
Hojas						---	---	$0.05 \pm 0.03$ Cc	$0.108 \pm 0.03$ Bb	$0.162 \pm 0.03$ Ba	
Total	0.0 d	0.0 f	$0.102 \pm 0.1$ d	$0.128 \pm 0.1$ d	$0.546 \pm 0.2$ D	$1.454 \pm 0.2$ c	$1.550 \pm 0.2$ c	$2.247 \pm 0.25$ b	$3.457 \pm 1.0$ b	$5.573 \pm 1.8$ a	

CUADRO 2

Producción de alcaloides ( $\text{mg g}^{-1}$  de mat. seca) durante el desarrollo temprano de *A. macrophyllata*

Los valores se representan como el promedio de 10 repeticiones y su desviación estándar.

Las letras en minúsculas señalan diferencias en las cantidades de alcaloides de un mismo tejido entre las etapas evaluadas (arreglo en filas). Mientras que las letras

en mayúsculas señalan diferencias entre los tejidos de una misma etapa (arreglo en columnas). Las medias fueron separadas con la prueba de Tukey 95%.

Los alcaloides se incrementan de manera proporcional al desarrollo de los tejidos con asociaciones lineales,

excepto en cotiledones (cuadro 3). Por ejemplo, en los endospermos la acumulación es directamente proporcional entre los 5 días de imbibición y la fase de 2 cm de radícula, en las radículas-raíces entre la fase de 1 cm de

radícula y la de plántulas con 6 hojas. Si se considera a la pendiente del modelo lineal como una velocidad de acumulación, se observa que las raíces son las que más aportan a la abundancia de alcaloides en las plántulas.

	Gl	F	P	Pba. Levene	Intervalo de linealidad (días)	Regresión lineal	r
Endospermos	29	35.0	0.000	0.569	5-16	Y= 0.0347 X - 0.0424	0.7961
Radículas/Raíces	17	10.92	0.004	0.058	13-60	Y= <b>0.0712</b> X - 0.7194	0.8901
Hipocótilos /Tallos	14	16.83	0.000	0.474	16-60	Y= 0.0380 X - 0.0264	0.9159
Cotiledones	8	8.88	0.016	0.100	13-30	Y= -.0031X - 0.1439	0.0403
Hojas	8	28.31	0.001	0.664	25-60	Y= 0.0027 X - 0.0027	0.8398
Total	29	24.39	0.000	0.039	5-60	Y= <b>0.1017</b> X - 0.312	0.9567

**CUADRO 3** Relación de la producción de alcaloides en el desarrollo temprano de *A. macrophyllata*

Gl= grados de libertad, F= estadístico, P= probabilidad, r= correlación

**Relaciones órgano-específicas en el perfil de alcaloides**

El perfil de alcaloides en el desarrollo de las plántulas incluye hasta cinco moléculas, tres de ellas fueron identificadas: lisicamina, atherospermidina y liriodenina (figura 3). Estos alcaloides son muy comunes en la familia Annonaceae, aunque se extienden a otros taxa (cuadro 4).



**FIGURA 3** Alcaloides producidos durante el desarrollo temprano de *Annona macrophyllata*.

Familias (número de géneros y especies)	Géneros (Número de especies)
Liriodenina	
Annonaceae (48, 143)	<i>Alphonsea</i> (2), <i>Annona</i> (23), <i>Artabotrys</i> (4), <i>Asimina</i> , <i>Cananga</i> (2), <i>Cardiopetalum</i> , <i>Cleistopholis</i> , <i>Cyathostemma</i> , <i>Cymbopetalum</i> , <i>Disepalum</i> , <i>Desmos</i> (2), <i>Duguetia</i> (3), <i>Enicosanthum</i> , <i>Enantia</i> (2), <i>Eupomatia</i> (2), <i>Fissistigma</i> , <i>Fusaea</i> , <i>Goniothalamus</i> (4), <i>Guatteria</i> (21), <i>Guatterioopsis</i> , <i>Hexalobus</i> , <i>Hornschurchia</i> , <i>Lettowianthus</i> , <i>Isolona</i> , <i>Meiogyne</i> , <i>Melodorum</i> , <i>Milusa</i> (3), <i>Mitrella</i> , <i>Mitrephora</i> , <i>Monodora</i> , <i>Oncodostigma</i> , <i>Oxandra</i> (2), <i>Oxymitra</i> , <i>Papualthia</i> , <i>Pachypodanthium</i> , <i>Polyalthia</i> (13), <i>Pseudomalmea</i> , <i>Pseudovoria</i> (4), <i>Popowia</i> , <i>Rollinia</i> (7), <i>Saphranthus</i> , <i>Saccopetalum</i> , <i>Schefferomitra</i> , <i>Trivalvaria</i> , <i>Unonopsis</i> (4), <i>Uvaria</i> (3), <i>Uvariopsis</i> , <i>Xylopia</i> (9)

