



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE BIOLOGÍA
ECOLOGÍA

**RESPUESTA FISIOLÓGICA Y BIOSÍNTESIS DE LIRIODENINA FRENTE AL ESTRÉS
HÍDRICO EN *Annona lutescens* Saff.**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

MARISOL CASTRO MORENO

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. ALMA ROSA GONZALEZ ESQUINCA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS, UNICACH

COTUTORA DE TESIS: DRA. CLARA LEONOR TINOCO OJANGUREN
INSTITUTO DE ECOLOGIA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. MARÍA DEL ROCÍO CRUZ ORTEGA
INSTITUTO DE ECOLOGIA, UNAM

MÉXICO, D.F.

Agosto 2013



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.

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM

Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 6 de mayo de 2013, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de DOCTORA EN CIENCIAS de la alumna CASTRO MORENO MARISOL con número de cuenta 507010061 con la tesis titulada: "Respuesta fisiológica y biosíntesis de liriodenina frente al estrés hídrico en *Annona lutescens* Saff", realizada bajo la dirección de la DRA. ALMA ROSA GONZÁLEZ ESQUINCA:

Presidente:	DRA. GUADALUPE JUDITH MÁRQUEZ GUZMÁN
Vocal:	DR. MARIANO MARTÍNEZ VÁZQUEZ
Secretario:	DRA. MARÍA DEL ROCÍO CRÚZ ORTEGA
Suplente:	DR. OSCAR LUIS BRIONES VILLARREAL
Suplente	DRA. ANA ELENA MENDOZA OCHOA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F. a 2 de agosto de 2013.

María del Coro Arizmendi

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

c.c.p. Expediente del (la) interesado (a).

Agradecimientos Institucionales

- Agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México por mi formación académica
- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo para realizar los estudios de posgrado, otorgándome la beca numero 205070 y CVU
- Al Concejo de Ciencia y Tecnología del Estado de Chiapas, por el apoyo otorgado
- A la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas por el apoyo para la realización de la investigación
- A mi Comité Tutorial: la Dra. Alma Rosa González Esquinca, la Dra. Clara Leonor Tinoco Ojanguren y la Dra. Ma. del Rocío Cruz Ortega, por su apoyo, orientación, paciencia y dedicación que tuvieron durante el posgrado

Agradecimientos personales

A la Dra. Alma Rosa González Esquinca, por compartir conmigo la aventura de mi formación académica desde mucho tiempo atrás, por apoyarme en cada paso que he dado tanto académico como personal, por darme el aliento que necesité para seguir adelante, por su confianza, por su cariño invaluable, por ayudarme a apreciar mi libertad y mi camino, porque sin usted y sin su guía no habría llegado a este momento. Con todo, todo, todo mi cariño, amor y admiración.

A la Dra. Clara Tinoco Ojanguren y la Dra. Rocío Cruz Ortega, por su guía, confianza y apoyo durante el posgrado, porque siempre estaban ahí apoyándome y animándome. Con muchísimo afecto y admiración.

A los miembros del Jurado: Dra. Guadalupe Judith Márquez Guzmán, Dr. Mariano Martínez Vázquez, Dr. Oscar Luis Briones Villarreal y Ana Elena Mendoza Ochoa, por las valiosas contribuciones al documento final que mejoraron sustancialmente este documento.

Al Dr. Mariano Martínez Vázquez por los cursos, los regaños, las bromas y los comentarios tan acertados

A Iván de la Cruz Chacón, por su amistad invaluable, por abrir un rinconcito de tu cerebro para aceptarme como amiga y por todo lo que me has ayudado día a día, los consejos, los regaños, las alegrías. Te quiero Mucho

A Christian Anabí Riley Saldaña, por compartir conmigo los momentos de alegría, tristeza, desesperación, por apoyarme cuando más lo necesitaba y cumplir un papel de amiga y hermana. Te quiero mucho.

A Agustín Orozco Castillo por compartir este camino, por las pláticas y por su música en el laboratorio.

A la Dra. Lorena Mercedes Luna Cazáres, por su apoyo, amistad, por el aliento y ayuda en los momentos precisos, desde hace tanto tiempo.

A todos los que han compartido un lugar en ese maravilloso lugar en el que yo me siento como en casa, el Laboratorio de Fisiología y Química Vegetal.

A mi papá, Ramiro Castro Santiago, porque aunque aun duele su ausencia, es el hombre que me dio la fuerza, la confianza y el amor para cumplir mis metas, es el aliento, el consejo, el amor. Siempre te recordaré y te amaré.

A mi mamá, por darme su amor infinito su ayuda en todo momento, por apoyarme en esta aventura de la vida, sin tu amor no sabría a donde ir, a qué puerto llegar a quién acudir. Te amo

A mi familia: mis hermanas Lupita y Cady, mis sobrinos Luis, Line, Rami y Fati, y mi cuñado Karlos que me han apoyado en todo y que han compartido esta aventura académica.

A mis primos que han colaborado y ayudado

A mi hijo: Andrés Rodríguez Castro, por existir, no concibo mi vida sin ti, eres mi impulso, gracias por hacerme descubrir tanto y tanto amor. TE AMO

Dedico este trabajo...

A mi hijo Andy

Cómo contarte que no quiero disfrutar el concierto de la vida sin ti,

*Mirar el río hecho de tiempo y agua
y recordar que el tiempo es otro río,
saber que nos perdemos como el río
y que los rostros pasan como el agua.
J.L. Borges*

INDICE

Resumen	1
Abstrac	3
1. Revisión de la literatura	5
1.1 La selva baja caducifolia	5
1.1.2 Adaptaciones fisiológicas y morfológicas de los árboles de la Selva Baja Caducifolia	8
1.2 Estrés abiótico	11
1.2.1 Estrés hídrico	11
1.2.2 Estrés hídrico y su relación con la fotosíntesis	13
1.2.3 Ambientes lumínicos	15
1.3 Alcaloides de Anonáceas	17
1.3.2 La Familia Annonaceae	19
1.3.3 <i>Annona lutescens</i>	20
2. Antecedentes	22
2.1 Ambiente de <i>A. lutescens</i>	22
2.2 Importancia ecológica y química de <i>A. lutescens</i>	23
2.3 Trabajos realizados con <i>A. lutescens</i>	24
3. Planteamiento de objetivos e hipótesis	25
3.1 Planteamiento de objetivos	25
3.2 Hipótesis	26
4. Métodos	26
4.1 Caracterización fenológica	29
4.2 Obtención de muestras de raíces, tallos y hojas de árboles adultos	31
4.3 Obtención de muestras de raíces, tallos y hojas de arbolitos jóvenes	33
4.4 Obtención de muestras de raíces, tallos y hojas de plántulas	34
4.5 Medición de variables	36
4.6 Análisis estadístico	41
5. Resultados	43
5.1 Fenología de <i>Annona lutescens</i>	41
5.2 Caracterización ecofisiológica de <i>Annona lutescens</i> en diversas condiciones ambientales	51
5.3 Variación estacional del contenido de liriodenina en adultos y plantas jóvenes y plántulas de <i>Annona lutescens</i>	63
6. Discusión	70
7. Conclusiones	76
8. Bibliografía	79
9. Anexos	97

Resumen

En este trabajo se evaluaron las respuestas ecofisiológicas y la de concentración de liriodenina en *Annona lutescens* ante los cambios estacionales en una Selva Baja Caducifolia al sur de México. Se caracterizó la variación fenomorfológica de plantas de *A. lutescens* inmediatamente después de la germinación, durante el establecimiento de plántulas y durante un ciclo anual en plantas jóvenes y adultos. Se evaluó experimentalmente el efecto de la disponibilidad de luz y agua en la asimilación de carbono, estado hídrico y la concentración de liriodenina en plántulas y plantas jóvenes de *A. lutescens*. El trabajo con plántulas se realizó experimentalmente, en un sombreadero con dos condiciones de luz; la primera con el 50% de la luz solar (con un máximo aproximado de $1000 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ de fotones) y la segunda con el 10% de luz (máximo de $200 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ de fotones). En ambos ambientes se diseñaron también tres tratamientos de estrés hídrico: ligero, (15 días sin riego), moderado (25 días sin riego), y severo (40 días sin riego)

En campo, plantas jóvenes y árboles adultos, mostraron una variación organoespecífica en el contenido de liriodenina durante el ciclo anual. La mayor concentración se observó en las raíces y se incrementó en este mismo órgano durante los últimos meses de la estación seca, temporada que coincide con la fructificación. En las plántulas tanto del control como las sometidas a estrés hídrico, también se encontró una mayor concentración de liriodenina en las raíces. Esta concentración se incrementó significativamente en las raíces de las plantas bajo tratamiento de estrés hídrico.

Los resultados mostraron que *A. lutescens* es una especie con fenología típica de las especies de Selva Baja Caducifolia, ya que pierde sus hojas y fructifica en la etapa más severa de la temporada de secas. Esto le permite tener semillas listas para germinar durante la temporada de lluvia, las semillas no presentan latencia y su germinación comenzó a los 15 días de imbibición. Con los tratamientos de estrés hídrico se comprobó que *A. lutescens* es una especie con adaptaciones marcadas de evitación a la sequía, dado que mientras transcurrió la sequía, el potencial hídrico foliar al amanecer disminuyó lentamente, las hojas iniciaron la senescencia y finalmente cayeron. Asimismo, la

evaluación de la captura de carbono diaria mostró que en los tratamientos de estrés hídrico la fijación de CO₂ se redujo paulatinamente. A los 10 días sin riego la asimilación diaria de carbono disminuyó 23.89 %, a los 23 días sin riego 50.29% y a los 50 días sin riego la asimilación bajó 85.23% con respecto a los testigos medidos el mismo día. La máxima asimilación en plantas de sol se presentó por las mañanas de 9:00 am a 12:00 pm mientras que en plantas crecidas bajo sombra su máxima asimilación se presentó de 1:00 a 3:00 pm.

Los primeros signos de senescencia foliar se presentaron a los 30 días sin riego. El proceso de senescencia y caducidad fue más evidente y rápido en las plantas expuestas al 50% de luz solar que en las plantas expuestas al 10% de luz solar. El potencial hídrico de las plantas jóvenes en el campo fue alto al inicio de la temporada de sequía (-0.7 MPa) y disminuyó paulatinamente hasta llegar a -4.5 MPa en el cuarto mes de sequía, que coincidió con la caída de las hojas. El potencial hídrico crítico (-2.3 MPa), que es cuando la captura de carbono disminuye el 75%, se alcanzó a los 43 días de sequía.

En plántulas, juveniles y adultos de *A. lutescens*, el contenido de liriodenina aumentó significativamente con la sequía. En los adultos y en las plantas jóvenes este incremento se produjo en los meses más severos de sequía, coincidiendo en los adultos con la fructificación y la caducidad de hojas, y en jóvenes con la senescencia y caducidad de hojas. En las plántulas sometidas a tratamientos de sequía el incremento de liriodenina se presentó inclusive bajo estrés hídrico ligero y se hizo más evidente en el tratamiento de estrés severo (50 días sin riego).

En conclusión, la producción y acumulación de liriodenina durante el año responde a los cambios hídricos estacionales que se presentan, lo que con mucha probabilidad apoya la idea de que la liriodenina juega un papel en la supervivencia de la especie ante los ambientes con cambios estacionales contrastantes.

Abstract

In this study the ecophysiological responses and liriodenine concentration in *Annona lutescens* due to seasonal changes in a Tropical Dry Forest in Mexico were evaluated. Pheno-morphological changes were characterized immediately after germination, during seedling establishment, and during an annual cycle of young and adult trees. The ecophysiological characterization and its relation with liriodenine content were carried out in seedlings and in young plants. The experiments with seedlings were performed in a shade house with two light conditions: the first with the 50% of solar light ($1000 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ of photons), and the second with the 10% of solar light ($200 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ of photons). In these two light conditions seedlings were exposed to three different irrigation regimes: 15, 25 and 40 days without watering.

Under natural conditions, during the annual cycle, we found an organ-specific variation in the liriodenine content in young plants and adult trees. The highest liriodenine content was in roots, increasing during the last months of the dry season. In control and stressed seedlings the content of liriodenine in roots was also high, and it increased during a severe water stress.

Annona lutescens showed a typical phenology of the Tropical Dry Forest species, it lost their leaves and fructified during the most dried months. Therefore the seeds are available at the beginning of the rainy season, and germinate during the first month of the rainy season. There was no evidence of latency, and seeds germinated after 15 days of imbibition. Daily courses of gas exchange measurements in seedlings showed a slow decrease of CO_2 fixation during the drought treatment. After 10 days with no irrigation the carbon assimilation decreased 23.89%, and after 25 days without irrigation decreased 85.23%. In sun plants the maximum period of assimilation was between 9:00 am to 12:00 pm, for plants in shade the maximum period of assimilation was between 1:00 pm to 3:00 pm.

The signals of senescence were observed after 30 days of drought. The senescence process and the decay of leaves were faster in sun plants than in shade plants. The

predawn water potential in the field was -0.7 MPa in the first month of drought, and it decreased monthly up to -4.5 MPa in the fourth month of drought. The critical water potential (- 2.3 MPa) was observed 43 days after drought.

In seedlings, young plants and adults of *A. lutescens*, the liriodenine content increased in the driest months, reaching maximum values at the end of the dry season. During the dry season, fructification occurred and leaves dropped. In seedlings exposed to drought, liriodenine increased even in the low water stress treatment, but in the most severe treatment (50 days without irrigation) the liriodenine content increased significantly only in sun-seedlings.

In conclusion, the production and accumulation of liriodenine during the year respond to the seasonal rainy changes in the tropical dry forest. We suggest that liriodenine might have a role in the survival of the species to environments with contrasting seasonal changes.

1. Revisión de la literatura

1.1 La Selva Baja Caducifolia

Los Bosques Neotropicales Deciduos (Rzedowski y McVaugh, 1966) también llamados Selvas Bajas Caducifolias (SBC) (Miranda y Hernández X 1963) constituyen uno de los principales tipos de vegetación. La SBC se distribuye al norte y al sur del ecuador extendiéndose hasta las regiones áridas, donde son sustituidos por sabanas de arbustos espinosos, matorrales suculentos, semidesiertos y desiertos (Osorio-Beristain 2012, Lamprecht 1990). En Centro América, este tipo de vegetación, representa cerca del 50% de los bosques, mientras que en Sur América el 22% (Murphy and Lugo 1986). En México estos bosques ocupaban el 14.14% del territorio (Rzedowski 1978), aunque estos valores han cambiado ya que Trejo y Dirzo (2000) señalan una tasa de deforestación de 1.4% anual y en el 2002 se estimó que ya solo cubría el 7% del territorio y de éste solo el 47% estaba conservado (SEMARNAT, 2002).

En México, la mayor parte de SBC se distribuye desde los 26° en el sur de Sonora hasta los 16°N en Chiapas en una franja casi continua en la vertiente del Pacífico, con algunas interrupciones en las porciones más húmedas de Nayarit y Oaxaca, mientras que por la vertiente del Golfo se presenta desde Tamaulipas hasta la península de Yucatán (Bullock *et al.* 1995, Trejo 1999, Dirzo y Trejo 2000) (Fig. 1).

La precipitación media anual en este ecosistema, varía desde 250 a 1200 mm, aunque según Trejo (1998) y Murphy & Lugo (1986) el 32% del área total se encuentra en el rango de 800 a 1000 mm. La mayor parte de las precipitaciones se presentan en una temporada de 5 a 7 meses en verano mientras la sequía se presenta en invierno y en primavera (Bullock *et al.* 1995). Debido al contraste en las condiciones climáticas durante el ciclo anual, la dinámica y fisionomía de las SBC están determinadas por la precipitación pluvial, la temperatura y la fertilidad del suelo (Osorio-Beristain 2012).

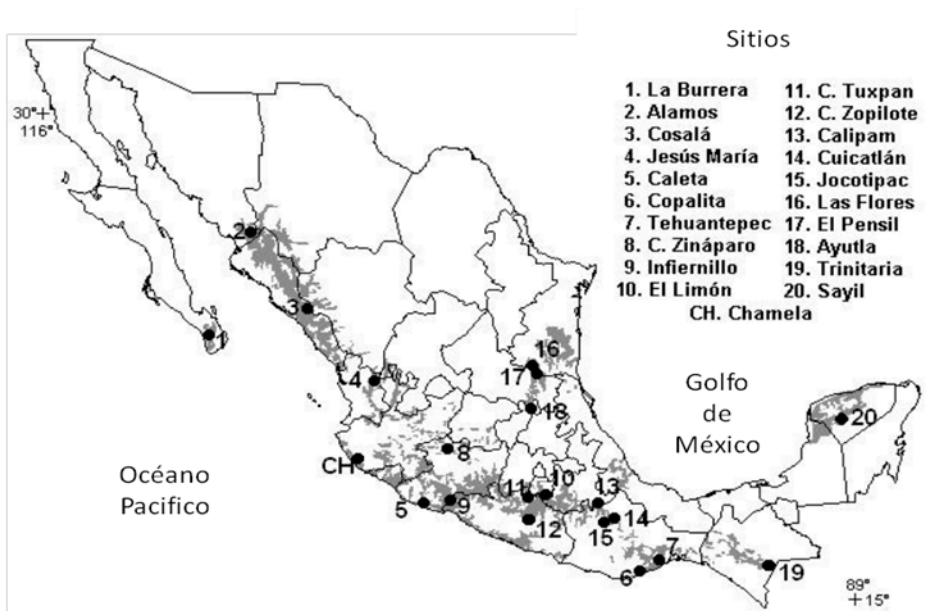


Figura 1. Distribución de los Bosques Tropicales Caducifolios en México según Trejo & Dirzo (2002).

Las SBC se caracterizan por tener un estrato arbóreo dominante con alturas de no más de 15 m. La principal característica de las SBC es la estacionalidad en la distribución de las precipitaciones; además estos bosques comparten: la alta capacidad de rebrote, una alta cantidad de biomasa subterránea, maderas con peso específico alto y árboles con alta proporción de ramas (Murphy & Lugo 1986, Bullock *et al.* 1995). En las SBC, la productividad primaria neta es menor que en las Selvas Altas Perennifolias (SAP), porque el crecimiento de las plantas es interrumpido por la época seca en la selva seca y se acumula una mayor cantidad de hojarasca debido a que la radiación solar alcanza el suelo en la época seca, lo que aminora la tasa de descomposición de las hojas (Osorio-Beristain, 2012).

Las SBC son sistemas de alta diversidad florística, conformadas por elementos tropicales, árboles de copas extendidas y con altura promedio entre 7 y 10 m, aunque en algunos casos llegan a 15 m (Trejo 1998). En estos ecosistemas, se han reportado más de 1200 especies de plantas vasculares y más de 420 especies de vertebrados terrestres (Balvanera *et al.* 2000). La estacionalidad permite un alto índice de endemismos (16%), por ejemplo de las 84 especies del género *Bursera* en México, cerca de 80% son endémicas de estos bosques (Gentry 1995, Trejo y Dirzo 2002, Becerra 2005).

1.1.2 Adaptaciones morfológicas y fisiológicas de los árboles de la Selva Baja Caducifolia

Debido a la severa sequía, en la SBC se imponen reglas de supervivencia muy estrictas (Osorio-Beristain 2012), este período no permite satisfacer las demandas hídricas de los organismos, provocando un estrés hídrico. Por esto, las plantas adaptan sus características morfológicas y fisiológicas para prevenir la pérdida excesiva de agua y así sobrevivir (Eamus 1999, Schmidt & Levin 1985).

Las especies de las Selvas Bajas Caducifolias, muestran un mosaico diverso de estrategias fenológicas y fisiológicas, que facilitan la adaptación de las plantas ante los cambios estacionales de luz, temperatura y precipitación (Borchert 1994). Los atributos fenológicos característicos de este ambiente, como por ejemplo, la caída de hojas en la estación seca o el aumento en la cantidad de raíces con respecto a la parte aérea, suelen ser estrategias para la conservación del agua (Kushwaha & Singh 2005).

Las hojas tienen un rol central en la obtención de energía y nutrientes para la planta (Wright *et al.* 2004). Las hojas de árboles que crecen en ambientes estacionales tropicales, son significativamente diferentes a las hojas de los árboles de otros sistemas tropicales florísticos, como los bosques nublados y siempre verdes. En este sentido, las características fisiológicas foliares más estudiadas, debido a que predicen la respuesta que las plantas pueden tener ante cambios en el ambiente, son la masa por área foliar (LMA), el área foliar específica (SLA), la concentración foliar de carbono (LCC), la concentración foliar de nitrógeno (LNC), la concentración de clorofila (Chl), las respuestas fotosintéticas a la luz, la eficiencia intrínseca de uso del agua (WUEi) y la tasa de crecimiento relativa (RGR) (Chaturvedi *et al.* 2011).

Entre los parámetros clave para determinar el balance de carbono de las hojas está la biomasa por unidad de área foliar (LMA) y el inverso del área foliar específica (SLA) (Davi *et al.* 2006, 2008). Las hojas en la SBC, tienen una densidad específica baja, que se ha calculado desde 32 hasta 123 gm^{-2} , mientras que las de SAP presentan una densidad de 98 hasta 485 gm^{-2} ; las de SBC, tienen una mayor cantidad de nitrógeno mg.g^{-1} que las de las SAP (Sobrado y Ball 1999, Holbrooke *et al.* 1996, Villar y Merino 2001, Sobrado 2010). El

estudio de dichos atributos de las hojas permite predecir el comportamiento fisiológico y de respuesta al ambiente (Davi *et al.* 2006).

El mantenimiento de la turgencia celular es fundamental para el funcionamiento de las hojas durante la sequía (Hanson y Hitz 1982). Sin embargo, en la SBC, cuando el contenido hídrico disminuye, la caducidad de las hojas es una de las respuestas fenológicas más frecuentemente encontradas en las especies, lo que expresa una de las adaptaciones a la falta de precipitaciones (Singh & Singh 1992), aunque también hay árboles siempre verdes, como algunas especies de *Cordia* en los neotrópicos (Choat *et al.* 2007), *Faidherbia albida* en África (Roupsard *et al.* 1999) que muestran atributos fenológicos poco comunes en estos ambientes, debido a que no presentan caducidad de hojas durante la estación seca (Chaturvedi *et al.* 2011), además hay otros síndromes de foliación, por ejemplo, Las brevidecidas, las que solo recambian las hojas y las suculentas; también se han reportado especies que presentan fenología inversa como *Jacquinia nervosa* y *Cordia sp* (Chavez y Avalos 2006, Valdez-Hernández *et al.* 2010).

Las hojas de los árboles de SBC son, en general, más pequeñas que las de los árboles de las SAP, con una menor densidad estomática, con capas cerosas, pubescencias, hojas divididas en foliolos, espinas y otras estructuras que permiten reducir al mínimo la pérdida de agua (Mulkey & Wright 1996, Osorio-Beristain 2012), las características foliares, dependen también del ambiente en el que se desarrolle la especie, por lo que se puede encontrar a la misma especie con variaciones foliares dependiendo de las distintas condiciones de luz y temperatura (Goulart *et al.* 2011).

Las hojas son sensibles a la sequía y si hay una baja humedad relativa en conjunto con la imposibilidad de obtener el agua necesaria por medio de las raíces, por lo general cierran sus estomas parcial o totalmente durante el día, provocando que la actividad fotosintética solo se lleve a cabo durante pocas horas por la mañana, o al atardecer. Este es el caso de los pocos árboles que mantienen sus hojas durante todo o la mayor parte de la época seca (Mulkey & Wright 1996, Kitajima *et al.* 1997, Brodribb *et al.* 2002).

De la misma manera que las hojas, los tallos de las especies de la SBC muestran adaptaciones para resistir la estacionalidad. Los tallos tienen importantes funciones para las plantas como son el transporte de agua, minerales y productos de la fotosíntesis. Debido a estas funciones de los tallos de algunas especies de árboles, estos suelen ser complejos y pueden tener adaptaciones para enfrentar la sequía (Holbrook 1996); por ejemplo, en ellos se puede almacenar grandes cantidades de agua y otros más son fotosintéticos (Osorio- Beristain 2012). Hay también diferencias sustanciales entre la estructura de los tallos de árboles que viven en SBC y en SAP, por ejemplo, en árboles de SAP, los diámetros de los poros de los vasos del xilema son significativamente menores que los encontrados en árboles de SBC de Australia, aunque el número de vasos por milímetro cuadrado y la densidad de la madera son mayores en los árboles de las SAP que en los árboles de las SBC (Halbrook 1996, Choat *et al.* 2005), incluso algunas de estas diferencias se observan entre los árboles caducifolios y perennifolios que co-habitan en estas selvas tropicales (Fu *et al.* 2012).

Ante las sequías estacionales de las SBC, las plantas presentan adaptaciones estructurales, anatómicas y fisiológicas que les permiten desarrollar estrategias de sobrevivencia, ejemplo de ellas son los patrones fenológicos foliares y características distintivas en la arquitectura hidráulica de tallos y hojas (Gartner 1995, Sobrado 1993, 1997), por ejemplo en los bosques secos tropicales, se ha encontrado que los tallos de los árboles caducifolios, tienen una mayor eficiencia hidráulica que los tallos de los árboles perennifolios lo que sugiere una correlación entre la arquitectura hidráulica y los patrones de fenología foliar (Choat *et al.* 2005; Cao and Webber 2001). Sin embargo, los árboles caducifolios son más susceptibles a la cavitación (Choat *et al.* 2005) así, las diferencias hidráulicas en árboles caducifolios y perennes que ocupan un mismo hábitat indican estrategias evolutivas distintas para hacer frente a las condiciones desfavorables de la SBC.

Las adaptaciones anatómicas y morfológicas de los árboles de las Selvas Bajas Caducifolias, incluyen también a las raíces, algunas por ejemplo, se vuelven más lignificadas luego del primer periodo de sequía, otras en cambio crecen hasta los estratos

más profundos del suelo para poder encontrar agua en la temporada de sequía (Holbrook *et al.* 1996, Jackson *et al.* 1996).

1.2 Estrés abiótico

La definición biofísica de estrés involucra una fuerza ejercida sobre un objeto en relación al área sobre la cual se aplica, (es decir, posee un significado equivalente al de presión). Esta fuerza refleja la magnitud de la presión ambiental que puede originar una fuerza al cambio en la fisiología de una planta (Nilsen y Orcutt 1996). Levitt (1980) acotó que el término estrés se refería a cualquier factor potencialmente desfavorable para la planta; otros autores como Göring (1982), Nilsen & Orcutt (1996) y Godbold (1998), definen al estrés como una reacción de un sistema biológico a un factor ambiental extremo y dependiendo de su duración e intensidad puede causar cambios en el sistema. El estrés también se define como cualquier cambio de condiciones que aumente las demandas de las plantas, desestabilizando sus funciones y que, incluso, le pueden conferir a la planta mayor resistencia, aunque si los límites de tolerancia exceden a la capacidad adaptativa de la especie, puede haber daños permanentes o la muerte (Larcher 2003).

Sin embargo, es difícil señalar los efectos dañinos, que efectivamente causa el estrés en las plantas. Es por eso que Lichtenthaler (1988, 1996) distingue tres conceptos:

1. Estrés: es el estado de una planta cuando se la somete a una tensión ambiental biótica ó abiótica.
2. Tensión: es la respuesta de la planta al estrés antes que ocurra algún daño.
3. Daño: es el resultado de un estrés de tal intensidad que no puede ser compensado por la planta.

Por tanto, según Chapin (1992) para definir el estrés se deben tomar en cuenta los requerimientos ecológicos y fisiológicos de los organismos durante su ciclo vital debido a que no todas las especies se estresan con los mismos factores.

1.2.1 Estrés hídrico

La sequía es un fenómeno meteorológico en el que las plantas no obtienen la cantidad de agua necesaria para su desarrollo, y como respuesta modifican su estatus hídrico y fisiológico; esto a su vez puede generar diversos daños en el desarrollo (Sánchez-Díaz y Aguirreolea 1998, Bradford y Hsiao 1982 en: OL Ange *et al.*). Ante el déficit hídrico, las plantas desarrollan estrategias que se han clasificado como “evasión” “resistencia” y “tolerancia”, (Levitt 1980, Le y McQueen-Mason 2006).

