



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

Contenido de taninos en el fruto de *Thalassia testudinum*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
BIÓLOGO

PRESENTA:

ALFONSO TROYO BALLINA

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. GUADALUPE JUDITH MÁRQUEZ GUZMÁN



México, DF.

Mayo, 2009



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

Esta tesis y el trabajo que conlleva fueron hechos bajo la dirección de la Dra. Guadalupe Judith Marquez Guzmán en el Laboratorio de Desarrollo en Plantas de la Facultad de Ciencias, UNAM dentro del taller titulado "Biología del Desarrollo y Función de las Estructuras Reproductoras en Cactaceas". Con colaboración de la Dra. Brigitta Van Tussenbroek Ribbink del laboratorio de Botánica marina ubicado en la unidad académica de Puerto Morelos del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM. Y con colaboración del Dr. David Manuel Díaz Pontones del laboratorio de Fitoquímica de la Universidad Autónoma Metropolitana plantel Iztacala.

## AGRADECIMIENTOS

A Judith, por permitirme compartir un ratito de su vida. Por ser tan paciente conmigo, por siempre estar dispuesta a escuchar mis dudas, cuestionamientos y hasta dilemas personales, por esas pláticas a escondidas sobre politiquerías y por aceptarme como su alumno, lo cual me permitió formar parte de una bonita familia. Eres una gran mujer de Ciencia.

A Brigit por el apoyo que me brindó en Puerto Morelos, el trabajo de campo, por siempre estar tan dispuesta a ayudar y mostrarme esa pasión que tiene por los pastos.

A David por aceptarme a ratos en su laboratorio y no desesperarse (tanto) conmigo.

A Margarita Ponce por sus comentarios siempre tan valiosos, por compartir sus conocimientos en clases muy padres. Siempre te he admirado por tu temple tan tranquilo.

A Karina porque a pesar de que fui muy mal alumno suyo, siempre me vio con buena cara y porque aceptó ser mi sinodal con todo el trabajo que tiene.

A Mague por ser el único agente que combate la entropía en el laboratorio, por emanar tanta felicidad y positivismo y a la vez educarnos a todos con mano dura. Una sonrisa tuya me hace el día!

Al Rich por su ayuda invaluable cuando la necesitaba, por compartir sus conocimientos conmigo y por tantas charlas tan agradables haciendo ameno mi tiempo en el laboratorio.

Guadalupe Barba por su apoyo en todo el trabajo de campo en Puerto Morelos, trabajo nada sencillo.

A la M. en C. Monica por siempre estar dispuesta a responder mis dudas y por hacer una gran parte de mis cortes en ultramicrotomo.

A la M. en C. Yolanda Hornelas por su apoyo al utilizar y obtener tan buenas fotografías en el MEB.

A la M. en C. Guillermina por su apoyo en la identificación de cristales que tanto trabajo nos costó encontrar!

A Soni por revisar este trabajo cuando apenas estaba en sus albores y por tantas risas que me brindó por siempre tener la cabeza en la nubes.

A Kor por ayudarme con el trabajo de campo a pesar de encontrarse tan ocupado en su tesis doctoral.

A Fernando Negrete por su ayuda con la captura de peces.

A Silvia Espinoza por brindar su apoyo desecando material para el EDS.

A mi papá por su paciente impaciencia y porque aunque no se da cuenta, nos da mucho más de lo que necesitamos.

A mi mamá por esa fe ciega que tiene en mí, de no ser por ti, no habría llegado tan lejos.

A Paola por ser mi amiga desde la infancia y fingir interés cuando le explicaba algo aunque estoy casi seguro de que no entendía nada.

A Sil, mi musa, mi jefa, mi amor, porque me ayudó mucho durante la carrera, en ocasiones creo que hasta me arrastró para hacer las cosas. Te debo mucho. Juntos hemos vivido muchas cosas, aprendido muchas otras y lo que nos falta!

A los Triana, porque siempre mostraron interés en mi tesis a pesar de que no me entendían nada. Cuando pienso en la familia, ustedes me vienen a la mente. Din, eres como un hermano para mí.

A Rosita y Joel porque han estado presentes casi toda mi vida y siempre han sido muy amables conmigo. Los admiro por ser tan trabajadores.

A mi familia adquirida, Denis, Rodri, Pichit, Marce, la tía Yoli, Juan y en especial a mi suegrita por ser tan noble, a mi suegro por permitir un intercambio de vivencias y a Florian por ser un amigo tan ameno.

A los chavos del laboratorio Raúl, Diana (y Manolo) Alfredo, Paty, Juan, Alma, Amelia, León, Memo, Aldebarán, Rocío, Magali, y todos los no mencionados por contribuir a tener un ambiente cómodo en el laboratorio.

Si olvidé a alguien, también le doy las gracias.

## ÍNDICE

|  |    |
|--|----|
| <b>RESUMEN</b>                             | 2  |
| <b>ANTECEDENTES</b>                        |    |
| • Introducción                             | 3  |
| • Distribución de <i>Thalassia</i>         | 5  |
| • Localización                             | 5  |
| • Reproducción                             | 6  |
| • Fruto y semilla                          | 6  |
| • Metabolitos secundarios                  | 7  |
| <b>JUSTIFICACIÓN</b>                       | 12 |
| <b>OBJETIVO</b>                            | 12 |
| <b>METODOLOGÍA</b>                         |    |
| • Área de estudio                          | 13 |
| • Análisis estructural                     | 13 |
| • Pruebas de depredación <i>in situ</i>    | 14 |
| • Determinación de metabolitos secundarios | 16 |
| • Microscopio electrónico de barrido       | 18 |
| • Análisis de rayos X (SEM-EDS)            | 18 |
| <b>RESULTADOS</b>                          |    |
| • Análisis estructural de las emergencias  | 19 |
| • Contenido de células parenquimatosas     | 20 |
| • Análisis de rayos X (SEM-EDS)            | 24 |
| • Pruebas de depredación <i>in situ</i>    | 26 |
| • Determinación de metabolitos secundarios | 27 |
| <b>DISCUSIÓN</b>                           | 32 |
| <b>CONCLUSIÓN</b>                          | 35 |
| <b>BIBLIOGRAFÍA</b>                        | 36 |

## ÍNDICE DE IMÁGENES

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1.</b> <i>Thalassia testudinum</i>  | 4  |
| <b>Figura 2.</b> Distribución geográfica de <i>Thalassia testudinum</i>                 | 6  |
| <b>Figura 3.</b> Fruto y semilla de <i>Thalassia testudinum</i>                         | 7  |
| <b>Figura 4.</b> Estructura y arreglo de los isoprenos                                  | 8  |
| <b>Figura 5.</b> Estructura base de un fenilpropanoide                                  | 9  |
| <b>Figura 6.</b> Estructura general de un flavonoide                                    | 10 |
| <b>Figura 7.</b> Estructura general de una antocianina                                  | 10 |
| <b>Figura 8.</b> Estructura general de un tanino condensado y de un tanino hidrosoluble | 11 |
| <b>Figura 9.</b> Fruto de <i>Thalassia</i> indicando cortes                             | 13 |
| <b>Figura 10.</b> <i>Sparisoma viride</i>   | 14 |
| <b>Figura 11.</b> Cuadrante   | 15 |
| <b>Figura 12.</b> Placa HPTL  | 17 |
| <b>Figura 13.</b> Corte longitudinal del fruto de <i>Thalassia testudinum</i>           | 21 |
| <b>Figura 14.</b> Fotografías de MEB  | 22 |
| <b>Figura 15.</b> Cristales   | 23 |
| <b>Figura 16.</b> Resultado de análisis mediante EDS de rafídios                        | 24 |
| <b>Figura 17.</b> Resultado de análisis mediante EDS de cristales cúbicos               | 24 |
| <b>Figura 18.</b> Resultado de análisis mediante EDS de cristales poligonales           | 25 |
| <b>Figura 19.</b> Residuos de fruto de <i>T. testudinum</i>                             | 26 |
| <b>Figura 20.</b> Curva patrón del ácido gálico   | 27 |
| <b>Figura 21.</b> Extracción y cuantificación de fenoles solubles                       | 28 |
| <b>Figura 22.</b> Fenoles totales por etapa   | 29 |
| <b>Figura 23.</b> Pruebas Dot-Blot  | 30 |
| <b>Figura 24.</b> Cromatografía de placa fina   | 32 |

## RESUMEN

Los pastos marinos constituyen un pequeño grupo de angiospermas adaptadas para la vida submarina. Son capaces de completar su ciclo de vida debajo del agua y nunca estar en contacto con el aire. Además de los obstáculos reproductivos y fisiológicos a los que se enfrentan, los pastos marinos deben ser capaces de defenderse de la ardua herbivoría a la que son sometidos, ya que se distribuyen en zonas con una biota muy diversa, numerosa y hambrienta. Para defenderse en contra de los herbívoros, los pastos marinos utilizan las mismas estrategias usadas por una gran cantidad de plantas terrestres. Una de las estrategias consiste en utilizar metabolitos secundarios (como son los taninos) que ellas mismas producen (Raven et al., 1992). Los pastos marinos producen metabolitos secundarios de la misma forma que lo hacen las plantas terrestres y las sustancias producidas son las mismas (Zapata y McMillan, 1979).

Los metabolitos secundarios son sustancias químicas que las plantas producen y son derivados del metabolismo primario, por lo que no se consideran sustancias vitales para las plantas. Estos compuestos suelen ser específicos para grupos taxonómicos de plantas (Wink, 2003) y pueden tener una amplia variedad de usos, muchos de los cuales aún son desconocidos. Los compuestos químicos producidos por el metabolismo secundario son de amplio interés para el hombre ya que constituyen el compuesto activo de muchas plantas utilizadas en la herbolaria, con los que posteriormente es posible producir medicamentos (Buchanan et al., 2000), alimentos, pesticidas (Hans-Walter, 1997) entre otros.

En este trabajo se localizó la presencia de taninos en los frutos del pasto marino *Thalassia testudinum* durante distintas etapas de su desarrollo. Las células que contienen taninos se ubican únicamente en el exocarpo del fruto. En los frutos maduros se identificó la presencia de cristales poligonales, cúbicos y rafídios ubicados también en el exocarpio.

Se cuantificaron los taninos totales por etapas de desarrollo. Se obtuvo como resultado que la acumulación de taninos hidrosolubles es activa en etapas tempranas y conforme el fruto madura disminuye. Por el contrario, la síntesis de taninos no solubles en etapas tempranas es muy escasa y aumenta conforme el fruto madura. Se caracterizaron los tipos de metabolitos secundarios producidos en el fruto de *T. testudinum* como un primer acercamiento a las sustancias producidas por estas plantas tan peculiares.

## ANTECEDENTES

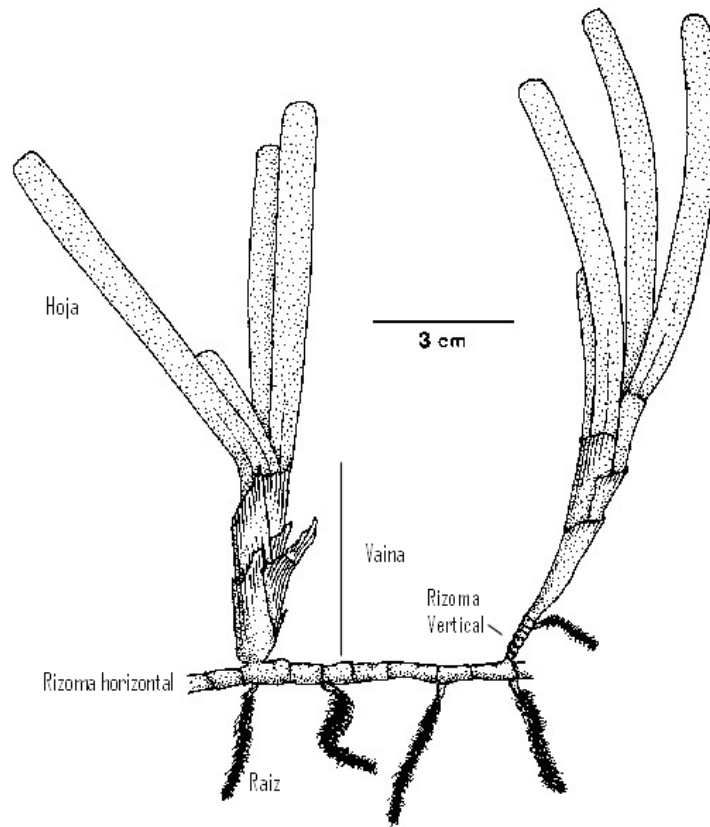
Los pastos marinos son un grupo de angiospermas que se distribuyen en las costas de Brasil, Australia, Alaska, Sureste de Europa, India, Este de África, el Caribe y algunas otras costas del mundo a excepción de la Antártida (Green y Short, 2003). Proporcionan un hábitat para numerosas especies de peces, crustáceos, poliquetos y microorganismos, entre otros (Gambi y Tussenbroek, 2003) además constituyen el principal alimento de tortugas, sirenios (manatí en América y dugongos en el resto del mundo; Burnie, 2003), erizos de mar, peces y aves marinas (Supanwanid *et al.*, 2006). También constituyen las guarderías de los peces que viven en el océano abierto (Orth *et al.*, 2000; Green y Short, 2003). Los sistemas formados por los pastos marinos resultan muy útiles para filtrar aguas costeras, para disipar la energía de las olas y ayudan a retener el sedimento (Green y Short, 2003), además de formar regiones de alta producción primaria y secundaria (Orth *et al.*, 2000).

El ambiente marino ofrece condiciones de vida muy diferentes para estas plantas en comparación con las condiciones en las que viven las plantas terrestres. Sin embargo, al igual que para todas las plantas, la luz resulta ser un factor limitante en su crecimiento, pero la luz no se transmite de igual manera en un medio gaseoso que en un medio líquido (Sculthorpe, 1985). Al viajar por el agua, la luz pierde intensidad y conforme aumenta la profundidad, la cantidad de luz presente disminuye. Debido a esto, los pastos marinos están restringidos a habitar la región de agua iluminada conocida como zona fótica (Dring, 1986). En aguas transparentes oceánicas, la zona fótica tiene una profundidad promedio de 100 m dependiendo de la turbidez del agua. Sin embargo, la luz se va descomponiendo conforme aumenta la profundidad. El espectro completo de luz puede transmitirse solamente un metro por debajo de la superficie. Pasando esa profundidad la longitud de onda del rojo (700nm) deja de incidir; pasando los 10 m ya no incide el amarillo (540nm); pasando los 50 m deja de incidir el verde (480nm), y el azul (460nm) puede alcanzar hasta profundidades de 100 m y un poco más (Página en red: The photic zone: The Light in the water, 2003). Los requerimientos de luz de los pastos marinos varían dependiendo de la especie de que se trate. La mayoría de estas plantas pueden crecer hasta los 20 m de profundidad, aunque *Posidonia oceanica* puede encontrarse hasta los 40 m de profundidad (Philips y Meñez, 1988) y *Halophila* ha sido localizado en aguas cristalinas hasta 58 m de profundidad (Short *et al.*, 2001).

Los pastos marinos crecen completamente sumergidos ya sea en aguas salobres (estuarios) o en agua salada, siendo la salinidad la responsable de restringir tanto la distribución de las especies como su reproducción. Casi todos los pastos marinos crecen mejor en sustratos arenosos, lodosos o rocosos y casi todos se encuentran en lugares protegidos de la acción de las olas con la excepción de *Phyllospadix*, que se puede distribuir en el Pacífico donde rompen las olas, o también *Amphibolis* y *Thalassodendron* que se pueden anclar a rocas y arrecifes en zonas con oleaje fuerte (Short *et al.*, 2001).