Familias (número de géneros y especies)	Géneros (Número de especies)
Eupomatiaceae (1, 2)	<i>Eupomatia</i>
Hernandiaceae (1, 1)	<i>Illigera</i>
Lauraceae (5, 6)	<i>Litsea</i> (2), <i>Neolitsea</i> , <i>Cryptocarya</i> , <i>Lindera</i> , <i>Neolitsea</i>
Magnoliaceae (8, 35)	<i>Aromadendron</i> , <i>Elmerrillia</i> , <i>Liriodendron</i> , <i>Kmeria</i> , <i>Magnolia</i> (18), <i>Michelia</i> (8), <i>Paramichelia</i> , <i>Talauma</i> (4)
Menispermaceae (8, 17)	<i>Anisochyla</i> , <i>Chamasenthra</i> (2), <i>Cissampelos</i> , <i>Pachygone</i> , <i>Pycnarhea</i> , <i>Rhigiocarya</i> , <i>Sinomenium</i> (2), <i>Stephania</i> (4)
Monimiaceae (7, 18)	<i>Atherosperma</i> , <i>Doryphora</i> , <i>Dryadodaphne</i> , <i>Glossocalyx</i> , <i>Laurelia</i> , <i>Mollinedia</i> (5), <i>Siparuna</i> (7)
Nelumbonaceae (1, 1)	<i>Nelumbo</i>
Papaveraceae (2, 2)	<i>Roemeria</i> , <i>Papaver</i>
Ranunculaceae (2, 4)	<i>Thalictrum</i> (3), <i>Xanthorhiza</i> (1)
Rhamnaceae (2, 2)	<i>Colubrina</i> , <i>Zyziphus</i>
Rutaceae (1,4)	<i>Zanthoxylum</i> (4)
Thymelaeaceae (1, 1)	<i>Aquillaria</i>
Moraceae (1, 1)	<i>Broussonetia</i>
<b>Lisicamina</b>	
Annonaceae (17, 34)	<i>Annona</i> (4), <i>Artabotrys</i> (2), <i>Cananga</i> , <i>Duguetia</i> , <i>Enantia</i> (2), <i>Fissistigma</i> , <i>Guatteria</i> (8), <i>Heteropetalum</i> , <i>Oncodostigma</i> , <i>Oxandra</i> (2), <i>Polyalthia</i> (4), <i>Rollinia</i> (2), <i>Trivalvaria</i> , <i>Unonopsis</i> , <i>Uvaria</i> , <i>Uvariopsis</i> , <i>Xylopia</i>
Hernandiaceae (1, 1)	<i>Illigera</i>
Lauraceae (3, 3)	<i>Cassytha</i> , <i>Cryptocarya</i> , <i>Lindera</i>
Magnoliaceae (2, 2)	<i>Liriodendron</i> , <i>Michelia</i>
Menispermaceae (4, 5)	<i>Abuta</i> (2), <i>Chamasenthra</i> , <i>Limacia</i> , <i>Stephania</i> , <i>Telotoxicum</i>
Rhamnaceae	<i>Zyziphus</i>
<b>Atherospermidina</b>	
Annonaceae (12, 15)	<i>Artabotrys</i> (3), <i>Desmos</i> , <i>Duguetia</i> , <i>Enantia</i> , <i>Fissistigma</i> , <i>Guatteria</i> (2), <i>Polyalthia</i> , <i>Popowia</i> , <i>Pseudomalmea</i> , <i>Pseudovoria</i> , <i>Rollinia</i> (2), <i>Oxandra</i>
Monimiaceae	<i>Atherosperma</i>