La evasión a la sequía se presenta en especies anuales o especies que pasan la época de sequía en forma latente, ya sea en forma de semillas, rizomas y bulbos, y especies de árboles y arbustos caducifolios. La tolerancia a la desecación es la habilidad de algunas plantas, a través de cambios en su expresión genética, para mantener sus funciones vitales aun cuando presenten una deshidratación severa, en algunos casos, el contenido relativo de agua disminuye el 90% y aun así se recuperan (Levitt 1980, Rascio & La Rocca 2005). La resistencia a la sequía es la capacidad de una planta para soportar periodos de déficit hídrico disminuyendo la pérdida de agua o incrementando su extracción. Las expectativas de una planta son mejores cuando puede ser retrasada una disminución peligrosa del contenido relativo de agua del protoplasma por más tiempo (evitación de la desecación) o cuando puede buscar nuevas fuentes de agua para su uso (Larcher 1995).

El déficit hídrico es uno de los factores más importantes que causan la reducción en la tasa de crecimiento de la planta, provoca cambios químicos e hidráulicos que afectan varios procesos fisiológicos en la planta, por ejemplo, la fotosíntesis y la producción de metabolitos primarios y secundarios (Chavez *et al.* 2009).

Las plantas sometidas a estrés hídrico, activan diferentes estrategias de supervivencia, todas tienen la capacidad de percibir, activar vías de señalización y responder a la falta de agua; pero depende de la especie, la sensibilidad y la intensidad de la respuesta que presenten ante el fenómeno (Zhu 2002, Seki *et al.* 2003, Levitt 1980, Kramer 1988, Valladares *et al.* 2004). En general, de acuerdo a su hábitat, las plantas

tienen adaptaciones morfológicas, anatómicas, celulares y fisiológicas que ayudan a responder al estrés.

1.2.2 Estrés hídrico y su relación con la fotosíntesis

En las temporadas secas y calurosas, la ganancia de carbono en hojas expuestas a pleno sol, es intermitente, presentándose en lapsos cortos, por lo general en las mañanas y en los atardeceres. Sin embargo, en el dosel de los árboles y en el sotobosque, las características microclimáticas permiten a las plantas fotosintetizar en función de la radiación solar recibida (Valladares y Pearcy 1997, 1999). La cantidad de carbono fijado bajo el dosel y en el sotobosque, depende de la actividad de las hojas en su conjunto, aprovechando así los periodos cortos de luz directa (sunflecks) en las diferentes horas del día (Pearcy 1990, Mulkey y Wright 1996, Kitajima *et al.* 1997) y también de cómo responden ante el déficit hídrico y las altas temperaturas.

La actividad fotosintética depende, en primera instancia, de la difusión del CO₂ desde la atmósfera hasta los sitios de carboxilación (estroma del cloroplasto) siendo las primeras barreras la capa límite, cutícula y los estomas. Cuando se presenta un periodo de estrés hídrico, una de las respuestas más tempranas es el cierre estomático (Lawlor 2002, Flexas & Medrano 2002), que conduce a una disminución de la fijación de carbono que se amplifica conforme el déficit se prolonga; la disminución de la tasa fotosintética interfiere con los procesos de división celular y expansión de hojas debido al escaso aporte de energía. La tasa de crecimiento lenta que presentan algunas plantas, se ha sugerido como una adaptación ante esta condición (Zhu 2001, Chaves y Oliveira 2004).

En plantas con condiciones hídricas normales, la concentración de CO₂ intercelular (C_i) es de 0.7 a 0.8 veces menor que la concentración de CO₂ atmosférica (C_a) y se mantiene una tasa fotosintética (A) hasta de 30 μmol m⁻²s⁻¹ (Martin y Ruiz-Torres 1991; Tezara *et al.* 1999; Lawlor y Tezara 2009). Cuando se presenta el déficit hídrico, la conductancia estomática se restringe y el C_i decae aproximadamente al 0.7 % con la consecuente descompensación de la proporción C_i/C_a (Lawlor y Tezara 2009). También se desequilibra la concentración del CO₂ en el estroma que además depende de la

conductancia de los estomas, de los espacios intracelulares y su difusión a través de las membranas celulares y del cloroplasto (Lawlor 2001, 2002).

Durante el estrés hídrico, los procesos más sensibles son la fotofosforilación y el metabolismo del carbono (Havaux 1992). Mientras la sequía se incrementa, la fotosíntesis sufre más limitaciones metabólicas (Chávez y Oliveira 2004) y como respuesta, se producen cambios en la concentración de clorofilas (Cl) y otros pigmentos afectando la proporción normal de Cl_a/Cl_b y en conjunto con el estrés hídrico, por lo general se genera un estrés lumínico que puede provocar fotoinhibición por lo que para proteger al aparato fotosintético se activan los carotenoides y las xantofilas (Estill *et al.* 1991, Jaleel *et al.* 2009)

A consecuencia del cierre estomático, el flujo de CO₂ en el mesófilo y dentro de las células se restringe (Lawlor 2002, Lawlor & Tezara 2008). El estrés hídrico disminuye las reservas de ATP y de ribulosa bisfosfato en las hojas interfiriendo con el ciclo de Calvin afectando directamente a la ribulosa bifosfato carboxilasa (EC 4.1.1.39) (Cornic *et al.* 1992; Tezara *et al.* 1999, Zlatev & Yordanov 2004).

La estructura molecular del fotosistema II es bastante resistente al estrés hídrico (Havaux 1992, Yordanov *et al.* 2000), pero el flujo de electrones es inhibido después de un tiempo, debido a la deshidratación y esto hace que se regule el proceso. El transporte lineal de electrones se puede estimar a partir de la eficiencia fotosintética del PSII que a su vez puede medirse a través de la fluorescencia de clorofilas, que se relaciona con la eficiencia fotosintética y con el estado de estrés lumínico y térmico que se conjugan con el déficit hídrico. A este proceso se le conoce como fotoinhibición; aun así, cuando la pérdida del contenido relativo de agua (CRA) supera el 40% se observa una reducción del 15% en la eficiencia fotosintética (ϕ) como sucede con algunas especies de solanáceas (Havaux 1992; Medrano *et al.* 2002; Jaleel *et al.* 2009).

Con el estrés moderado, hay disminución en el transporte lineal de electrones que está asociado con un aumento en la tasa de disipación de energía a nivel de la antena del PSII (Flexas *et al.* 2002), sin algún daño en el aparato fotosintético por lo que esta disminución parece ser un sistema de regulación “dawn regulation” que se revierte

cuando se supera el estrés hídrico (Lawlor 2002, Lawlor y Tezara 2008). Sin embargo, los electrones generados se deben consumir en procesos alternativos, como la fotorespiración y la reducción univalente del oxígeno a nivel del fotosistema I (Foyer *et al.*, 1994). Este último proceso produce especies reactivas de oxígeno (ROS) que pueden originar un estrés oxidativo debido a ellas, es por esto, que los mecanismos para reducir el estrés oxidativo juegan un papel importante en la tolerancia a la sequía (Tambussi 2004).

Los centros de reacción de los fotosistemas I y II de los tilacoides son los que mayormente generan ROS (Asada 2006). La fotoreducción del oxígeno a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en el fotosistema I (Mehler 1951), el desequilibrio entre la proporción peróxido/oxígeno y la reducción de otro producto llamado anión superóxido (O_2^-). Por otro lado, el fotosistema II también produce oxígeno singulete (1O_2) a partir del triplete (3O_2), por la reacción de excitación de las clorofilas en estado triplete ($^3P680^*$), lo que aumenta los niveles de ROS (Telfer *et al.* 1994, Asada 2006).

1.2.3 Ambientes lumínicos

El tipo y la cantidad de radiación que los seres vivos reciben en un ambiente, influye en numerosos procesos fisiológicos, morfogenéticos y reproductivos de plantas y animales (Kohen *et al.* 1995), por esto, se considera un factor ecológico y evolutivo determinante para las especies de los diferentes hábitat (Valladares *et al.* 2006). La radiación tiene cuatro características importantes: la intensidad lumínica, la composición del espectro, la direccionalidad y su distribución espacio-temporal (Kohen *et al.* 1996, Valladares 2004, Valladares *et al.* 2007). Los bosques tienen muchas variaciones de luminosidad generando distintos ambientes que dependen también de los cambios climáticos estacionales y de la composición y sucesión de la vegetación.

En el sotobosque de un sistema de selva tropical, la luz es un recurso limitante y la tolerancia a la sombra es una adaptación crítica para la supervivencia (Chazdon & Fetcher 1984; Denslow *et al.* 1990, Kustard & Coley 1999). Según las mediciones de Kustard y Coley (1999) en la temporada de lluvia, en una zona conservada de un bosque tropical, el sotobosque recibe entre 50 y 80 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, llega esporádicamente a 150 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, menos del 10% de la radiación recibida a cielo abierto, es decir, las plantas están

expuestas a la luz difusa y a periodos cortos de luz directa, ambos importantes para la producción fotosintética (Chadzon y Pearcy 1991, Valladares *et al.* 2000, Valladares *et al.* 2002, Valladares *et al.* 2005). En los claros del mismo bosque, la radiación es de 400–1500 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ según la hora del día.

En la Selva Baja Caducifolia, las plántulas y juveniles bajo el dosel y del sotobosque, están expuestas a variaciones lumínicas que dependen tanto de la estacionalidad como de algunas respuestas fenológicas, por ejemplo, la caída de las hojas de los árboles adultos (Borchert 1984, 2003). Durante la estación seca, la cobertura vegetal decrece lentamente mientras se prolonga el tiempo sin precipitaciones, sin embargo, cuando la mayor parte de los árboles han perdido las hojas, la radiación bajo el dosel y el sotobosque llega a más del 50% por lo que muchas de las plántulas pierden también las hojas como respuesta al incremento de la radiación y a la sequía (Reich & Borchert 1984, Bullock *et al.* 1995).

Los “sunflecks” suelen ser de pocos segundos o minutos y su duración y densidad de flujo de fotones depende directamente de la altura de la vegetación, de la dirección del viento y de la posición del sol en el cielo. La maquinaria fotosintética de plantas adaptadas a la sombra parece responder rápidamente a estos breves e impredecibles periodos de radiación directa, al contrario de las plantas heliófilas que responden lentamente ante la luz (Chadzon y Pearcy 1991, Valladares 2004).

Las especies se han establecido en una amplia gama de ambientes lumínicos y tienen la habilidad de alterar sus características morfofisiológicas en función de la luz; a esta flexibilidad se le ha llamado plasticidad fenotípica (Gianoli y Valladares 2012). Ejemplos de este fenómeno se dan en especies que viven en diferentes ambientes lumínicos, las hojas de las plantas formadas a pleno sol son en general más gruesas y tienen una capacidad fotosintética superior a la de las plantas sombreadas, estas variaciones se dan incluso en un mismo individuo (Givnish 1988). Además, ante un cambio permanente en el régimen lumínico, las hojas, pueden reajustar sus características fisiológicas (posición de los cloroplastos, degradación de proteínas, traslocación de nitrógeno, etc.); el ajuste de estos cambios se da por la capacidad de cada especie para expresar un genotipo dependiente de las condiciones ambientales (Gianoli & Valladares 2012).

1.3 Alcaloides de Anonáceas

Las plantas, bacterias, hongos, e incluso algunos animales, biosintetizan compuestos químicos nombrados metabolitos secundarios (MS) también llamados de especialización (ME), son compuestos de naturaleza química diversa y normalmente su distribución está restringida a diferentes taxa, otra característica es la gran especialización en la maquinaria enzimática que las produce (Anaya 2004, Wink 2006, De la Cruz *et al* 2011, Schillmiller *et al.* 2008, Pichersky and Lewinsohn 2011).

Aunque tradicionalmente se estudian estos compuestos por sus usos en la industria farmacéutica, alimentaria, agrícola o cosmética, en años recientes se han incrementado las investigaciones acerca de la importancia que tienen para los organismos que los producen. A los MS se les atribuyen diferentes funciones de interacción biológica con otros organismos como la defensa, la atracción y protección (Dixon 2001, Wink 2006, Hartmann 2007), son compuestos que contribuyen a la adaptación de las plantas a su nicho ecológico (Pichersky and Lewinsohn 2011). En algunos casos, se ha comprobado que funcionan como un tipo de lenguaje químico entre las plantas (infoquímicos), o con los microorganismos y animales con los que interactúan (Anaya 2004, Wink 2006).

Las especies de la familia Annonaceae producen diversos tipos de metabolitos secundarios, que han sido documentados por diversos autores. Por ejemplo Leboeuf *et al.* (1982) detalló la diversidad fitoquímica de la familia, que incluía aceites esenciales, alcaloides, flavonoides, polifenoles, glucósidos cianogénicos y terpenos. Al mismo tiempo, Jolad *et al.* (1982) aislaron la primera de una serie de moléculas llamadas posteriormente “acetogeninas de Anonaceas”, y después, Cave *et al.* (1997) sistematizaron las acetogeninas hasta ese momento conocidas.

De varias especies del género *Annona* se han aislado MS, como ácidos grasos (Pérez Amador *et al.* 1997), terpenos (Yang *et al.* 2004), flavonoides (Chang *et al.* 1998) y aceites esenciales (Gonzalez-Esquínca 2001) además de una amplia diversidad alcaloides bencilisoquinolínicos (Guinaudeau *et al.* 1975, 1979, 1983 y 1994) y de acetogeninas características de la familia (Cavé *et al.*, 1997; Feras *et al.*, 1999).

Los alcaloides bencilisoquinolínicos (ABI) (alrededor de 2500 conocidos), son derivados de los aminoácidos fenilalanina y tirosina, presentan un esqueleto carbonado básico que proviene de un enlace entre un anillo isoquinolínico y otro bencil (de la Cruz *et al.* 2012).

Los ABI de anonáceas son de tipo aporfínico (Leboeuf *et al.* 1982, González 2001) e incluyen diversos tipos de aporfinas y alcaloides relacionados biogenéticamente a ellas, como las proaporfinas y las oxoaporfinas (Stévigny *et al.* 2005). Se reconocen once grupos: benciltetrahydroisoquinolínicos, proaporfinas, aporfinas *sensu stricto*, aporfinas 4,7-oxo sustituidas, 7,7-dimetil aporfinas, 7-hidroxi-7-metil aporfinas, dehidroaporfinas, 4,5-dioxoaporfinas, aporfinas 4-oxo sustituidas, oxoaporfinas, tetrahidroprotoberberinas y fenantrenos (Leboeuf *et al.*, 1982; González, 2001). Aunque estos alcaloides no son exclusivos de la familia, se han reportado en al menos 50 géneros (comúnmente en *Annona*, *Xilopia* y *Monodora*) y 300 especies (Gonzalez-Esquince *et al.* 2007) y este número muy probablemente se ampliará con la contribución de nuevos estudios en los géneros y especies faltantes.

Los alcaloides aporfínicos en ensayos *in-vitro* e *in-vivo* tienen diversas actividades biológicas (antitumorales, vasodilatadores, antimicrobianos y contra fitopatógenos) (Woo *et al.* 1997, Chulia *et al.* 1995 a,b). Algunos alcaloides como r-(-)-roemerina, anonaina y dehidroroemerina, norushinsunina y liriodenina tienen efectos vasodilatadores en aorta de rata, sugiriendo un efecto relajante (Chuliá *et al.*, 1995a; Chuliá *et al.*, 1995b). Ho Woo *et al.* (1997) comprobaron con ensayos *in vivo* e *in vitro* la alta actividad inhibitoria de la liriodenina y otros alcaloides sobre la enzima topoisomerasa II. De-la-Cruz *et al.* (2010) sistematizaron datos sobre la actividad de la liriodenina contra 24 hongos fitopatógenos. La importancia de este grupo de compuestos no solo radica en su potencial biológico agronómico y farmacéutico al ser moléculas bioactivas, sino también tienen valor evolutivo porque son moléculas que se reportan entre las primeras plantas con flores (Magnoliales), hasta especies modernas (Eudicotiledoneas) (Liscombe *et al.* 2005, Wink 2010, De-la-Cruz *et al.* 2012).

Uno de los alcaloides oxoaporfínicos más distribuidos y objeto de este estudio es la liriodenina, que se encuentra en aproximadamente 240 especies de los órdenes Magnoliales, Laurales, Nymphaeales, Ranunculales, Papaverales, Sapindales y Malvales; en la familia Annonaceae, se encuentra en los géneros *Annona*, *Guateria*, *Xylopia*, *Polyalthia* y *Rollinia* (De-La-Cruz *et al.* 2013).

1.3.2 La familia Annonaceae

La familia Annonaceae apareció hace 62 a 110 millones de años, formando parte de las primeras plantas con flores junto con otras familias del orden Magnoliales (Lawrence 2000). Annonaceae tiene aproximadamente 128 géneros y aproximadamente 2300 especies distribuidas en los trópicos de todo el mundo en sabanas, selvas caducifolias, subcaducifolias y siempre verdes. Los géneros con las mayores cantidades de especies son *Guateria* (250), *Xylopia* (150), *Uvaria* (100), *Artabotrys* (100) *Annona* (100) y *Polyanthia* (100) (Singh 2004). Es una de las familias más diversas dentro de las plantas con flores (Phillips & Miller 2002), en el orden es la familia con mayor número de especies (Chatrou *et al.* 2012). Fries desde 1959, propuso una clasificación para la familia Annonaceae, su filogenia y sus relaciones actualmente se han realizado diversos esfuerzos para conocer su filogenia y sus relaciones evolutivas y con el avance de la sistemática molecular se han fusionado algunos géneros. Recientemente, Erkens *et al.* (2012) publicaron en una revisión los nombres de los géneros que son aceptados y de las modificaciones que se han realizado en años recientes, entre ellas, la inclusión de algunos géneros dentro del género *Annona*, por ejemplo *Rollinia* y *Aberemoa*.

Dada la amplitud de la familia, se han presentado diversas clasificaciones intrafamiliares. Actualmente, Annonaceae se divide en cuatro grandes clados con rango de subfamilias (Anaxagoreoideae, Ambavioideae, Annonoideae, Malmeoideae). La rama basal formada por *Anaxagorea*, un grupo hermano formado por *Ambavia*, *Cananga*, *Cleistopholis*, *Mezzettia* y *Tetrameranthus* y el clado terminal formado por los demás géneros (Chatrou *et al.* 2012).

Annonaceae tiene características bien definidas y primitivas que permiten ubicar a la familia en el complejo Ranaleano. Las especies pueden ser árboles, arbustos o lianas, perennes o caducifolias, tienen aceites esenciales abundantes, nodos unilacunares o bilaculares, pueden tener canales de resina y la médula del tallo con septos, hojas enteramente alternas simples, no septadas. Inflorescencias o flores solitarias primitivas usualmente hermafroditas, cáliz con tres sépalos, de tres a seis pétalos y carpelos sésiles, el androceo presenta de 25 a 100 estambres centripétalos en espiral, los granos de polen pueden ser en agregaciones o granos solos en tétradas; el gineceo tiene de 10 a 100 carpelos usualmente separados, placentación en carpelos basales libres, de 1 a 50 óvulos apotropos con rafe ventral. Frutos generalmente en bayas con carpelos sésiles e indehiscentes (Fries 1937 en González 2001, Cronquist 1981, Singh 2004).

El género tipo es *Annona* con 90 especies, su centro de origen histórico fue Lauracia y posteriormente colonizaron América (Rzedowski 1998, González, 1996; González *et al.*, 1999) y se han encontrado fósiles en Chiapas desde el Mioceno (Ramírez & Ceballos-Ferriz 2000). *Annona*, se distribuye principalmente en América tropical y subtropical, desde el sur de Florida, México y las Antillas hasta Brasil. Actualmente hay también algunas especies en África y Madagascar (Fries 1938, Gonzalez 2000, Luna 2009). En México hay 16 especies, 14 de ellas en Chiapas.

Los usos tradicionales de algunas especies del género están documentados desde la época prehispánica; sus frutos son comestibles y algunos de ellos bastante apreciados, también se han usado como medicinales, José de Acosta (1940), y Francisco Hernández (1959) relatan sus usos. Algunas de las especies del género más apreciadas por su gusto dulce son la papaya (*A. diversifolia*), la chirimoya (*A. cherimolla*), la guanábana (*A. muricata*) y en menor medida la anona amarilla (*A. lutescens*).

1.3.3 *Annona lutescens*

Annona lutescens Safford es un árbol pequeño de 5 a 10 m de alto, con ramas fulvocericeas a glabras, sus hojas son deciduas, con forma elípticas a ovadas, de 1 a 14 cm de longitud, y 3.5 a 7.5 cm de ancho, en la base pueden presentarse redondeadas a

subcutadas, coriáceas cuando jóvenes pero cambian a glabras rápidamente, tienen pecíolos de 8 a 12 mm de longitud; las flores verdes, tienen pedicelos de 12 a 18 mm de longitud, sépalos triangulares, 2 a 3 mm de longitud, 6 pétalos tres de ellos (los internos) son rudimentarios y tres bien desarrollados lineal oblongos, obtusos, pulverulentos por fuera, de 1.5 a 2 cm de longitud. El fruto es globoso-ovoide liso, de amarillo a verde, de 8 a 9 cm de diámetro areolas escasamente perceptibles, de sabor dulce (Standley & Steyermark, 1946). Su nombre vernáculo es anona amarilla.

2. Antecedentes

2.1 Ambiente de *A. lutescens*

Annona lutescens se encuentra con frecuencia entre los 200 y los 1000 m.s.n.m.; su distribución incluye la Depresión Central de Chiapas y la Planicie Costera del Pacífico de la Sierra Madre de Chiapas (Reyes-García *et al.* 2011). Cohabita frecuentemente con diversas especies de *Annona*, y con algunas otras como *Busida macrostachya* Standl, *Bursera excelsa* (H.B.K) Engl, *Bursera simaruba* (L) Sarg, *Calycophyllum candidissimum* (Vahl), *Cecropia peltata* L., *Cedrela oaxacensis* C.DC & Rose, *Ceiba aesculifolia* Spreng, *Cordia alliodora* (R. & P.), *Eysenhardtia adenostylis* Baill, *Gliricidia sepium* (Jacq) Steud, *Godmania aesculifolia* (H.K.B.) Standl, *Hauya elegans*, *Heliocarpa donnell-smithii*, *Hura poliandra*, *Ipomoea murucoides* Roem. & Schult., *Leucaena* spp. *Luehea candida* (DC.) Mart, *Lysiloma aurita* (Schlecht) (Breedlove 1995).

En la Depresión Central de Chiapas, la temperatura durante la primavera y verano puede alcanzar los 40°C y en los días más fríos está entre los 20 y 13°C (día y noche, respectivamente), la precipitación media anual varía entre 900 y 1300 mm. La radiación más alta durante los meses secos se presenta entre las 12:00 y las 14:00 horas (950 W ó 1800 $\mu\text{molm/s}^{-1}$), mientras que en la temporada de lluvia es muy variable (los valores más altos a las 12:00 son de 1009-1800 $\mu\text{molm/s}^{-1}$) y la humedad relativa siempre es alta (50 y 90%) (COANAGUA 2012, datos climáticos obtenidos de la estación meteorológica de Plan de Ayala, Tuxtla Gutiérrez).



Figura 2. Selva Baja Caducifolia de la Depresión Central de Chiapas en la estación seca (enero)

2.2. Importancia ecológica y química de *A. lutescens*

Aunque *A. lutescens* es una especie bastante frecuente en las SBC de Chiapas (Reyes García *et al.* 2011), sin embargo, su importancia ecológica no está documentada, algunas observaciones de campo permiten señalar que sus frutos sirven de alimento a varias especies de mamíferos y aves, incluyendo aquéllas de mediana envergadura. También es hospedera de la avispa *Bephratelloides cubensis* que completa su ciclo de vida al interior de las semillas y de coleópteros polinizadores. *A. lutescens* contribuye con la producción de hojarasca en la temporada de secas brindando protección y alimento a diversas especies. Un aspecto importante de resaltar es la posibilidad de considerar a esta especie como indicadora de cambio climático, debido a las adaptaciones que presenta ante ambientes contrastantes (Castro *et al.* 2013).

En cuanto a su importancia química, esta especie es productora de diversas moléculas con potencial farmacológico como las acetogeninas rolliniastatina-2 (Castro 2005), laherradurina, isoannoreticuina, así como los diterpenos ácido 19-formi-ent-kaurenoico (Abraján 2002) y el alcaloide liriodenina objeto de este estudio.

2.3 Trabajos realizados con *Annona lutescens*

Abraján Hernández *et al.* en 1999, analizaron la producción de alcaloides de *A. lutescens* en diversas condiciones edafoclimáticas en cuatro municipios de Chiapas (Cintalapa, Tonalá, Jiquipilas y Tuxtla (Copoya)), la mayor producción de liriodenina se obtuvo de árboles de la localidad de Copoya que es la localidad con menor cantidad de precipitación, y con un clima entre 8 y 37°C; los autores concluyeron que las condiciones ambientales influyen en la producción de alcaloides en esta planta. Por su parte, González (2001), reportó la composición de ácidos grasos, aceites esenciales, acetogeninas y alcaloides, en semillas, hojas, raíces y tallos de plantas adultas, y en diferentes etapas de germinación, encontrando que los alcaloides en *A. lutescens* se presentan desde etapas tempranas de la germinación y que el metabolismo secundario de la plántula tiene gran semejanza con el

de individuos adultos. En ese mismo trabajo resalta el gran nivel de especialización y diversificación del metabolismo secundario en los miembros de la familia Annonaceae.

Alfaro (2005) realizó un seguimiento de alcaloides y acetogeninas durante la germinación y algunas etapas de plántulas de *A. lutescens*. La única acetogenina identificada fue laherradurina en el endospermo, hojas y tallo, así como dos alcaloides (oxopurpureina y liriodenina). La liriodenina se detecta en semillas germinadas con un centímetro de radícula y en raíces, tallos, hojas cotiledonarias y hojas de plántulas. El mayor rendimiento de este alcaloide se encontró en el endospermo de las semillas (se conserva durante cuatro meses en promedio) de plántulas con primordio foliar (76.14 mg.g de material vegetal (MV)), seguido por las raíces de árboles adultos (70.2mg.g de MV); en contraste, el mayor rendimiento de la oxopurpureina se presentó en las hojas cotiledonarias de plántulas con cuatro hojas (20.58 mg.g de MV).

Castro (2005) evaluó en un ensayo el efecto del estrés hídrico en raíces, tallos y hojas de plántulas con ocho hojas desarrolladas, sobre laherradurina, rolliniastatina-2 y dos alcaloides (liriodenina y uno no identificado). En condiciones de riego constante la liriodenina se encuentra en raíces (0.31 $\mu\text{m.g}$), tallos (0.0684 $\mu\text{m.g}$) y hojas (0.0017 $\mu\text{m.g}$), en plantas con estrés hídrico la concentración de liriodenina aumentó a 0.4131 $\mu\text{m.g}$ en raíces (25% más), a 0.1225 $\mu\text{m.g}$ en tallos y a 0.0497 $\mu\text{m.g}$ en hojas.

3. Planteamiento de objetivos e hipótesis

3.1 Planteamiento de objetivos

Annona lutescens, es una especie arbórea característica de la Selva Baja Caducifolia de Chiapas, de la que se han aislado alcaloides aporfínicos, entre ellos la liriodenina (González-Esquinca 2001, De La Cruz *et al.* 2010). Sus respuestas, fenológicas y fisiológicas parecen depender de las variaciones ambientales estacionales típicas del hábitat tales como la falta de precipitaciones durante 5-7 meses, la variación lumínica, la humedad, composición de los suelos (Abrajan *et al.* 1999, González 2000, Castro 2005) o a factores intrínsecos de la planta como el desarrollo (De La Cruz & González Esquinca 2012, Alfaro 2005). Por estas características, *A. lutescens*, representa un buen modelo de estudio para profundizar sobre los factores bióticos y abióticos que influyen en la producción de metabolitos secundarios, particularmente de alcaloides y en específico del oxoaporfínico lirionenina, que es el mayoritario en esta especie.

En este trabajo se plantearon las siguientes preguntas, con el fin de entender la dinámica de acumulación de liriodenina en *A. lutescens*, 1) ¿Qué factores ambientales o fenológicos influyen en la acumulación de liriodenina?, 2) ¿Cuál es su distribución órgano-específica en plántulas, árboles jóvenes y adultos?, 3) ¿Cómo responde *A. lutescens* a condiciones adversas como la sequía estacional y los ambientes contrastantes de luz?

El objetivo de este trabajo fue determinar la relación entre las respuestas ecofisiológicas y la producción de liriodenina en diferentes etapas fenológicas de *A. lutescens* ante los cambios ambientales estacionales naturales e inducidos, además determinar la variación órgano-específica del alcaloide en plántulas, juveniles y adultos en fragmentos de Selva Baja Caducifolia

OBJETIVOS PARTICULARES

- Caracterizar la fenología de *Annona lutescens* durante un ciclo anual.
- Determinar el efecto de la disponibilidad de luz y agua sobre la asimilación de carbono y el estado hídrico de *Annona lutescens*
- Determinar el patrón de variación ontogenético y temporal del alcaloide liriodenina en *Annona lutescens* bajo condiciones de campo.
- Evaluar el efecto de la disponibilidad de luz y agua en la producción de liriodenina en plántulas de *Annona lutescens*.