Los pastos marinos están constituidos por un grupo polifilético de monocotiledóneas con ciertas características morfológicas en común: hojas aplanadas (excepto *Syringodium* y *Phyllospadix*) y largas (excepto *Halophila*) y un sistema extenso de raíces y rizomas (Figura 1) que las fijan al sustrato (Philips y Meñez, 1988; Green y Short, 2003). Estas adaptaciones son características de las plantas sumergidas, ya que en aguas con corrientes, proporcionan un anclaje fuerte al sustrato, permiten que las plantas vivan con luz restringida y reducen la difusión de gas en el agua (Ferguson *et al.*, 1980 en Philips y Meñez, 1988).





**Figura 1.** *Thalassia testudinum* mostrando raíces, rizomas, tallo aéreo y hojas (A) y la zona apical de las hojas (B) (tomado de Philips y Meñez, 1988).

Existen cinco adaptaciones generales que deben presentar los pastos marinos para poder sobrevivir (Den Hartog, 1970; de la Lanza y Tovilla, 1986; Green y Short, 2003):

1. Deben estar adaptadas a un medio salino.
2. Deben ser capaces de crecer completamente sumergidas en el agua.
3. Deben tener un sistema de raíces que opere como anclaje para contrarrestar el efecto de las olas.
4. Deben ser capaces de tener una polinización hidrófila eficaz.
5. Deben tener la habilidad de competir con otras especies marinas (Kuo y Den Hartog, 2000).

Respecto a sus ancestros, el origen de los pastos marinos es incierto debido a que su presencia en el registro fósil es muy pobre (Short *et al.*, 2001) y los pocos registros existentes no están bien preservados (Kuo y Den Hartog, 2000). Arber (1920) propuso que los ancestros de los pastos marinos son plantas que estaban adaptadas a vivir en agua dulce y que gradualmente se convirtieron en plantas tolerantes a la sal, después en plantas de agua salobre y finalmente en plantas marinas. Sin embargo, algunos fósiles bien conservados de pastos marinos demuestran que ya existían estas plantas en etapas muy tempranas en la historia de las angiospermas (Den Hartog, 1970). Cabe mencionar que los fósiles encontrados de pastos marinos aún no han sido tratados con técnicas de análisis actuales, por lo cual se debe tener cuidado con el tema (Kuo y Den Hartog, 2000).

Todas las especies de pastos marinos son capaces de reproducirse asexualmente mediante la extensión de rizomas horizontales que en algún momento determinado pueden adquirir su independencia física y/o fisiológica. Según Short *et al.* (2001) este tipo de reproducción es lo que mantiene principalmente a las poblaciones

y éstas son genéticamente iguales. Sin embargo, Kornelis (2008) encontró que para *T. testudinum* existe una alta diversidad genética en su área de distribución.

Existen aproximadamente 60 especies de pastos marinos (Short y Coles, 2001) agrupados en cuatro familias y sus géneros representativos aparecen en paréntesis:

1. Zosteraceae (*Zostera*, *Heterozostera* y *Phyllospadix*)
2. Cymodoceaceae (*Halodule*, *Cymodocea*, *Syringodium*, *Thalassodendron* y *Amphibolis*)
3. Posidoniaceae (*Posidonia*)
4. Hydrocharitaceae (*Thalassia*, *Halophila* y *Enhalus*)

Por desgracia muchas praderas de pastos marinos están desapareciendo de las costas como consecuencia de la actividad humana. Muchas playas son dragadas, otras reciben todos los residuos del drenaje proveniente de las ciudades, lo cual enturbia el agua y no permite que incida la luz, además de que hay un exceso de nutrientes (Short et al. 2001). También la actividad turística ocasiona que sean cortados y retirados los pastos debido a que las playas en donde se localizan suelen ser playas con una gran cantidad de hojas secas que no agradan al turismo. La industria pesquera está tomando parte en la desaparición de los pastos marinos, pues las hélices de los botes que se usan para sacar almejas que se encuentran ahí enterradas se llevan todo el pasto marino que se halla a su paso (Orth et al. 2000; Short et al. 2001). En las costas de Cancún y de la rívera Maya la problemática principal se debe a que el turismo va en aumento y cada año se construyen más hoteles que aportan más contaminación y un mayor número de gente en la zona, disminuyendo el área de distribución de pastos marinos, manglares y muchas especies de animales que van siendo desplazados.

### **Distribución de *Thalassia***

*Thalassia* es uno de los tres géneros marinos de la familia Hydrocharitaceae y está compuesto por dos especies consideradas especies gemelas (Kuo et al., 1991; Tussenbroek et al., 2006). *Thalassia testudinum* Banks ex König y *Thalassia hemprichii* (Ehrenberg) Ascherson. *T. testudinum* se distribuye ampliamente en el mar Caribe y el Golfo de México (Figura 2) entre los 9°S y 32°N, mientras que *T. hemprichii* se puede encontrar en el Indo-pacífico entre los 28° S y 32°N. *T. testudinum* es además la especie más abundante en su área de distribución (Den Hartog, 1970; Green y Short, 2003). Forma comunidades extensas en el sublitoral y puede vivir hasta 10 m de profundidad en aguas claras, pero en aguas turbias se le encuentra a un máximo de 1 – 2 m (Burkholder et al., 1959 y Tussenbroek et al., 2006).

### **Localización**

Es posible encontrar a *T. testudinum* en diferentes sustratos: arena de coral, plataformas de corales muertos, sustratos rocosos (Den Hartog, 1970) y lodo o arena, pero requiere entre 20 y 25 cm de profundidad en el sustrato para tener un crecimiento apropiado (Tussenbroek et al., 2006). Usualmente, se le localiza a profundidades entre 0.3 y 5 m y rara vez crece en la zona intermareal (Tussenbroek et al., 2008). Este pasto marino se establece tanto por semillas (reproducción sexual) como por rizomas (Tussenbroek et al., 2006).

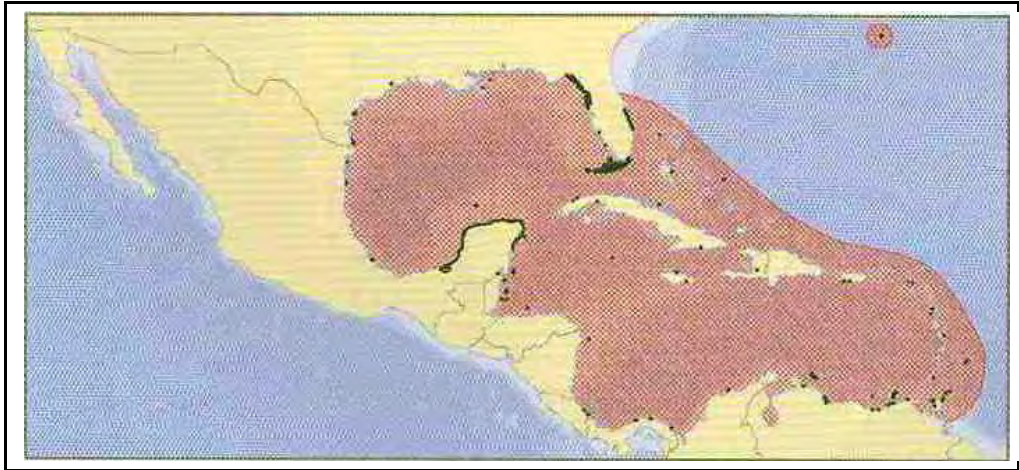


Figura 2. Distribución geográfica de *Thalassia testudinum* (tomado de Creed y Short, 2003).

*Thalassia testudinum* no tolera temperaturas altas por tiempos prolongados, ni tampoco la desecación. El rango de temperatura ideal para el crecimiento de estas plantas oscila entre los 23°C - 31°C. El rango óptimo de salinidad ha sido reportado de 24 a 35 psu (*practical salinity units*), pero tolera desde 3 hasta 60 psu por periodos cortos, lo cual provoca la pérdida de hojas de la planta (Tussenbroek et al., 2006).

### Reproducción

El sistema de reproducción sexual de *T. testudinum* y *T. hemprichii* es dioico (Kuo y Den Hartog, 2006). Aunque la propagación vegetativa la producción de flores es común (Den Hartog, 1970). En el Caribe mexicano, en Puerto Morelos, el periodo de floración inicia en marzo y termina en septiembre (Tussenbroeck, 1994; Jiménez, 2004), y se pueden encontrar frutos maduros desde julio hasta octubre (Jiménez, 2004). La flor femenina tiene siete u ocho estilos, el ovario es ínfero y generalmente tiene tres óvulos (Den Hartog 1970). La flor masculina tiene un pedicelo de 1.25-2.5 cm, nueve estambres y la proporción de flores masculinas con respecto a las flores femeninas varía dependiendo de la zona en la que se ubiquen (Tussenbroek et al., 2006).

La polinización en *Thalassia testudinum* es hidrófila y la antesis de flores masculinas y femeninas es sincronizada (Tussenbroek et al, 2008). Las flores femeninas y masculinas en antesis se encuentran a 2.5 y 3 cm sobre el sustrato y el polen es liberado envuelto en un mucílago con una flotación ligeramente negativa (Cox y Tomlinson, 1988; Tussenbroek et al., 2008). El polen es arrastrado por las corrientes hasta que se encuentra con algún estigma de la flor femenina y se adhiere a éste (Tomlinson, 1969). Los granos de polen germinan rápidamente en el estigma.

### Fruto y semilla

El fruto (figura 3 -1-) tiene forma globosa (Kuo y den Hartog, 2006), es de color verde amarillo brillante y consta de exocarpio, mesocarpio y endocarpio. Mide de 20 a 25 mm de diámetro, de 15 a 20 mm de largo y un pico estilar de 3 a 7 mm. Conforme madura, el fruto cambia de color de verde brillante a amarillo y en ocasiones puede tornarse rojo (Orpurt y Boral, 1964). Una vez maduro, el fruto se abre por la parte superior en seis o nueve valvas y generalmente produce tres semillas piriformes, aunque en ocasiones produce desde una semilla hasta cinco (Tussenbroek et al., 2006). El fruto maduro generalmente permanece adherido a la planta madre donde se abre y libera las semillas ya germinadas. Sin embargo, en algunas ocasiones el fruto se desprende y flota en la superficie, en donde posteriormente se abre y libera a las

semillas que poseen una flotabilidad negativa (Kuo, 1991; Jiménez, 2004). Las semillas de *T. testudinum* (figura 3 -3-) son criptovivíparas; esto quiere decir que las semillas comienzan la germinación, incluso antes de que las valvas del fruto se abran (Orpurt y Boral, 1964) sin haber pasado por un periodo de latencia.

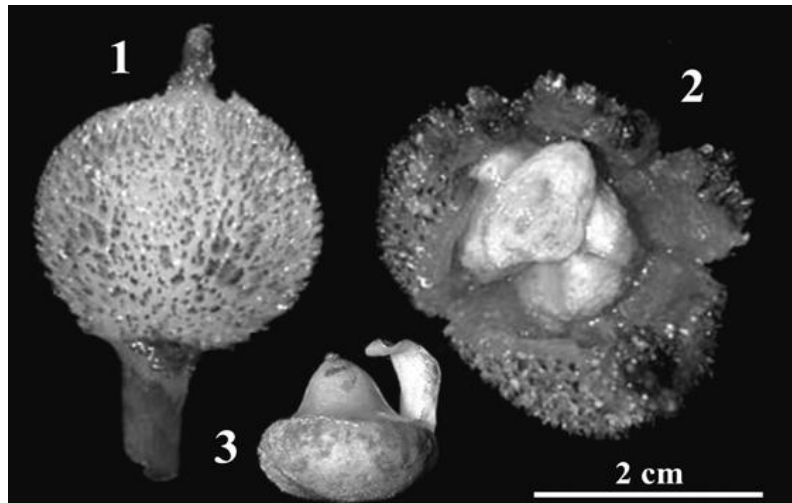


Figura 3. (1) Fruto de *Thalassia testudinum*. (2) Fruto abierto con dos semillas. (3) Semilla de *T. Testudinum* (tomado de van Dijk, 2008)

Las semillas son piriformes y miden ~ 10 mm de ancho y ~ 8 mm de longitud (Orpurt y Boral, 1964; Kuo et al., 1991). El embrión tiene un hipocótilo grande fusionado con el cotiledón (Jiménez, 2004; Kuo y Den Hartog, 2006). La parte basal siempre queda en contacto con el suelo mientras que la parte apical queda hacia arriba y de esta parte surge la plúmula rodeada de tres primordios de hojas. La cubierta seminal es muy delgada. Kuo y Den Hartog (2006) la describen como membranosa, mencionando que se remueve muy fácilmente.

El pericarpio, el hipocótilo del embrión (Jiménez, 2004; Kuo, 1991) y los primordios foliares presentan taninos en vacuolas (Kuo y McComb, 1989).

### Metabolitos secundarios

Los metabolitos secundarios son sustancias químicas producidas por las plantas que a diferencia de los metabolitos primarios, no participan en la nutrición ni en procesos metabólicos esenciales dentro de la planta. Las sustancias producidas por el metabolismo secundario influencia interacciones ecológicas entre la planta y el ambiente. Basándose en el origen biosintético, los metabolitos secundarios o productos naturales de las plantas se dividen en (Buchanan et al., 2000):

- Terpenoides: derivan de precursores isopentenil (IPP) de cinco carbonos. Se han identificado más de veinticinco mil compuestos.
- Alcaloides: contienen uno o más átomos de nitrógeno y son biosintetizados a partir de aminoácidos. Se han identificado más de doce mil compuestos.
- Fenilpropanoides y otros compuestos fenólicos: sintetizados por la vía del ácido shikímico o por la vía del malonato/acetato y provienen de aminoácidos aromáticos. Se han identificado más de ocho mil compuestos.

### Terpenos

Los terpenos constituyen el grupo más extenso de los metabolitos secundarios. Todos los terpenos son sustancias derivadas de la fusión repetida de unidades de

cinco carbonos basados en un esqueleto de isopentano (figura 4). Estos monómeros son conocidos como isoprenos debido a que la descomposición térmica de muchos terpenoides da como resultado el gas alqueno isopreno y porque ciertas condiciones químicas (*in Vitro*) pueden inducir al isopreno a polimerizarse formando unidades múltiples de cinco carbonos. Es por esto que los terpenos también son llamados isoprenoides aún cuando el isopreno no es un precursor de estos metabolitos (figura 4).

Los isoprenos que forman a los terpenoides usualmente están unidos en un arreglo “cabeza a cola”; sin embargo también se pueden encontrar arreglos cabeza-cabeza y cabeza-cuerpo medio (figura 4).

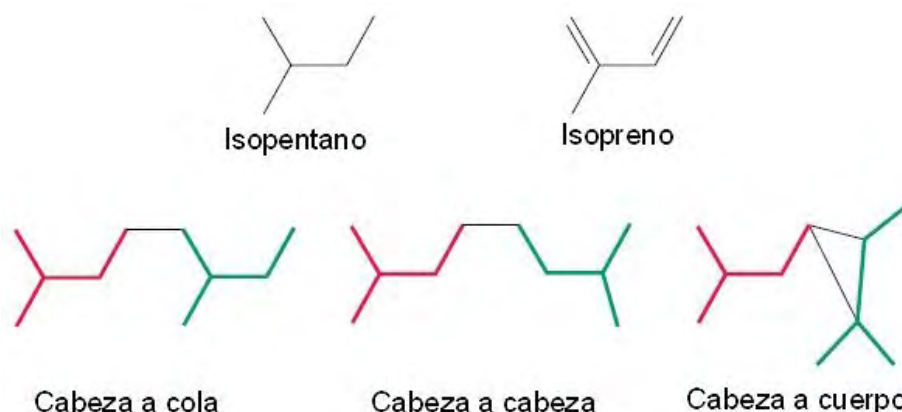


Figura 4. Estructura y arreglo de los isoprenos. Tomado de Buchanan, 2000

## Alcaloides

Desde la antigüedad, los alcaloides han sido utilizados en extractos de raíces, cortezas, hojas, flores, frutos y semillas y siempre con una utilidad farmacológica o en ritos y ceremonias religiosas. Los agentes activos en muchas de estas sustancias han sido aislados en tiempos modernos y se ha descubierto que son compuestos heterocíclicos de nitrógeno.