CUADRO 4

Distribución de liriodenina, lisicamina y atherospermidina (De-la-Cruz, 2012)

Fue posible caracterizar la dinámica de acumulación de liriodenina (figura 5), el primer sitio en donde aparece el alcaloide es el endospermo durante la imbibición (BBCH: 03), luego en las radículas, hipocótilos y cotiledones (BBCH: 05-07), consecuentemente se encuentra en las raíces, tallos y hojas de las plántulas (BBCH: 11-16). Las raíces son el sitio con mayor abundancia del alcaloide, las hojas las menos. El endospermo es desprendido (BBCH: 16) con cierta cantidad del MS. La abundancia del alcaloide en las plántulas con seis hojas (BBCH: 16) es similar a la de un adulto (~ 1.0 mg.g<sup>-1</sup> MV).

#### **Papel biológico de los alcaloides de *A. macrophyllata*.**

Utilizando los hongos *Aspergillus glaucus* y *Rhizopus stolonifer* responsables de la pudrición de las semillas, se encontró que varios de los extractos alcaloidales de las plántulas en desarrollo inhiben en alta proporción su crecimiento (figura 4). El alcaloide liriodenina detiene el crecimiento de ambos fitopatógenos a 100 y 200 µM, respectivamente. La actividad de los extractos, la de liriodenina pura y la proporción de ésta en los extractos señalan la importancia del alcaloide como sustancia responsable de la actividad que muestran los extractos. Existe al menos otro alcaloide, en menor concentración, en las raíces de las plántulas que



podiera contribuir a la actividad antifúngica. Con estos datos se puede señalar que la proporción de alcaloides en los tejidos parecen ser suficiente barrera para impedir el crecimiento de estos fitopatógenos (figura 4).

Finalmente, los alcaloides provienen de los aminoácidos tirosina y fenilalanina, durante la germinación y el

desarrollo de la plántula son obtenidos de la degradación de las proteínas de reservas, su cuantificación permite señalar que para la biosíntesis de alcaloides, la plántula utiliza hasta 1.0 % de los aminoácidos precursores. Gasto energético justificable por la función que desempeñan estas moléculas especializadas (figura 5).

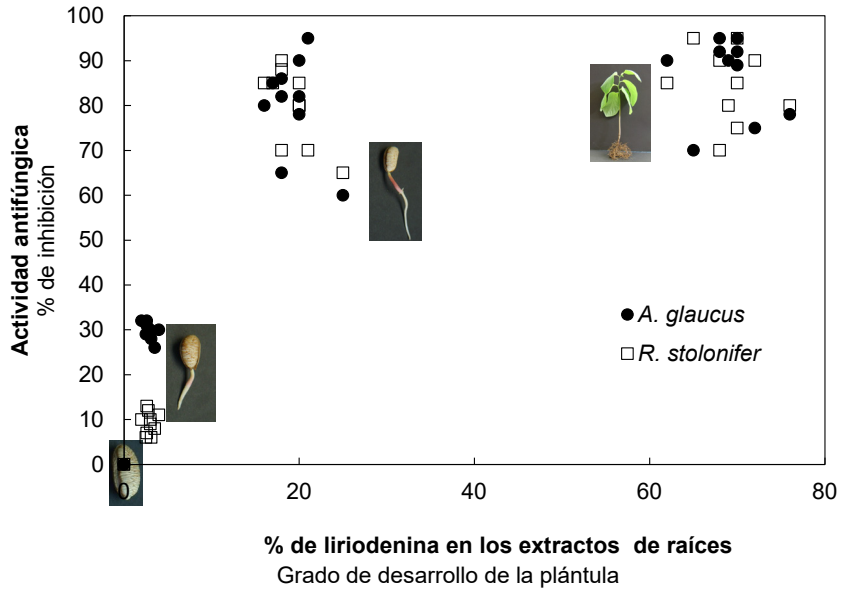


FIGURA 4

Correlación entre la actividad antifúngica de extractos de raíces de plántulas en desarrollo y la abundancia de liriodenina en ellos (n= 10).