3.2 Hipótesis

Algunas especies aumentan la producción de metabolitos secundarios en condiciones de estrés abiótico. *Annona lutescens* en un árbol de la Selva Baja Caducifolia, expuesto a periodos estacionales de sequía, por lo que:

- 1) Se esperaría que la producción del alcaloide liriodenina se incremente durante el periodo de baja disponibilidad hídrica.
- 2) Además, en un periodo de máxima disposición hídrica la biosíntesis de liriodenina dependerá de la actividad fotosintética y de la fenofase de las plantas.
- 3) En plántulas en condiciones experimentales, el aumento de la luz durante el periodo de sequía afectaría negativamente la producción de liriodenina y la supervivencia, debido a la conjunción de ambos factores.

4. Métodos

General

Los métodos se diseñaron para conocer los efectos a la influencia de la luz, el déficit hídrico y de la fenología sobre la biosíntesis del alcaloide liriodenina así como su impacto en el crecimiento y la fotosíntesis.

Primero se diseñaron estudios con plantas jóvenes y árboles adultos en campo, tomando en consideración que la asignación de recursos es distinta en las plántulas y los juveniles, ya que en esta etapa utiliza energía para crecer y responder a los factores ambientales, mientras que, los árboles adultos destinan parte de su energía en la producción de flores, frutos y semillas para la reproducción. Estas etapas fenológicas y/o fisiológicas pueden impactar en la biosíntesis de alcaloides como la liriodenina, por lo que se realizó el seguimiento de la producción de este alcaloide en adultos y juveniles durante un año (temporada de lluvia y sequía) (Figura 3).

Para determinar la distribución organoespecífica de liriodenina en adultos se diseñó una colecta mensual de raíces, tallos y hojas de seis árboles por un año. Se caracterizó la fenología en los diferentes periodos vegetativos con el fin de relacionarlos con los parámetros climáticos. El promedio de la temperatura y precipitación durante la época de colecta, se obtuvieron de la estación meteorológica de Plan de Ayala, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas.

Los estudios en condiciones semicontroladas de luz y disponibilidad hídrica, así como la medición de los parámetros de crecimiento se llevaron a cabo con plántulas (Figura 3).

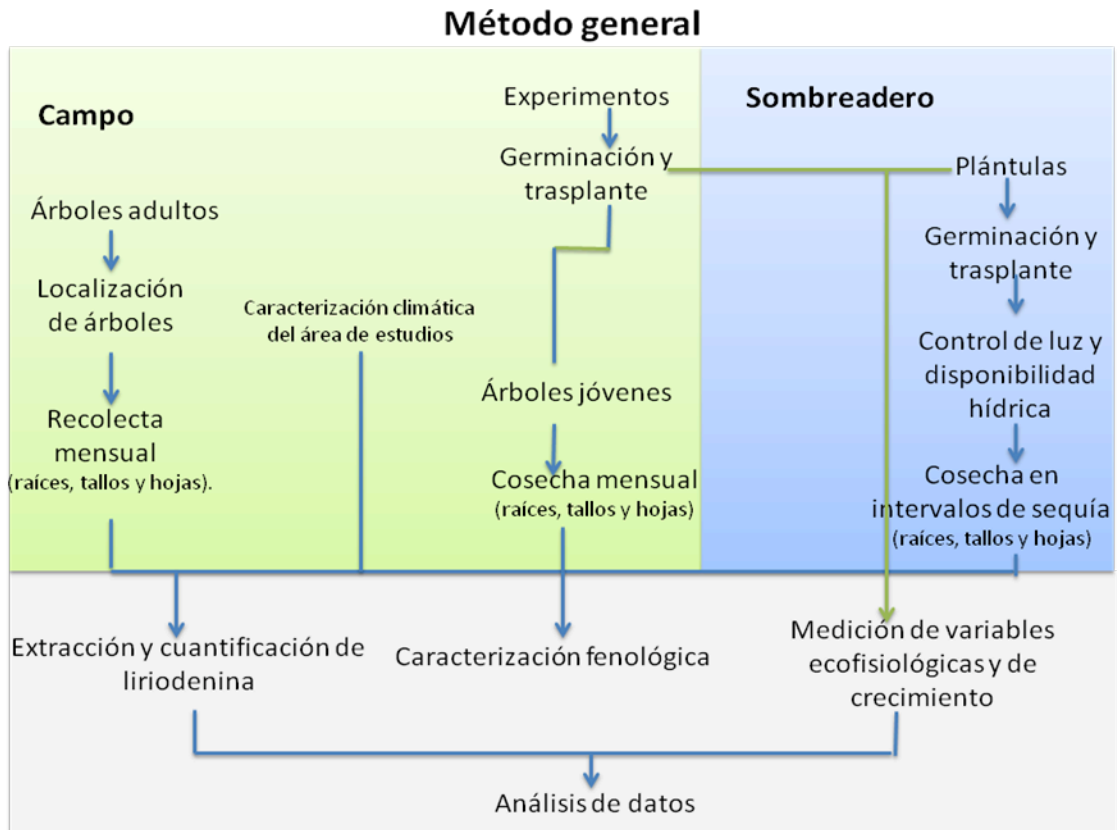


Figura 3. Diseño general de los experimentos realizados en campo y bajo condiciones de sombreadero.

Área de estudio.

El estudio con se llevó a cabo en la localidad de Terán, Tuxtla Gutiérrez. En la localidad de Terán ($16^{\circ}45'3.2''N$, $93^{\circ}10'00''W$), predomina la Selva Baja Caducifolia, y su clima es cálido sub-húmedo con lluvias en verano (AWo (w)). La temperatura media anual es de $20^{\circ}C$ y la precipitación anual promedio es de 948.2 mm (media de 30 años 1980-2010).

Se obtuvieron también los datos climáticos de la estación meteorológica de plan de Ayala, que es una localidad aledaña a Terán. Los datos climáticos fueron del 2007, 2009 y 2010 y los históricos de 30 años. Durante el 2007 (año en que se comenzó el estudio), la estación seca comenzó en Noviembre y terminó a mediados de Mayo; los meses más secos y calurosos fueron Marzo y Abril, y las temperaturas más bajas se presentaron en Enero. Durante el 2009 y 2010 la estación seca comenzó en la última parte de Octubre y

terminó en la segunda mitad de Mayo, al igual que en el 2007, los meses más calurosos y secos fueron Febrero y Marzo (Figura 4).

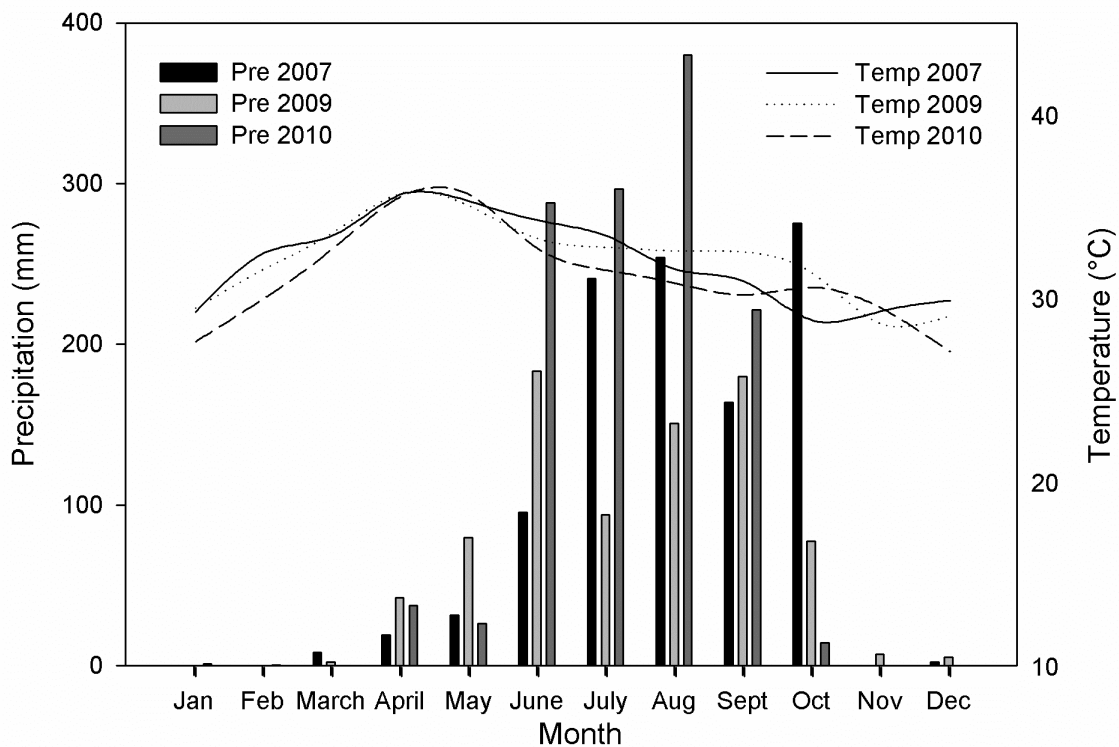


Figura 4. Precipitaciones mensuales (Pre) y temperatura media mensual (Temp) en Terán, durante el periodo de estudio (datos de la Estación Meteorológica de Plan de Ayala).

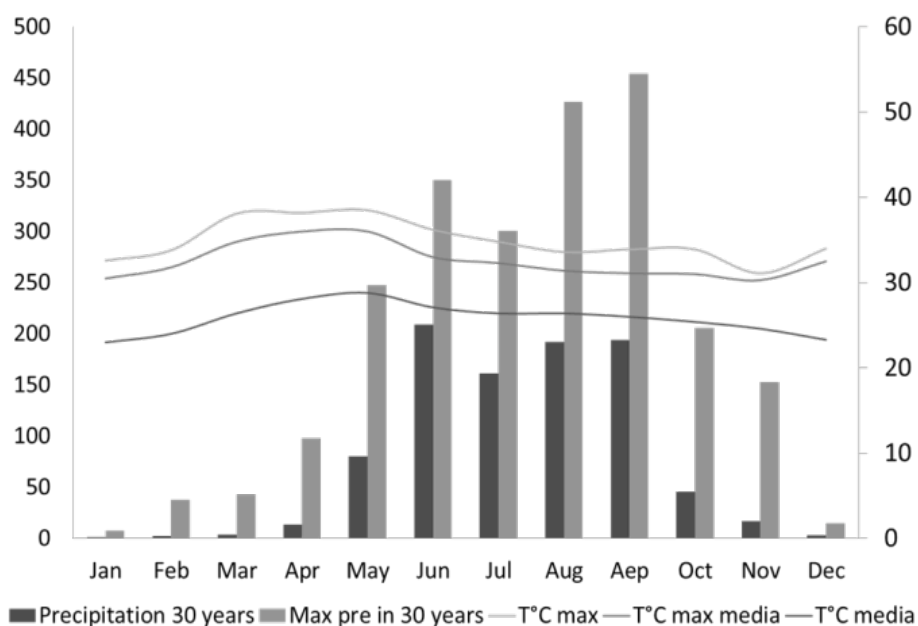


Figura 5. Promedios mensuales históricos (1970-2001) de precipitación y temperaturas. (CONAGUA).

4.1 Caracterización fenológica

Se analizaron las características fenológicas de árboles adultos, jóvenes (de dos años) y plántulas, empleando la escala BBCH (Biologische Bundesanstalt, Bundessortenamt and Chemical industry) (Hess *et al.* 1997). Esta escala es un código uniforme para documentar los cambios de las especies a lo largo de su vida iniciando desde el periodo de germinación hasta la senescencia, tiene diez estados generales de desarrollo y cada estado también tiene diez sub-estados que se nombran con números de dos dígitos del 0 al 9. Las etapas caracterizadas fueron: la germinación (BBCH 0), el desarrollo de hojas en las plántulas (BBCH 1), el desarrollo vegetativo durante un año en plantas jóvenes y adultas (BBCH 1, 2) y la floración (BBCH 5, 6) y fructificación (BBCH 7 y 8) en árboles adultos.

Se tomaron datos de diez individuos adultos, veinte jóvenes, veinte plántulas y veinte semillas en cada etapa de germinación, los porcentajes de germinación se obtuvieron a partir de 1800 semillas. Las observaciones durante la germinación y el establecimiento de plántulas se realizaron cada tercer día y el seguimiento durante el

desarrollo vegetativo de adultos y juveniles fue mensual, (la tercera semana de cada mes), y semanal durante la temporada de floración y fructificación, las flores en su última etapa se observaron todos los días. En árboles, el estudio se realizó desde febrero del 2007 hasta enero del 2008 y en árboles jóvenes desde octubre del 2009 hasta septiembre del 2010.

Para la descripción de las etapas de germinación y de plántula, se recolectaron frutos de 10 individuos adultos situados en la zona de estudio y se obtuvieron 1800 semillas de *A. lutescens* de 53 frutos, se separaron en dos lotes iguales. Las semillas se germinaron con el método “entre papel”, se colocaron 25 semillas en piezas de papel humedecido, se enrollaron y se mantuvieron en una cámara de germinación (CONVIRON), con condiciones controladas de luz, temperatura y humedad. Las semillas se revisaron cada tercer día hasta que alcanzaron los cinco centímetros de radícula. Posteriormente las semillas germinadas se transplantaron en tierra franca en bolsas de jardinería de 10X20 cm y se colocaron en un sombreadero con condiciones de riego controlado hasta alcanzar la etapa de plántulas con 6 a 8 hojas, se dejaron crecer y después de dos años se sembraron 120 juveniles en un parche de Selva Baja Caducifolia que se ubica en la misma zona de estudio de los árboles adultos.

Para la descripción fenológica del crecimiento vegetativo se consideraron los estados de germinación de semillas y en adultos el desarrollo de yemas foliares (BBCH: 0), el desarrollo de hojas en número y tamaño (BBCH: 1), (desarrollo del primer par de hojas: (BBCH 11), desarrollo del décimo par de hojas al tamaño final (BBCH19), el subsecuente crecimiento de ramas (BBCH: 3) así como la caracterización de los senescencia y el porcentaje visual de senescencia y caída foliar (BBCH: 9) (hojas con signos de senescencia foliar: BBCH 92, caducidad de hojas al 90%: BBCH 99). Y para el periodo reproductivo la emergencia de flores desde la yema hasta llegar al tamaño final (BBCH: 5) (flor alcanzando el 70% del tamaño final: BBCH 57) y la floración, (BBCH: 6) (flor pre-hembra: BBCH 61, flor macho: BBCH 65), el desarrollo de frutos desde el cuajado hasta la obtención del tamaño final (BBCH: 7) y la fructificación (maduración de frutos) (BBCH: 8).

4.2 Obtención de muestras de raíces, tallos y hojas de árboles adultos

En el campo, se ubicaron y seleccionaron los árboles adultos, algunos formaban parte de fragmentos de Selva Baja Caducifolia perturbada y otros de las cercas vivas de los terrenos colindantes a los parches de selva, todos en la localidad de Terán, Tuxtla Gutiérrez Chiapas cercanos a un área sujeta a protección ecológica llamada “Cerro Mactumatzá”.

Mensualmente se cosecharon raíces, tallos y hojas de seis árboles (aproximadamente 20 g cada vez) la tercera semana de cada mes a partir de febrero del 2007 terminando las recolectas en enero del 2008 (Figura 5), para la recolecta de raíces se separó el suelo con un pico y para cortar el material se utilizó una navaja. El material vegetal se llevó al laboratorio, donde se secó a la sombra y temperatura ambiente, se molió con una licuadora hasta obtener un granulado fino. Se obtuvieron los extractos alcaloidales y se cuantificaron por medio de cromatografía líquida de alta resolución con un Cromatógrafo Perkin Elmer Series MCL 900, Norwalk, CT, USA).

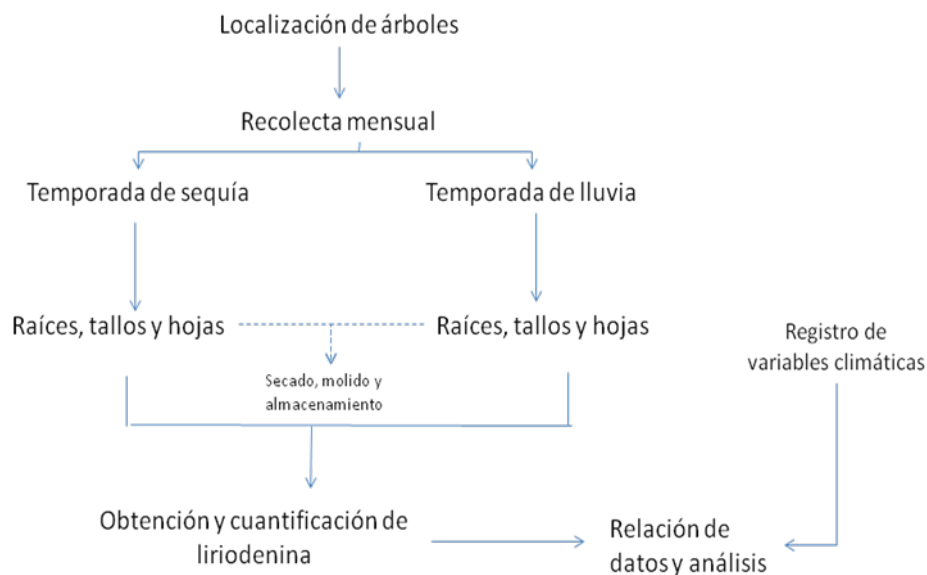


Figura 6. Esquema de las colectas de los árboles adultos en campo.

4.3 Obtención de muestras de raíces, tallos y hojas de arbolitos jóvenes

Las 120 plántulas que se obtuvieron de las semillas germinadas, se mantuvieron en un sombreadero hasta cumplir los dos años de edad, en ese momento se transplantaron con una distribución al azar en un fragmento de Selva Baja Caducifolia, ubicado en la Localidad El Sabino, Tuxtla Gutiérrez Chiapas (16°45'3.2''N, 93°10'00''W). El área experimental fue de 40X50 m y los árboles se plantaron al azar. Posteriormente, cada mes se midieron los potenciales hídricos al amanecer (Ψ_{pd}) en 5 árboles seleccionados al azar. Además se realizaron marchas diurnas de asimilación de CO₂ en octubre, noviembre y diciembre, de 10 plantas diferentes, las marchas diurnas comenzaban a las 7:00 h y concluían a las 18:00 h, para obtener la ganancia diaria de carbono durante el desarrollo de la sequía. Las plantas a las que se determino Ψ_{pd} se llevaron a laboratorio para la extracción de alcaloides, cada planta se tomó como una unidad experimental (Figura 6) (las técnicas se describen posteriormente).

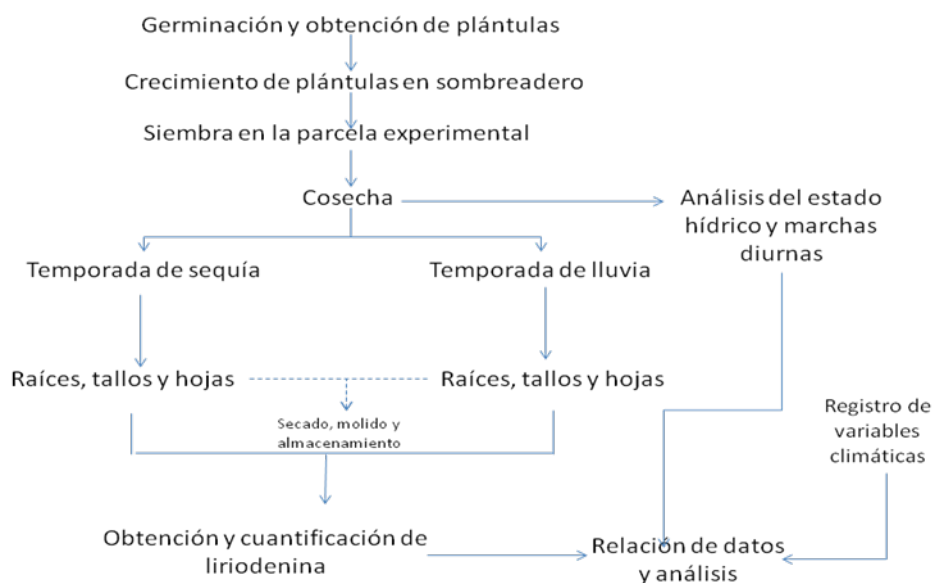


Figura 7. Diseño del trabajo con árboles jóvenes sembrados en el campo experimental del Sabino, Tuxtla Gutiérrez Chiapas.

4.4 Obtención de muestras de raíces, tallos y hojas de plántulas

En plántulas fue posible analizar la respuesta fotosintética y de la biosíntesis de liriodenina a diferentes intensidades de luz y al estrés hídrico inducido experimentalmente. Se diseñó un experimento con diseño factorial, incluyendo dos condiciones de luz y tres niveles de deficiencia hídrica (Figura 8).

Para crear dos ambientes con diferente intensidad de luz, en un sombreadero se instalaron dos mallas-sombra, una que dejaba pasar el 10 % de la luz solar (luz tenue, sombra) y la segunda que dejaba pasar el 50% de la luz solar (Figura 7, 8).

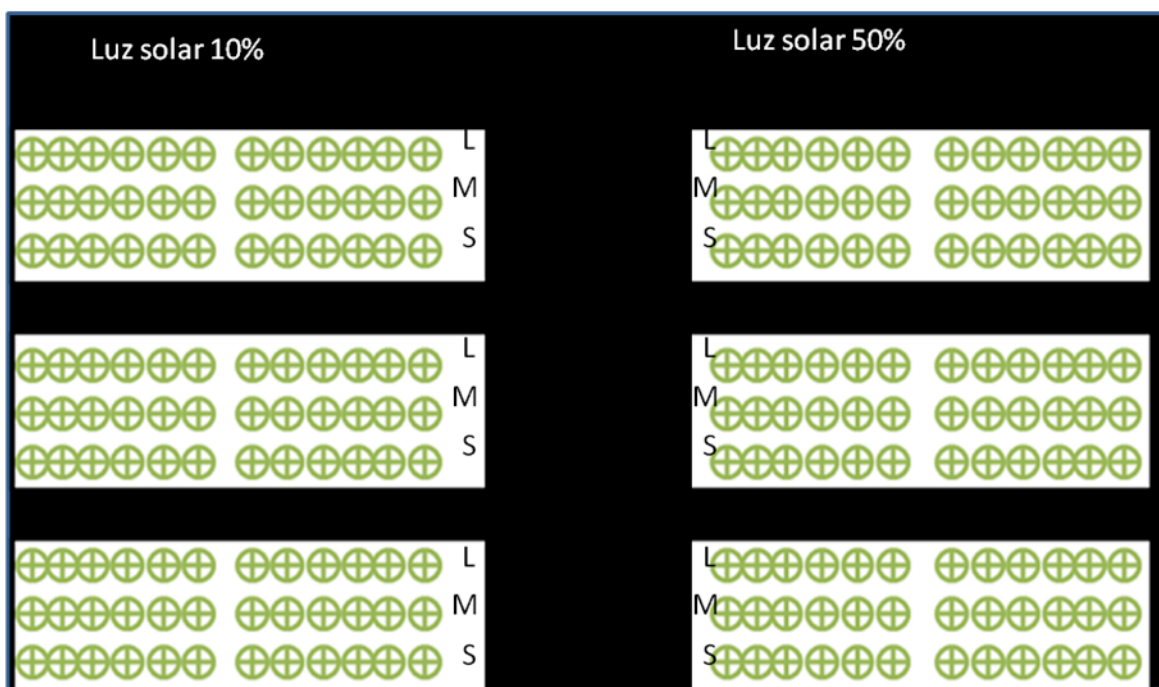


Figura 8. Distribución de las plántulas en el sombreadero. En cada fila había seis plántulas con déficit hídrico y seis testigos. Diseño factorial de tres niveles de estrés hídrico L: ligero, M: moderado y S: severo, y dos condiciones de luz (10 y 50 %), unidad experimental fue de una plántula y tres repeticiones por tratamiento. En cada fila hubo seis plántulas con déficit hídrico y seis testigos. En la figura cada círculo representa una planta.

Se utilizaron 216 plántulas de *Annona lutescens* de seis meses de edad, tenían de 10 a 12 hojas y crecieron en bolsas de 5 litros con tres kg de abono. Dentro del sombreadero, las plantas se colocaron en seis mesas dispuestas en filas de tres (Figura 7). El sitio en el que quedaron las plantas fue al azar. Las plantas se regaron a saturación un día antes de comenzar el experimento.

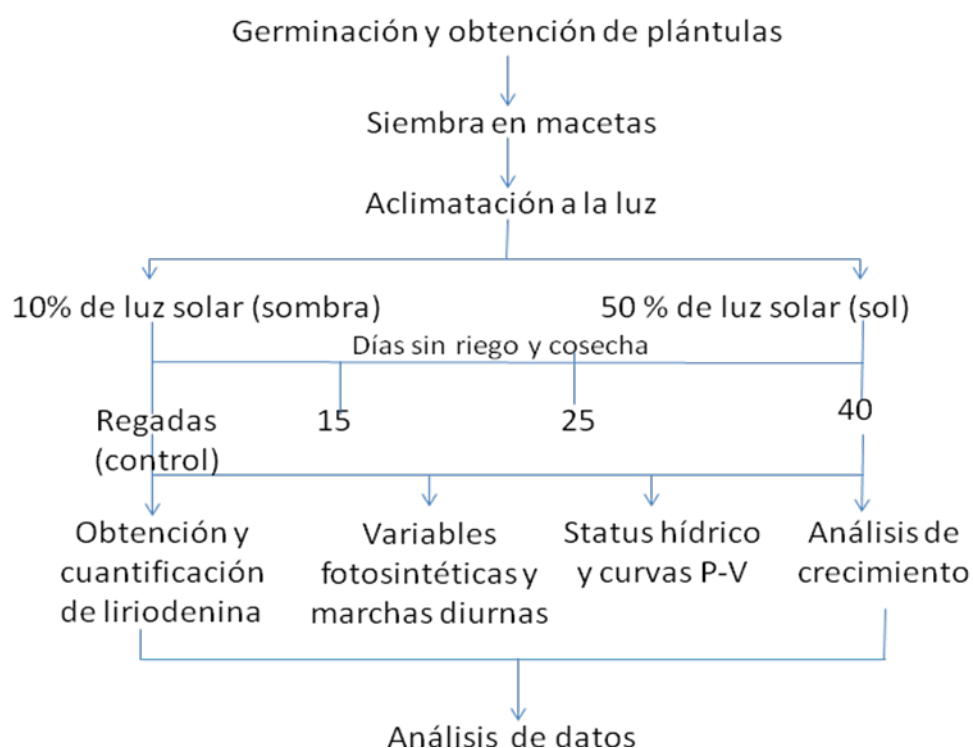


Figura 9. Diseño del trabajo con plántulas en el sombreadero, bajo dos condiciones de luz (50% y 10%).

Antes de iniciar los tratamientos de déficit hídrico, se realizaron 12 curvas de respuesta a la luz con plántulas que crecieron en las dos condiciones de luz (10 % y 50 % de luz). Luego se iniciaron los cuatro tratamientos hídricos con niveles de disponibilidad hídrica (testigo: riego a saturación cada tercer día; estrés hídrico ligero: 15 días sin riego; estrés moderado: 25 días sin riego y estrés severo: 40 días sin riego). Se realizaron cuatro marchas diurnas fotosintéticas durante los tratamientos a los 10, 20, 30 y 50 días.

Los potenciales hídricos se midieron antes del amanecer a las 5:30 am antes de cada cosecha a los 0, 15, 25 y 40 días. Los parámetros para el crecimiento relativo se midieron al inicio del experimento, en la primera cosecha (15 días) y en la segunda cosecha (25 días).

Para la extracción y cuantificación de liriodenina, se colectaron plántulas completas, sacando cuidadosamente las raíces, posteriormente, se separaron los órganos para la extracción y cuantificación de liriodenina. Con estos parámetros se determinó la importancia de la luz y del estrés hídrico en la modulación de la síntesis de liriodenina además de las respuestas fisiológicas de la planta bajo condiciones estresantes.

4.5 Medición de variables

Cuantificación de la liriodenina

Obtención del material vegetal para análisis de alcaloides

Para la extracción del material vegetal, en los árboles adultos se descubrieron las raíces principales por excavación y se sacaron de 10 a 20 gr de corteza de raíces que posteriormente se cubrieron con la misma tierra. Para la cosecha de tallos y hojas, se cortaron tres ramas al azar y se separó el duramen, conservando y preparando la corteza, de las mismas ramas se obtuvieron las hojas.