Muchos de los compuestos de nitrógeno obtenidos de vegetales tienen átomos de nitrógeno básico, por lo que es posible extraerlos mediante una dilución ácida. Estos alcaloides pueden ser regenerados después de su extracción mediante una base acuosa.

Quizás el alcaloide más importante es la morfina, ya que fue el primero en descubrirse al ser aislado de un miembro de la familia *Papaveraceae*. Dados los efectos de la morfina, fue y es muy útil para la medicina, razón por la cuál se inició una búsqueda de alcaloides útiles para el hombre. Esta búsqueda llegó a tal grado que a la fecha se han aislado e identificado más de doce mil alcaloides distintos. Otro alcaloide de gran importancia para el hombre es la nicotina, que en pequeñas cantidades estimula al sistema nervioso y millones de personas lo consumen en tabaco; sin embargo a concentraciones altas puede utilizarse como insecticida. En la siguiente tabla se encuentran distintos ejemplos de alcaloides y sus usos:

Tabla 1.

| Sustancia | Usos                         | Planta de la que se obtiene |
|-----------|------------------------------|-----------------------------|
| Codeína   | Analgésico, supresión de tos | <i>Papaver rhoeas</i>       |
| Heroína   | Analgésico muy potente       | <i>Papaver somniferum</i>   |
| Cocaína   | Estimulante y analgésico     | <i>Erythroxylon coca</i>    |
| Morfina   | Analgésico                   | <i>Papaver somniferum</i>   |

|          |   |                          |
|----------|---|--------------------------|
| Atropina | Dilatación de pupilas, sedante  | <i>Atropa belladona</i>  |
| Nicotina | Estimulante del sistema nervioso  | <i>Nicotiana tabacum</i> |
| Cafeína  | Vasodilatador, efectos a sistema cardiovascular, digestivo y respiratorio | <i>Coffea arabica</i>    |

Un gran número de alcaloides activos fisiológicamente contienen el sistema anular de tropano.

### Fenilpropanoides

Las plantas producen muchos compuestos fenólicos distintos. Algunos tienen un rol estructural, otros son utilizados como defensa y otros dan color a las flores; pueden también conferir olores y sabores. Estos compuestos fenólicos constituyen cerca del 40% del carbono circundante en la biósfera y la mayoría son derivados del fenilpropanoide, fenilpropanoide acetato y algunas otras rutas bioquímicas.

Todos los fenil propanoides tienen en común la presencia de un anillo fenilo unido a una cadena de tres carbonos (Figura 5) y son derivados de la fenilalanina o la tirosina. Los grupos derivados del metabolismo de los fenilpropanoides son las ligninas, Suberinas, Cutinas, Stilbenos, Flavonoides, antocianinas y Taninos.



Figura 5. Estructura base de un fenilpropanoide. Tomado de Buchanan, 2001

Las ligninas son utilizadas para fortalecer las paredes celulares ya que se unen covalentemente a la celulosa (Hans-Walter, 1997), permitiendo así a las plantas obtener estaturas enormes y soportar pesos extraordinarios, además de poder transportar agua a lo largo de la planta (Buchanan et al, 2000). Los componentes básicos de la lignina son denominados monolignoles (los alcoholes p-cumaril, sinapil y coniferil). Sin embargo, la composición monolignoles varía entre las distintas especies de plantas. Además de dar soporte a las plantas, la lignina puede actuar como un mecanismo de defensa, ya que dada su dureza mecánica y composición química pueden presentar dificultades para los herbívoros que los ingieran. Además, la lignina inhibe el crecimiento de microorganismos patógenos. Cuando una planta es lesionada. en respuesta se inicia la síntesis de lignina. Otro grupo de fenoles que se obtiene de dimerizar los monolignoles son los lignanos, que ayudan a las plantas defendiéndolas contra diversos agentes patógenos o actuando como agentes antioxidantes en flores, semillas, tallos, hojas y raíces.

La suberina es un polímero de fenilpropanoides, ácidos grasos muy grandes y lipalcoholes. Es un componente de la pared celular y probablemente un constituyente

de la banda de Caspary. La cutina es un polímero similar a la suberina que se encuentra alrededor de la epidermis junto con capas de cera que ayudan a hacer impermeables a las hojas (Hans-Walter, 1997).

Los flavonoides comprenden un grupo muy grande de metabolitos secundarios con más de 4500 compuestos (Buchanan et al., 2000). Se caracterizan por tener dos anillos fenólicos (Figura 6). Estos compuestos incluyen a muchas fitoalexinas y son utilizados por las leguminosas por ejemplo para mandar señales sus simbioses los rizobios cuando requiere que se produzcan más nódulos. Algunos flavonoides son pigmentos protectores dado que tienen un máximo de absorción de luz ultravioleta, protegen a las plantas en contra de daños que pueda ocasionar este rango de luz. Cuando hojas son irradiadas con luz UV se induce la síntesis de flavonoides.

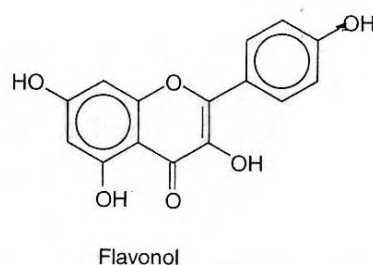


Figura 6. Estructura general de un flavonoide (Tomado de Hans-Walter, 1997).

Las antocianinas son glucósidos de antocianidinas en los que una hexosa se encuentra unida a un grupo hidroxilo de un anillo de pirilo (Figura 7) y son depositadas en vacuolas. Actúan como pigmentos en las flores para pueden atraer polinizadores y también pueden proteger a las células del mesófilo filtrando la luz que les llega.

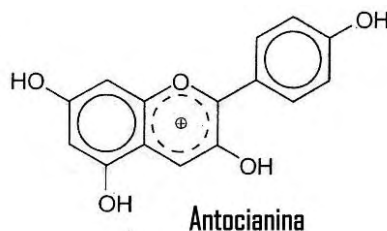
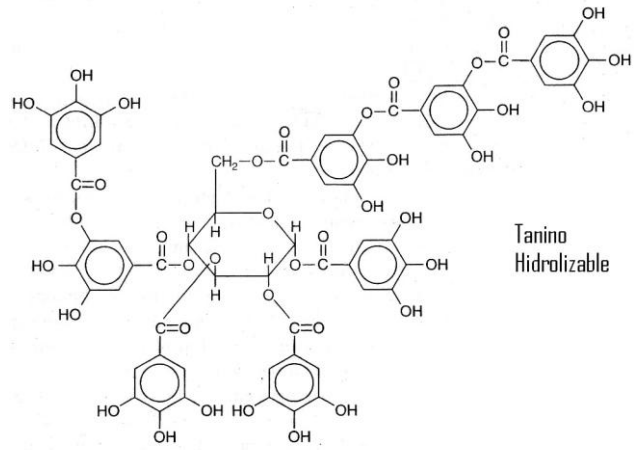
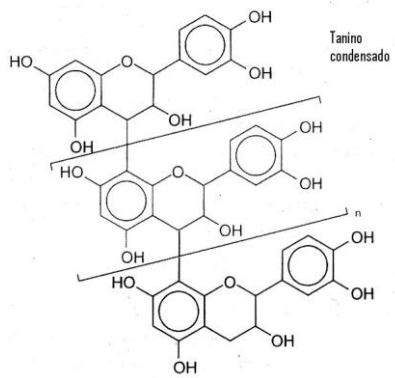


Figura 7. Estructura general de una antocianina (Tomado de Hans-Walter, 1997).

La palabra "tanino" engloba una gama muy amplia de polifenoles. Existen taninos condensados e hidrosolubles (Figura 8). Los taninos condensados son polímeros de flavonoides. Por otro lado están los taninos hidrolizables, que consisten de ácidos gálicos glicocilados y provienen del ácido shikímico. Muchos de éstos ácidos gálicos están unidos a una hexosa (Hans-Walter, 1997). Estos taninos se encuentran en cualquier parte de la planta; sin embargo nunca han sido observados en monocotiledóneas (Buchanan et al., 2000). Los taninos (en general) se unen fuertemente a proteínas formando enlaces hidrógeno con el grupo NH de los péptidos. Estos enlaces no pueden separarse por enzimas digestivas. Cuando un herbívoro muerde hojas, los taninos se unen a proteínas vegetales provocan que el bolo sea menos digerible, además los taninos reaccionan con enzimas del aparato digestivo de los herbívoros logrando constituir un buen medio de defensa para la planta (Hans-Walter, 1997).



**Figura 8.** Estructura general de un tanino condensado y de un tanino hidrosoluble (Tomado de Hans-Walter, 1997).



## **JUSTIFICACIÓN**

Los pastos marinos son un grupo de plantas que por mucho tiempo no fueron estudiados, probablemente debido a la dificultad de mantener los ejemplares en buen estado fuera del mar (Den Hartog, 1970). Hoy en día se conoce mucho más de los pastos marinos de lo que se conocía hace cien años. Esto se debe a que en la década de los sesentas se inventó una nueva forma de bucear que facilitó el estudio de estas plantas (Tussenbroeck, 2006). Sin embargo la investigación con respecto a pastos marinos sigue siendo escasa debido básicamente a que muy poca gente se interesa en examinar a este grupo de plantas por la dificultad intrínseca de su estudio.

Se sabe que todas las plantas, incluyendo a *T. testudinum*, producen metabolitos secundarios, los cuales pueden mermar la herbivoría así como defender a la planta en contra de agentes patógenos. En la unidad académica del ICMYL en Puerto Morelos se ha observado que los frutos de *Thalassia testudinum* son sujetos a herbivoría principalmente por peces lora, y estas observaciones indicaron que hay una preferencia por frutos de edades tempranas (van Tussenbroek, datos no publicados) a pesar de que parecían contener una cantidad mayor de taninos que los frutos maduros (Jiménez, 2004).

## **OBJETIVO**

Determinar y cuantificar el contenido de metabolitos secundarios a lo largo del desarrollo del fruto de *Thalassia testudinum* así como observar si existe alguna relación entre los taninos, la edad del fruto y la intensidad de la herbivoría.

## METODOLOGÍA

### Área de estudio

El estudio se realizó en la laguna arrecifal de Puerto Morelos (20° 51' N, 86° 55' W), ubicado en la península de Yucatán, 20 km al sur de la ciudad de Cancún. La temperatura del agua varía con una media en invierno de ~25°C y ~31°C en verano. La salinidad medida en la laguna alcanza 35.7 psu (Ruiz-Rentería et al., 1998). El sustrato está constituido por arenas calcáreas. La laguna arrecifal es un pastizal marino dominado por *Thalassia testudinum* (Ruiz-Rentería et al., 1998).

Para poder determinar las etapas de desarrollo de los frutos se formaron conjuntos tomando en consideración el diámetro de los frutos y escogiendo sólo aquellos que tuvieran dos semillas. Se obtuvieron 6 etapas:

Tabla 2. *Thalassia testudinum*: etapas de los frutos en base al diámetro.

| Etapa | Rango (basado en el diámetro del fruto) |
|-------|---|
| 1     | 1 mm a 5 mm                             |
| 2     | 5 mm a 10 mm                            |
| 3     | 10 mm a 15 mm                           |
| 4     | 15 mm a 20 mm                           |
| 5     | 20 mm a 25 mm                           |
| 6     | Frutos dehiscentes                      |

### Análisis estructural

Frutos de las distintas etapas de desarrollo se fijaron en FAA (Formol 10%, Acido acético glacial 5%, alcohol al 96%, 50%, agua 35%) el mismo día de su colecta en el mar (Julio, 2006), en la unidad académica del ICMYL en Puerto Morelos, México.

Los frutos fueron cortados en cuatro secciones de las cuales se tomaron dos secciones para realizar cortes transversales y longitudinales (Figura 9). Se deshidrataron gradualmente en soluciones etanólicas al 35%, 50%, 70%, 85%, 96%, y 100%. Cada cambio se realizó durante dos horas. Al terminar la última deshidratación con alcohol absoluto, los frutos se trasladaron a una solución 1:1 alcohol – xilol durante diez minutos, después a xilol puro durante otros diez minutos y posteriormente a una solución xilol – paraplast 1:1 durante 24 horas. A continuación se infiltraron en paraplast durante una semana y se incluyeron en los cubos para posteriormente cortarlos en el micrótopo (López et al., 2005). Se obtuvieron cortes de 10 µm de grosor.



Figura 9. Fruto de *Thalassia* indicando los planos en los que fueron cortados. (Tomado de Lovec-Theobold y Katz, 2006).

Para realizar la tinción doble safranina – verde rápido, se removió el paraplast con calor (60° C) y un tratamiento de xilol (durante tres minutos), xilol-alcohol absoluto

(diez minutos), alcohol absoluto (diez minutos) y alcohol 96% para rehidratar los tejidos. Las muestras montadas en los portaobjetos fueron sumergidas en safranina durante 24 horas. Se utilizó safranina debido a que ésta tiñe taninos condensados (López et al., 2005). Una vez transcurridas las 24 horas, se lavaron las muestras removiendo el exceso de safranina y posteriormente se lavaron con una solución de alcohol 96% con ácido pícrico durante unos segundos, posteriormente con etanol al 96% mas amoniaco para detener la acción del ácido pícrico. Unos segundos después se volvió a lavar con etanol absoluto. Para hacer el contraste, los cortes se tiñeron con verde rápido e inmediatamente después con aceite de clavo. A continuación los tejidos se aclararon con una mezcla de aceite de clavo, xilol y etanol absoluto. En seguida se lavaron con xilol para finalmente colocar la resina sintética y los cubreobjetos.

#### Pruebas histoquímicas

- Reacción para taninos en sulfato ferroso: a los cortes se les aplicó una solución de formalina al 10% con sulfato ferroso al 2% (Jensen, 1962; López et al., 2005).
- Para teñir taninos condensados se utilizó la vainillina: los cortes se mantuvieron en baño maría a 30° C y se les aplicó una mezcla de vainillina – HCl 6M 1:1 v/v (López et al., 2005).
- Para determinar presencia de almidón se utilizó lugol: se agregó a los cortes una solución de 2g de yoduro de potasio y 0.5g de yodo en 100 mL de agua (Jensen, 1962).

#### Pruebas de depredación en estanques

Se montaron cuadrantes de alambre galvanizado de 90cm X 50cm (Figura 11) para colocar los frutos de *Thalassia testudinum* en los estanques.

Se recolectaron frutos con pedicelo de *Thalassia testudinum* en las coordenadas 20° 51.735" N 86° 51.529 O. Se separaron los frutos en cuatro tamaños distintos y se midió el diámetro de todos.

Se capturó un ejemplar adulto de la especie *Sparisoma viride* (Figura 10) dado que se capturó en video un ejemplar de esta especie depredando flores de *T. testudinum* (Tussenbroek et al., 2008). Esta especie presenta tres etapas en su vida: juvenil, inicial y adulto. El adulto se reconoce por presentar una coloración azul llamativa (Humann, 1996).