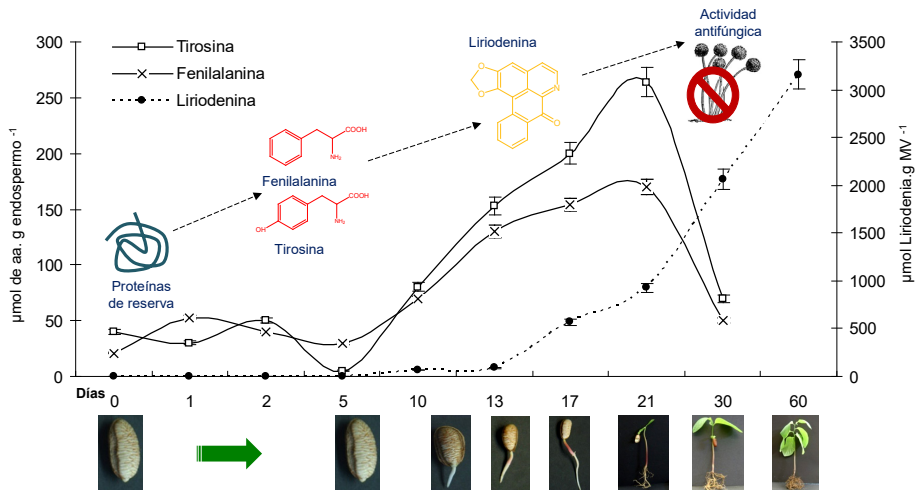


FIGURA 5

Figura 5. Abundancia de aminoácidos aromáticos y del alcaloide liriodenina durante el desarrollo temprano de *Annona macrophyllata*.

## CONCLUSIÓN

Los alcaloides constituyen recursos de defensa durante el desarrollo temprano de *Annona macrophyllata*.

## LITERATURA CITADA

- BEWLEY J.D. & M. BLACK, 1994.** *Seeds: Physiology of Development Germination*. New York: Plenum. 445 p.
- BEWLEY, J.D., K. BRADFORD, & H. HILHORST, 2013.** *Seeds: Physiology of Development, Germination and Dormancy*. Edic. Springer Science & Business Media. 392 p.
- BRÜCKNER H. & T. WESTHAUSER, 2003.** Chromatographic Determination of L- and D-amino Acids in Plants. *Amino Acids* 24: 43–55.
- BOVE, J., M. JULLIEN & P. GRAPPIN, 2001.** Functional Denomics in the Study of Seed Germination. *Genome Biology* 3(1): 1002.1–1002.5
- DE-LA-CRUZ-CHACÓN, I., 2001.** *Acetogeninas bioactivas de Annona diversifolia Safford*. Tesis de Licenciatura en Ingeniería Bioquímica. Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez. México. 75 p.
- DE-LA-CRUZ-CHACÓN, I., 2012** *Alcaloides bencilisoquinolínicos y su relación órgano-específica en las primeras fases de desarrollo de Annona diversifolia*. Tesis Doctoral, Universidad Nacional Autónoma de México, México. 175 p.
- DE-LA-CRUZ-CHACÓN, I. & A.R. GONZÁLEZ-ESQUINCA, 2012.** Liriodenine Alkaloid in *Annona diversifolia* During Early Development. *Natural Product Research* 26 (1): 42-49.
- DE VOGEL, E.F., 1980.** Seedlings of Dicotyledons. Structure, Development, Types. Agricultural Publishing and Documentation (PUDOC), Wageningen, p. 168-181.
- DUKE, J.A., 1969.** On Tropical Tree Seedlings. I. Seeds, Seedlings, Systems and Systematic. *Ann. Missouri Bot. Garden* 56 (2): 154-161.
- FERREIRA, G., A.R. GONZÁLEZ-ESQUINCA & I. DE-LA-CRUZ-CHACÓN, 2014.** Water Uptake by *Annona diversifolia* Saff. and *A. purpurea* Moc. & Sessé ex dunal Seeds (Annonaceae). *Revista Brasileira de Fruticultura* 36 (SPE1): 288-295.
- GONZÁLEZ-ESQUINCA, A.R., 2001.** *Contribución al estudio del género Annona (Annonaceae). Análisis fitoquímico de tres especies del estado de Chiapas*. Tesis Doctoral, Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- GONZÁLEZ-ESQUINCA, A.R., I. DE-LA-CRUZ-CHACÓN & L.M. DOMÍNGUEZ-GUTÚ, 2015.** Dormancy and Germination of *Annona macrophyllata* (Annonaceae): the Importance of the Micropylar Plug and Seed Position in the Fruits. *Botanical Sciences* 93 (3): 509-515.
- HARTMANN, T., 2008.** The Lost Origin of Chemical Ecology in the Late 19th Century. *PNAS* 105 (12): 4541–4546
- HESS, M., G. BARRALIS, H. BLEIHOLDER, L. BUHR, T. EGGERS, H. HACK, & R. STAUSS, 1997:** Use of the Extended BBCH Scale—General for the Descriptions of the Growth Stages of Mono and Dicotyledonous Weed Species. *Weed Research* 37: 433-441.