Las plántulas y juveniles se cosecharon completos; para descubrir las raíces se realizaron excavaciones alrededor de un radio de 15 cm, tomando como centro a la planta y las raíces se extrajeron con toda la tierra. En todos los casos, se separaron las raíces, tallos y hojas y se secaron a la sombra y se molieron con ayuda de una licuadora hasta obtener muestras homogéneas.

Para la obtención de extractos alcaloidales, el material vegetal se secó, se molió con una licuadora hasta dejar un granulado fino, se pesó y se le realizó una extracción selectiva ácido-base (González 2001). Se impregnaron cinco gramos de muestra con 30 ml de una solución saturada de Na_2CO_3 , se dejaron secar y se realizó la extracción con 100 ml de cloroformo, se filtró y a la solución clorofórmica se le agregó 60 ml de ácido clorhídrico

1 N, se conservó la fase ácida y se les agrego carbonato de sodio hasta llegar a un pH de 9, se extrajo de nuevo con cloroformo, obteniendo así el extracto de alcaloides totales.

Para la cuantificación de liriodenina, los extractos alcaloidales se analizaron por medio de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), con este equipo se detectó y cuantificó la cantidad de liriodenina para cada órgano y tratamiento con los siguientes lineamientos: El HPLC usó una columna Spheri 5 RP18 (de 100 x 4.6 mm y con un diámetro de partícula de 5 micras). La fase móvil consistió en agua y metanol 30:70 (Baker grado HPLC). La velocidad de flujo fue de 1 ml/min. La detección se realizó con luz UV a 236nm. El volumen analizado de muestra fue de 20 μ L a 1 mg/mL disuelta en metanol. Como referencia se usaron curvas patrón de liriodenina. El alcaloide patrón fue caracterizado por el Dr. Mariano Martínez Vázquez del Instituto de Química de la UNAM.

Medidas del estado hídrico

Se desarrollaron curvas presión-volumen en plantas sometidas a ambas condiciones lumínicas, en estrés hídrico ligero, moderado y en testigos con riego constante, con la finalidad de determinar si existen ajustes en las relaciones hídricas de las células en respuesta al estrés hídrico. Se realizó el método de libre transpiración, propuesto por Tyree & Hammel (1972) y descrito por Corcuera (2002), el cual simula la deshidratación natural de las plantas. Para esto se tomaron los brotes de las plántulas cortadas bajo el agua para eliminar el aire del xilema y se rehidrataron en agua destilada por 18 horas en condiciones de oscuridad. Con el tejido rehidratado, con una balanza analítica modelo AS60 marca Ohaus, se obtuvo el peso turgente, posteriormente se obtuvieron los cambios en el peso fresco, los potenciales hídricos durante el periodo de deshidratación de la planta se midieron después de cada intervalo de pesado. A partir de las curvas P/V se obtuvieron parámetros como el módulo de elasticidad máxima (ξ_{max}) los potenciales osmóticos a plena turgencia y la turgencia 0.

El potencial hídrico foliar es el parámetro por excelencia para definir el estado hídrico de la planta. El registro del potencial hídrico al amanecer (Ψ_{pd}) a las 5:30 am, proporciona información del nivel de energía libre del agua al amanecer y es indicativo del grado de estrés con el que la planta inicia el día (Aussenac y Balete 1982). El potencial

hídrico al amanecer y las curvas presión volumen se obtuvieron con una bomba de presión de Scholander PMS modelo 600. Para medir el potencial hídrico, se realizaron cortes limpios de los brotes de tres plántulas en tratamiento y tres brotes de testigos en cada cosecha a las 6:00 am. Una vez realizado el corte inmediatamente se introducía la rama en la cámara de presión y se aplicaba presión hasta el momento en el que se compensaba la presión xilemática brotando por el corte del tallo el agua del xilema.

Caracterización fotosintética.

La caracterización fotosintética ayuda a conocer las respuestas fisiológicas en condiciones ambientales favorables o desfavorables, entre las más comunes son las curvas de respuesta a la luz y las marchas diurnas fotosintéticas. Para realizar los análisis, se usó un Analizador de Gases por medio de luz Infrarroja (IRGA) en sistema abierto (LI-COR modelo LI-6400) que trabaja en sistema abierto.

Se realizaron 12 curvas de respuesta a la luz, 6 en plantas aclimatadas a 10% de luz solar y 6 para plantas expuestas al 50% de luz solar. Para determinar las curvas de respuesta a la luz se midió la asimilación a 0, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 300, 400, 500, 700, 1000 y 1200 $\mu\text{mol fotonos m}^{-2} \text{s}^{-1}$, con una lámpara de led con luz roja, el análisis se llevó a cabo con una concentración de CO_2 ambiental que en promedio se mantuvo en $[360 \pm 15 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}]$. La temperatura de la cubeta fue de 25°C y el flujo de aire de $500 \mu\text{mol s}^{-1}$. A partir de las curvas de respuesta a la luz, se determinaron los siguientes parámetros: fotosíntesis máxima (A_{max}), la eficiencia cuántica con base en luz incidente o aparente ($\square \text{CO}_2$), la conductancia estomática, las tasas de compensación y saturación de luz y la disminución de la fotosíntesis con el programa Photosynthesis proporcionado en la página de LI-COR Bioscience (<http://www.licor.com/env/>).

Durante el experimento, se desarrollaron marchas diurnas fotosintéticas, a los 12, 24, 36, y 50 días, que corresponden a los periodos de estrés hídrico (ligero, ligero-moderado, moderado y severo). Se usó la luz natural y las tasas instantáneas de asimilación de CO_2 se registraron cada dos horas desde la salida hasta la puesta del sol (7:00, 9:00, 11:00, 13:00, 15:00, 17:00). En cada día se midieron 6 hojas por tratamiento.

Los valores de ganancia de carbono se obtuvieron al calcular las integrales bajo las curvas obtenidas con ayuda del programa SigmaPlot versión 10 Systat Software, Inc.

Para el experimento con árboles jóvenes en condiciones de campo se desarrollaron marchas diurnas fotosintéticas mensuales en octubre, noviembre y diciembre, que corresponden a los primeros meses de sequía, cada una con 10 plantas. En los siguientes meses no se pudieron medir las tasas fotosintéticas, debido al inicio de la senescencia y caducidad foliar, y en la temporada lluviosa, la excesiva humedad relativa no permitió desarrollar las marchas fotosintéticas.

Biomasa y análisis de crecimiento relativo

El análisis de crecimiento vegetal utiliza datos primarios como pesos, áreas y volúmenes de todos los componentes de las plantas, explicando matemáticamente las variaciones en la materia seca y el área foliar de los organismos en función del tiempo y de las condiciones del medio (Hunt *et al.* 2002, Borrego *et al.* 2000). Para el análisis de crecimiento se realizaron muestreos destructivos a los 0, 15 y 25 días, tomando cinco plantas al azar de cada tratamiento. Se cosecharon las hojas, se sacaron fotocopias de cada una y se midió su área foliar total con el programa para PC gratuito "Leaf área meter". También se separaron raíces, tallos y hojas, y se secaron en una estufa por 48 horas a 70°C y se registró la biomasa seca. Con los datos ajustados de biomasa de las plantas completas, de sus órganos y del área foliar, se calcularon los índices de eficiencia fisiológica con las siguientes fórmulas:

Tasa de crecimiento absoluta (ARG):

$$\overline{AGR} = \frac{(\overline{W}_2 - \overline{W}_1)}{(t_2 - t_1)} \quad [\text{g día}^{-1}]$$

Donde W_1 y W_2 es la media del peso seco total de la planta (g) a los tiempos de cosecha t_1 y t_2 entre la diferencia en el tiempo (d^{-1}).

Tasa de crecimiento relativo (RGR):

$$RGR = \frac{dW}{dt} \frac{1}{W} = \frac{d(\ln W)}{dt}$$

Donde W es el peso seco total de la planta (g) y t es el tiempo (d^{-1}).

Tasa de crecimiento relativo promedio (RGR)

$$\overline{RGR} = \frac{\ln \overline{W}_2 - \ln \overline{W}_1}{t_2 - t_1} \quad [\text{g g}^{-1} \text{ día}^{-1}]$$

Si el crecimiento es exponencial, entonces (RGR) es constante a través del intervalo entre las cosechas.

Tasa de asimilación neta (NAR):

$$NAR = \frac{dW}{dt} \frac{1}{A} \quad [\text{g m}^{-2} \text{ día}^{-1}]$$

Donde A es el área de superficie de los órganos asimilatorios.

Su valor entre intervalos de cosecha es:

$$NAR = \frac{(\overline{W}_2 - \overline{W}_1)(\ln L_{A2} - \ln L_{A1})}{(L_{A2} - L_{A1})(t_2 - t_1)} \quad [\text{g m}^{-2} \text{ día}^{-1}]$$

Donde \overline{W}_1 y \overline{W}_2 son las medias de los pesos secos, L_{A2} y L_{A1} son las áreas foliares, $\ln L_{A2}$ y $\ln L_{A1}$ es el logaritmo natural de las áreas foliares a los tiempos de cosecha t_1 y t_2 .

Tasa de área foliar (LAR):

Se define como la proporción del área foliar total entre el peso seco total de la planta y su valor promedio en el intervalo t_1 a t_2 está dado por:

$$LAR = \frac{\left(\frac{L_{A1}}{W_1}\right) + \left(\frac{L_{A2}}{W_2}\right)}{2}$$

Donde L_{A1} y L_{A2} son las áreas foliares, W_1 y W_2 son el peso seco total de la planta, t_1 y t_2 son los tiempos de cosecha; las unidades son $\text{m}^2 \text{ g}^{-1}$.

Área foliar específica (SLA):

El área foliar específica es una medida de la densidad o de la talla relativa de la hoja.

$$SLA = \frac{\left(\frac{L_{A1}}{L_{W1}}\right) + \left(\frac{L_{A2}}{L_{W2}}\right)}{2}$$

Donde L_{A1} y L_{A2} son las áreas foliares y L_{W1} y L_{W2} son el peso seco de las hojas a los tiempos de cosecha t_1 y t_2 ; sus unidades son $\text{m}^2 \text{ g}^{-1}$.

Fracción del peso de las hojas, peso del tallo y peso de la raíz (LWR, SWR y RWR):

$$LWR = ([L_{W1}/W_1] + [L_{W2}/W_2])/2$$

$$SWR = ([S_{W1}/W_1] + [S_{W2}/W_2])/2$$

$$RWR = ([R_{W1}/W_1] + [R_{W2}/W_2])/2$$

Donde L_{W1} y L_{W2} , S_{W1} y S_{W2} , R_{W1} y R_{W2} son las medias del peso seco para el follaje, el tallo y la raíz respectivamente y W_1 y W_2 son las medias del peso seco total de la planta a los tiempos de cosecha t_1 y t_2 .

Proporción raíz-parte aérea (R/S)

$$Root / Shoot = \frac{R}{(L + S)}$$

Donde R, S y L son los pesos secos de la raíz, tallo y hojas respectivamente.

4.6 Análisis estadístico

Para comparar las diferencias en la biomasa y en el crecimiento relativo del experimento de plántulas en el sombreadero se realizó una prueba de ANOVA multifactorial, los factores fueron la intensidad lumínica y disponibilidad hídrica. También para medir las diferencias entre el potencial hídrico, curvas presión volumen, captura de carbono, curvas de respuesta a la luz y contenido de liriodenina se realizaron pruebas de ANOVA multifactorial y pruebas de separación de medias de LSD, los factores fueron la luz y la disponibilidad hídrica y las respuestas, el potencial hídrico, la ganancia de carbono y el contenido de liriodenina. Para los experimentos en campo se realizaron pruebas de ANOVA simples y pruebas de separación de medias de LSD, las respuestas fueron también el potencial hídrico, la ganancia de carbono y el contenido de liriodenina. Para relacionar los potenciales hídricos, la captura de carbono y la acumulación de liriodenina se realizaron correlaciones lineales. Todos los análisis se realizaron con el programa estadístico Statgraphics Centurion XV Statpoint Inc.

5. Resultados

5.1 Fenología de *Annona lutescens*

La caracterización fenológica se llevó a cabo con base en la escala BBCH propuesta por Hess (1998) que consta de diez estados generales o principales de crecimiento que describen tiempos amplios en el desarrollo de la planta y los estados secundarios son usados para describir los cambios en una escala de tiempo menor.

Cuadro 1. Codificación BBCH de las etapas fenológicas de *A. lutescens*, basada en Hess (2008)

Estado principal de desarrollo 0: Germinación			
Fenofase	Órgano	Descripción de la fase	Periodo de tiempo
00	semilla	Semilla seca	marzo, abril y mayo
	Yema	Yema latente	
01	Semilla	Semilla iniciando la imbibición	1 día de imbibición
	Yema	Yema foliar visible	abril-mayo
03	Semilla	Imbibición completa	5-6 días de imbibición
	Yema		
05	Semilla	Emergencia de la radícula	14-30 días después de la imbibición
	Yema	Yema foliar hinchada	
06	Semilla	Radícula con pelos radicales	5-7 días después de la emergencia de la radícula
	Yema	Yema foliar hinchada	mayo
07	Semilla	Gancho del hipocótilo formándose	9-11 días después de la emergencia de la radícula
	Yema		
09	Semilla	Plantula con la testa de la semilla unida pero las primeras hojas verdaderas se distinguen	15-20 días después de la emergencia de la radícula
	Yema	Emergencia de la yema foliar	

Estado general de desarrollo 1: desarrollo foliar			
Código	Órgano	Descripción	Periodo de tiempo
10	Hojas	Primeras hojas separándose: color en escala de marrón claro, hojas emergiendo	mayo
11	Hojas	Primer par de hojas creciendo: en escala de color verde claro o verde bronceado	mayo- junio
12	Hojas	Hojas visibles desplegadas	mayo-junio
15-18	Hojas	De cinco a ocho pares de hojas desplegadas	mayo-agosto
19	Hojas	Nueve o mas pares de hojas desplegadas	mayo-agosto

Estado general de desarrollo 2: desarrollo de ramas			
Código	Órgano	Descripción	Periodo de tiempo
20	Rámas jóvenes	Primer par de ramas desarrollándose (edad: de 6 a 9 meses)	junio (iniciando la temporada de lluvias)
21-29	Ramas adultas	Desarrollo de más ramas del árbol adulto	junio-octubre (durante la temporada de lluvia)

Estado principal de desarrollo 5: emergencia floral			
Código		Descripción	Periodo de tiempo
50	Yema	Yema floral visible y cerrada	julio-octubre (las
51	Yema	Yema flora hinchada y comenzando a separarse	inflorescencias emergen durante la estación lluviosa
53	Yema	Primordio floral visible a $\frac{1}{4}$ de su talla final	
55	Primordio floral	Pétalos elongándose, $\frac{1}{2}$ de su talla final	
59	Flor cerrada	Flor aun cerrada con el tamaño final	octubre-noviembre

Estado principal de desarrollo 6: Floración			
Código		Descripción	Periodo de tiempo
60	Flor	Flor cerrada al tamaño final comienza opturación (Pre-femenina)	Floración: Noviembre-diciembre
61	Flor	Flor abriendo (femenina)	2 días luego del estado 59
64	Flor	Flor finalizando el estado femenino	24 horas
65	Flor	Flor masculina inicial	12-36 horas
			24-36 horas
66	Flor	Flor masculina	24 horas

Estado principal de desarrollo 7: Desarrollo de frutos			
Código	Órgano	Descripción	Periodo de tiempo
70	Fruto	Gineceo hinchado	diciembre-enero
71	Fruto	Fruto color verde claro	enero
72	Fruto	Fruto al 20% del tamaño final	febrero-marzo
78	Fruto	Fruto al 80% del tamaño final	
79	Fruto	Fruto al tamaño final	marzo-abril

Estado principal de desarrollo 8: Fructificación			
Código	Órgano	Descripción	Periodo de tiempo

80	Fruto	Fruto verde al tamaño final	abril
81	Fruto	Comienza el cambio de color de verde a amarillo	12 días después de alcanzar su tamaño final
82	Fruto	El color Amarillo en $\frac{1}{4}$ del fruto, firmeza completa	
85	Fruto	$\frac{1}{2}$ del fruto o más en color amarillo	
87	Fruto	Fruto Amarillo, pierde firmeza	
89	Fruto	Finaliza la fructificación	mayo

Estado principal de crecimiento: 9 senescencia foliar			
Código	Órgano	Descripción	Periodo de tiempo
90	Hojas	Hojas maduras en color verde oscuro	enero
92	Hojas	Primeros signos de senescencia, pérdida de turgencia, cambio de coloración en las hojas	Primer parte de febrero
93	Hojas	Senescencia plena, hojas amarillas o marrón	febrero
94	Hojas	Inicia la caducidad foliar	febrero-marzo
95	Hojas	Hojas caducidad 50%	marzo
99	Hojas	Caducidad total, yemas en latencia	marzo-abril

Fase vegetativa

Esta fase está relacionada estrechamente con el periodo de lluvias (Figura 11), tanto la germinación como el crecimiento y foliación ocurren durante este lapso de tiempo.

Germinación y plántulas

Estado general de crecimiento 0: germinación y propagación vegetativa

El primer estado (BBCH 00) corresponde a las semillas totalmente desarrolladas. Las semillas de *A. lutescens* miden en promedio 1.2 cm de largo por 0.55 cm de ancho, alargadas hacia el micrópilo, de color pardo oscuro, con testa delgada, brillante y resistente. Presentan un pequeño tapón micropilar en forma de triángulo y un hilo poco evidente; en el interior se observa un endospermo ruminado, característico de las anonas, en el que se insertan las fibras internas de la endotesta. En la región basal media de la semilla, cerca del micrópilo, se encuentra el embrión de más o menos 1 mm, totalmente formado, translúcido, con una radícula y dos cotiledones diferenciados (Figura 10).

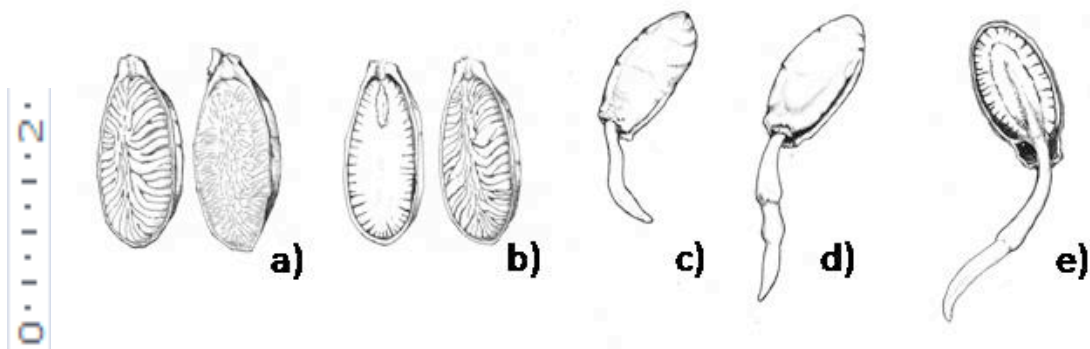


Figura 10. Semillas de *A. lutescens* a) BBCH 00, b) BBCH 02, c) BBCH 05, d) BBCH 06, e) Semilla abierta (Dibujos realizados por Nestor Daniel Zambrano Cruz).

El porcentaje de germinación de las semillas de *Annona lutescens* fue de 21%, determinado a partir de 1800 semillas, a diferencia de otras especies del género, *A. lutescens* no presenta latencia, aunque al igual que varias anonas tiene baja capacidad germinativa (cuadro).

La germinación bajo condiciones controladas en una cámara de germinación, se lleva a cabo en un periodo que abarca desde 14 a 50 días y comprende la imbibición (BBCH: 01-03), el rompimiento de la testa (BBCH: 04). La emergencia de la radícula (BBCH: 05), y la aparición del epicótilo (BBCH: 06) que es visible cinco días después de la emergencia radicular, los pelos radiculares son evidentes cuando la radícula llega a los 4 cm; en esta fase los cotiledones todavía están aprisionados en la semilla (BBCH: 07). El tipo de germinación es epigea, y el gancho de germinación se forma entre los 7 y 10 días después la aparición de la radícula, en ésta fase el epicótilo emerge con la semilla (BBCH: 07). La testa que persiste encierra parte de los cotiledones hasta cuando salen las primeras hojas verdaderas (BBCH 08), luego, cae junto con los cotiledones (BBCH: 09) o en algunos individuos se mantiene por más tiempo, alcanzando la etapa BBCH 1.

Estado general de crecimiento 1: desarrollo de hojas

Luego de la etapa 0, las plántulas fueron trasplantadas y llevadas a un sombreadero. Las hojas verdaderas aparecen 20 días después de la germinación, persistiendo los cotiledones y la testa (Figura 11) (BBCH: 11); el segundo par de hojas, se desarrolla entre los 30 y 40 días (BBCH: 13) mientras que el tercer par de hojas lo hace entre los 50 y los 60 días (BBCH 13). En el periodo comprendido entre los 70 y 90 días hay un brote de 8 a 10 hojas (BBCH 14, BBCH 15), en este tiempo inicia la disminución de la producción de hojas, encontrando plántulas de 6 meses con siete a nueve pares de hojas totalmente desarrolladas (BBCH 19). El alargamiento del tallo se lleva a cabo durante el estado 01, pero no hay producción de ramas sino hasta que son plantas jóvenes. Las hojas de *A. lutescens* tienen pecíolos de 8 a 12 mm de largo, alternas, opuestas, elípticas u obovadas de 7 a 14 cm de largo y de 3.5 a 7.5 cm de ancho, ligeramente acuminadas a obtusas, redondeadas o subagudas en la base, cuando jóvenes son pubescentes pero pronto se vuelven glabras, con solo unos pocos pelos persistentes en el envés a lo largo de las nervaduras (Standley & Steyeramak, 1946).

La supervivencia de las plántulas, fue del 86 %, y solo en un 9% se observó un bajo desarrollo, debido a que presentaron una altura de 6-8.5 cm mientras que el resto de las plántulas tenían entre 15 y 21 cm de altura. Además el 5% presentó deformaciones debido a la persistencia de la testa durante la germinación que no permitía que las hojas y el ápice se desarrollaran correctamente ocasionando en algunos casos la muerte del ápice y el desarrollo de ramas laterales en plántulas poco desarrolladas.

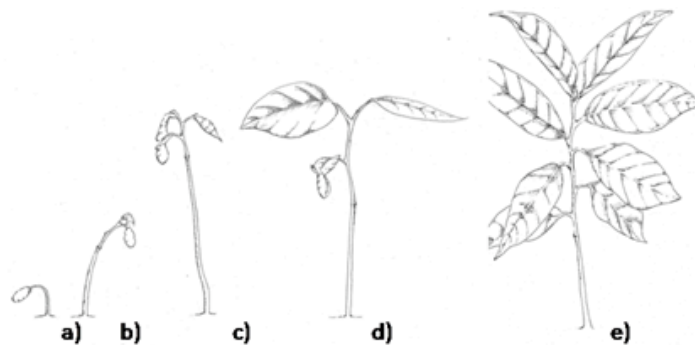


Figura 11. Desarrollo de plántulas a) BBCH 09, b) BBCH 11, c) BBCH 02, d) BBCH 04, e) BBCH 09 (Dibujos realizados por Nestor Daniel Zambrano Cruz).

Plantas jóvenes y adultas

Los cambios fenológicos de Juveniles y adultos de *Annona lutescens* se relacionaron estrechamente con los cambios estacionales. Como ya se mencionó anteriormente, la Selva Baja Caducifolia de la zona en estudio tiene periodos de 5 a 7 meses de lluvia y de 5 a 7 meses de sequía.

A. lutescens se mostró como una especie típicamente caducifolia, en la que la senescencia foliar comienza poco antes de los tres meses de instalada la sequía y a los cuatro meses hay caducidad de hojas, en las plantas jóvenes parte del tallo suele morir, para rebrotar cuando se presentan las lluvias.

Estado principal de desarrollo 0: latencia y yemas foliares

Durante la temporada seca, *A. lutescens*, pierde las hojas y produce yemas latentes (BBCH 00), que aumentan de volumen y se desarrollan a finales de la temporada de sequía (BBCH 02, BBCH 03), las yemas se abren a los pocos días después de que se rompe la latencia (BBCH 07) mostrando los primeros brotes verdes (BBCH 09).

Estado principal de desarrollo 1: desarrollo de hojas en árboles jóvenes y adultos

El rebrote foliar se lleva a cabo durante mayo, después de la temporada de sequía tanto en plantas jóvenes como en árboles adultos, adelantándose, en ocasiones, a las lluvias. Las primeras hojas surgen de las yemas foliares de cada rama en un tiempo variable de tres a cuatro días (BBCH 11); su desarrollo continua y en veinte días hay hojas en diferentes estados, siendo las más jóvenes las de la parte apical (BBCH 12-19). En octubre (final de la temporada de lluvia), se observan en su mayoría árboles con follaje abundante y ramas desarrolladas (BBCH 19, BBCH 39) (Figura 12).

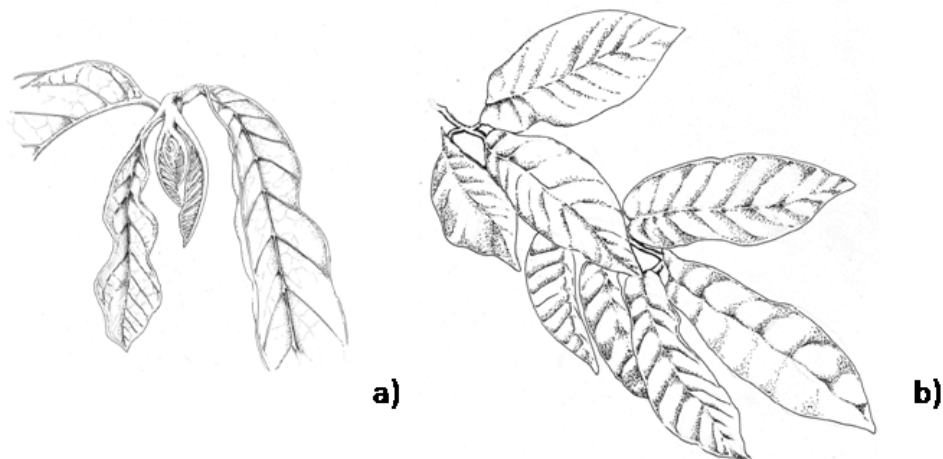


Figura 12. Desarrollo de hojas en árboles adultos a) BBCH 11-16 b) BBCH 18-19. (Dibujos realizados por Nestor Daniel Zambrano Cruz).

Fase reproductiva

La floración es abundante y asincrónica; aunque hay flores durante todo el año, la mayor parte de las yemas florales aparecen al final de la temporada de lluvia y la floración plena se presenta durante noviembre y diciembre, al inicio de la temporada de sequía. La temporada de fructificación comienza en marzo y concluye en abril.

Estado general de desarrollo 5 y 6: emergencia de flores y floración

En *A. lutescens*, las yemas florales aparecen en septiembre y octubre, el desarrollo de una flor suele durar de tres a cuatro semanas. Las yemas florales son verdes, visibles y se encuentran en las ramas con hojas (BBCH 50). En una yema floral se pueden observar de una a seis flores en diferentes etapas de crecimiento, desde flores visibles a 1/4 de su tamaño final (BBCH 52), flores a 1/2 de su tamaño final (BBCH 55) y flores en su tamaño final cerradas (BBCH 59). Las inflorescencias pueden estar opuestas a las hojas o implantadas desde la mitad de un entrenudo, presentan varias flores individuales con pedicelos de 12 a 18 mm de largo, pubescentes, sépalos triangulares de 2 a 3 mm de largo y pétalos blanquecinos linear-oblongos, obtusos, puberulentos por fuera, de 1.5 a 2 cm de largo, los pétalos interiores rudimentarios (Standley & Steyermark, 1946) (Figura 12).