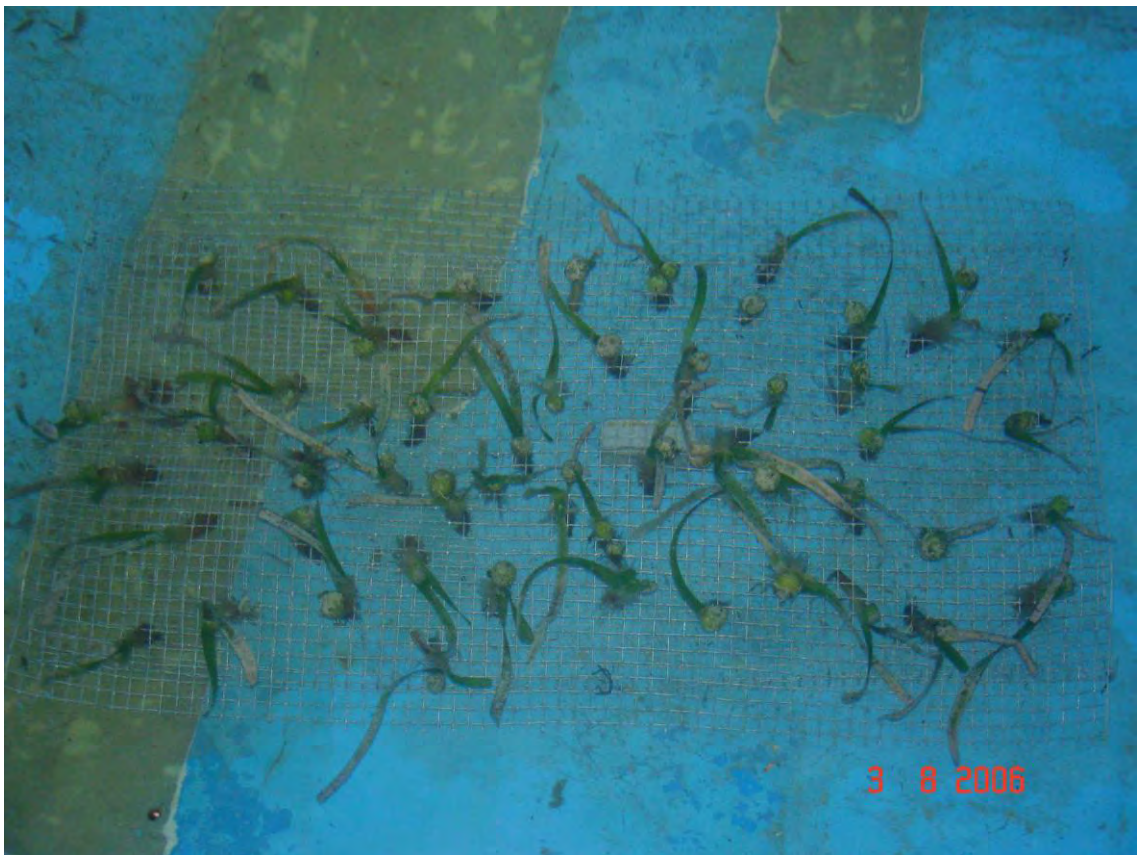


Figura 10. *Sparisoma viride* adulto.

Para marcar los frutos se les colocaron alambres grises, verdes, azules y rojos. Cada color corresponde a una etapa diferente de desarrollo de los frutos (Tabla 3). El cuadrante se instaló en el estanque (Figura 11).

**Tabla 3.** Clave de colores de acuerdo a la etapa.

| Etapa | Color de alambre |
|-------|------------------|
| 1     | -                |
| 2     | Gris             |
| 3     | Verde            |
| 4     | Azul             |
| 5     | Rojo             |



**Figura 11.** Reja colocada en el estanque con frutos y hojas de *T. testudinum*.

Los experimentos quedaron instalados durante cinco días. Los tres primeros días se consideraron como tiempo de aclimatación requerida por el pez.

En el día 1 se colocaron en el estanque 22 frutos con haz de la etapa 2, 22 frutos con haz de la etapa 3 y 56 haces sin fruto, colocando en total 100 haces. Se hicieron observaciones a las 24 horas de colocados. Se consideró un haz como un rizoma vertical con hojas que contenía un rizoma horizontal corto.

En el día 2 se colocaron 22 haces con fruto en etapa 4, 22 haces con fruto en etapa 5, 22 haces con fruto en etapa 6 y 34 haces sin fruto. Se hicieron observaciones a las 24 horas de colocados.

## Determinación de metabolitos secundarios

### Obtención de muestra y pretratamiento

Después de la colecta (Julio 2007), los frutos se midieron, se separaron por etapas y se colocaron en un refrigerador REVCO a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Una vez congelados, los frutos fueron macerados hasta obtener un polvo muy fino; se pesó un gramo de éste polvo y se colocó en el papel filtro (portamuestras). Posteriormente se instaló el portamuestras en el soxhlet (Ranocha *et al.*, 2002).

Se hicieron extracciones secuenciales de 16 horas en agua, alcohol etílico (70%), tolueno-alcohol (50-50 v/v), y acetona, de los macerados de cada etapa de los frutos. Se utilizó un soxhlet con capacidad para 100mL con un matraz bola de 500mL y una manta para matraz bola de 500mL con una potencia de 275 watts y 115 volts. Para controlar la temperatura de la manta se utilizó un reóstato Barnstead International, Thermolyne Type 45500 modelo: CN45515.

Los extractos obtenidos fueron almacenados en refrigeración a  $4^{\circ}\text{C}$ .

### Cuantificación de fenoles totales

Para la cuantificación de fenoles se utilizó la técnica de Folin (Ranocha *et al.*, 2002) en la que se realiza una curva patrón. Se agregaron las soluciones de acuerdo a la tabla 4. En el caso del control se sustituye el extracto con una solución de ácido gálico. Se utiliza el ácido gálico como patrón debido a que un mol de ácido gálico es igual a un mol de catequina con Folin pero con un costo menor.

Tabla 4. Tratamiento para cada uno de los tubos.

| Tubo   | Extracto ( $\mu\text{L}$ ) | H <sub>2</sub> O ( $\mu\text{L}$ ) | Folín ( $\mu\text{L}$ ) | Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ( $\mu\text{L}$ ) |
|--------|----------------------------|------------------------------------|-------------------------|---|
| 1 y 1' | 0                          | 100                                | 500                     | 400   |
| 2 y 2' | 20                         | 80                                 | 500                     | 400   |
| 3 y 3' | 40                         | 60                                 | 500                     | 400   |
| 4 y 4' | 60                         | 40                                 | 500                     | 400   |
| 5 y 5' | 80                         | 20                                 | 500                     | 400   |
| 6 y 6' | 100                        | 0                                  | 500                     | 400   |

Los tubos se calentaron a  $50^{\circ}\text{C}$  en baño maría durante cinco minutos. Posteriormente se enfriaron a chorro de agua y se determinó su absorbancia a 760 nm. El espectrofotómetro (Sequoia Turner 340) se calibró para cada tubo y se midió la absorbancia a 760 nm que corresponde a la absorbancia del ácido gálico con Folin.

Simultáneamente se hizo una curva patrón con ácido gálico y se interpolaron en ella las absorbancias medidas de los extractos para determinar la cantidad de equivalentes de fenoles en mg.

### Pruebas Dot-Blot

Las pruebas Dot Blot se hicieron cortando las placas en cinco tiras de 10cm X 1cm divididas en 5 casillas. A cada casilla se le agregaron extractos de acuerdo a la siguiente tabla (tabla 5). El té verde se utilizó como control debido a que por ser de gran interés antropogénico se han estudiado mucho los compuestos que contiene.

**Tabla 5.** Aplicación de muestras para dot blot

| Placa | Extractos |        |         |         |          |
|-------|-----------|--------|---------|---------|----------|
|       | Agua      | Etanol | Tolueno | Acetona | Té verde |
| 1     | 30 mg     | 30 mg  | 30 mg   | 30 mg   | 30 mg    |
| 2     | 30 mg     | 30 mg  | 30 mg   | 30 mg   | 30 mg    |
| 3     | 30 mg     | 30 mg  | 30 mg   | 30 mg   | 30 mg    |
| 4     | 30 mg     | 30 mg  | 30 mg   | 30 mg   | 30 mg    |
| 5     | 30 mg     | 30 mg  | 30 mg   | 30 mg   | 30 mg    |

Una vez secas las placas se revelaron con los siguientes solventes (tabla 6).

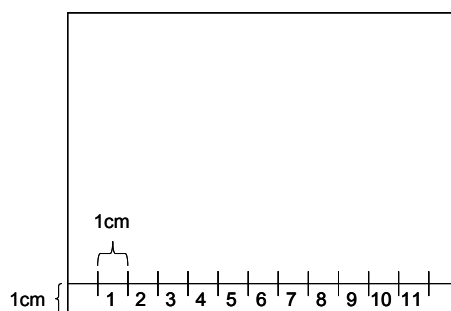
**Tabla 6.** Soluciones aplicadas en Dot Blot

| Placa | Solución          | Concentración   |
|-------|-------------------|---|
| 1     | KMnO <sub>4</sub> | 0.2 %   |
| 2     | FeSO <sub>4</sub> | 1% en HCl 0.1 M   |
| 3     | NaNO <sub>3</sub> | 10%   |
| 4     | Vainillina        | 1% en H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 70%  |
| 5     | Azul B            | 7 mg de Fast blue, 0.5 ml H <sub>2</sub> O, 7 ml metanol y 2.5 ml diclorometano |

#### Separación y preidentificación de fenoles

Para determinar los metabolitos secundarios presentes en los extractos se hizo una cromatografía y pruebas Dot Blot utilizando cromatofolios (o placas) de aluminio para HPTLC (High Performance Thin Layer Chromatography o cromatografía en capa fina de alta resolución) de silicagel 60 F<sub>254</sub> marca Merck.

Placas de 20cm X 10cm fueron marcadas como se describe en la figura 12a. A cada carril se le agregaron 30µg de extracto concentrados en un solo punto colocado en la línea horizontal ubicada a 1cm de la base de la placa. El contenido de los extractos añadido a cada carril se observa en la figura 9b.



(a)

| Carril | Muestra  |
|--------|--|
| 1      | Extracto de té verde                                   |
| 2      | Ácido gálico   |
| 3      | Catequina  |
| 4      | Extracto acuoso etapa 5 (20 a 25 mm de diámetro)       |
| 5      | Extracto etanólico 70% etapa 5                         |
| 6      | Extracto tolueno-etanol etapa 1 (1 a 5 mm de diámetro) |
| 7      | Extracto acetónico etapa 1                             |

(b)

**Figura 12.** (a) Placa indicando dimensiones y el lugar de colocación de las muestras. (b) Tipo de muestras.

La placa HPTLC con las muestras se corrió en un eluyente de Tolueno – Acetona – Ácido fórmico (9:9:2) durante treinta minutos sin saturar la cámara previamente.

Se dejó secar por un día y se hicieron observaciones con luz ultravioleta a longitud de onda corta (254nm) y longitud de onda larga (340nm).

### **Microscopio electrónico de barrido**

Frutos de las cinco etapas preservados en FAA se deshidrataron gradualmente en soluciones etanólicas al 35%, 50%, 70%, 85%, 96%, y 100% durante dos horas cada uno de los cambios. Posteriormente, fueron trasladados durante dos horas a una solución alcohol absoluto – acetona (1:1) y por último a acetona 100%. Los pericarpios fueron desecados a punto crítico y montados en un portamuestras. Los portamuestras fueron después bañados en oro para poder hacer observaciones en el microscopio electrónico de barrido (López et al., 2005) marca JEOL.

### **Microscopio electrónico de barrido con análisis de rayos X (SEM-EDS)**

Frutos de las cinco etapas preservados en FAA se deshidrataron gradualmente en soluciones etanólicas al 35%, 50%, 70%, 85%, 96%, y 100% durante dos horas cada uno de los cambios. Posteriormente, fueron trasladados durante dos horas a una solución alcohol absoluto – acetona (1:1) y por último a acetona 100%. Los pericarpios fueron desecados a punto crítico y montados en un portamuestras. Los portamuestras fueron después bañados en grafito para poder hacer observaciones en el microscopio electrónico de barrido con análisis de rayos X (López et al., 2005) marca JEOL.

## RESULTADOS

### Análisis estructural de las emergencias

El fruto de *Thalassia testudinum* es una cápsula globosa constituida por endocarpio, mesocarpio y exocarpio. El exocarpio desarrolla emergencias en las que se depositan taninos (figura 13 a) °.

Una emergencia es una excrescencia o crecimiento que viene del tejido que se encuentra debajo de la epidermis (Warren y Zetina, 2002). En el fruto de *T. testudinum* se observan emergencias pequeñas en el exocarpio que se alargan hasta que el fruto alcanza la etapa 3 (figura 13 a, b y c). En corte longitudinal, se observa que las emergencias están formadas por una cutícula delgada, una epidermis uniestratificada (figura 13 a, b, c, d, e y 14 f) y un parénquima de 5 a 8 células de grosor (figura 14 a, c y d).

Las emergencias se separan unas de otras por células parenquimatosas que aumentan de tamaño conforme el fruto crece. Es por esto que en las primeras etapas, las emergencias se encuentren muy pegadas unas con respecto a otras, mientras que en la última etapa (5) la distancia entre emergencias aumenta por el crecimiento de las células de parénquima (figura 14 a, c y e).

Dentro de las emergencias se observan grandes vacuolas con depositaciones de taninos ubicadas dentro del parénquima. Estas depositaciones son visibles únicamente en el exocarpio y se les encuentra en las emergencias de todas las etapas del desarrollo (figura 13 a, b, c, d, e y 14 c).

La presencia de cristales sólo se detecta en los frutos de etapas maduras. Las observaciones realizadas en microscopía de campo oscuro indican la presencia de cristales en los frutos desde la etapa 3 hasta la etapa 5.



## **Contenido de células parenquimatosas**

Se hicieron las pruebas histoquímicas de vainillina, sulfato ferroso y lugol. La prueba histoquímica de la vainillina y del sulfato ferroso se utilizan debido a que tiñen a los taninos. La prueba del lugol se utiliza para teñir almidón.

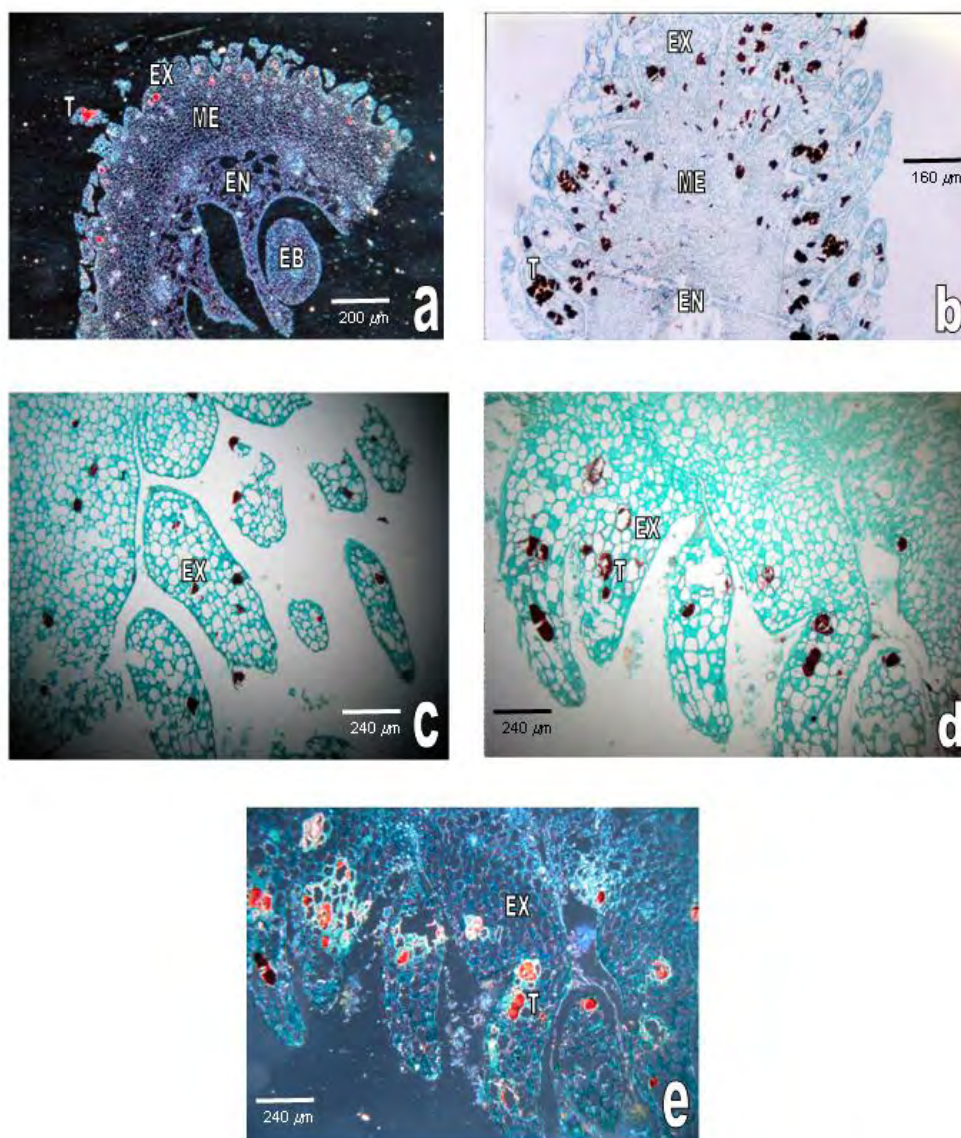
La prueba de la vainillina tiñe los taninos de un color rojizo. Se hizo la prueba en cortes de todas las etapas. La histoquímica dio positivo para la vainillina ya que se observó un cambio en la coloración de las células taniníferas (figura 15 e).