- HOLME, P.C. & K.A. WOODS, 2002.** Measurement of Plasma Tyrosine by HPLC-UV or LC-MS-MS for Assessing Chemically Induced Tyrosinaemia. *Chromatographia* 55 (1): S193-S194.
- LUNA-CAZARES, L.M. & A.R. GONZÁLEZ-ESQUINCA, 2010.** Susceptibility of Complete Bacteria and Spheroplasts of *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella typhi* to Rolliniastatin-2. *Natural Product Research* 24 (12): 1139-1145.
- NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards), 1997.** *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. Approved Standard*, NCCLS Document M27-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA, USA.
- NONOGAKI, H., F. CHEN, & K.J. BRADFORD, 2007.** Mechanisms and Genes Involved in Germination Sensu stricto. Chapter 11. In: *Seed Development, Dormancy and Germination*. Kent Bradford and Hiroyuki Nonogaki. (Ed.) Annual Plant Reviews. Vol. 27, Blackwell Publishing Ltd.
- NONOGAKI, H., 2010.** MicroRNA Gene Regulation Cascades During Early Stages of Plant Development. *Plant and Cell Physiology*, 51 (11): 1840-1846.
- PÉREZ-AMADOR, M.C., A.R. GONZÁLEZ-ESQUINCA, A. GARCIA-ARGAEZ, E. BRATOEFF & C. LABASTIDA, 1997.** Oil Composition and Flavonoid Profiles of the Seeds of Three *Annona* Species. *Phyton* 61: 77-80.
- PERKIN E., 2007.** *Catálogo de métodos. Aromatic Amino Acids on C18 (Fast Analysis)*. LC\_307.
- RIESELMAN, M.H., K.C. HAZEN, & J.E. CUTLER, 2000.** Determination of Antifungal MICs by a Rapid Susceptibility Assay. *J. Clin. Microbiol.* 38: 333 – 340.
- SCHLIE-GUZMÁN, M.A., A. GARCÍA-CARRANCÁ & A.R. GONZÁLEZ-ESQUINCA, 2009.** *In vitro* and *in vivo* Antiproliferative Activity of Laherradurin and Cherimolin-2 of *Annona diversifolia* S12aff. *Phytotherapy Research* 23: 1128–1133.
- WEITBRECHT, K., K. MÜLLER & G. LEUBNER-METZGER, 2011.** First off the Mark: Early Seed Germination. Darwin Review. *Journal of Experimental Botany* 62 (10): 3289–3309.
- ZADOKS, J.C., T.T. CHANG & C.F. KONZAK, 1974.** A Decimal Code for the Growth Stages of Cereals. *Weed Research* 14: 415-421.