Las flores de *A. lutescens* (BBCH 60) son dicogamas y protogineas, presentan varios estados florales, diferenciándose el estado pre-hembra (BBCH 61), cuando los pétalos se separan ligeramente y el estigma apenas visible es brillante, la duración de esta etapa es de 24 a 48 horas. El estado hembra (BBCH 63) es cuando los pétalos están separados y debido al fluido estigmático el estigma es más visible y brillante, en esta etapa ocurre la polinización y puede durar hasta 3 días. El estado macho (BBCH 65) es cuando los pétalos están abiertos y los estambres que ya son visibles se separan liberando el polen (BBCH 66). Las flores cambian de coloración de verde-amarillo a café (BBCH 68), al final de la floración se da el cuajado de frutos (frutos no abortados) (BBCH 69, BBCH 70)

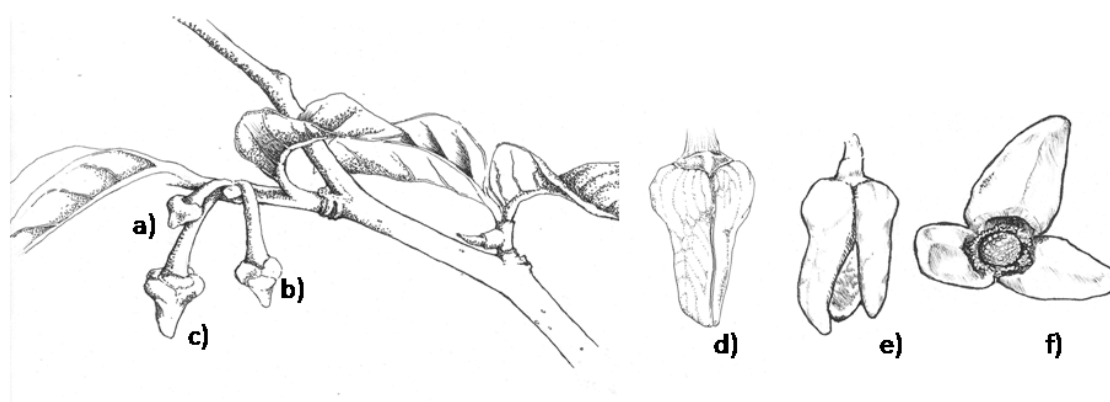


Figura 13. Desarrollo de flores y floración a) BBCH 53, b) BBCH 54, c) BBCH 55, d) BBCH 60, e) BBCH 63, f) BBCH 65 (Dibujos realizados por Nestor Daniel Zambrano Cruz).

Estado general de desarrollo 7, 8: desarrollo de frutos y fructificación

El desarrollo de frutos comienza cuando el gineceo de las flores se vuelve protuberante y los pétalos caen (BBCH70), después de esta etapa las flores abortadas se desprenden de la planta, mientras que los frutos crecen (BBCH 71). En un mismo árbol se observan frutos en diferentes estados de desarrollo y el tamaño medio lo alcanzan aproximadamente a los 70 días (BBCH 75) mientras que el tamaño final se alcanza aproximadamente a los 120 días (BBCH 79) (Figura 14).

Los frutos llegan a la madurez fisiológica después de más o menos 20 días de alcanzar su tamaño final, que se da entre los 120 y 160 días después de la floración. *A.*

lutescens tiene frutos climatéricos. Se encuentran frutos con madurez incipiente que cambian de verde a amarillo (BBCH 81), frutos con un mayor grado de madurez con color intenso pero bastante firmes (BBCH 85), frutos con madurez de recolección y firmeza y color intensos (BBCH 87), y frutos con madurez de consumo con aroma y color intenso y textura suave (BBCH 89). Los frutos con madurez de recolección maduran rápidamente por lo que no se pueden almacenar por más de cuatro días. Los frutos son comestibles ligeramente arenosos y de gusto dulce, globoso-ovoides, lisos, amarillos, de 8 a 9 cm de diámetro o de largo con aréolas escasamente perceptibles (Standley & Steyermaek, 1946). La dispersión es por vía zoocoria, por medio de aves y mamíferos de pequeña y mediana envergadura.

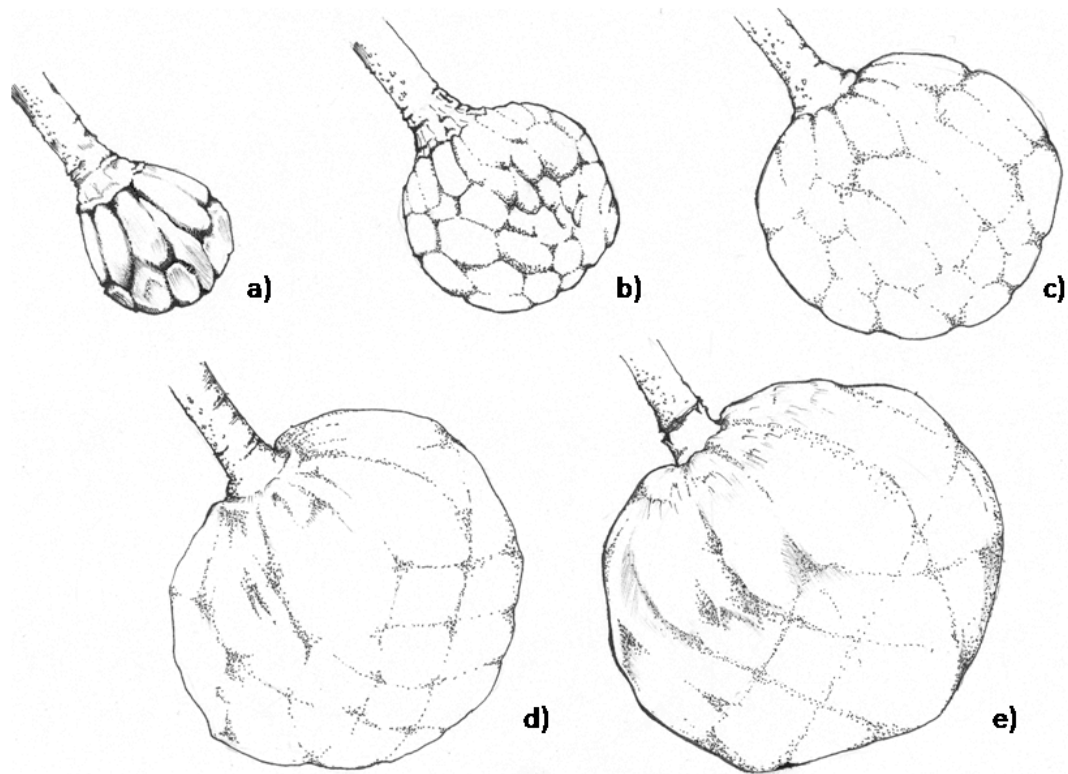


Figura 14. Desarrollo de frutos a) BBCH 71, b) BBCH 73, c) BBCH 75, d) BBCH 79, e) BBCH 82. (Dibujos realizados por Nestor Daniel Zambrano Cruz).

Fase de senescencia

En la SBC, al inicio de la temporada de sequía las condiciones de disponibilidad de agua en el suelo son favorables, pero al desecarse el suelo, primero las plantas jóvenes y luego los árboles adultos comienzan el proceso de senescencia foliar que se caracteriza por la pérdida de turgencia de las hojas, clorosis progresiva hasta llegar a la muerte celular y la caída de las hojas, las yemas foliares quedan latentes hasta el inicio de las lluvias.

Estado general de desarrollo 9: senescencia y caducidad foliar

Después de la temporada lluviosa, se presenta la estación seca de 5 a 7 meses, durante los meses iniciales (noviembre, diciembre y enero) no se encuentran indicios de senescencia foliar, en parte porque aunque las precipitaciones son escasas, la temperatura es relativamente baja y la humedad ambiental alta lo que permite mantener las demandas hídricas satisfechas, en este periodo, se presenta el fin del crecimiento vegetativo y no se desarrollan nuevas hojas (BBCH 91). Sin embargo a finales de enero y principios de febrero se encuentran árboles con síntomas de senescencia foliar, las hojas cambian de color de verdes a amarillo (BBCH 93), durante febrero, pierden más del 50% de hojas (BBCH 95) y a principios de marzo los árboles solo conservan un 10% de hojas senescentes (BBCH 97) y durante la últimas semanas de marzo y abril, los árboles permanecen sin hojas (BBCH 99).

4.2 Caracterización ecofisiológica de *Annona lutescens* en diversas condiciones ambientales

1. Crecimiento de las plántulas

Área foliar: El crecimiento del área foliar fue mayor en las plántulas que se aclimataron a las condiciones de baja luminosidad, que el de las expuestas al 50% de la radiación ($P=0.0027$). En ambas condiciones lumínicas el estrés hídrico, también influyó en el incremento de área foliar ya que aunque el crecimiento no se detuvo, si disminuyó significativamente la tasa de crecimiento, siendo más notoria la reducción en las plántulas expuestas a mayor intensidad de luz ($P=0.0001$) (Figura 14).

Biomasa total: La biomasa total de las plántulas, se incrementó diferencialmente con el tiempo en todos los tratamientos (luz, sombra, estrés y testigo), las plántulas crecidas bajo la sombra presentaron mayor biomasa inicial y final con respecto a las de sol ($P=0.0001$). El estrés hídrico afectó la acumulación de biomasa y las plántulas más afectadas fueron las plántulas de sombra donde la velocidad de acumulación de biomasa fue significativamente menor que en las plántulas crecidas bajo sol ($P=0.001$, interacción de ambos factores $P=0.002$) (Figura 14).

Asignación de biomasa: Los tallos y raíces, duplicaron y triplicaron su peso en condiciones de riego constante, de 0.09 ± 0.02 g a 0.33 ± 0.07 g en raíces de plántulas crecidas en sol y de 0.29 ± 0.01 g a 0.35 ± 0.03 g en raíces de plántulas crecidas bajo sombra; las plántulas que estaban bajo tratamiento de estrés hídrico, tuvieron un menor incremento de biomasa que los testigos. Las hojas fueron las que presentaron mayor biomasa al inicio y final de los tratamientos, representando más del 35% del peso total de las plantas en la mayoría de los casos. El estrés hídrico, afectó la acumulación de biomasa en todos los órganos y todos los tratamientos ($P=0.023$) (Figura 14).

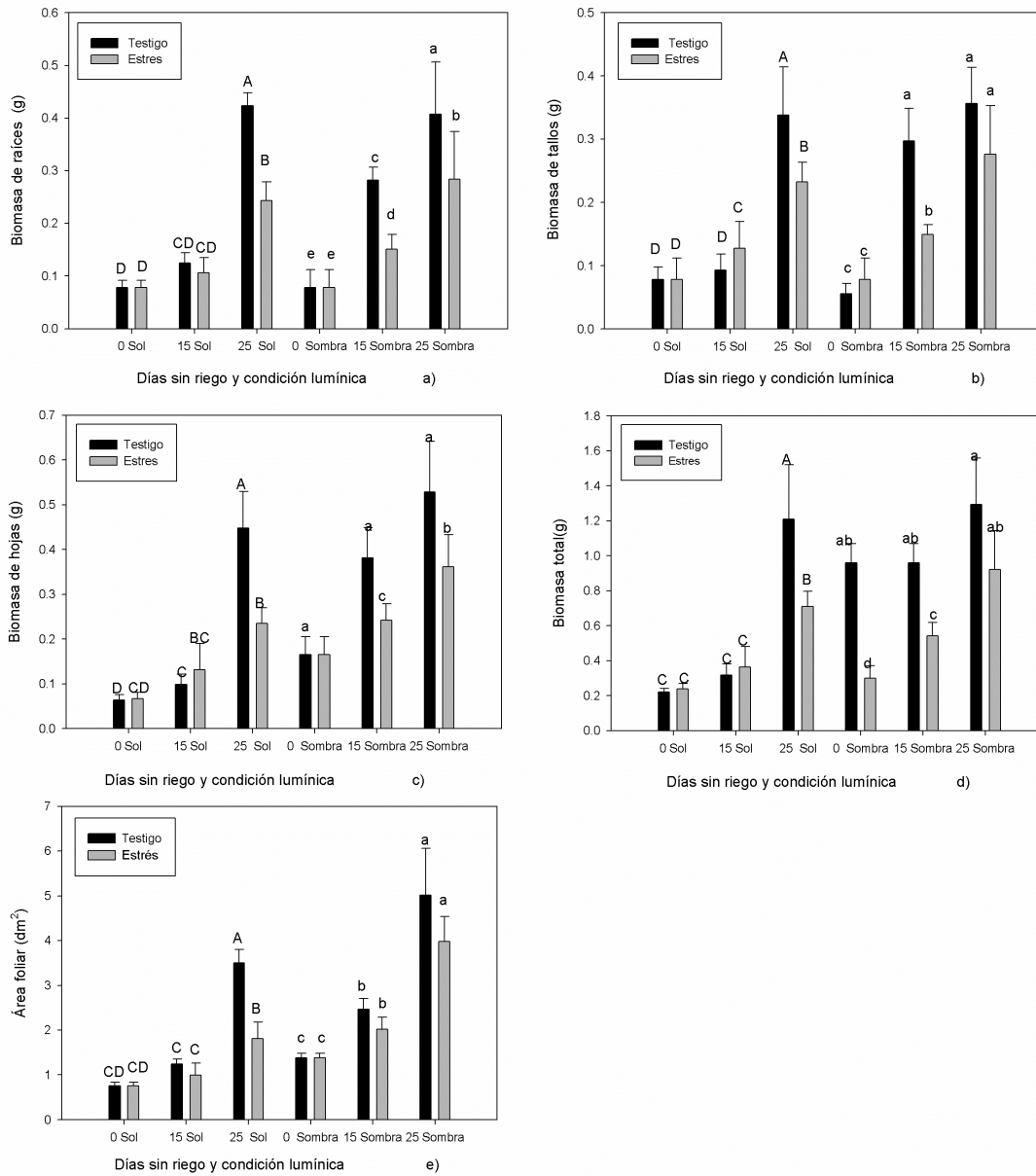


Figura 15. Efecto de la cantidad de radiación y del estrés hídrico (0, 12 y 25 días sin riego) en la biomasa total y biomasa de diferentes órganos, así como área foliar total de plántulas de *Annona lutescens*. Se muestra la media y desviación estándar. Análisis estadístico, Anova multifactorial, Factores: cantidad de luz y niveles de estrés, las letras diferentes indican las diferencias significativas, mayúsculas bajo sol y minúsculas bajo sombra. n=6 (P= 0.000 área foliar, biomasa de hojas P=0.023, biomasa de raíces y tallos P=0.001)

Índices fisiológicos

La Tasa de Crecimiento Absoluta (AGR) de las plantas testigos fue más alta que la de las plantas en estrés en el segundo periodo. En las plantas crecidas bajo sol (50%), el primer periodo de 15 días fue de crecimiento más lento incrementándose de 0.0096 a 0.059 g d⁻¹ en el segundo periodo (P= 0.0001), mientras que en las plantas crecidas bajo sombra 90% el primer periodo la tasa de crecimiento absoluta fue mayor que en el segundo periodo disminuyendo de 0.06 a 0.03 g/d (P=0.0001). En cambio, en las plantas bajo estrés hídrico no hay diferencias significativas en ambos periodos, en ninguna de las condiciones lumínicas (P=0.1119, P=0.0795) (Figura 15).

La tasa de crecimiento relativo promedio (RGR), mostró que las plántulas en estrés hídrico ligero crecidas en sombra se desarrollaron mejor en la primera etapa de la sequía que las crecidas bajo sol (50%) (P=0.006), mientras que en el segundo tiempo de cosecha (estrés hídrico moderado) la tasa disminuyó notablemente. Bajo sol los cambios en la tasa de crecimiento no son significativos (Figura 15).

La Tasa de Asimilación Neta (NAR) de plántulas en ambas condiciones de luz, fue similar en los tratamientos y en los periodos de estrés hídrico, donde no se encontraron variaciones estadísticas significativas entre plántulas de sol y sombra y en ambos periodos de estrés (P= 0.06). Solo los testigos (con riego constante) aumentaron su capacidad para producir brotes nuevos, las plántulas bajo sol en el segundo periodo de tiempo (estrés hídrico moderado) aumentaron de 0.009 a 0.02 gm⁻².d⁻¹ (P=0.0002) y bajo sombra en el primer periodo (estrés hídrico ligero) disminuyó de 0.03 a 0.007 gm⁻².d⁻¹ (P=0.0001) (Figura 15).

El Área Foliar Específica (SLA) disminuyó significativamente en el tratamiento de plántulas bajo sol en estrés moderado de 9.6 a 7.7 dm⁻² .g⁻¹ (0.017) en cambio en los demás tratamientos no hubieron cambios estadísticamente significativos. La Tasa de Área foliar no cambió significativamente en ningún tratamiento (P=0.3, P=0.25) (Figura 15).

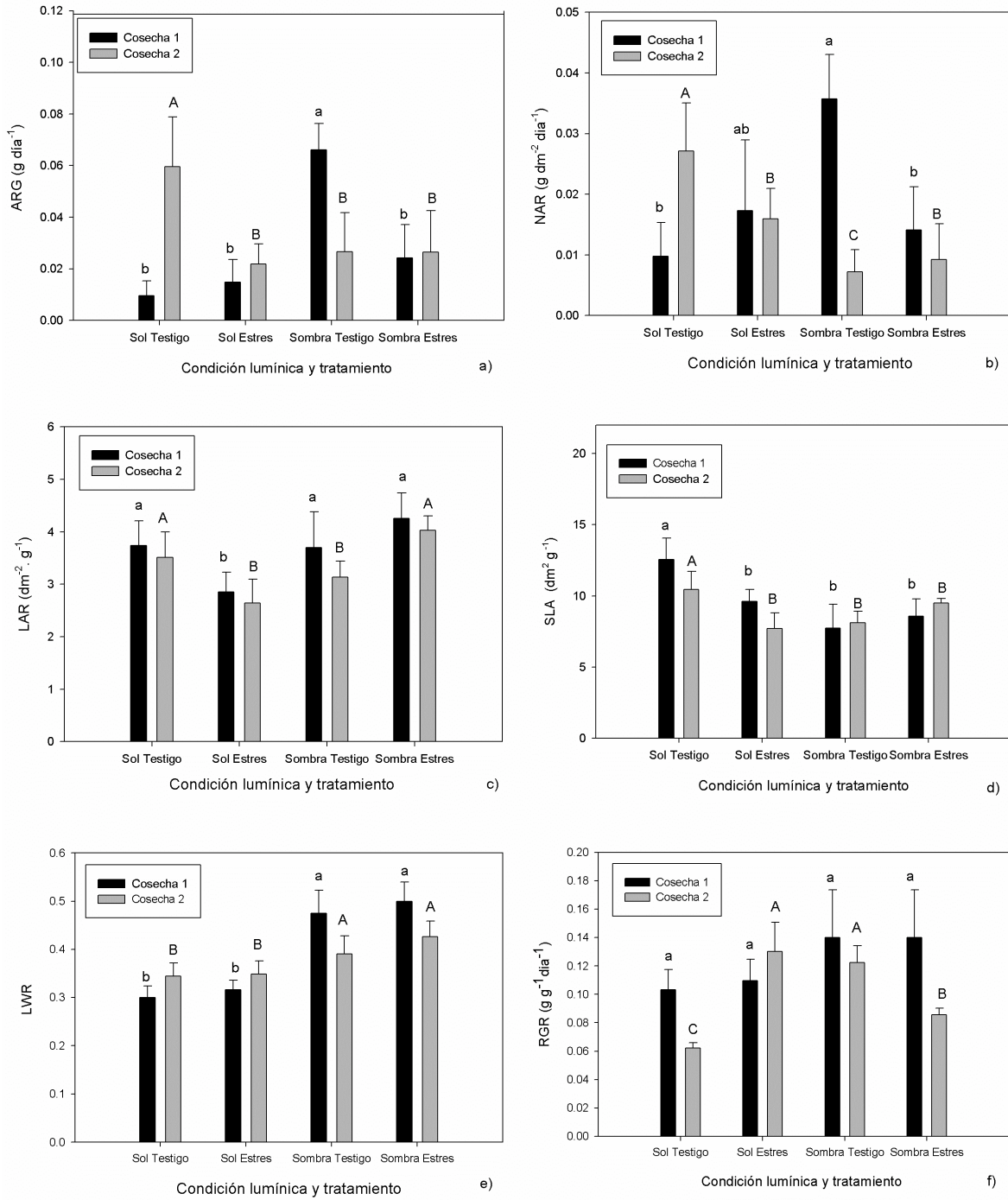


Figura 15. Análisis de crecimiento relativo de las plántulas de *A. lutescens*, tasa de crecimiento absoluto (AGR), tasa de crecimiento relativo RGR), tasa de asimilación neta (NAR); Tasa de área foliar (LAR); área foliar específica (SLA); (proporción raíz/parte aérea (R/S). Cosecha 1: 15 días sin riego, cosecha 2: 25 días sin riego. Se muestra medias y desviación estándar: ANOVA multifactorial (Factores: Luz y estrés hídrico) las letras diferentes arriba de las barras, indican diferencias significativas n= 6.

Estado hídrico de plántulas de *Annona lutescens*

El status hídrico, de las plantas cambió con la progresión de la sequía y en menor intensidad por la luz. Los contenidos relativos de agua (CRA) de las plántulas de los testigos de sol y las plántulas de sombra, fueron altos (93.1 y 96.3% respectivamente) con diferencias estadísticas significativas entre sol y sombra ($P= 0.05$). El CHR en los tratamientos de estrés disminuye drásticamente a los 15 días sin riego (74-86%) ($P= 0.001$), pero se mantiene en el mismo nivel durante los siguientes 9 días sin riego, ($P=0.06$) (Cuadro 3) mientras que los testigos en todos los tratamientos mantuvieron los valores iniciales (93.1 y 96.3% respectivamente sol y sombra).

Se realizaron doce curvas presión-volumen, en plantas de ambos ambientes lumínicos, en estrés hídrico y testigos (tres curvas para cada tratamiento) de las que se obtuvo el módulo de elasticidad máximo (ϵ_{max}) y los potenciales osmóticos. Se calculó el módulo de elasticidad máximo, de plántulas en cada tratamiento encontrando que en plantas crecidas bajo sol, el grupo testigo tienen un valor menor de ϵ_{max} (0.69 MPa) que las plantas sometidas al estrés hídrico (1.96 MPa) ($P=0.01$), lo que sugiere que los tejidos tienen un ajuste elástico conforme el estrés se incrementa (Cuadro 2)

Cuadro 3. Parámetros de las curvas Presión Volumen de plántulas de *A. lutescens* en dos condiciones lumínicas y dos grados de déficit hídrico. CHR: contenido relativo de agua, ξ max: módulo de elasticidad, $\Psi_{\pi 100}$: potencial osmótico a turgencia 100. Las letras indican diferencias significativa entre testigo y estrés, $n=3$

Tratamientos		Días en estrés	CHR	ξ_{max} (MPa)	$\Psi_{\pi 100}$ (MPa)
Sol	Testigo	15	93.1 \pm 3.3 b	0.42 \pm 0.13 a	-0.96 \pm 0.04 b
	Estrés	15	74 \pm 1.6 c	1.76 \pm 0.136 c	-1.3 \pm 0.2d
Sombra	Testigo	15	96.7 \pm 2 a	0.572 \pm 0.02b	0.87 \pm 0.078a
	Estrés	15	86 \pm 1.1 c	1.925 \pm 0.12 c	1.002 \pm 0.06c
Sol	Testigo	25	96.3 \pm 1.6 A	0.69 \pm 0.14A	-0.23 \pm 0.1 A
	Estrés	25	87.9 \pm 2.6 C	1.96 \pm 0.59C	-0.62 \pm 0.05C
Sombra	Testigo	25	93.26 \pm 1.2 B	1.53 \pm 0.087B	-0.24 \pm 0.2A
	Estrés	25	88.3 \pm 1.17 C	2.622 \pm 0.94 D	-0.57 \pm 0.086B

Potenciales hídricos al amanecer (Ψ_{pd}) de plántulas sometidas a dos condiciones lumínicas y tres tratamientos de déficit hídrico y en árboles jóvenes en campo

Plántulas: Los potenciales hídricos al amanecer (Ψ_{pd}) de las plántulas decrecen significativamente mientras transcurren los días sin riego ($P= 0.0001$) y según el análisis de LSD todos los tiempos de estrés son diferentes. La luz también influye significativamente en la severidad de esta disminución ($P= 0.01$), incluso en los testigos, se observa un Ψ_{pd} de -0.69 MPa en plántulas crecidas con el 10% de luz solar (sombra), y de -0.81 MPa en plántulas crecidas bajo sol (Figura 16).

En los tratamientos de déficit hídrico, también se ve el efecto combinado de los dos factores (agua y luz) en la disminución del potencial hídrico durante los cincuenta días de tratamiento ($P=0.0001$ factor a=días sin riego, $P=0.0001$ factor b= intensidad lumínica, $P=0.001$ interacción de ambos factores (Figura 16). El análisis de regresión lineal mostró una relación significativa entre la progresión de la sequía y la disminución del potencial hídrico ($r^2=93.9\%$).

Árboles jóvenes en campo. El valor de los potenciales hídricos al amanecer Ψ_{pd} disminuyó a medida que la sequía progresó ($r^2= 94\%$) registrándose valores de Ψ_{pd} de -0.6 MPa en octubre, hasta de -4 MPa (Figura 16) en febrero, en marzo y abril la ausencia de hojas no permitió realizar mediciones.

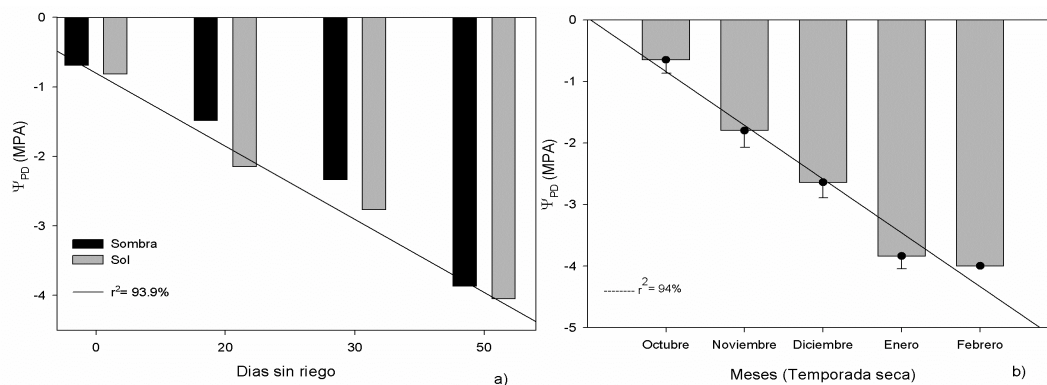


Figura 16. Potencial hídrico (Ψ_{pd}) al amanecer en a) plántulas de *A. lutescens* en el sombreadero con dos condiciones de luz y sin riego durante 0, 15, 30 y 40 días b) en árboles jóvenes durante los meses de la temporada de seca. ANOVA $P= 0.0001$ $n=6$

Las plantas presentaron los síntomas de senescencia característicos hasta el cuarto mes de sequía (hojas poco turgentes, con marchitamiento, hojas basales senescentes o ausentes), pero no fue hasta el quinto mes de sequía cuando perdieron en promedio hasta el 70% de sus hojas, quedando únicamente las hojas apicales.

En mayo se presentaron las primeras lluvias, los brotes foliares aparecieron y el potencial hídrico al amanecer se recuperó hasta -0.3 MPa (Figura 17), y se mantuvo en este nivel durante toda la temporada de lluvias.

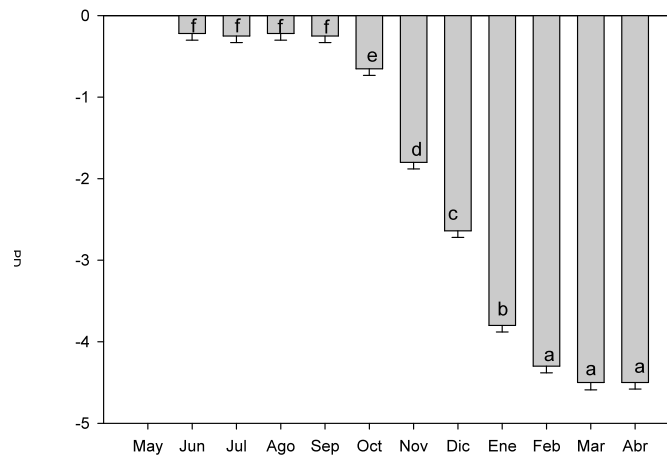


Figura 17. Variación mensual promedio del potencial hídrico al amanecer (Ψ_{pd}) de juveniles de *A. lutescens* en condiciones naturales a lo largo de un ciclo anual. Se presenta la media y la desviación estándar. $n=5$, $P=0.000$. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas de acuerdo a la prueba de comparaciones múltiples con LSD con $p<0.05$.

Caracterización de la respuesta fotosintética en plántulas en condiciones de luz contrastantes

La caracterización de la respuesta fotosintética a la luz, se realizó antes de iniciar los periodos de déficit hídrico (Figura 18).