El sulfato ferroso tiñe los taninos de un color café pardo. Se hizo la prueba en cortes de todas las etapas y dio positivo ya que se observó una coloración café pardo (figura 15 f).

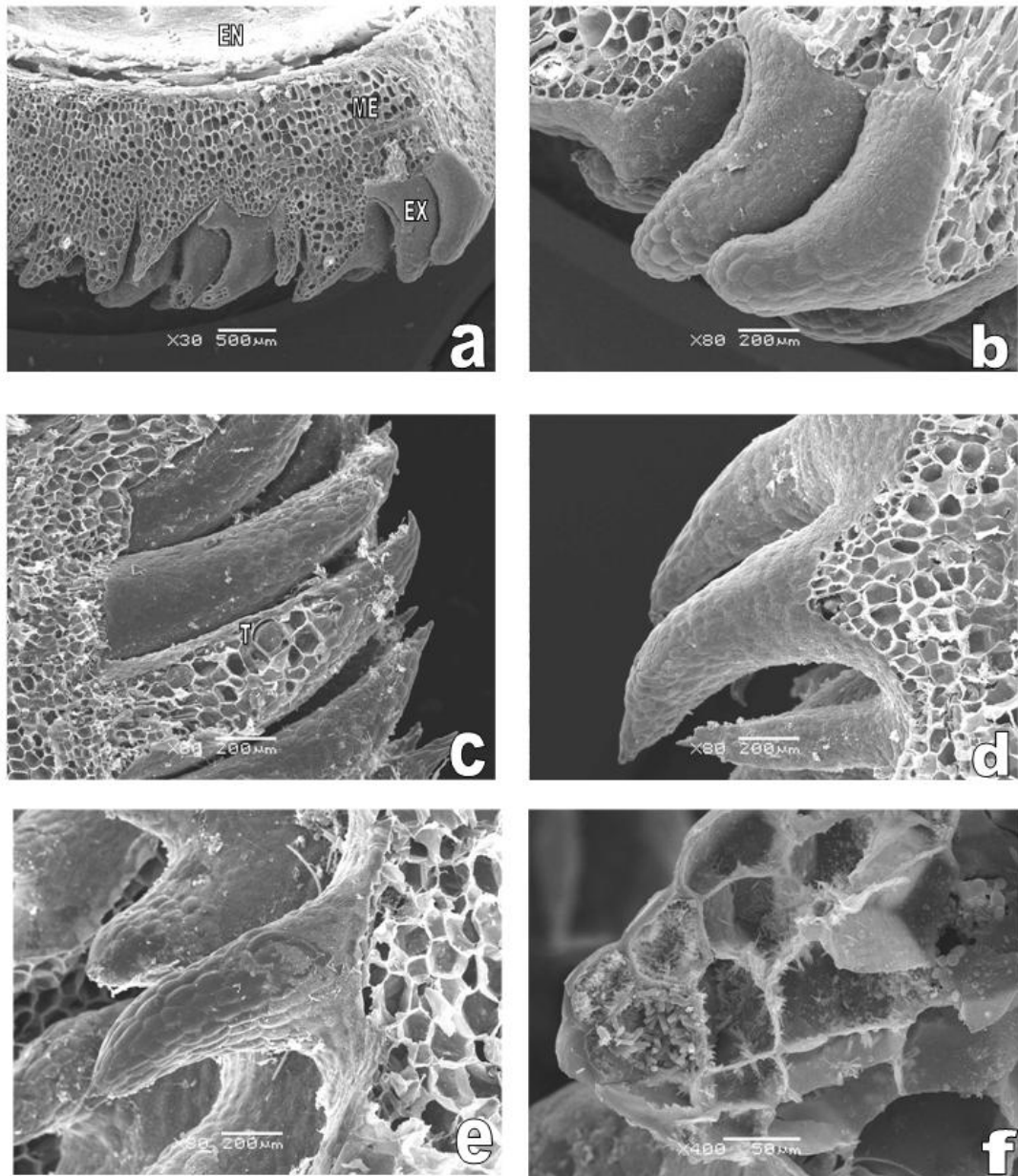
La prueba del lugol tiñe el almidón de un color morado. Se hizo la prueba en cortes de todas las etapas sin cambios en la coloración de los tejidos, por lo que el resultado es negativo.

Las observaciones realizadas en el Microscopio Electrónico de Barrido (MEB) indican que la depositación de taninos ocurre en vacuolas que ocupan el espacio completo de la célula que los posee (figura 15 a).

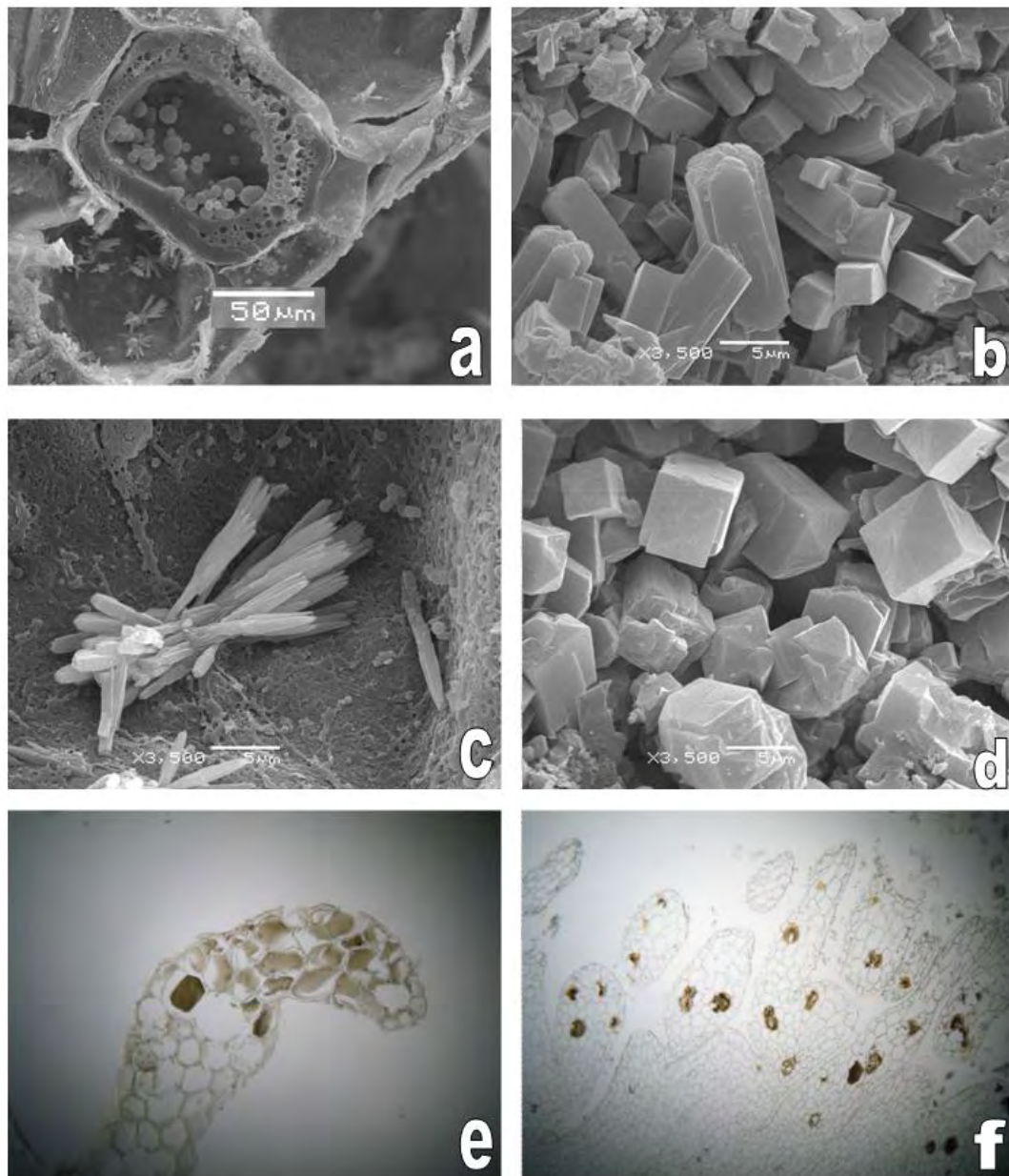
Las emergencias observadas demuestran que los cristales aparecen únicamente en los frutos que se encuentran en las etapas 3, 4 y 5 y son principalmente de 3 tipos; rafídios (figura 15 c), cristales cúbicos (figura 15 d) y cristales poligonales (figura 15 b). Estos cristales son escasos en la etapa 3, aumentan en la etapa 4 y llegan a su máxima concentración en la etapa 5 o de fruto maduro.



**Figura 13.** Corte longitudinal del fruto de *T. testudinum*. a) Fruto de 4.5 mm de diámetro (etapa 1). Se observan emergencias pequeñas con pocas células con depositaciones de taninos. Contraste de fases 50X. b) Fruto de 7 mm de diámetro (etapa 2). Campo claro 50X. c) Fruto de 14 mm de diámetro (etapa 3). Contraste de fases 50X. d) Fruto de 17 mm de diámetro (etapa 4). Campo claro 50X. e) Fruto de 24 mm de diámetro (etapa 5). Contraste de fases 50X. EX – Exocarpio ME – Mesocarpio EN – Endocarpio EB – Embrión T- Tanino



**Figura 14.** Microscopía electrónica de barrido de las emergencias de *Thalassia testudinum* en corte transversal. a) Fruto de etapa 1 donde se observa endocarpio, mesocarpio y exocarpio con las emergencias. b) Emergencia de fruto en etapa 2. c) Emergencia de fruto en etapa 3 donde se observan inclusiones de taninos en la emergencia abierta. d) Emergencia de fruto en etapa 4. e) Emergencia de fruto en etapa 5. f) Emergencia expuesta de fruto en etapa 5. EX – Exocarpio ME – Mesocarpio EN – Endocarpio EB – Embrión T - Tanino



**Figura 15.** Contenido de las células parenquimáticas de las emergencias. A Corte transversal donde se muestra la inclusión de taninos. MEB b) Cristales poligonales. MEB c) Rafídios. MEB d) Fotografía obtenida mediante MEB d) Cristales cúbicos. MEB e) Prueba histoquímica positiva de vainillina etapa 5 100X. f) Prueba histoquímica positiva del sulfato ferroso. Fruto en etapa 1 50X



## Análisis de rayos X (SEM-EDS)

Mediante un análisis al Microscopio electrónico de Rayos X ( EDS) se determinó la composición de los distintos cristales encontrados. Los rafídios (Figura 15 c) están compuestos fundamentalmente por Ca, C y O, y en cantidades menores se detectaron Al, Mg, Si, P, S y Fe (figura 16). Los cristales cúbicos (figura 15 d) están compuestos por Ca, C, Si y O (figura 17).

Los cristales poligonales (figura 15 b) están compuestos fundamentalmente por Si, Na, O y Ca, encontrándose trazas de Mg, Al y C (figura 18).

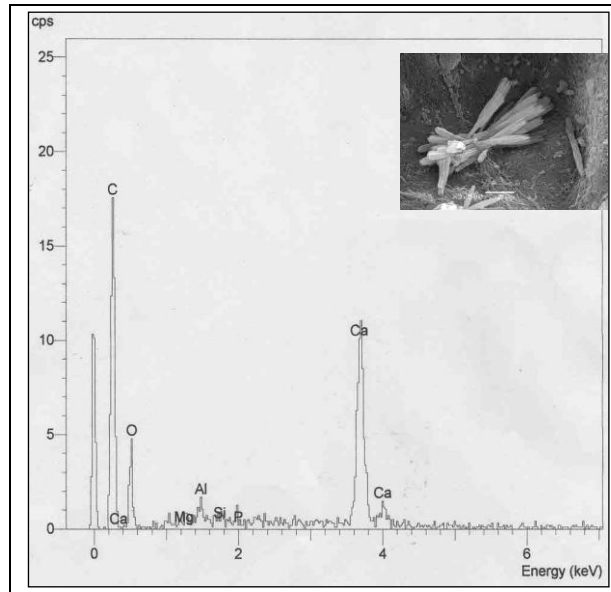


Figura 16. Resultado de análisis mediante EDS de rafídios ubicados en pericarpio de fruto en etapa 5.

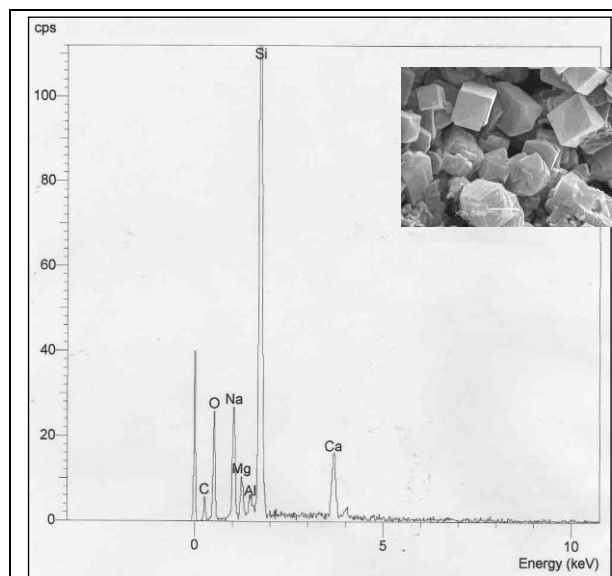
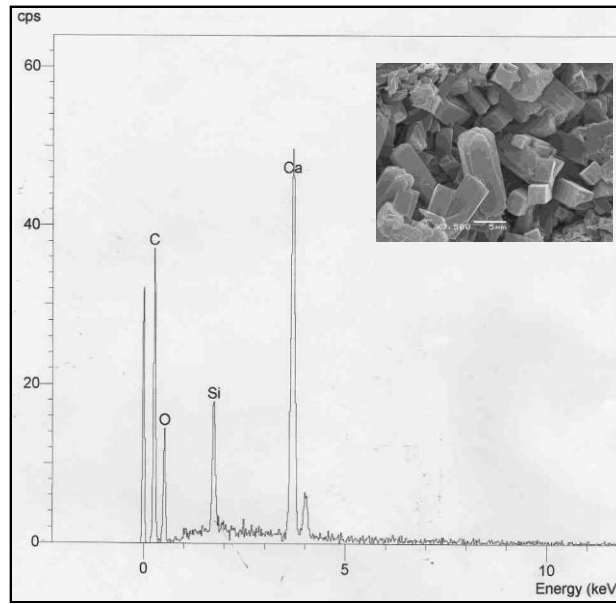


Figura 17. Resultado de análisis mediante EDS de cristales cúbicos ubicados en pericarpio de fruto en etapa 5.