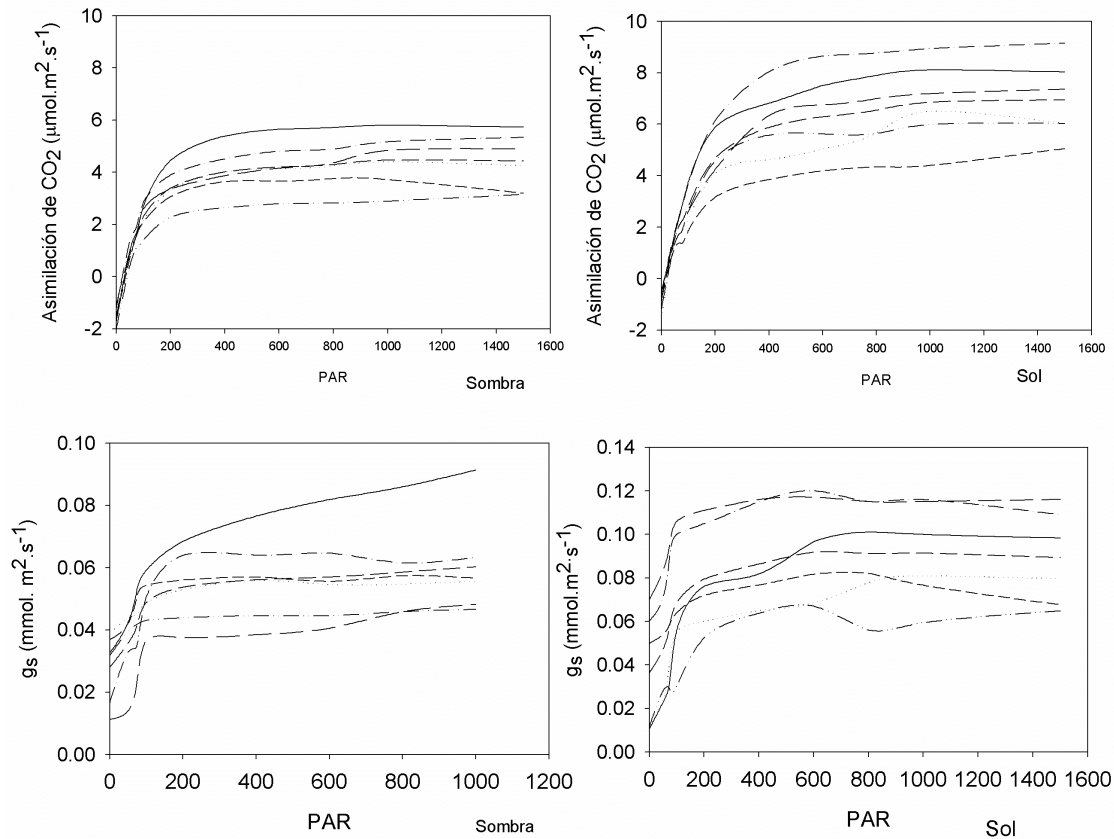


Figura 18. Curvas de respuesta a la luz de plántulas crecidas bajo sol y sombra. Asimilación de CO₂ y conductancia estomática (g_s), radiación fotosintéticamente activa (PAR) n=7

Cuadro 4. Parámetros derivados de las curvas de respuesta a la luz de plántulas aclimatadas a sol y sombra de *A. lutescens*. Amax: capacidad fotosintética máxima, punto de compensación y punto de compensación.

	Punto de saturación de luz (μmol. m ⁻² .s ⁻¹)	Punto de compensación de luz (μmol. m ⁻² .s ⁻¹)	A max CO ₂ (μmol.m ⁻² .s ⁻¹)
Plantas en sombra	474.67±76.87 a	25.167±8.75b	5.512±1.69a
Plantas en sol	801±141.92 b	12.5±4.8a	8.71±1.18b

Los valores colocados son medias con desviación estándar, las letras diferentes en cada columna indican diferencias significativas entre plantas crecidas en sombra y sol. n=6

Los valores de los parámetros derivados de las curvas de respuesta a la luz: Asimilación máxima de CO₂ (A_{max}), punto de compensación a la luz y punto de saturación a la luz (Cuadro 4), permiten observar la respuesta de aclimatación a los dos ambientes contrastantes de luz. Es decir, el punto de saturación para las plantas de luz alta en promedio es el doble de las que están a la sombra, lo mismo ocurre con el punto de compensación de luz. Sin embargo la capacidad fotosintética no se duplica, aunque es significativamente mayor. Esto indica que aunque las plántulas de *A. lutescens* nacen y crecen en un ambiente muy sombreado (sotobosque) y son de crecimiento lento, pueden adaptarse con relativa facilidad a claros o media sombra. Una estrategia observada durante el periodo de aclimatación, fue que las plántulas tiraron sus hojas formadas en la sombra cuando se colocaron en el ambiente de luz alta y produjeron nuevos brotes con características morfológicas y fisiológicas diferentes (hojas más pequeñas, coriáceas, mas pubescentes y con un color verde menos intenso que el de las plantas de sombra (Figura 18), que les permitió ser funcionales en esta nueva condición.

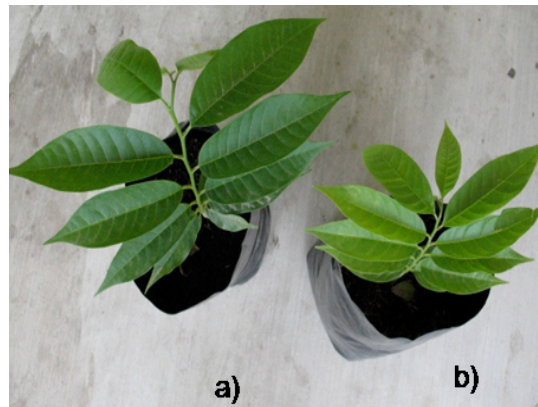


Figura 19. Plantas crecidas en a) condiciones de luz baja (10% de luz solar) y b) plantas crecidas en luz alta (50% de luz solar).

Ganancia de carbono en plántulas y árboles jóvenes

La actividad fotosintética de las plántulas de *A. lutescens* es baja en condiciones de sol, en ningún caso rebasa los 9 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ (Figura 19). Sin embargo, esta actividad es todavía menor en las plantas que crecen bajo un 10% de luz (4.6 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$).

El tiempo de fijación de carbono en plántulas expuestas a la luz alta es de 11 horas diarias y está en función de las condiciones ambientales. Entre las 9:00 y 12:00 horas se observó la máxima asimilación de carbono, que disminuyó cuando la temperatura y la intensidad luminosa fueron más altas. Las plantas aclimatadas a la sombra, iniciaron su actividad fotosintética después de las 9:00 hrs alcanzando un tiempo máximo de siete horas diarias de fijación de carbono, la asimilación máxima se presentó entre las 13:00 y las 15:00 hrs (Figura 20).

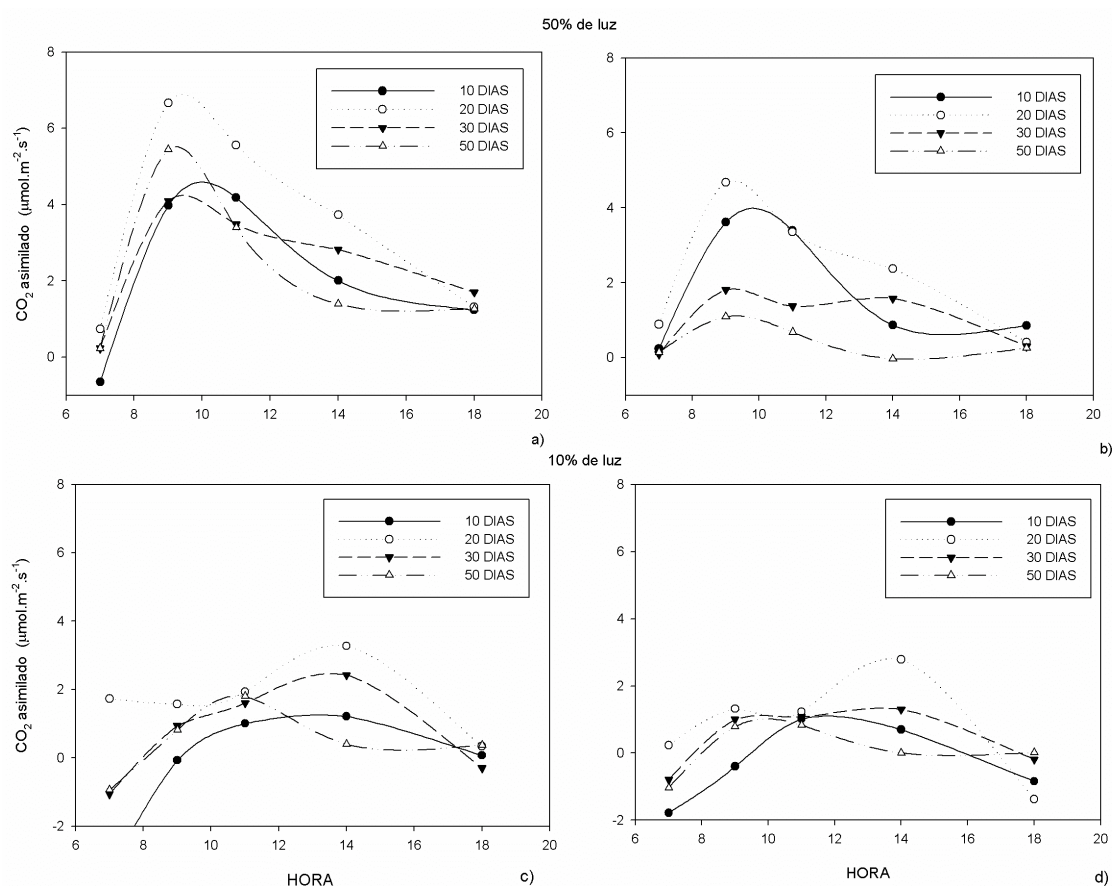


Figura 20. Marchas diurnas de fotosíntesis de plántulas de *A. lutescens* crecidas en el sombreadero en diferentes tratamientos sin riego (0, 10, 20, 30 y 50 días sin riego) y de luz. a y b, plantas bajo sol, c y d= plantas bajo sombra.

Los tratamientos de estrés hídrico redujeron paulatinamente la fijación de CO₂; a los 10 días sin riego la asimilación diurna de carbono disminuyó 23.89 %, a los 23 días sin

riego 50.29% y a los 50 días sin riego la asimilación bajó 85.23% con respecto a sus testigos del mismo día ($P= 0.001$) (Fig. 21).

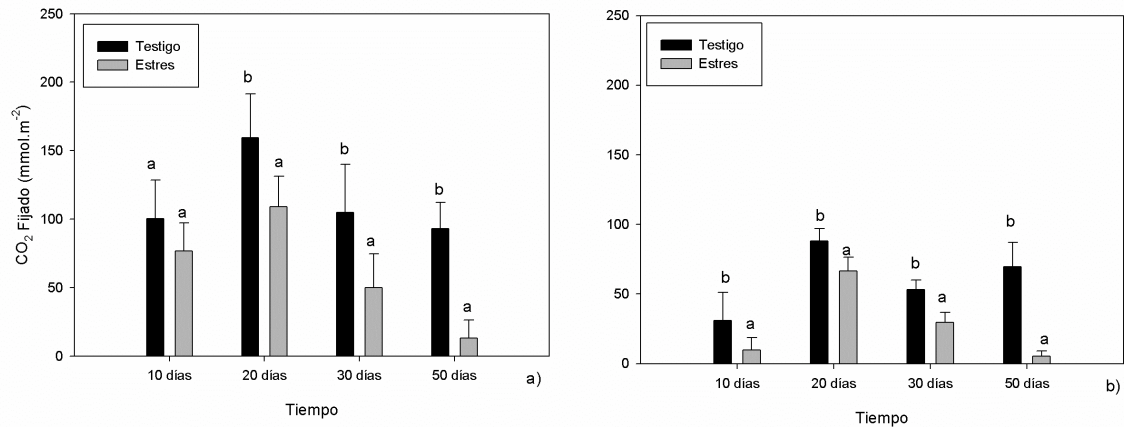


Figura 21. Ganancia de carbono diaria en plántulas de *A. lutescens* expuestas a dos condiciones de luz a) Sombra y b) Sol, en los tratamientos sin riego (0, 10, 20, 30 y 50 días sin riego). MANOVA $P=0.0001$ $n=10$, MANOVA $P=0.01$

Se midieron una vez al mes, durante tres meses las marchas diurnas fotosintéticas con la finalidad de obtener, en condiciones naturales, la ganancia diaria de carbono. En árboles jóvenes sembrados en el campo experimental, las plantas formaron parte del sotobosque, donde el ambiente lumínico es dinámico de modo que, durante breves periodos de tiempo (sunfleks), la Radiación Fotosintéticamente Activa (PAR) no excedió los $400 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{S}^{-1}$ (Figura 22); a medio día fue cuando se encontró la actividad fotosintética más alta. *Annona lutescens* fotosintetizó activamente durante los dos primeros meses de sequía y al tercero cuando se inició la senescencia, la fotosíntesis se redujo prácticamente a cero ($P=0.001$).

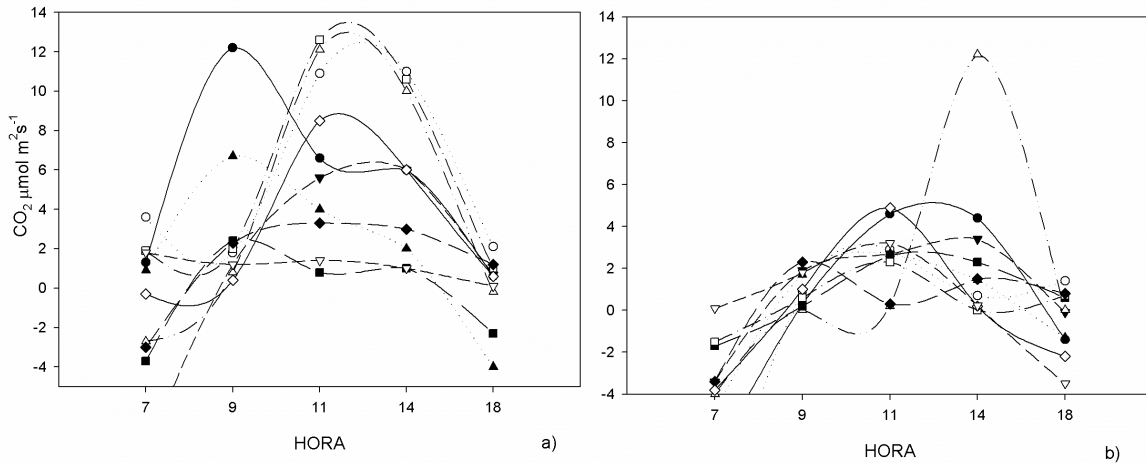


Figura 22. Marchas diurnas de asimilación de CO₂ en 10 plantas jóvenes de *A. lutescens* sembradas en el sotobosque del campo experimental (SBC) a) octubre y b) noviembre.

La ganancia de carbono diaria durante el primer mes de sequía fue significativamente mayor que durante el segundo mes de sequía y durante el tercer mes se redujo a 0. Este decremento observado en la asimilación de carbono, se relaciona fuertemente con la reducción del potencial hídrico (Figura 22) que se observó con el aumento de la sequía, ambas variables indican que las plantas están presentando un estrés hídrico ligero durante el segundo mes (-1.8 ± 0.27 MPa), moderado durante el tercer mes (-2.64 ± 0.25 MPa) y muy severo ya en el cuarto (-3.8 ± 0.26).

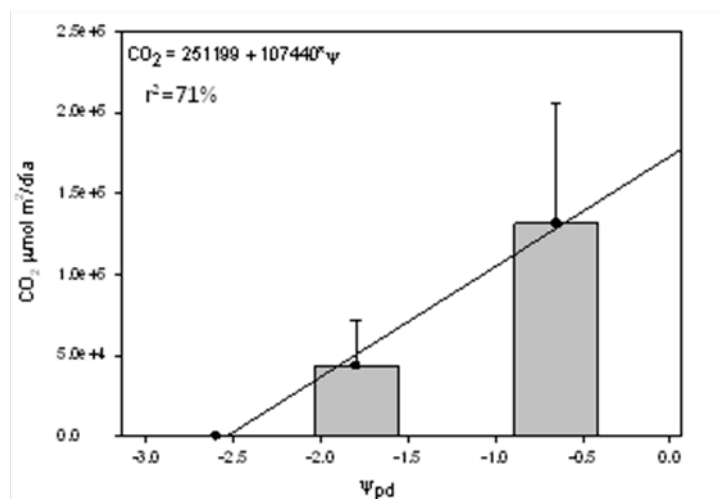


Figura 23. Asimilación diaria de carbono y su relación con la disminución del potencial hídrico en plantas jóvenes de *A. lutescens* sembradas en el sotobosque del campo experimental. $Y = 251199 + 107440X$, correlación (r^2) $n=10$, $P = 0.0085$

5.3 Variación estacional del contenido de liriodenina en árboles adultos, plantas jóvenes y plántulas de *Annona lutescens*

Árboles adultos y jóvenes

Durante el año, se encontró liriodenina en las raíces, los tallos y las hojas de árboles adultos y jóvenes de *A. lutescens*. Las concentraciones más altas de liriodenina se encontraron en las raíces de árboles adultos y jóvenes.

En los tallos y hojas, la liriodenina fue escasa durante el ciclo anual. En algunos meses, solo se encontró en concentraciones trazas. Se advierte que, mientras aumenta la liriodenina en las raíces en las hojas disminuye en una relación inversa ($r = -0.52$, $P = 0.0226$). En algunos meses no se cuantificaron hojas debido a la caducidad foliar (febrero-mayo) (Figura 24).

En la época de sequía en árboles adultos (diciembre, febrero y abril), se encontró en las raíces un incremento significativo del alcaloide liriodenina (Figura 24), que puede ser hasta 300 veces más que la encontrada en tallos y hojas, mientras que, durante la temporada de lluvia, la liriodenina sólo alcanza concentraciones menores a $70 \mu\text{molg}^{-1}$, con diferencias significativas ($F = 6.4$, $P = 0.004$) entre las estaciones. El análisis de LSD (separación de medias por distancias mínimas) muestra diferencias entre algunos meses de la temporada de lluvia (Cuadro 5). La mayor concentración se encontró al final de la estación seca (marzo y abril), cuando las frutas están madurando, mientras que la concentración más baja se presentó en el inicio de la temporada de lluvia (mayo), cuando ya pasó la fructificación y se inicia la foliación. No hay relación entre la variación de temperatura, las precipitaciones y la acumulación de liriodenina ($r = 0.32$, $F = 1.58$, $P = 0.228$).

Cuadro 5. Variación mensual de la concentración de lirioidenina ($\mu\text{mol g}^{-1}$) durante las fenofases vegetativas y reproductivas (con la escala BBCH, representada por códigos de dos dígitos) en raíces de árboles jóvenes y adultos de *A. lutescens*.

Estación / Mes	Fase fenológica (BBCH)			Raíces		
	Vegetativa Árboles jóvenes		Reproductiva Arboles adultos	Lirioidenina $\mu\text{mol.g}^{-1}$		
				Árboles jóvenes	Arboles adultos	
Lluvias	mayo	00	11	-	54.86 \pm 0.19 c	0.682 \pm 0.03e
	junio	11-15	11-15	-	3.79 \pm 0.64 cd	33.26 \pm 11.1 cd
	julio	12-18	12-18	-	4.85 \pm 0.49cd	31.59 \pm 10 cd
	agosto	13-19	12-19	-	3.98 \pm 0.39 cd	37.98 \pm 6.67 cd
	septiembre	15-19	13-19	51	3.52 \pm 0.73 cd	33.06 \pm 7.6 cd
	octubre	15-19	13-19	51-5	1.59 \pm 0.52 e	66.28 \pm 7.4 b
Seca	noviembre	18-19	18-19	*55-59 y 61-62	7.62 \pm 1.39 cd	52.71 \pm 11.8 bc
	diciembre	91	18-19	*63-69 y 71	0.24 \pm 0.06 e	340.32 \pm 75.7a
	enero	91-98	29	71-72	227.30 \pm 17.7 b	12.21 \pm 1.01d
	febrero	99-00	91-95	81	264.08 \pm 53.5 b	344.3 \pm 100a
	marzo	00	95-99	81-84	278.26 \pm 18.9 b	182.17 \pm 27.5 a
	abril	00	99	85-89	775.53 \pm 62.39 b	377.56 \pm 94.9 a

Datos del contenido mensual del contenido de lirioidenina. Medias y desviaciones estándar, n=6, $P \leq 0.0000$, las letras diferentes muestran diferencias estadísticas de acuerdo al análisis LSD (a, b, c, d, e)

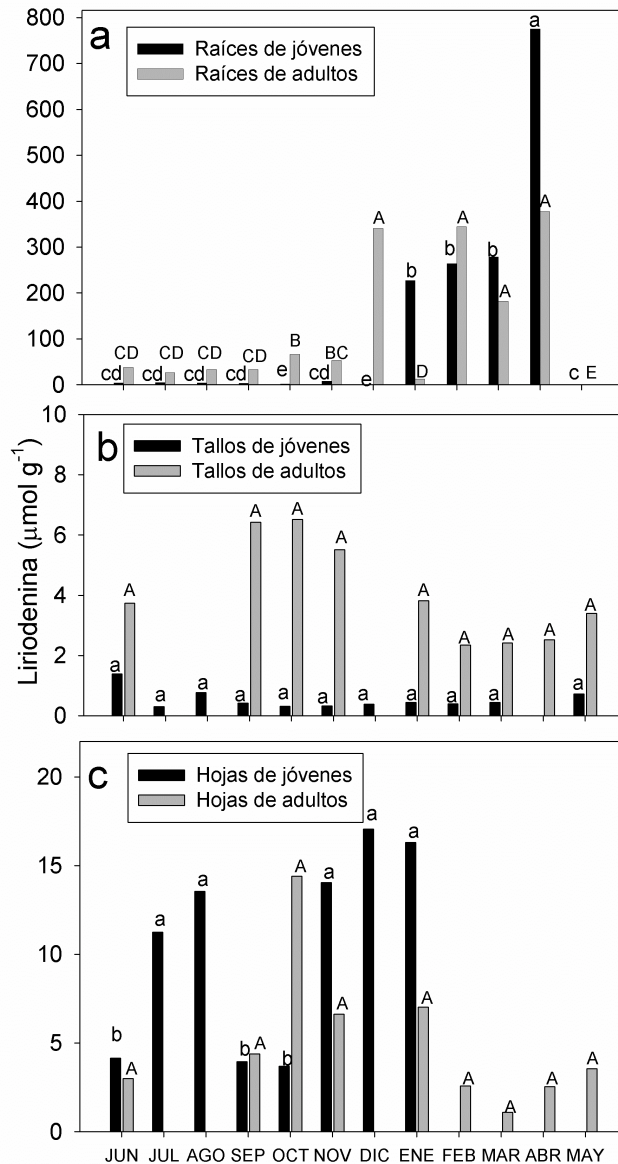


Figura 24. Contenido mensual de liriodenina en raíces, tallos y hojas de plantas jóvenes y adultas de *A. lutescens*. Los valores presentados son las medias de árboles adultos (n=6) y de las plantas jóvenes (n=5) las letras diferentes muestran diferencias significativas mensuales, minúsculas para jóvenes y mayúsculas para adultos (LSD-Test; P<0.05)

Durante la sequía, la concentración de liriodenina aumenta a 377 µmol/g de tejido en las raíces (P=0.0001). En hojas no hay variación significativa de liriodenina entre las estaciones (P= 0.06) y en tallos hay un incremento en la estación lluviosa (P=0.0135); aunque el incremento no es tan grande como el que se presenta en raíces.

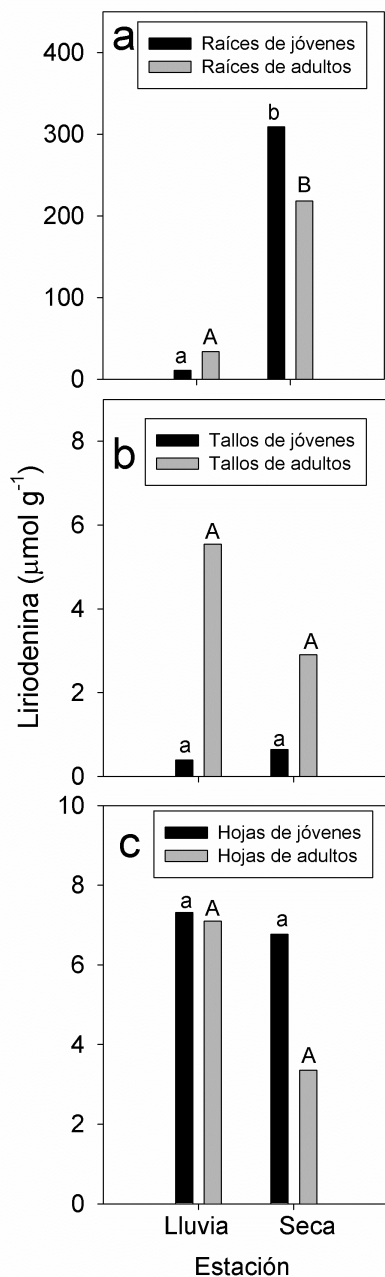


Figura 25. Contenido de liriodenina en árboles maduros y plantas jóvenes de *A. lutescens* en las estaciones de lluvia y sequía. n=36, las letras diferentes representan las diferencias significativas entre las estaciones minúsculas para jóvenes y mayúsculas para adultos.

Árboles jóvenes

En las raíces de los árboles jóvenes se encontró variación en la concentración mensual y estacional de liriodenina; durante la estación seca, el contenido de liriodenina

fue significativamente mayor al de la temporada de lluvias ($P=0.001$) que corresponde al mismo incremento de los árboles adultos. En contraste con los árboles adultos, el incremento de liriodenina se observó desde el cuarto mes de sequía y varió de 9.69 $\mu\text{mol/g}$ en la estación lluviosa a 225.54 $\mu\text{mol / g}$ (26 veces) ($P=0.0001$), pero con alta variabilidad durante el periodo de octubre a diciembre; en la estación seca. En abril se presentó un nuevo incremento (775.53 $\mu\text{mol / g}$) (Figura 25).

Durante la estación lluviosa, el potencial hídrico se mantuvo alto y el nivel de liriodenina bajo. Cuando inicia la sequía el potencial hídrico comienza a disminuir progresivamente, hasta que a los 63 días alcanza el potencial hídrico crítico que es cuando la ganancia de carbono disminuye en un 75 %, (diciembre) después de este punto es cuando la liriodenina comienza a incrementarse en raíces desde 0.24 $\mu\text{mol.g}$ en diciembre cuando el Ψ_{pd} está en -2.57 MPa, a 227 $\mu\text{mol.g}$ en enero cuando el Ψ_{pd} es de 3.8 MPa. El proceso de senescencia foliar inició también en enero y en febrero, ya habían perdido más del 70% de sus hojas, para abril algunos de los tallos de los árboles jóvenes ya estaban secos, pero rebrotaron con las primeras lluvias de mayo. Al analizar las temporadas de sequía y de lluvia, sí hubieron diferencias significativas ($P=0.0001$), pero por la variación entre el primer periodo (octubre-diciembre) y el segundo (enero-abril) en el análisis se discriminaron los primeros meses para reducir la variabilidad de los datos ($P=0.0001$).

Variación del contenido de liriodenina en plántulas de Annona lutescens sometidas a condiciones de estrés y bajo dos condiciones de luz

En las plántulas crecidas en el sombreadero, también se encontraron concentraciones pequeñas de liriodenina en tallos y hojas, sin diferencias significativas en las concentraciones; ni la luz ni el régimen hídrico de sequía influyeron en la variación de la liriodenina ($P=0.06$).

En las raíces hubo un incremento significativo de la concentración de liriodenina en plántulas de ambas condiciones lumínicas en estrés y la interacción de ambos factores inducen este incremento que es mayor en el grado más severo de la sequía, aumentando de 15.81 a 177.7 $\mu\text{mol.g}$ de tejido, sin embargo, el incremento es menor que en los árboles jóvenes y en adultos.

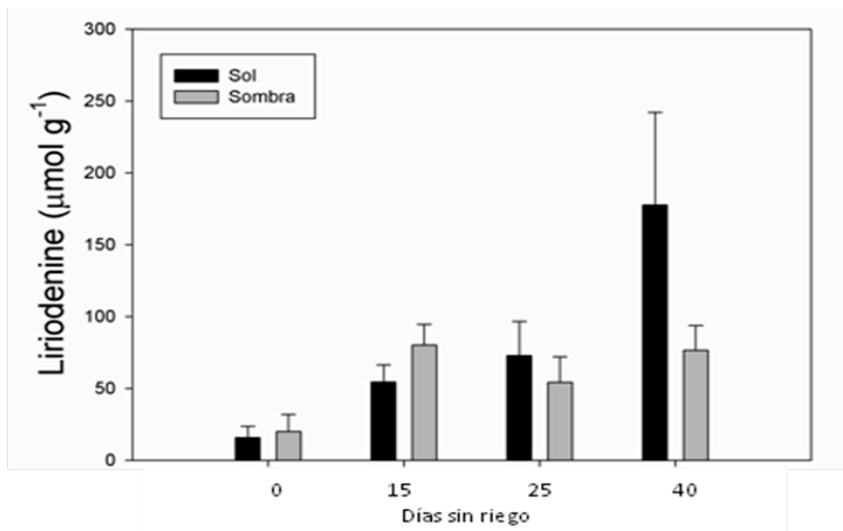


Figura 26. Concentración de liriodenina en raíces de plántulas de *A. lutescens* durante los tratamientos sin riego (0, 15, 25 y 40 días sin riego) sol (50% de luz) sombra (10% de luz). n=6, P=0.0001.

Al relacionar el carbono capturado durante el día con la cantidad de liriodenina en plántulas crecidas bajo el sol, se observó que estas variables están inversamente relacionadas ($r=-0.8234$, $P=0.001$)

Hay una disminución de la ganancia de carbono que también coincide con la disminución del potencial hídrico (Ψ_{pd}) durante la progresión del estrés, mientras que se incrementa el contenido de liriodenina. En este caso, las plántulas alcanzan el potencial hídrico crítico (-2.6 MPa) a los 46 días sin riego.

La intensidad de la luz también tiene un efecto en el aumento de liriodenina cuando interactúa con el estrés hídrico severo, incrementando significativamente el contenido de liriodenina en raíces, sin embargo, la intensidad lumínica por sí misma no afecta el contenido del alcaloide, ya que en los testigos de ambas condiciones lumínicas, se presentaron contenidos similares de liriodenina y las variaciones no fueron significativas (Figura 26).

6. Discusión

La Selva Baja Caducifolia es un ecosistema con condiciones climáticas estacionales contrastantes, por lo que las especies que la habitan han desarrollado adaptaciones fisiológicas y fenológicas para posibilitar su sobrevivencia, entre ellas las relacionadas con el metabolismo secundario. *Annona lutescens*, es un árbol que por sus adaptaciones a este medio permitió investigar la influencia de las condiciones ambientales sobre la variación de la concentración del alcaloide liriodenina.

Las plantas en la Selva Baja Caducifolia desarrollan varias estrategias fenológicas, fisiológicas y reproductivas que les permiten sobrevivir a las mismas condiciones ambientales, incluso especies relacionadas pueden responder de distinta forma, por ejemplo *A. lutescens* (objeto de estudio) y *A. diversifolia*. Mientras que *A. lutescens* florece al inicio de la temporada de sequía, fructifica al final de la estación seca y sus semillas pueden germinar inmediatamente después de la fructificación, *A. diversifolia*, florece al final de la temporada seca, fructifica al final de las lluvias o al inicio de la temporada seca y sus semillas permanecen latentes al menos cuatro meses o hasta que se presenta la nueva estación lluviosa (González-Esquinca *et al.* 1997). *A. lutescens* es una especie cuyas estrategias de reproducción y supervivencia están correlacionadas con las condiciones climáticas del lugar, posibilitando establecer modelos de estudio para incrementar el conocimiento sobre las respuestas fisiológicas y morfológicas que las plantas han desarrollado a lo largo de la historia evolutiva ante un ambiente cambiante, incluyendo los cambios asociados al metabolismo secundario que podrían cumplir una función importante en la adaptación al ambiente.

Los datos encontrados para árboles adultos demuestran que el desarrollo de las flores y la floración de *A. luteceus*, que ocurren en los meses lluviosos y al inicio de la sequía, coincide con una disminución significativa del contenido de liriodenina en las raíces, similar a lo que sucede en plantas de ambientes tropicales como *Psychotria brachyceras* (Schäffer *et al.* 2004) y *P. umbellata* (Paranhos 2009), en las que la cantidad de alcaloides totales durante el desarrollo de las flores disminuye en las partes vegetativas y se incrementó en las flores. Adler (2000) Schäffer *et al.* (2004) y Paranhos (2009) atribuyen la

el contenido de alcaloides en estos órganos al posible papel defensivo que pudieran tener para proteger a las partes reproductivas, necesarias para la supervivencia. En contraste, el contenido de liriodenina en hojas (10.5 ± 5.7) y tallos (0.49 ± 0.3), en esta misma etapa fenológica, no sufrió mayores cambios, sin embargo en este trabajo no se obtuvieron datos que corroboren la presencia de alcaloides en las flores y de su posible importancia biológica.

En *A. lutescens*, el desarrollo de los frutos fue simultáneo con la pérdida de hojas. Durante este periodo se observó una pequeña disminución de liriodenina en los tallos y un aumento significativo en las raíces (de 34 a $218 \mu\text{mol.g}^{-1}$) que corresponde también a los meses de sequía más severos (febrero, marzo y abril) en los que la etapa de fructificación se completa. La misma tendencia se encontró en plantas jóvenes durante la temporada seca, que no tienen todavía producción de flores y frutos, y en las plántulas bajo déficit de riego, de ahí que la etapa fenológica reproductiva parece no ser tan influyente en la producción de liriodenina como los cambios climáticos estacionales. En otras especies también se han relacionado los factores ambientales (temperatura, radiación y precipitación) con la dinámica de algunos alcaloides, por ejemplo en *Murraya euchrestifolia* (Wu 1996) y en *Hydrastis canadensis* (Duglas *et al.* 2010) la concentración de alcaloides varió de acuerdo a las estaciones del año, también en *Crinum macowanii*, *Achnatherum robustum*, *Papaver somniferum*, *Merendera montana* la variación de alcaloides y su distribución órgano-específica se relacionó con los cambios de temperatura, luz, altitud y con las precipitaciones que ocurren durante cada estación (Elgorashi *et al.* 2003; Szabó *et al.* 2003; Gómez *et al.* 2003) por ejemplo, en *Merendera montana* Gómez *et al.* (2003) se encontró una mayor concentración de alcaloides en las hojas que en los cormos, con variaciones durante las estaciones del año y con los diferentes lugares de cosecha, obteniendo la menor concentración en climas mediterráneos (0.217-0.174 % del peso seco) y la mayor en climas subalpinos (0.302-0.324 % del peso seco). Nuestros datos indican que también en *A. lutescens* hay una variación órgano-específica y temporal de la liriodenina, las menores concentraciones se encontraron en tallos y hojas de árboles jóvenes y adultos ($0.3051 \mu\text{mol.g}^{-1}$ en tallos)

mientras que la mayor cantidad de liriodenina se presenta en las raíces en la estación seca (hasta 775 $\mu\text{mol.g}^{-1}$ en abril), que coincide con la senescencia y caducidad de las hojas.

En ambientes con estaciones climáticas extremas, la sequía afecta de manera más severa a las plantas jóvenes. Se ha reportado una mortalidad hasta del 80% en plantas jóvenes de ambientes mediterráneos cuando la sequía se prolonga más de 120 días (Valladares *et al.* 2004). Contrariamente, las plantas jóvenes (dos años de edad) de *A. lutescens*, sembradas en el campo, presentan una mortalidad menor (11%), siendo más resistentes a la sequía que las plantas jóvenes de otras especies por ejemplo, Tyree *et al.* (2003) estudiaron la tolerancia a la desecación y la rehidratación de plántulas de cinco especies de una SBC, obteniendo mortalidad alta cuando las plantas se mantienen en invernadero y una tasa de mortalidad menor cuando están plantadas en el sotobosque, lo que indica la importancia del microclima para la supervivencia de las plantas.

En las plantas jóvenes, fue factible caracterizar el estatus fisiológico durante un ciclo anual. En la estación lluviosa tanto los niveles de liriodenina como el potencial hídrico se mantuvieron estables, sin variaciones significativas. Mientras que, según progresa la sequía en el campo, los potenciales hídricos al amanecer y la captura de carbono disminuyen al mismo tiempo que se encuentran variaciones significativas en la acumulación del alcaloide liriodenina.

Al relacionar los potenciales hídricos al amanecer y la ganancia de carbono se determinó el potencial hídrico crítico (cuando la ganancia de carbono disminuye en un 75%) que las plantas jóvenes de *A. lutescens* alcanzan a los 60 días sin lluvia (-2.3 MPa). En otras especies del mismo género, también se han reportado potenciales hídricos críticos similares, en Atemoya (*Annona cherimola* x *Annona escuamosa*) fue de -2.5 MPa (George y Nilsen, 1988), para *A. diversifolia* de -2.37 MPa (Tijerina-Chavez *et al.* 2005) y para *A. escuamosa*, según Rodríguez *et al.* (2010) se presentó una disminución moderada de la conductancia estomática de -1.3 MPa. En *A. lutescens*, después de que se alcanza potencial hídrico crítico, la liriodenina comienza a incrementarse en raíces desde 0.24 $\mu\text{mol.g}$ (diciembre cuando el Ψ_{pd} está en -2.57 MPa), a 227 $\mu\text{mol.g}$ (enero cuando el Ψ_{pd} es de -3.8 MPa), estos datos sugieren que el *A. lutescens* requiere llegar a un estado de

estrés hídrico moderado, (tomando en cuenta al potencial hídrico crítico), para que activen las señales que posibilitan el incremento de liriodenina en las raíces. Ninguno de los trabajos encontrados relaciona el aumento de algún alcaloide con los potenciales hídricos o con la ganancia de carbono, en este estudio, se correlaciona negativamente la disminución del potencial hídrico con el incremento de liriodenina ($r=-0.79$).

En los experimentos de plántulas con ambientes de luz (sol y sombra) y riego controlado (déficit hídrico ligero, moderado y severo), se presentaron tendencias similares en las respuestas fisiológicas a las de los plantas jóvenes. Antes del experimento, se registraron los valores fotosintéticos por medio de curvas de respuesta a la luz y curvas presión volumen para caracterizar a las plántulas en ambos ambientes lumínicos bajo condiciones hídricas normales. Se encontró en plántulas de *A. lutescens* puntos de compensación y saturación bajos en ambas condiciones lumínicas, siendo el punto de saturación de plántulas aclimatadas a sol más alto, los valores encontrados no son comparables con los de especies adaptadas a estas condiciones. También hay diferencias estadísticamente significativas en A_{max} de las plantas en los dos ambientes, debido a las respuestas plásticas de aclimatación a los ambientes de luz, datos que sugieren que *A. lutescens* es una especie que se puede adaptar a ambientes lumínicos distintos. Los parámetros indican que aunque las plántulas de *A. lutescens* nacen y crecen en un ambiente sombreado (sotobosque) y son de crecimiento lento, pueden adaptarse con relativa facilidad a claros o a media sombra; una estrategia observada durante el periodo de aclimatación, fue que cuando las plántulas se colocaron en el ambiente de luz intensa todas desecharon sus hojas de sombra y produjeron nuevos brotes con características morfológicas y fisiológicas diferentes, entre ellas, una menor área foliar y más pubescencia, lo que les permitió ser funcionales en esta nueva condición. En ningún caso la tasa de fijación instantánea de C superó los $8 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ en plántulas crecidas bajo el 50% de luz y los $4.6 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ en plantas bajo el 10% de luz solar. No se encontraron datos sobre tasas de fijación de C en plántulas crecidas bajo distintos ambientes, sin embargo hay datos de especies de distintos Bosques Tropicales Secos que señalan tasas de A_{max} variables, algunas similares a las encontradas en *A. lutescens*, por ejemplo Wen-

Chen *et al.* (2009) reportaron que especies como *Drypetes indica*, *Aleurites moluccana* y *Codiaeum variegatum*, de un BTS en China presentaron valores de Amax de 4.29, 11.79 y 7.22 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ respectivamente, mientras que *Hevea brasiliensis*, *Macaranga denticulata* y *Bischofia javanica* presentaron valores mayores (14.18, 16.72, 14.35 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ respectivamente), Mengistu *et al.* (2011) reportaron valores de 14.89 a 22.14 en dos localidades de BTS de África para *Boswellia papyrifera* y Kenzo *et al.* (2012) registró en un Bosque tropical seco de Cambodian valores de 3.22-7.70 en *Calophyllum calaba* y de 6.25-8.01 en *Anisiptera costata*; en ambientes mediterráneos las tasas fotosintéticas de árboles adaptados al sol son mayores que las de *A. lutescens*, por ejemplo en el almendro de 14 a 18 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ (Herralde 2000), y en algunos árboles de la Laurisilva las tasas máximas (Amax) están en un intervalo de 12 a 20 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$.

En las plántulas, el potencial hídrico de los testigos, se mantuvo en -0.6 MPa en plantas crecidas bajo la sombra y en -0.8 MPa en plantas expuestas a mayor cantidad de luz. En las plántulas sin riego, el potencial hídrico disminuyó paulatinamente, el potencial hídrico crítico se observó a los 43 días sin riego y a los 50 días se registraron potenciales de -4 MPa. Aunque *A. lutescens* presenta valores parecidos a los reportados por Cordeiro *et al.* (2009) en plántulas de *Swietenia macrophylla* que en condiciones de riego constante tienen un potencial hídrico de -0.4 MPa, y a los 20 días sin riego -3.52 MPa, *A. lutescens* demuestra ser más resistente a la falta de agua.

La correlación negativa entre la ganancia de carbono, la disminución del potencial hídrico y la acumulación de liriodenina es ligeramente diferente en plantulas crecidas en los dos ambientes lumínicos, cuando crecen bajo sombra, el potencial hídrico y la fotosíntesis disminuyen paulatinamente durante todo el periodo de déficit hídrico, pero aunque hay un incremento significativo de liriodenina en el estrés hídrico ligero, éste se mantiene en niveles similares durante los cuarenta días sin agua; en plántulas que crecen bajo sol, hay una correlación negativa entre la ganancia de liriodenina y el incremento de liriodenina en raíces ($r=-0.823449$) pero la correlación se incrementa mientras progresa el estrés hídrico obteniendo concentraciones mayores de liriodenina a los 40 días sin agua; así, aunque la deficiencia hídrica es un factor determinante para que los contenidos de

liriodenina aumenten en las raíces, la interacción de la disponibilidad hídrica con la alta radiación es la que parece regular su contenido exponencial en raíces (de 15.57 $\mu\text{mol g}^{-1}$ en los testigos hasta 177 $\mu\text{mol g}^{-1}$ en plántulas con estrés severo), es notable que el contenido de liriodenina no varía significativamente en los tallos y en las hojas implicando quizá, que el proceso de regulación se lleva a cabo en las raíces. Esta respuesta parece estar generalizada en todas las etapas de desarrollo de *A. lutescens* ya que los aumentos del contenido de liriodenina en juveniles y adultos también se dan en las raíces cuando la temporada de sequía avanza y los árboles han perdido gran parte de su follaje, dejando pasar del 40 al 60% de luz solar, contrario a lo que ocurre en la temporada de lluvia cuando la cantidad de luz en el sotobosque de las SBC es menor al 10%.

El crecimiento de las plantas es un proceso dinámico que se ve afectado por las las condiciones ambientales; con el estrés hídrico, la tasa de desarrollo de las plantas disminuye debido a que la planta gasta más energía en la activación de respuestas frente al estrés, que en el crecimiento (Chikhy Jones, 1994). Por lo general, el contenido de biomasa en una planta es diferente según su hábito de vida (Camargo-Rodriguez y Rodriguez-Lopez 2006), en plantas de *A. lutescens* crecidas bajo sol, el incremento de biomasa, raíces, tallos y hojas es similar, en contraste, las plantas crecidas bajo la sombra, las hojas además de ser notoriamente mas grandes su biomasa es mayor y la de las raíces menor; Krause *et al.* (2012) no reportaron cambios significativos cuando algunas especies adaptadas a la sombra, como *Ormosia macrocalyx* y *Tetragastris panamensis* se sometieron a luz intensa, sin embargo si señalaron variaciones en el contenido de algunas sustancias como el Tocoferol y el radio entre la clorofila a y b. En *A. lutescens* si hubieron cambios entre las plántulas que crecieron en condiciones de sol y sombra, obteniendo un incremento significativo en el área foliar bajo sombra, en este caso, tanto en condiciones de riego como de estrés hídrico las plántulas mantienen los recursos destinados al crecimiento y los necesarios para el incremento de la liriodenina en raíces. Los datos de crecimiento de *A. lutescens* concuerdan con el reporte de que la cantidad de radiación afecta significativamente a la talla foliar de *Toona ciliata* cuyas áreas son mayores en ambientes sombreados que en ambientes abiertos, expandiendo sus hojas 116 % cuando

tienen poca irradiación Carinds-Murphy *et al.* (2012), otros autores como Sack *et al.* (2004) sustentan también los cambios en la talla de las hojas y en la densidad estomática cuando las plántulas crecen en condiciones de sombra.

La severidad del estrés hídrico también influyó en la cantidad y distribución de la biomasa. En las plantas crecidas bajo sol no hubo una asignación equivalente para raíces tallos y hojas; en los primeros periodos de estrés la proporción de raíz aumentó significativamente con respecto a las hojas. Larcher (2000) y Valladares *et al.* (2006) argumentan que una de las estrategias que le permite a la planta tener más hidroestabilidad es la combinación de raíces profundas y baja conductancia estomática, por lo que tanto el aumento de biomasa en raíces y la baja actividad fotosintética durante el estrés hídrico en *A. lutescens* pueden considerarse estrategias para la búsqueda de nuevas fuentes de agua. El crecimiento relativo y la asignación de biomasa, al igual que la producción y acumulación organoespecífica y temporal de la liriodenina, son afectadas por el estrés hídrico y en menor proporción por la luz (Figuras 14 y 15), desde la primera etapa de estrés.

En la Selva Baja Caducifolia, se presenta una temporada de sequía que puede afectar la productividad y el desarrollo de las plantas (Hsiao, 1973). Para adaptarse a estos ambientes contrastantes las plantas responden con estrategias hídricas que según Valladares (2006) están asociadas a respuestas morfológicas, anatómicas fisiológicas y bioquímicas, enfocadas al mantenimiento del estatus hídrico.

Versules *et al.* (2006) proponen como elementos de respuesta ante el estrés, al aumento del módulo de elasticidad y al incremento del potencial osmótico. Una de las respuestas al estrés es el ajuste elástico de las células que permite mantener por un tiempo mayor el agua en la planta, si la pared es muy rígida, con una pérdida de agua hay una disminución notoria en el CHR y del Ψ_w (Sánchez-Díaz y Aguirreola 2008). En las plantas de *A. lutescens* crecidas tanto en el sol como en la sombra, con el estrés ligero y moderado aumenta el módulo de elasticidad, disminuye el potencial osmótico, y disminuye la turgencia.

Annona lutescens presenta mecanismos de evitación con estrategias ahorradoras de agua que se caracterizan, según Levit (1980) y Valladares *et al.* (2004) como la reducción del potencial hídrico, inducir el cierre estomático y cuando la sequía se prolonga las plantas tiran sus hojas con el fin de ahorrar agua. En las plántulas también se documentaron por medio de las curvas presión-volumen, algunas estrategias de tolerancia, como el ajuste osmótico y el ajuste elástico que les permiten seguir siendo funcionales aun reduciendo su contenido hídrico. Finalmente el aumento de lirioidenina en las raíces constituye una respuesta clara ante los periodos de estrés hídrico y lumínico.

7. Conclusiones

Anona lutescens tiene características típicas de plantas adaptadas a condiciones ambientales contrastantes, y sus estrategias de supervivencia ante circunstancias desfavorables del medio están acopladas a las condiciones climáticas de la SBC. Los cambios fenológicos y fisiológicos de *A. lutescens* que se observaron en este estudio (ganancia de carbono, estatus hídrico y contenido de liriodenina) estuvieron relacionados con los cambios climáticos estacionales de la Selva Baja Caducifolia, siendo la disponibilidad hídrica y la radiación los factores que más impactan en el incremento del alcaloide liriodenina .

A. lutescens presenta estrategias de evitación (ahorradora) y de tolerancia para enfrentar la sequía estacional. Los mecanismos de evitación incluyen: 1) el cierre estomático, 2) la captura de carbono restringida a unas pocas horas de la mañana, 3) el inicio de la senescencia foliar y la consecuente pérdida de hojas y los mecanismos de tolerancia que se encontraron fueron el ajuste osmótico y el ajuste elástico.

El aumento de liriodenina en las etapas más severas de la sequía y en el estrés hídrico severo permite proponer que esta molécula cumple también un papel en las estrategias para enfrentar estas condiciones desfavorables.

La liriodenina se encontró en plántulas, plantas jóvenes y adultas, con una distribución órgano-específica: la mayor cantidad se cuantificó en las raíces, mientras que en los tallos y en las hojas las cantidades fueron mínimas. En las plántulas expuestas a las dos condiciones de luz y en plantas jóvenes, la liriodenina presentó proporciones similares, mientras que en adultos el alcaloide se encontró en mayor concentración que en plántulas y jóvenes.

En los árboles adultos se registraron cambios sustanciales en el contenido de liriodenina a lo largo de un ciclo anual. Estas variaciones, en un principio se creyeron relacionadas con los eventos fenológicos que se presentaban ya que el mayor aumento del alcaloide en raíces, se observaba en la etapa de fructificación y el mayor decremento cuando los árboles comenzaban la etapa de foliación. Sin embargo, este estudio demostró que la variación de la liriodenina está también influenciada por los factores ambientales.

Se comprobó que la luz es un factor que puede incidir también en el contenido del alcaloide en las raíces, en las plantas expuestas al 10% de luz solo el incremento de lirioidenina con el estrés hídrico fue similar en todos los tratamientos, mientras que en las plántulas expuestas al 50 % de luz en el tratamiento de 40 días sin riego, el contenido del alcaloide se incrementó más del 200% con respecto al testigo.

Al igual que en otras especies, la producción de alcaloides (lirioidenina) en el periodo de estrés abiótico, se incrementa durante el periodo de sequía, sin embargo, la acumulación del alcaloide no depende directamente de la actividad fotosintética ni de la fenofase de la especie.

8. Bibliografía

- Abrajan HP, Diaz CA, De La Cruz CI, Luna CLM, Pérez AMC y González EAR (1999) Análisis sobre la producción de alcaloides en *Annona lutescens* en diversas condiciones edafoclimáticas. Memoria del II Congreso Internacional de Anonaceas. Tuxtla Gutiérrez. Chiapas. México. 83
- Acosta JD (1940) 1590: Historia natural y moral de las Indias, en que se tratan las cosas notables del cielo, y elementos, metales, plantas, y animales de las: y los ritos, ceremonias, leyes, y gobierno, y guerras de los Indios. *Sevilla: Juan de Leon*.
- Acosta L (2003) Principios agroclimáticos básicos para la producción de plantas medicinales. *Rev Cubana Plant Med. Vol.8(1)*
- Acuña CW, De-La-Cruz CI y Gonzalez-Esquinca AR (2011) Actividad insecticida de *Annona diversifolia* frente a *Atta mexicana*. En Gonzalez-Esquinca AR, Luna CLM, Gutierrez JJ, Schlie GMA y Vidal LDG (2011) *Annonaceas: Plantas Antiguas, Estudios Recientes*.
- Adler, L. S. (2000). The ecological significance of toxic nectar. *Oikos*, *91(3)*, 409-420
- Alfaro-Romero TJ (2005) Producción de acetogeninas y alcaloides durante la germinación y el desarrollo de *Annona lutescens* Saff. (Annonaceae). Tesis de licenciatura, de la escuela de Biología UNICACH.
- Asada K (2006) Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiology*, *141(2)*, 391-396.
- Aussenac G y Valette JC (1982) Summer water status of *Cedrus-atlantica manetti*, *Quercus-ilex* and *Quercus-pubescens* willd and of some pinetrees on the Mont-Ventoux. *Annales des Sciences Forestieres* (39):41-62.
- Balvanera P, Islas Á, Aguirre E, & Quijas S (2009). Las selvas secas. *Ciencias*, (057).
- Banful BB, Adjei PY, & Achiaa NK (2011). Effect of Seed Drying on Germination Behavior and Seedling Growth of Sweetsop (*Annona squamosa*). *Journal Of Agricultural Science & Technology*. *5(4)*, 443-447
- Becerra J X (2005) Timing the origin and expansion of the Mexican tropical dry forest. *PNAS*. *102(31)*, 10919-10923.

- Bergmann DC & Sack FD (2007) Stomatal development. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 58, 163-181.
- Borchert R (1983) Phenology and control of flowering in tropical trees. *Biotropica*. 15:81-89
- Borchert R (1993) Water status and development of tropical trees during seasonal drought. *Trees*. 8:115-125
- Borchert R (1999) Climatic periodicity, phenology, and cambium activity in tropical dry forest trees. *IAWA Journal*. 20:239-247
- Borchert R, Rivera G and Hagnauer W (2002) Modification of Vegetative Phenology in a Tropical Semi-deciduous Forest by Abnormal Drought and Rain. *BIOTROPICA*. 34:27-39
DOI: 10.1111/j.1744-7429.2002.tb00239.x
- Bradford KJ y Hsiao TC (1982) Physiological response to moderate water stress. pp. 263-324. En: OL Ange, PS Nobel, CB Osmond y H Ziegler (eds). *Physiological Plant Ecology II*. vol. 12B. Springer-Verlag, Berlin.
- Breedlove D.E. Ed. 1995. *Flora of Chiapas. Part 4, Acanthaceae*. California Academy of Sciences, San Francisco.
- Brodribb TJ, Holbrook NM & Gutierrez MV (2002) Hydraulic and photosynthetic co-ordination in seasonally dry tropical forest trees. *Plant, Cell & Environment*, 25(11), 1435-1444.
- Bullock SH, Mooney, HA, & Medina E (1995) *Seasonally dry tropical forests*. Cambridge University Press.
- Camargo Rodriguez, ID, & Rodriguez Lopez N (2006) Nuevas perspectivas para el estudio de asignacion de biomasa y su relacion con el funcionamiento de plantas en ecosistemas neotropicales; New Perspectives to Study the Biomass Allocation and its Relationship with the Functioning of Plants in Neotropical Ecosystems. *Acta biol. colomb*, 11(supl, 1), 75-87.
- Cao KF & Booth EW (2001) Leaf anatomical structure and photosynthetic induction for seedlings of five dipterocarp species under contrasting light conditions in a Bornean heath forest. *Journal of Tropical Ecology*, 17(02), 163-175.

Carins Murphy M R, Jordan GJ, & Brodribb TJ (2012) Differential leaf expansion can enable hydraulic acclimation to sun and shade. *Plant, Cell & Environment*, 35(8), 1407-1418.

Castro-Moreno M (2005) Efecto del estrés hídrico en la biosíntesis de alcaloides y acetogeninas en plántulas de *Annona lutescens* Saff. Tesis de licenciatura. Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas

Cautin R y Agustí (2005) Phenological growth stages of the cherimoya tree (*Annona cherimola* Mill). *Scientia Horticulturae*. 105:491-497

Cavé A, Leboeuf M y Waterman PG (1987) The Aporphinoid Alkaloids of the Annonaceae. En: *Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives* Vol. 5: 133-270. Editado por S. William Pelletier. Editorial. John Wiley and Sons.USA.

Chapin FSIII, Schulze ED and Mooney H. A (1990) The ecology and economics of storage in plants. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 21:423-447

Chatrou LW, Pirie MD, Erkens RH, Couvreur TL, Neubig KM, Abbott JR & Chase M W (2012) A new subfamilial and tribal classification of the pantropical flowering plant family Annonaceae informed by molecular phylogenetics. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 169(1), 5-40.

Chaturvedi R K, Raghubanshi AS & Singh JS (2012) Growth of tree seedlings in a tropical dry forest in relation to soil moisture and leaf traits. *Journal of Plant Ecology*.

Chaturvedi RK, Raghubanshi AS & Singh JS (2011) Leaf attributes and tree growth in a tropical dry forest. *Journal of Vegetation Science*, 22(5), 917-931.

Chaves ÓM, & Avalos G (2006) Is the inverse leafing phenology of the dry forest understory shrub *Jacquinia nervosa* (Theophrastaceae) a strategy to escape herbivory?. *Revista de biología tropical*, 54(3), 951-963.

Chaves MM, Flexas J, & Pinheiro C (2009) Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of Botany*, 103, 551-560.