**Figura 18.** Resultado de análisis mediante EDS de cristales poligonales ubicados en pericarpio de fruto en etapa 5.

## PRUEBAS DE DEPREDACIÓN EN ESTANQUES

Día 1

Todos los frutos marcados y los no marcados fueron depredados en distintos grados sin distinción de etapa (figura 19). El pez muerde el fruto completo, pero se observó diversas ocasiones que solo las semillas son comidas mientras que escupe los restos del fruto. No se pudo determinar si comió primero alguna etapa en específico.



Figura 19. Residuos de fruto de *T. testudinum* mordido por *S. viride*.

Día 2

Todos los frutos en etapa 4 y 5 fueron mordidos y el pez se comió todas las semillas.

Los frutos en etapa 6 no presentaron mordidas y se encontraban en estado de descomposición. Estos frutos fueron colectados abiertos y sin semillas, las cuales ya se habían dispersado.

## DETERMINACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS

### Cuantificación

Se midió la absorbancia del ácido gálico a distintas concentraciones. Con estos datos se obtuvo una curva patrón (Figura 20). Posteriormente se midió la absorbancia de los distintos extractos y se interpolaron los valores medidos a los valores de la curva patrón del ácido gálico. Se obtuvo una equivalencia en microgramos de los fenoles contenidos en los frutos de *T.testudinum* (tabla 7).

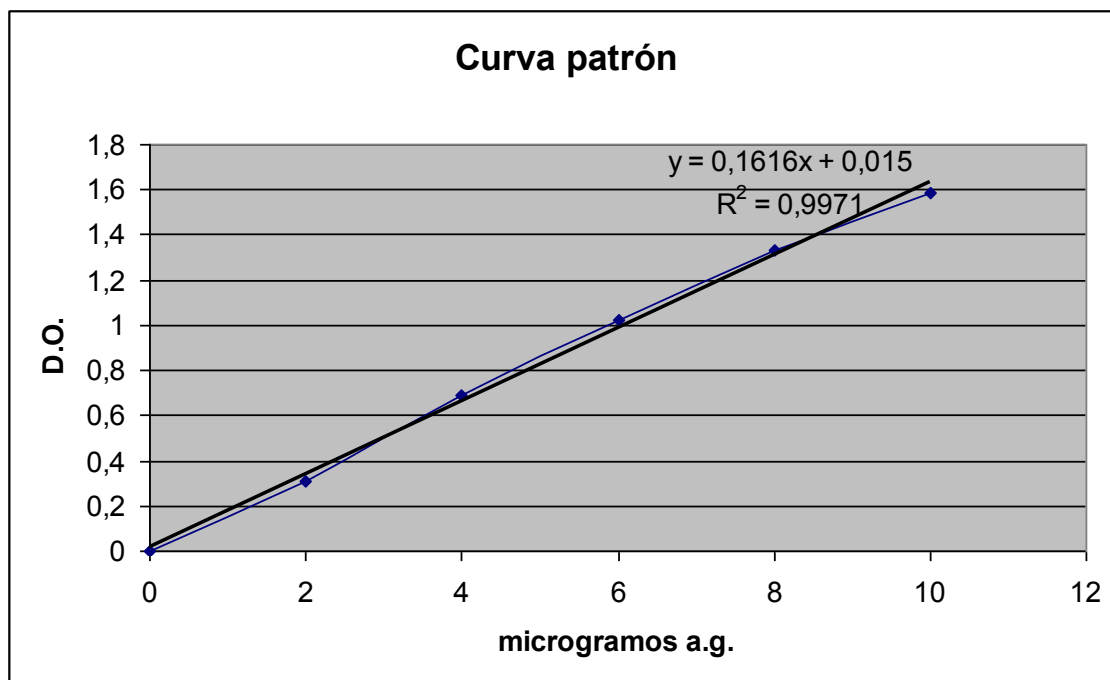


Figura 20. Curva patrón del ácido gálico.

Tabla 7. Cantidad de fenoles solubles en frutos de *T. testudinum*.

| Extracto   | Etapa 1 * | Etapa 2 * | Etapa 3 * | Etapa 4 * | Etapa 5 * |
|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Acuoso     | 4.05      | 2.81      | 0.905     | 0.8528    | 0.8864    |
| Alcoholico | 0.534     | 0.1641    | 0.0388    | 0.0034    | 0.4234    |
| Tol - OH   | 0.1345    | 0.1061    | 0.0237    | 0.0133    | 0.1432    |
| Acetonico  | 0.8644    | 0.0533    | 0.243     | 0.0359    | 0.3944    |
| Σ          | 5.5829    | 3.1335    | 1.2105    | 0.9054    | 1.8474    |

\* µg de fenoles

Fraccionando los fenoles totales obtenidos por extracto y por etapa se observa que la mayor cantidad de fenoles solubles se obtiene en la fracción acuosa en todas las etapas (figura 21 y tabla 8) y que la mayor cantidad de fenoles solubles se ubica en frutos de la etapa 1.



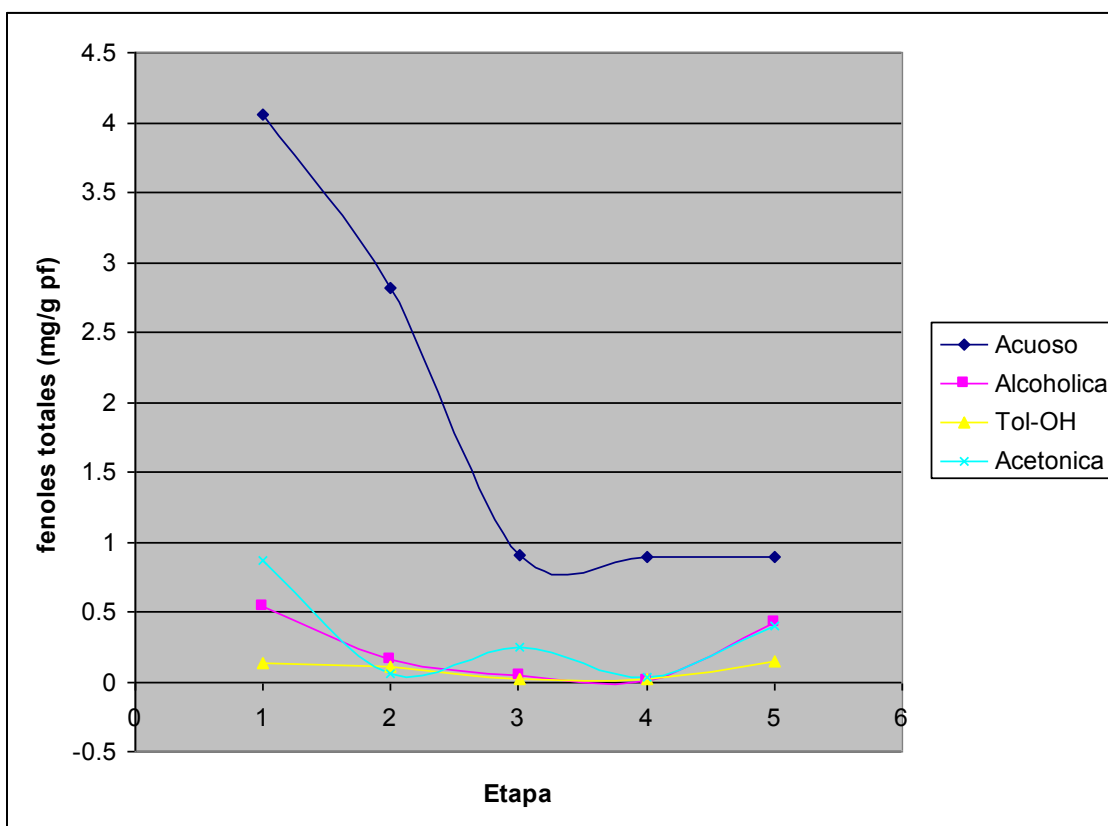


Figura 21. Extracción y cuantificación de fenoles solubles en una extracción consecutiva usando agua, alcohol, tolueno-alcohol y acetona en las cinco etapas de desarrollo del fruto de *T. testudinum*.

Tabla 8. Abundancia de fenoles totales por extracto expresada en porcentaje.

|         | Acuoso | Etanólico | Tolueno-etanol | Acetónico |
|---------|--------|-----------|----------------|-----------|
| Etapa 1 | 72.5   | 9.5       | 2.41           | 15.49     |
| Etapa 2 | 89.77  | 5.2       | 3.3            | 1.7       |
| Etapa 3 | 74.79  | 3.2       | 1.95           | 20.08     |
| Etapa 4 | 94.19  | 0.37      | 1.4            | 3.96      |
| Etapa 5 | 48     | 22.91     | 7.75           | 21.34     |

Posteriormente se sumaron los fenoles totales contenidos por etapa y se hizo una gráfica (figura 22) en la que se observa que la mayor concentración de fenoles se da en la etapa 1 y disminuye conforme el fruto crece.

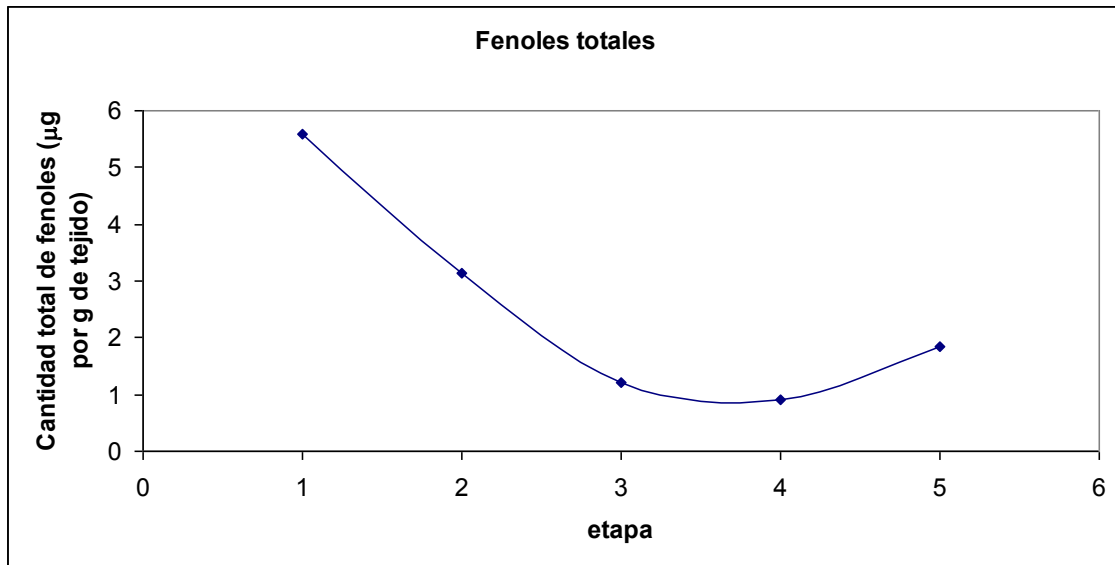


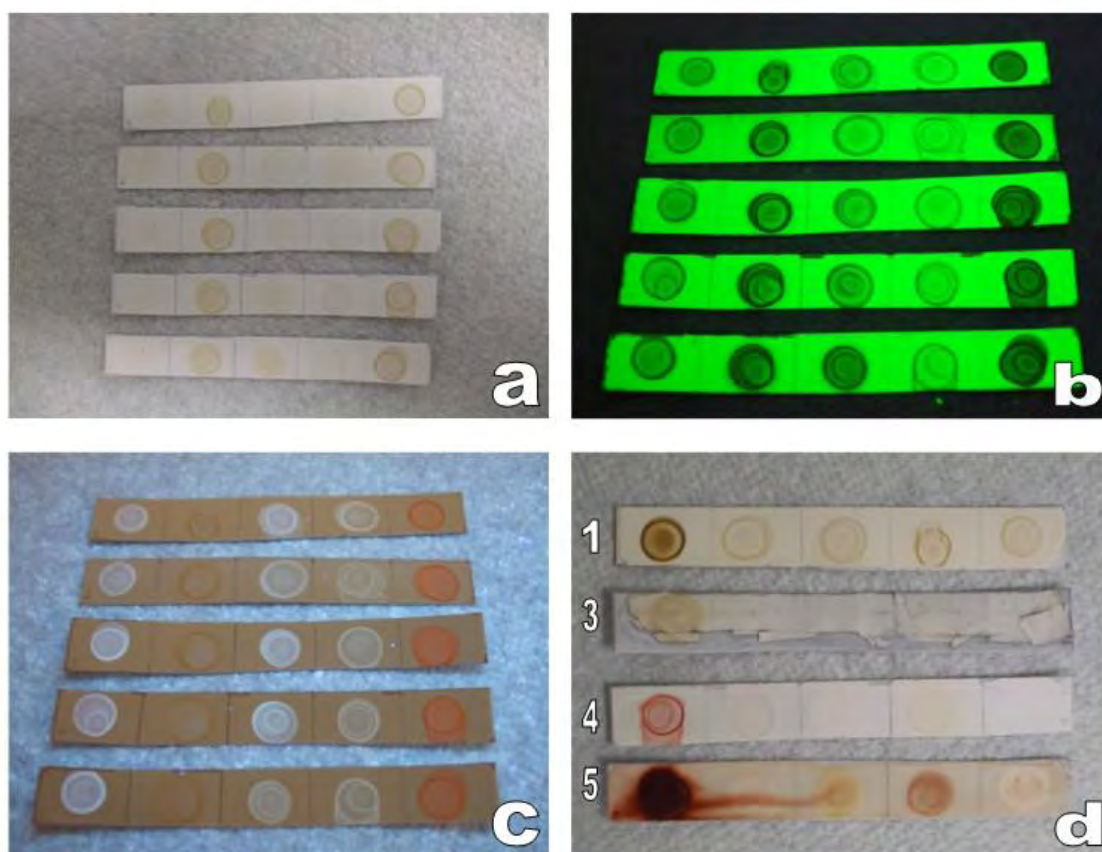
Figura 22. Fenoles totales por etapa.

### Pruebas Dot-Blot

Las pruebas de Dot-Blot (tabla 9 y fig. 23) se hicieron para poder determinar qué tipo de metabolitos secundarios se encuentran en el fruto de *Thalassia testudinum*. La prueba realizada con  $\text{KMnO}_4$  dio positiva ya que todos los extractos aplicados adquirieron una coloración amarilla indicando la presencia de fenoles. En la prueba con  $\text{FeSO}_4$  se obtuvieron resultados negativos debido que la solución provoca cambios químicos en la placa ocasionando un desprendimiento del gel y el aluminio. En la prueba con  $\text{NaNO}_3$  el extracto de té verde y el extracto alcohólico adquirieron una coloración amarilla. En la prueba de la vainillina el extracto de té verde se tiñó de rojo, el extracto alcohólico se tiñó de amarillo y el extracto acetónico de color café, colores que indican una reacción positiva para taninos teniendo en amarillo una concentración baja de taninos mientras que concentraciones elevadas en colores rojos. En la prueba de Azul B el extracto de té verde, acuoso, alcohólico y acetónico obtuvieron una coloración rojiza y el extracto de tolueno obtuvo una coloración amarillenta dando un resultado positivo para polifenoles.

Tabla 9. Resultado de pruebas de Dot-blot. Las palomas indican reacción positiva y las equis indican que no hubo reacción.

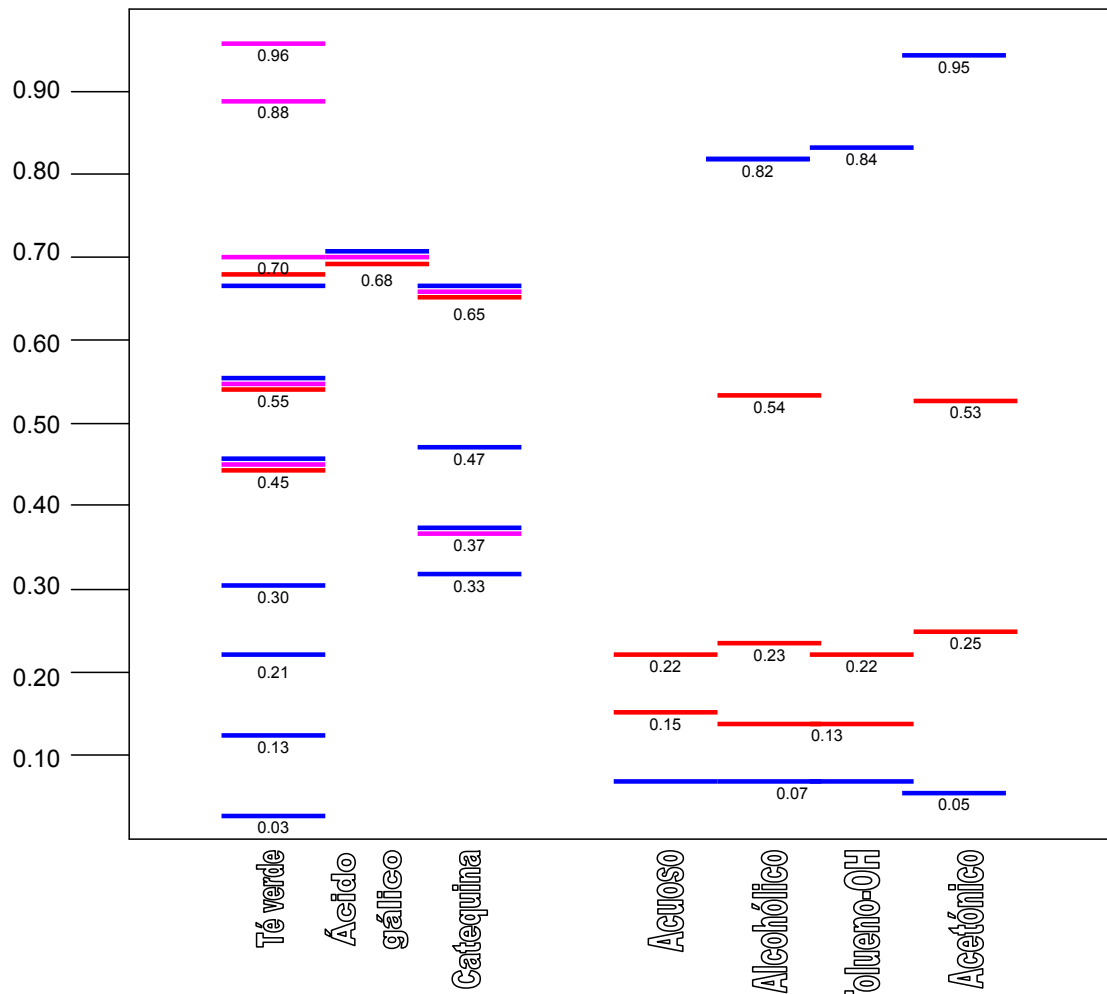
| Revelado        | Extracto acuoso | Extracto alcohólico | Extracto toluénico | Extracto acetónico | Extracto de té verde |
|-----------------|-----------------|---------------------|--------------------|--------------------|----------------------|
| $\text{KMnO}_4$ | ✓               | ✓                   | ✓                  | ✓                  | ✓                    |
| $\text{FeSO}_4$ | -               | -                   | -                  | -                  | -                    |
| $\text{NaNO}_3$ | ✗               | ✓                   | ✗                  | ✗                  | ✓                    |
| Vainillina      | ✗               | ✓                   | ✗                  | ✓                  | ✓                    |
| Azul B          | ✓               | ✓                   | ✓                  | ✓                  | ✓                    |



**Figura 23.** Pruebas Dot – Blot. a) Placas preparadas para pruebas Dot-blot a luz visible. b) Placas preparadas para Dot-blot vistas en longitud de onda corta. c) Placas preparadas para Dot-blot vistas en longitud de onda larga. d) Placas 1, 3, 4 y 5 en las que se hizo Dot-Blot vistas a luz visible.

### Caracterización de metabolitos secundarios

En la cromatografía de placa fina se obtuvo una gran variedad de bandas indicando que existen distintos metabolitos secundarios en el fruto de *Thalassia testudinum*. La mayoría de las bandas presentes en el extracto del fruto mostraron coincidencias con las bandas de los extractos del té verde. Ninguna banda coincide con los extractos de ácido gálico ni con la catequina (figura 24). En la figura 24 se observan bandas de color lila que representan a los flavonoides, bandas azules que representan a los alcaloides y bandas rojas que representan a los polifenoles. En los carriles de los extractos se encontraron bandas que indican presencia de a alcaloides y polifenoles pero no se detectó presencia de flavonoides. De acuerdo a los resultados obtenidos por Reich et al. (2006) dos bandas tienen coincidencias con compuestos conocidos en base a su RF (cociente entre la distancia recorrida por una sustancia desde el origen de la placa y la distancia del origen al frente del disolvente), el compuesto con RF 54 del extracto alcohólico y el compuesto con RF 53 del extracto acetónico están identificados como epigalocatequina. Para el resto de los compuestos fraccionados no se encontraron correspondencias con los compuestos utilizados en Reich et al (2006).



**Figura 24.** Cromatografía de placa fina. En azul (alcaloides) se muestran RF's observados en longitud de onda corta (260 nm), en lila (flavonoides) los RF's observados en longitud de onda larga (340 nm) y en rojo (polifenoles) los RF's observados al revelar con permanganato de potasio (KMnO<sub>4</sub>). En la horizontal se observan los extractos y en la vertical el valor RF.

## DISCUSIÓN

Los pastizales marinos son zonas muy productivas. Sostienen diversas comunidades de muchas especies de animales, desde artrópodos hasta sirenios pasando por una amplia gama de peces, poliquetos, y otros. Es por esta intensa actividad de herbivoría que este grupo de plantas (todas las plantas en realidad) necesita contrarrestar de algún modo los ataques continuos. Los metabolitos secundarios son producidos con el fin de evitar en lo posible la herbivoría (Forkner et al., 2004; Hay y Fenical, 1988). Debido a sus características químicas, los metabolitos secundarios pueden provocar un mal sabor a los organismos que se los comen, o lograr un efecto astringente en la boca de quien los consume, e incluso en algunos otros casos logran interferir negativamente en el proceso de la digestión debido a que precipitan proteínas (Hans-Walter, 1997; Zucker, 1983). Los frutos representan un excelente medio de dispersión de las semillas para las plantas. Sin embargo, para muchos animales constituyen una fuente muy nutritiva de alimento, pues contienen las semillas y el pericarpio, que generalmente son ricos en almidón y otras sustancias aprovechables por los organismos. Las semillas son muy importantes para la perpetuación de las especies, en especial cuando son producto de una reproducción sexual, para mantener la variabilidad genética, por lo que no es de extrañar que las plantas protejan a las semillas produciendo metabolitos secundarios que las defiendan de herbívoros colocando defensas en los frutos y en semillas.

Este trabajo se inició por una observación previa que indicaba que los frutos pequeños eran sujetos de una herbivoría mayor que los grandes, a pesar de que éstos contenían una mayor proporción de taninos (Jiménez, 2004; comunicación personal Dra. Van Tussenbroek). A pesar de que en este trabajo no se pudo establecer una relación entre la herbivoría y la edad de los frutos, sí se observó la síntesis de cristales y otras sustancias ergásticas pueden participar en la contención de la herbivoría. Sin embargo, se proponen estudios complementarios a éste, con el fin de comprender de mejor manera las interacciones ecológicas de este pasto marino.

Los frutos de *Thalassia testudinum* presentan unas emergencias que se originan en el exocarpo. Estas emergencias representan la superficie externa y son las únicas estructuras del fruto que contienen células parenquimáticas que almacenan taninos. Así los frutos contienen taninos en sus tejidos externos que son el primer contacto con los depredadores y le ahorran a la planta el tener que producir taninos en los demás tejidos del fruto, proceso metabólico que podría resultar innecesario.

Es común encontrar cristales en todas las familias de angiospermas y se les atribuyen distintas funciones, como reservorios de metabolitos secundarios, almacenes de calcio y ácido oxálico, promotores de espacios con aire en plantas acuáticas y como ayuda para prevenir la herbivoría (Prychid y Rudall, 1999), así como una forma de secuestrar metales pesados que se encuentren en el ambiente depositándolos dentro de los cristales (Nataka, 2003). En Hydrocharitaceae se ha reportado la presencia de estiloides (cristales prismáticos o pseudorafídios que pueden tener muchas formas) y otros cristales. En células epidermales de hojas de *T. testudinum* se han encontrado grandes cantidades de cristales romboides de oxalato de calcio (Dobbs et al., 2004). En las emergencias del fruto de *T. testudinum* se encontraron tres tipos distintos de cristales, rafídios, cristales cúbicos y cristales poligonales. La formación de cristales inicia en frutos que se encuentran en la etapa 3 y esta producción llega a su máximo en la etapa 5, donde las emergencias se encuentran saturadas de cristales. Esta producción de cristales en etapas maduras puede darse para defender al fruto de depredadores que podrían llegar a comer semillas en las que ya se invirtió una gran cantidad de recursos para llenarlas de almidón. La presencia de cristales en los tejidos puede ayudar a las plantas para evitar

la herbivoría, incluso se ha observado que hay herbívoros que evitan partes de las hojas que contienen una gran cantidad de cristales (Nakata, 2003) Aunque los cristales son de tamaño pequeño y para un depredador grande como un pez o una tortuga podrían ser insignificantes, para un depredador más pequeño como un poliqueto podrían representar un buen sistema de defensa, como se probó con *Gazella dorcas* (gacela) y *Pancratium sickenbergeri* (lili de desierto), en donde las gacelas mordían las hojas únicamente en lugares donde la proporción de cristales era menor que en el resto de la hoja (Ward et al., 1997).

Al analizar la composición de los cristales presentes en el fruto se observó que los elementos más comunes son el carbón, calcio, oxígeno y sílice. La presencia de carbón, calcio y oxígeno resulta hasta cierto punto obvia, dado que el sustrato en la laguna arrecifal de Puerto Morelos es un ambiente altamente carbonatado con restos de algas calcáreas. Sin embargo, la presencia de sílice no es algo común dado que no debería estar presente en ese sustrato, no obstante, en la zona hay grandes cantidades de sílice (Kring et al., 2004). La presencia de sílice en la laguna arrecifal y en toda la península de Yucatán se debe a un meteorito denominado Chicxulub que cayó en la península hace 65 millones de años creando un cráter con un diámetro ~200 km (Grajales-Nishimura et al., 2000; Kring et al., 2004), trayendo al planeta tierra entre otras cosas, sílice que posteriormente utilizarían las plantas. La función del sílice en las plantas representa una defensa mecánica, ya que puede contribuir a endurecer los tejidos que lo contienen (Lucas et al., 2000).

Existen casos documentados con rumiantes en los que se ha comprobado que la presencia de taninos evita el pastoreo. Sin embargo hacen falta más experimentos para demostrar que los metabolitos secundarios evitan la herbivoría (Zucker, 1983). Targett et al. (1986) realizó experimentos de depredación con el pez *Sparissoma radians* (pez lora) en el que comprobó que algunos compuestos fenólicos producidos por algas sí afectan la alimentación del pez dado que selectivamente dejó de comer las algas ricas en determinados compuestos fenólicos. Por otro lado, los mismos compuestos fenólicos no alteraron la alimentación del pez *Siganus spinus* (Paul et al., 1987). Lo mismo ocurrió en experimentos conducidos por Hay et al. (1988) utilizando cinco compuestos distintos en gasterópodos y pepinos de mar. En los experimentos realizados en este trabajo con *Sparisoma viride* se observó que esta especie muerde los frutos con el objeto de obtener las semillas y no el fruto *per se*, ya que en ocasiones se observó al pez morder el fruto y no consumir el pericarpio. Una posible explicación a esto es que el pez evita consumir los metabolitos secundarios producidos por el fruto y por esto los escupe. Otra explicación sería que al pez no le interesa consumir el fruto dado su bajo contenido nutritivo. Jiménez (2004) describió la presencia de taninos en la cubierta seminal de la semilla de *T. testudinum*, sin embargo esta cubierta resulta ser muy delgada y por consiguiente no puede almacenar una gran cantidad de taninos, no obstante pueden formar parte de la defensa en contra de herbívoros. No se puede concluir que *S. viride* se alimenta de semillas de *T. testudinum* dado que en el diseño experimental no había otro tipo de alimento en el estanque en el que se encontraba y existe la posibilidad de que comiera las semillas por tener la necesidad de comer, aunque Tussenbroek et al. (2008) reportan la observación en el ambiente marino de peces de *S. viride* comiendo flores del *T. testudinum*. Al no funcionar los metabolitos secundarios como defensa en contra de peces grandes, es posible que estos se produzcan con el fin de protegerse de peces pequeños o algún otro tipo de depredador más pequeño o como defensa en contra de microorganismos patógenos (Dixon, 2001, Pichersky y Gang, 2000, Zucker, 1983). Es posible que los taninos producidos por las plantas no sean de "amplio espectro", sino que se sinteticen dirigidos a ciertos depredadores o patógenos. Para poder concluir esto sería necesario hacer un análisis de la historia evolutiva de cada una de las especies que son depredadores de *T. testudinum*.

Las altas concentraciones de fenoles en etapas tempranas de los frutos y posteriormente las altas concentraciones de cristales en el pericarpio de frutos maduros podría implicar una estrategia dual para proteger a la semilla durante distintas etapas de su desarrollo.

Se utilizó el método de Folin-Denis para cuantificar fenoles totales por etapa de los frutos de *T. testudinum*. Este método no siempre resulta ser muy preciso puesto que en algunas cuantificaciones ha tenido resultados muy por debajo de lo obtenido con otros métodos (Hay y Fenical, 1988). Debido a esto, en algunos trabajos se complementa el método de Folin-Denis con el método Bate-Smith que estima la astringencia relativa de los fenoles (Hay y Fenical, 1988; Ragan y Glombitza, 1986). La cantidad de fenoles presentes en el fruto es mayor en etapas tempranas y decae conforme este crece, teniendo un ligero repunte en la etapa 5. Este repunte coincide con el aumento en la producción de cristales en frutos maduros y podría indicar un aumento en el metabolismo secundario del fruto justo antes de dispersar las semillas que es cuando justamente tienen mucho almidón (Jimenez, 2002). Otra posible explicación a este comportamiento es que la mayor producción de fenoles se da cuando el fruto es muy pequeño y no se altere durante el desarrollo del fruto, ya que en los frutos maduros hay más tejido (mayor número de células) que en los inmaduros. Para contrarrestar esto, se propone hacer extracciones y cuantificaciones de un solo fruto por etapa, además de hacer esto se propone aumentar la n y hacer varias repeticiones con para determinar si el comportamiento que presenta la figura 18 de este trabajo se sigue manteniendo. Por otra parte se obtuvo que para todas las etapas, la mayoría de los fenoles son solubles en agua.

En algas marinas se han aislado entre 500 y 600 compuestos producto del metabolismo secundario, entre ellos terpenos, compuestos aromáticos, sustancias derivadas de aminoácidos y polifenoles y una gran parte de estas sustancias pueden actuar como estrategia ecológica para disuadir a herbívoros (Hay y Fenical, 1988). En *T. testudinum* se han hecho análisis para determinar los principales constituyentes de las hojas y rizomas y se encontró que están compuestos en un 13% de proteínas, 16% de fibra y 36% de carbohidratos. Produce doce aminoácidos esenciales siendo los más abundantes el ácido aspártico y glutámico, arginina, leucina y lisina (Burkholder et al., 1959).

En las pruebas realizadas a cortes de los tejidos de frutos de *T. testudinum* se tuvieron resultados positivos para la vainillina indicando la presencia de taninos condensados. En la placa HPTLC se obtuvieron diversas bandas que por ser visibles en longitud de onda corta se deduce que son alcaloides (Reich et al., 2006) pero no se pudo determinar con exactitud qué compuestos son. Por otro lado, se obtuvieron bandas que fueron reveladas con  $KMNO_4$  indicando ser polifenoles. En base a la publicación de Reich et al. (2006) se pudo determinar la composición de dos bandas siendo esta epigalocatequina, el resto de las bandas obtenidas no pudieron ser identificadas. Para determinar con exactitud la identidad de los compuestos faltantes y confirmar la presencia del compuesto identificado hacen falta estudios complementarios a este. En todos los extractos del fruto de *T. testudinum* se observó una banda gruesa que no corrió por la placa. Esto puede deberse a que son polímeros muy grandes con un alto peso molecular y/o a que no son solubles al eluyente de la placa y hacen falta estudios posteriores en los que se hidrolicen los compuestos para determinar su identidad.

## CONCLUSIONES

*Sparisoma viride* es un depredador de *Thalassia testudinum*. No obstante, no se pudo determinar si tiene preferencia por alguna etapa en particular de los frutos. Tampoco se pudo determinar si *S. viride* depreda el fruto junto con las semillas o sólo lo rompe para sacar las semillas.

La depositación de taninos y de cristales en el fruto ocurre únicamente en las emergencias.

La distancia entre emergencias se amplía conforme el fruto madura. Sin embargo, el tamaño de las emergencias llega a su máximo en la etapa 3.

Los frutos de *T. testudinum* contienen alcaloides y polifenoles (epigalato catequinas) desde etapas muy tempranas y persisten a lo largo de su maduración, sin embargo la síntesis de cristales de oxalato de calcio se da exclusivamente en etapas maduras de los frutos.

Los cristales observados y analizados mediante EDS contienen altos niveles de sílice.

La densidad de metabolitos secundarios con respecto al peso del tejido del fruto, disminuye conforme el fruto madura (incrementa su tamaño).

Para determinar con exactitud la composición de los metabolitos secundarios encontrados en el fruto, hace falta complementar estos resultados con nuevos estudios. Sin embargo es necesario tomar los frutos como unidades para hacer las extracciones, es decir, un fruto por etapa sin importar el peso. Además es importante tener repeticiones para hacer un análisis estadístico.



## BIBLIOGRAFÍA

1. Arber A. 1920. Water plants; a study of aquatic angiosperms. Cambridge University Press. Nueva York
2. Ayres P., T. Clausen, S. MacLean, A. Redman y P. Reichardt. 1997. Diversity of structure and antiherbivore activity in condensed tannins. *Ecology*. 78 (6): 1696-1712
3. Bennett R y R. Wallsgrave. 1994. Secondary metabolites in plant defense mechanisms. *New Phytol.* 127: 617-633
4. Bowman H. 1923. The distribution and pollination of certain sea-grasses. *Pap. Mich. Acad.Sci.*, 2: 3 – 10
5. Bratoeff E., M. Pérez-Amador, C. Labastida y J. Herrera. 1992. Tannins, sugars and flavonoids from the roots of *Stigmatophyllum* Juss. (Malpighiaceae). *Revista Internacional de Botánica Experimental*. 53 (2): 155-159
6. Buchanan B., W. Gruissem y R. Jones. 2000. Biochemistry & Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Physiologists. E.E.U.U. pp 1250-1318.
7. Burkholder P., L. Burkholder y J. Rivero. 1959. Some chemical constituents of turtle grass, *Thalassia testudinum*. *Bulletin of the Torrey botanical club*. 86 (2) 88-93
8. Burnie D. 2003. Animal. Dorling Kindersley. Londres, Gran Bretaña.
9. Cox P y P. Tomlinson. 1988. Pollination ecology of a seagrass, *Thalassia testudinum* (Hydrocharitaceae), in St. Croix. *American Journal of Botany*. 75: 958 – 965
10. Creed J.C., R.C. Phillips, B.I. Van Tussenbroek. 2003. Seagrasses of the Caribbean. En: E. Green, F. Short (Eds.). *World Atlas of Seagrasses*. Present status and future conservation. University of California Press:234-242.
11. Den Hartog C. 1970. The sea-grasses of the world. North-Holland Publishing Company. Amsterdam, Holanda. pp 1-33; 222-233
1. Dixon R. 2001. Natural products and plant disease resistance. *Nature*. Vol. 411 843 – 847
2. Dobbs F., R. Zimmerman y L. Drake. 2004. Occurrence of intracellular crystals in leaves of *Thalassia testudinum*. *Aquatic botany*. 80 23-28
3. Dring M. 1986. The biology of marine plants. Edward Arnold. Inglaterra.
4. Ferguson R., G. Thayer y T. Rice. 1980. Marine primary producers. En *Functional adaptations of marine organisms*. Academic Press. Nueva York. pp. 9-69
5. Forkner R., R. Marquis y J. Lill. 2004. Feeny revisited: condensed tannins as anti-herbivore defences in leaf-chewing herbivore communities of *Quercus*. *Ecological Entomology*. Vol 29 pp 174-187
6. Gambi M.C., B.I. van Tussenbroek, A. Brearley. 2003. Mesofaunal borers in seagrasses: world-wide occurrence and a new record of boring polychaetes in the Mexican Caribbean. *Aquat. Bot.* 76: 65-77
7. Grajales-Nishimura J., E. Cedillo-Pardo, C. Rosales-Domínguez, D. Morán-Zenteno, W. Alvarez, P. Claeys, J. Ruíz-Morales, J. García-Hernández, P. Padilla-Avila, A. Sánchez-Ríos. 2000. Chicxulub impact: The origin of reservoir and seal facies in the southeastern Mexico oil fields. *Geology*. 28 (4) pp 307-310
8. Green E. y F. Short. 2003. *World Atlas of seagrasses*. University of California Press. Berkeley, E.E.U.U.
9. Hagerman A. 2002. Tannin handbook. Miami University. (e-book).
10. Hans-Walter H. 1997. *Plant biochemistry and molecular biology*. Oxford University Press. Nueva York.
11. Hay M., W. Fenical y K. Gustafson. 1987. Chemical defense against diverse coral reef herbivores. *Ecology*. 68:1581-1591.

12. Hay M. y W. Fenical. 1988. Marine plant-herbivore interactions: The ecology of chemical defense. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 19: 111-145
13. Humann P. 1996. Reef fish identification. Segunda edición. New World Publications. E.E.U.U. p 178-179
14. Jensen W. 1962. Botanical histochemistry. Principles and Practice. Freeman & Company. San Francisco. p 198-206
15. Jiménez K. 2004. Desarrollo y dispersion de frutos y semillas de *Thalassia testudinum* Banks Ex König (Hydrocharitaceae). Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma México. México, D.F.
16. Kornelis J. 2008. Análisis de la variabilidad genética de la angiosperma marina *Thalassia testudinum*, Banks ex Köning, con el uso de microsatélites. Tesis de doctorado. Instituto de Ciencias del mar y limnología. Puerto Morelos, Quintana Roo, México.
17. Kring D., F. Hôrz, L. Zurcher y J Urrutia. 2004. Impact lithologies and their emplacement in the Chicxulub impact crater: initial results from the Chicxulub Scientific Drilling Project, Yaxcopoil, Mexico. *Meteoritics & Planetary Science*. 39 (6) pp 879-897.
18. Kuo J y C Den Hartog. 2000. Seagrasses: A profile of an ecological group. *Biol. Mar. Medit.* 7 (2): 3-17
19. Kuo J y C Den Hartog. 2006. Seagrass morphology, anatomy and ultrastructure. En: Larkun, W., R. Orth y C. Duarte (Eds). 2006. Seagrasses: Biology, Ecology and Conservation. Springer. Países bajos. p 51-87
20. Kuo J., R. Coles, W. Lee y J. Mellors. 1991. Fruits and seeds of *Thalassia hemprichii* (Hydrocharitaceae) from Queensland, Australia. *Aquatic Botany*, 40: 165-173
21. Kuo J y J McComb. 1989. Seagrass taxonomy, structure and development. En: Larkum A, J McComb y S Shepherd. 1989. Biology of seagrasses. A treatise on the biology of seagrasses with special reference to the Australian region. Elsevier. 841 pp
22. Lanza G y C Tovilla. 1986. Una revisión sobre taxonomía y distribución de pastos marinos. *Universidad y Ciencia*. 3 (6): 17-38
23. Latsague M. y J. Lara. 2003. Fenoles solubles totales y su relación con la inhibición de la rizogénesis en estacas de *Nothofagus pumilio* (OPEP et Ende) Krasser. *Gayana Botánica*. 60:2
24. Lovéc-Theobald R. y C. Katz. 2006. Seabeans and drift seeds. Página en red: <http://www.seabean.com>
25. López ML, J. Márquez y G. Murguía. 2005. Técnicas para el estudio del desarrollo en angiospermas. Segunda edición. Las prensas de ciencias. Facultad de Ciencias, UNAM. México.
26. Lucas P., I. Turner, N. Dominy y N. Yamashita. 2000. Mechanical defences to herbivory. *Annals of Botany*. 86. pp 913-920
27. Morrison I.M., E. Asiedu, T. Stuchbury y A. Powell. 1995. Determination of lignin and tannin contents of cowpea seed coats. *Annals of Botany*. 76: 287-290
28. Muñoz M. 1979. Determinación de saponinas, taninos y acción antibiotica en algunas plantas silvestres mexicanas. Tesis de licenciatura (Biólogo). Facultad de Ciencias, UNAM. México D.F. pp 15-23.
29. Nakata P. 2003. Advances in our understanding of calcium oxalate crystal formation and function in plants. *Plant Science*. 164. pp 901-909
30. Orpurt P. y L. Boral. 1964. The flowers, fruits, and seeds of *Thalassia testudinum* Koenig. *Bulletin of marine Science of the Gulf and Caribbean*. 14: 296 – 302
31. Orth R., M. Harwell, E. Bailey, A. Bartholomew, J. Jawad, A. Lombana, K. Moore, J. Rhode y H. Woods. 2000. A review of issues in seagrass seed dormancy and germination: implications for conservation and restoration. *Marine ecology progress series*. 200: 277 – 288

32. Paul V. y W. Fenical. 1987. Natural products chemistry and chemical defense in tropical marine algae of the phylum Chlorophyta. *Bioorganic Marine Chemistry*. 1:1-29
33. Phillips R y E. Meñez. 1988. Seagrasses. *Smithsonian contributions to Marine Science*. 34: 1 – 104
34. Pichersky E y D. Gang. 2000. Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective. *Trends in plant science*. Vol. 5 (10) 439 – 445
35. Prychid C. y P. Rudall. 1999. Calcium oxalate crystals in monocotyledons: A review of their structure and systematics. *Annals of botany* 84: 725 - 739
36. Ragan M. y K. Glombitza. 1986. Phlorotannins, brown algal polyphenols. *Progress in phycological research*. Editores: Round F.E. y D.J. Chapman, 4: 129-241. Bristol: Biopress Ltd.
37. Ranocha P., M. Chabannes, S. Chamayou, S. Danoun, A. Jauneau, A. Boudet y D. Goffner. 2002. Laccase down – regulation causes alterations in phenolic metabolism and cell wall structure in poplar. *Plant Physiology*. 129: 145 – 155
38. Raven P., R. Evert y S. Eichhorn. 1992. *Biology of plants*. Quinta Edición. Worth Publishers. Nueva York. Pp 642-644
39. Ruiz-Rentería F., B. van Tussenbroek, E. Jordán-Dahlgren. 1998. Puerto Morelos, Quintana Roo, México. En: Kjerfve B (edn) CARICOMP: Caribbean coral reef, seagrass and mangrove sites. UNESCO. Paris. pp 57-66
40. Sculthorpe C. 1985. *The biology of aquatic vascular plants*. Koeltz Scientific Books. Alemania. p 60 - 175
41. Short F., R. Coles, C. Pergent-Martini. 2001. Global seagrass distribution. En: Short, F. y R. Coles (Eds). *Global Seagrass Research Methods*. Elsevier Science. p 5 – 30
42. Supanwanid C., J. Albertsen, H. Mukai. 2006. Methods for assessing the grazing effects of large herbivores on seagrasses. En: Short, F. y R. Coles (Eds). *Global Seagrass Research Methods*. Elsevier Science
43. Targett N., T. Targett, E. Vrolijk y N. Orden. 1986. Effect of macrophyte secondary metabolites on feeding preferences of the herbivorous parrotfish *Sparisoma radians*. *Mar. Biol.* 92: 141-148
44. Tannins. 2001. Página en red: <http://www.ansci.cornell.edu/plants/toxicagents/tannin>
45. Temple A. 1982. Tannin-measuring techniques: a review. *J. Chem. Ecol.* 8: 1289-1298
46. The photic zone: Light in the water. 2003. Página en red: [http://curriculum.calstatela.edu/courses/builders/lessons/less/les5/photic\\_zone.html](http://curriculum.calstatela.edu/courses/builders/lessons/less/les5/photic_zone.html)
47. Tomlinson, P.B. 1969. On the morphology and anatomy of turtle grass, *Thalassia testudinum* (Hydrocharitaceae). III. Floral morphology and anatomy. *Bulletin of Marine Science* 19: 286 - 305
48. Tussenbroek, B.I., van. 1994. Aspects of the reproductive ecology of *Thalassia testudinum* in Puerto Morelos reef lagoon, Mexico. *Bot. Mar.* 37: 413-419
49. Tussenbroek B., J. Vonk, J. Stapel, P. Erftemeijer, J. Middelburg y J. Zieman. The biology of *Thalassia*: Paradigms and recent advances in research. En: Larkun, W., R. Orth y C. Duarte (Eds). 2006. *Seagrasses: Biology, Ecology and Conservation*. Springer. Países bajos. p 409-439
50. Tussenbroek B., R. Wong y J. Márquez-Guzmán. 2008. Synchronized anthesis and predation on pollen in the marine angiosperm *Thalassia testudinum* (Hydrocharitaceae). *Mar Eco Prog Ser.* 354: 119-124
51. Ward D., M. Spiegel y S. Saltz. 1997. Gazelle herbivory and interpopulation differences in calcium oxalate content of leaves of a desert lilly. *J. Chem. Ecol.* 23 pp 333-347

52. Warren D. y M. Zetina. 2002. English – Spanish dictionary of plant biology. Cambridge International Science Publishing. Inglaterra. 647 pp
53. Wikipedia, The Free Encyclopedia. 2007. Página en red: <http://en.wikipedia.org/wiki/Soxhlet>
54. Wink M. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry*. 64 pp 3-19
55. Wranham R. y P. Waterman. 1983. Condensed Tannins in fruits eaten by chimpanzees. *Biotropica*. Vol. 15 3: 217-222
56. Zapata O. y C. McMillan. 1979. Phenolic acids in seagrasses. *Acuatic Botany*. 7: 307-317
57. Zucker W. 1983. Tannins: Does structure determine function? An ecological perspective. *The American Naturalist*. 121: 3