Chazdon RL & Fetcher N (1984) Photosynthetic light environments in a lowland tropical rain forest in Costa Rica. *The Journal of Ecology*, 553-564.

Chazdon RL and Pearcy RW (1991) The importance of sunflecks for forest understory plants. *BioScience* 41, 7

Cheikh N, & Jones RJ (1994) Disruption of maize kernel growth and development by heat stress (role of cytokinin/abscisic acid balance). *Plant Physiology*, 106(1), 45-51.

Chen JW, Zhang Q, & Cao K F (2009) Inter-species variation of photosynthetic and xylem hydraulic traits in the deciduous and evergreen Euphorbiaceae tree species from a seasonally tropical forest in south-western China. *Ecological research*, 24(1), 65-73.

Choat B, Ball MC, Lully JG, & Holtum JA (2005). Hydraulic architecture of deciduous and evergreen dry rainforest tree species from north-eastern Australia. *Trees-Structure and Function*, 19(3), 305-311.

Choat B, Sack L & Holbrook NM (2007) Diversity of hydraulic traits in nine *Cordia* species growing in tropical forests with contrasting precipitation. *New Phytologist*, 175(4), 686-698.

CONAGUA Comisión Nacional del Agua (2012) Datos Climáticos Históricos de Tuxtla Gutiérrez Chiapas.

Cordeiro YE, Pinheiro HA, dos Santos Filho BG, Corrêa SS, & Dias-Filho MB (2009) Physiological and morphological responses of young mahogany (*Swietenia macrophylla* King) plants to drought. *Forest ecology and management*, 258(7), 1449-1455.

Cronquist, A. (1981). *An integrated system of classification of flowering plants*. Columbia University Press.

Davi H, Bouriaud O, Dufrêne E, Soudani K, Pontailier JY, Le Maire G & Le Dantec V (2006) Effect of aggregating spatial parameters on modelling forest carbon and water fluxes. *Agricultural and Forest Meteorology*, 139(3), 269-287.

De la Cruz CI and González-Esquinca AR (2012) Liriodenine alkaloid in *Annona diversifolia* during early development. *Nat Prod Res*. 26:42-49. doi: 10.1080/14786419.2010.533373

De la Cruz CI, González-Esquinca AR, Guevara FP y Jiménez GLF (2011). Liriodenine, early antimicrobial defense in *Annona diversifolia*. *Zeitschrift für Naturforschung*. 66: 377-384

Denslow JS, Schultz JC, Vitousek PM & Strain BR (1990) Growth responses of tropical shrubs to treefall gap environments. *Ecology*, 165-179.

Dixon RA (2001) Natural products and plant disease resistance. *Nature*, 411(6839), 843-847.

Douglas J, Follett JM, Parmener GA, Sansom CE, Perry NB, Littler RA. Seasonal variation of biomass and bioactive alkaloid content of goldenseal, *Hydrastis canadensis*. *Fitoterapia* 2010; 81 (7): 925-928.

Eamus D, Myers B, Duff G, and Williams D, (1999) Seasonal changes in photosynthesis of eight savanna tree species *Tree Physiol* 19(10): 665-671 doi:10.1093/treephys/19.10.665

Elgorashia EE, Drewesb SE, Morrisc C and van Staden J (2003) Variation among three *Crinum* species in alkaloid content *Biochemical Systematics and Ecology*. 31:601-615 DOI:dx.doi.org/10.1016/S0305-1978(02)00222-3

Erkens RH, Chatrou LW & Couvreur TL (2012) Radiations and key innovations in an early branching angiosperm lineage (Annonaceae; Magnoliales). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 169(1), 117-134.

Estill K, Delaney RH, Smith WK, & Ditterline, RL (1991) Water relations and productivity of alfalfa leaf chlorophyll variants. *Crop science*, 31(5), 1229-1233.

Facchini P (2001) Alkaloid biosynthesis in plants: Biochemistry, cell biology, molecular regulation, and metabolic engineering applications. *Annual Review of Plant Physiology*. 52:29-66

Fang Rong CC, C Chung-Yi W, Po-Hsun K, Reen-Yen C, Yuh Chew y W Yang Chang (2000) New alkaloids from *Annona purpurea*. *J. Nat. Prod.* 63: 746-748

Finn GA, Straszewski AE, & Peterson VV (2007). A general growth stage key for describing trees and woody plants. *Annals Of Applied Biology*, 151(1), 127-131. doi:10.1111/j.1744-7348.2007.00159.x

Flexas J. and Medrano H. 2002. Drought-inhibition of photosynthesis in C3 plants: stomatal and non-stomatal limitations revisited. *Anal. Bot.* 89:183-189

Foyer CH, Lelandais M, Kunert KJ (1994) Photooxidative stress in plants. *Physiologia Plantarum* 92: 696-717.

Fraenkel GS (1959) The raison d'être of secondary plant substances. *Science*. 129:1466-70

Fries RE, (1937) Revisión der Arten eininger Annonaceen-Gattungen IV *Acta Horti Berg.* 12(2):221-288

- Fuentes FVR, Méndez G, Lemes HCM, Rodríguez FCA, Soler BA, González R and López E (2001) Dinámica de acumulación mensual y diaria de alcaloides y flavonoides en *Pasiflora incarnata* L. Rev. Cubana Plant. Med. (3):105-111
- Gartner, B. L. (1995). Hydraulic and Mechanical Consequences. *Plant stems: physiology and functional morphology*, 125.
- Gentry AH (1995) Patterns of diversity and floristic composition in Neotropical montane forest. En:Churchill SP, H. Balslev E Forero and Luteyn L (eds.), *Biodiversity and Conservation of Neotropical Montane Forest*. The New York Botanical Garden, Nueva York.
- Gentry AH (1995) Diversity and floristic composition of neotropical dry forests. In: Bullock SH, Mooney HA and Medina E (eds), *Seasonally Dry Tropical Forests*. Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp. 146–194.
- George AP, & Nissen RJ (1988) The effects of temperature, vapour pressure deficit and soil moisture stress on growth, flowering and fruit set of custard apple (< i> Annona cherimola× Annona squamosa</i>)'African Pride'. *Scientia horticultrae*, 34(3), 183-191.
- Gianoli E & Valladares F (2012) Studying phenotypic plasticity: the advantages of a broad approach. *Biological Journal of the Linnean Society*, 105(1), 1-7.
- Givnish T J (1988) Adaptation to sun and shade: a whole-plant perspective. *Functional Plant Biology*, 15(2), 63-92.
- Godbold DL & Jentschke G (1998) Aluminium accumulation in root cell walls coincides with inhibition of root growth but not with inhibition of magnesium uptake in Norway spruce. *Physiologia Plantarum*, 102(4), 553-560.
- Gómez D, Azorin BJ, Viladomat F and Codina C (2003) Seasonal and Spatial Variation of alkaloids in *Merendera montana* in relation to chemical defense and phenology. *Journal of Chemical Ecology*. 29:1117-1126
- González EAR. 2001. Contribución al estudio del género *Annona* (Annonaceae): Análisis fitoquímico de tres especies de Chiapas. Tesis de Doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México.60–766.
- González Esquinca AR, Luna Cazares LM, Álvarez Moctezuma JG, Velazco P Y De la Cruz Chacon I (1997) Estudios sobre el letargo de (*A. diversifolia* Eaff.). In Congreso

internacional de anonáceas (1997, Chapingo, México). Memoria. México, Universidad Autónoma de Chapingo. p. 32.

González-Esquinca AR (2001) Contribución al estudio del género *Annona* (Annonaceae): Análisis fitoquímico de tres especies de Chiapas. Disertación de Doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México

González-Esquinca AR, Luna-Cazares LM, Álvarez-Moctezuma JG y De-Paz-Velazco Y (1997) Estudios sobre el letargo y germinación de *Annona diversifolia* Saff. (Annonaceae). Memoria del 1° Congreso Internacional de Anonaceas. Chapingo México Pag. 32

Goulart MF, Lovato B, De Vasconcellos Barros, Valladares F, & JP Lemos-Filho (2011) Which extent is plasticity to light involved in the ecotypic differentiation of a tree species from savanna and forest? *Biotropica* 43: 695-703. DOI: 10.1111/j.1744-7429.2011.00760.x

Guinaudeau H, Leboeuf M y Cavé A (1994) Aporphine Alkaloids V. *J. Nat. Prod.* 57 (8): 1033-1135

Guinaudeau H, Leboeuf M, Cavé A (1979) Aporphine Alkaloids II. *J. Nat. Prod.* 42 (3): 325-361.

Guinaudeau H, Leboeuf M, Cavé A (1975) Aporphine Alkaloids. *Lloydia* 38 (3): 275- 339.

Guinaudeau H, Leboeuf M, Cavé A (1983) Aporphine Alkaloids III. *J. Nat. Prod.* 46 (6): 761-835.

Hack H, Bleiholder H, Burh L, Meier U, Schnock-Fricke E, Weber E, Witzemberger A (1992) Einheitliche Codierung der phänologischen Entwicklungsstadien mono- und dikotyler Pflanzen.– Erweiterte BBCH-Skala, Allgemein. Nachrichten-blatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes 44,265–270

Hanson A D & Hitz WD (1982) Metabolic responses of mesophytes to plant water deficits. *Annual Review of Plant Physiology*, 33(1), 163-203.

Hartmann T (2007) From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry*, 68(22), 2831-2846.

Havaux M (1992) Stress tolerance of photosystem II in vivo antagonistic effects of water, heat, and photoinhibition stresses. *Plant Physiology*, 100(1), 424-432.

Hernández F, (1959) *Historia Natural de la Nueva España*. Obras completas. Tomos II y III. Universidad Nacional Autónoma de México. México. Regional, Unidad Durango, Instituto Politécnico Nacional. México

Herralde TF (2000) Estudio integral de las respuestas ecofisiológicas al estrés hídrico: caracterización de variedades de almendro. Tesis de Doctorado. Universidad de Barcelona, España. Pp. 1-17

Hess M, Barralis G, Bleiholder H, Buhr L, Eggers TH, Hack H, & Stauss R (2008) Use of the extended BBCH scale—general for the descriptions of the growth stages of mono; and dicotyledonous weed species. *Weed Research*. 37(6), 433-441.

Höft RM, Verpoorte, and Beck E (1996) Growth and alkaloid contents in leaves of *Tabernaemontana pachysiphon* Stapf (Apocynaceae) as influenced by light intensity, water and nutrient supply. *Oecologia*. 107:160-169 DOI: 10.1007/BF00327899

Holbrook NM, Whitbeck JL and Mooney. 1996. Drought responses of neotropical dry forest trees. In: Seasonally Dry Tropical Forest. Cambridge University press.

Hook I, Christiane P, Ahond A, Guénard D, Guéritte F, Adeline MT, Wang XP, Dempsey D, Breuillet Sand Potier P (1999) Seasonal variation of neutral and basic taxoid contents in shoots of European Yew (*Taxus baccata*). *Photochemistry*. 52:1041-1045

Jackson RB, Canadell J, Ehleringer JR, Mooney HA, Sala OE & Schulze ED (1996) A global analysis of root distributions for terrestrial biomes. *Oecologia*, 108(3), 389-411

Jaleel CA, Manivannan P, Kishorekumar A, Sankar B, Gopi R, Somasundaram R, and Panneerselvam R (2007) Alterations in osmoregulation, antioxidant enzymes and indole alkaloid levels in *Catharanthus roseus* exposed to water deficit. *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 59: 150-157.

Jaleel CA, Manivannan Paramasivam, Wahid A, Farooq M, Al-Juburi HJ, Somasundaram, Ramamurthy & Panneerselvam, RAJARAM (2009) Drought stress in plants: a review on morphological characteristics and pigments composition. *Int J Agric Biol*, 11(1), 100-105.

Kattge J, Ogle K, Bönisch G, Díaz S, Lavorel S, Madin J, Nadrowski K, Nöllert S, Sartor K&, Wirth C (2011) A genetic structure for plant trait databases. *Methods in Ecology and Evolution* 2: 202–213.

Kenzo T, Yoneda R, Matsumoto Y, Azani MA and Majid NM. Leaf photosynthetic and growth responses on four tropical tree species to different light conditions in degraded tropical secondary forest, Peninsular Malaysia. *JARQ*. 42(4): 299-306.

Kenzo T, Yoneda R, Sano M, Araki M, Shimizu A, Tanaka-Oda A, & Chann S (2012) Variations in Leaf Photosynthetic and Morphological Traits with Tree Height in Various Tree Species in a Cambodian Tropical Dry Evergreen Forest. *JARQ-JAPAN AGRICULTURAL RESEARCH QUARTERLY*, 46(2), 167-180.

Kessler A, Halitschke R, Diezel C and Baldwin IT (2006) Priming of plant defense responses in nature by airborne signaling between *Artemisia tridentata* and *Nicotiana attenuata*. *Oecologia*. 148: 280–292 DOI 10.1007/s00442-006-0365-8

Kinghorn AD, Selim MA, Smolenski SJ (1980) Alkaloid distribution in some new world *Lupinus* species. *Phytochemistry* 19: 1705-1710.

Kirk H and Vrieling K (2010) Species by environment interactions affect pyrrolizidine alkaloid expression in *Senecio jacobaea*, *Senecio aquaticus*, and their hybrids. *J. Chem. Ecol.* 36:378–387.

Kitajima K, Mulkey S, & Wright S (1997) Decline of photosynthetic capacity with leaf age in relation to leaf longevities for five tropical canopy tree species. *American Journal of Botany*, 84(5), 702-702.

Kohen E, Santus R, & Hirschberg JG (1995) *Photobiology*. Academic Press.

Kramer PJ (1988) Changing concepts regarding plant water relations. *Plant, Cell & Environment*, 11(7), 565-568.

Krause GH, Winter K, Matsubara S, Krause B, Jahns P, Virgo A, ... & García M (2012) Photosynthesis, photoprotection, and growth of shade-tolerant tropical tree seedlings under full sunlight. *Photosynthesis research*, 113(1-3), 273-285.

Kursar TA & Coley PD (1999) Contrasting modes of light acclimation in two species of the rainforest understory. *Oecologia*, 121(4), 489-498.

Kushwaha CP, & Singh K P (2005) Diversity of leaf phenology in a tropical deciduous forest in India. *Journal of Tropical Ecology*, 21(1), 47-56.

Lamprecht H (1990) *Silvicultura en los trópicos: los ecosistemas forestales en los bosques tropicales y sus especies arbóreas; posibilidades y métodos para un aprovechamiento sostenido*. Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit (GTZ) GmbH.

Lang ALA (2003) *Ecología química*. Edit. Plaza y Valdes. Primera edición.

Larcher W (2000) Temperature stress and survival ability of Mediterranean sclerophyllous plants. *Plant biosystems*, 134(3), 279-295.

Larcher W (2003) *Physiological plant ecology: ecophysiology and stress physiology of functional groups*. Springer.

LAWLOR DW (2002) Limitation to Photosynthesis in Water-stressed Leaves: Stomata vs. Metabolism and the Role of ATP. *Annals of Botany*, 89(7), 871-885.

Lawlor DW and Tezara W (2009) Causes of decreased photosynthetic rate and metabolic capacity in water-deficient leaf cell: a critical evaluation of mechanisms and integration of processes. *Annals of Botany*. 103:561-579

Le TN & McQueen-Mason SJ (2006) Desiccation-tolerant plants in dry environments. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 5(2-3), 269-279.

Leboeuf MA, Cavé PK Bhaumik y BR Mukherjee (1982) The Phytochemistry of the Annonaceae. *Phytochemistry* 21 (12): 2783-2813.

Lebrija-Trejos E, Pérez-García EA, Meave JA, Poorter L & Bongers F (2011) Environmental changes during secondary succession in a tropical dry forest in Mexico. *Journal of Tropical Ecology*, 27(5), 477.

Levit J (1980) *Responses of Plants to Environmental Stresses. Water, radiation, salt and other stresses*. Physiological Ecology series. Academic Press. New York.

Li Xia, Yang W and Xiufeng Y (2007) Effects of water stress on berberine, jatrorrhizine and palmatine contents in amur corktree seedlings. *Acta Ecologica Sinica*, Vol. 27(1):58-63

Lichtenthaler HK (1988) In vivo chlorophyll fluorescence as a tool for stress detection in plants. In *Applications of Chlorophyll Fluorescence in Photosynthesis Research, Stress Physiology, Hydrobiology and Remote Sensing* (pp. 129-142). Springer Netherlands.

Lichtenthaler HK (1996) Vegetation stress: an introduction to the stress concept in plants. *Journal of plant physiology*, 148(1), 4-14.

Liscombe DK, MacLeod BP, Loukanina N, Nandi OI, Facchini PJ. 2005 Evidence for the monophyletic evolution of benzyloisoquinoline alkaloid biosynthesis in angiosperms. *Phytochemistry*; 66:(11): 1374-1393.

Lobo M, Delgado Ó, Cartagena J, Fernández E, Medina C & Medina C (2007) Categorización de la germinación y la latencia en semillas de chirimoya (*Annona cherimola* L.) y guanábana (*Annona muricata* L.), como apoyo a programas de conservación de germoplasma. *Agronomía Colombiana*, 25, 231-244.

Mata DI & Moreno-Casasola P (2005) Effect of in situ storage, light, and moisture on the germination of two wetland tropical trees. *Aquatic botany*, 83(3), 206-218.

Medrano H, Escalona JM, Bota J, Gulías J, Flexas J (2002) Regulation of photosynthesis of C3 plants in response to progressive drought: stomatal conductance as a reference parameter. *Annals of Botany* 89: 895-905.

Mehler AH, Brown AH (1952) Studies on reactions of illuminated chloroplasts. III. Simultaneous photoproduction and consumption of oxygen studied with oxygen isotopes Arch Biochem Biophys 38: 365–370

Mengistu T, Sterck FJ, Fetene M, Tadesse W, & Bongers F (2011) Leaf gas exchange in the frankincense tree (*Boswellia papyrifera*) of African dry woodlands. *Tree physiology*, 31(7), 740-750.

Minckler LS, Woerheide JD and Schlesinger RC (1973) Light, soil moisture, and tree reproduction in hardwood forest openings. USDA For. Serv. Res. Pap. NC-89

Miranda F & Xolocotzi EH (1963) *Los tipos de vegetación de México y su clasificación*. Colegio de Postgraduados, Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos.

Miranda F (1975) La vegetación de Chiapas. Gobierno del Estado. Tuxtla Gutiérrez. *Chiapas, México*.

Miranda F and Hernández XE (1963) Los tipos de vegetación de México y su clasificación. Chapingo, México: Colegio de Postgraduados. p. 29-178

Molina-Montengro MA (2008) Variación de la pubescencia foliar en plantas y sus implicaciones funcionales a lo largo de gradientes altitudinales. *Ecosistemas* 17 (1): 146-154

Mulkey SS, & Wright SJ (1996) Influence of seasonal drought on the carbon balance of tropical forest plants. In *Tropical forest plant ecophysiology*(pp. 187-216). Springer US.

Mulkey SS, Smith AP, Wright SJ, Machado JL and Dudley R (1992) Contrasting leaf phenotypes control seasonal variation in water loss in a tropical forest shrub. *Proc. Natl. Sci.* 89:9084-9088.

Mulkey Stephen S, Kitajima Kaoru and Wright S Joseph (1996) Plant physiological ecology of tropical forest canopies. *Trends in Ecology and Evolution* 11(10): 408-412.

Munne-Bosch, Juvany-marí and Alegre L (2001) Drought-induced senescence is characterized by a loss of antioxidant defences in chloroplasts. *Plant, Cell and Environment.* 24:1319-1327.

Murphy PG & Lugo AE (1986) Ecology of tropical dry forest. *Annual review of ecology and systematics*, 17, 67-88.

Nilsen ET & Orcutt DM (1996) *Physiology of plants under stress. Abiotic factors.* John Wiley & Sons, INC, New York.

Osorio-Beristain M (2012) Origen, evolución y ecología de la selva seca. *Inventio, la génesis de la cultura universitaria en Morelos*, (16), 61-69.

Oumar BA, Sagna M, & Germination SYM (2012) Capacity of Annonaceae Seeds (*Annona muricata* L., *A. squamosa* L. and *A. senegalensis* Pers.) Cultivated Under Axenic Conditions. *International Journal of Science and Advanced Technology.* Vol 2:21-34

Paranhos JT, Fragoso V, da Silveira VC, Henriques AT and Fett-Neto AG (2009) Organ-specific and environmental control of accumulation of psychollanine, a major indole alkaloid glucoside from *Psychotria umbelata*. *Biochemical Systematic and Ecology.* 37:707-715. doi: 0098-0331/04/1000-2023/0

Parolin, P., Ferreira, L. V., & Junk, W. J. (2003). Germination characteristics and establishment of trees from central Amazonian flood plains. *Tropical Ecology*, 44(2), 155-168.

Pearcy RW (1990) Sunflecks and photosynthesis in plant canopies. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 41:421-453

Pedraza RA (1998) Germinación de especies arbóreas colectadas en áreas boscosas de la región de Xalapa, Veracruz. *Foresta Veracruzana* 1:13-18.

Pérez DY, Galindo CI y Arevalo F (2007) La muerte celular programada en las plantas: ¿es semejante a la apoptosis en animales?. *INTERCIENCIA*. Vol 32(12):812-818

Picotte JJ, Rosenthal MD, Rhode JM and Cruzan MB (2007) Plastic responses to temporal variation in moisture availability: consequences for water efficiency and plant performance. *Oecologia*. 153:821-832

Quero JL, Marañón T y Villar R. (2004) Tasas de fotosíntesis en plántulas de alcornoque y roble den distintos micrositios dentro del sotobosque. *Almoraima*. 31:101-109

Quero JL, Villar R, Marañón T, Murillo A y Zamora R (2008) Respuesta plástica a la luz y al agua en cuatro especies mediterráneas del género *Quercus* (Fagaceae). *Rev. Chilena de Hist. Nat.* 81:373-375

Ralfpms MH, Manners GD and Gardner RD (1998) Influence of light and photosynthesis on alkaloid concentration in Larkspur. *J. Chem. Ecol.* 24(1):167-180

Ramirez JL y Ceballos-Ferriz SRS (2000) consideraciones sobre las angiospermas (plantas con flor) fósiles de México. *GEOS. Union Geofísica Mexicana*. Pp 433-434

Rascio N & La Roca N (2005) Resurrection plants: the puzzle of surviving extreme vegetative desiccation. *Plant Sci* 24:209–225

Reich PB & Borchert R (1984) Water stress and tree phenology in a tropical dry forest in the lowlands of Costa Rica. *The Journal of Ecology*, 61-74.

Rejón-Orantes JC, Gonzalez-Esquinca AR, Roldan-Roldan G, Perez de la Mora M (2011) *Annona purpurea* Moc & Sesséex Dunal y su actividad ansiolítica en: Gonzalez-Esquinca *et al.* (2011) Anonáceas, Plantas antiguas, estudios recientes. Colección Jaguar, UNICACH.

Reyes- García A, Sousa MS y León-Velasco ME (2011) en: Álvarez Noguera F. Chiapas, estudios sobre su diversidad biológica. Universidad Nacional Autónoma de México.

Roupsard O, Ferhi A, Granier A, Pallo F, Depommier D, Mallet B, & Dreyer E (1999) Reverse phenology and dry-season water uptake by *Faidherbia albida* (Del.) A. Chev. in an agroforestry parkland of Sudanese west Africa. *Functional ecology*, 13(4), 460-472.

Rzedowski J (1978) *Vegetación de México*. Editorial Limusa. México, D. F. 432 pp

Rzedowski J, y R McVaugh (1966) La vegetación de Nueva Galicia. Contr. Univ. Mich. Herb. 9: 1-123.

Sack L, Dietrich EM, Streeter CM, Sanchez-Gomez D, and Holbrook NM (2008) Leaf palmate venation and vascular redundancy confer tolerance of hydraulic disruption. PNAS. 105(5): 1567–1572

Sack L., Melcher P.J., Liu W.H., Middleton E. & Pardee T. (2006) How strong is intracanopy leaf plasticity in temperate deciduous trees? *American Journal of Botany* 93, 829–839.

Schäffer GT, Denardi PD, Cannes DNN, Palma FJ, Teresinha HA and Germano FNA (2004) Environmental and Ontogenetic Control of Accumulation of Brachycerine, a Bioactive Indole Alkaloid from *Psychotria brachyceras*. *J of Chem Ecol.* 30:2023-2036, DOI: 10.1023/B:JOEC.0000045592.24785.33

Schillmiller, A. L., Last, R. L., & Pichersky, E. (2008). Harnessing plant trichome biochemistry for the production of useful compounds. *The Plant Journal*, 54(4), 702-711.

Schlie GMA, Gonzalez EAR, and Luna CLM (2009) Las acetogeninas de Annonaceae: efecto antiproliferativo en líneas celulares neoplásicas. *BLACPMA.* 8(4) 245-257

Schmidt KP, Levin DA (1985) The comparative demography of reciprocally sown populations of *Phlox drummondii* Hook. I. Survivorships, fecundities, and finite rates of increase. *Evolution* 39:396–404

Seki M, Narusaka M, Abe H, Kasuga M, Yamaguchi-Shinozaki K, Carninci P, Hayashizaki Y, Shinozaki K (2001) Monitoring the expression pattern of 1300 *Arabidopsis* genes under drought and cold stresses by using a full-length cDNA microarray. *The Plant Cell* 13:61–72.

Singh G (2004) *Plant Systematic an integrated approach.* SCIENCE PUBLISHERS INC. PP 319-321

Singh JS, & Singh VK (1992) Phenology of seasonally dry tropical forest. *Current science*, 63(11), 684-689.

Singh KP and Kushwaha CP (2005) Emerging paradigms of tree phenology in dry tropics. *Curr. Sci.* 89: 964–975.

Sobrado MA & Ball MC (1999) Light use in relation to carbon gain in the mangrove, *Avicennia marina*, under hypersaline conditions. *Functional Plant Biology*, 26(3), 245-251.

- Sobrado MA (1993) Trade-off between water transport efficiency and leaf life-span in a tropical dry forest. *Oecologia*, 96(1), 19-23.
- Sobrado MA (1997) Embolism vulnerability in drought-deciduous and evergreen species of a tropical dry forest. *Acta Oecologica*, 18(4), 383-391.
- Sobrado MA (2003) Hydraulic characteristics and leaf water use efficiency in trees from tropical montane habitats. *Trees* 17: 400-406
- Sobrado, M. A. (2010). Leaf characteristics, wood anatomy and hydraulic properties in tree species from contrasting habitats within upper Rio Negro forests in the Amazon region. *Journal of Tropical Ecology*, 26(2), 215.
- Standley PC, & Steyermark JA (1946) Flora of Guatemala. I. *Fieldiana (Bot)*, 24(5).
- Steyermark J, P. Berry, Holst B Y Yatskievych K (1995) Flora of the Venezuelan *Guayana*, Volume 2: *Pteridophytes, Spermatophytes, Acanthaceae, Annonaceae*. Missouri Botanical Garden Press. 706 pp.
- Szabó B, Lakatos Á, Kőszegi T and Botz L (2003) HPTLC and HPLC determination of alkaloids in poppies subjected to stress. *J. of Planar Chromatography-Modern TLC*. 16: 293-297 DOI: 10.1556/JPC.16.2003.4.9
- Tambussi AE (2004) Fotosíntesis, fotoprotección, productividad y estrés abiótico: algunos casos de estudio. Disertación de Doctorado. Universitat de Barcelonal. España. 231 p
- Telfer A, Bishop S M, Phillips D, & Barber J (1994) Isolated photosynthetic reaction center of photosystem II as a sensitizer for the formation of singlet oxygen. Detection and quantum yield determination using a chemical trapping technique. *Journal of Biological Chemistry*, 269(18), 13244-13253.
- Tezara W, Mitchell VJ, Driscoll and Lawlor DW (1999) Water stress inhibits plant photosynthesis by decreasing coupling factor and ATP. *NATURE*. 401:914-917
- Tijerina-Chávez L, Ruiz-Posadas LM, Engleman EM, Castillo-Morales A, Otero-Sánchez MA, & Becerril-Román, AE (2005) CRECIMIENTO, RELACIONES HÍDRICAS E INTERCAMBIO GASEOSO DE PLANTAS JÓVENES DE ILAMA (*Annona diversifolia* Saff.) EN CONDICIONES DE ESTRÉS HÍDRICO. *Revista Chapingo. Serie horticultura*, 11(1), 59-65.

- Trejo I & Dirzo R (2000) Deforestation of seasonally dry tropical forest: a national and local analysis in Mexico. *Biological conservation*, 94(2), 133-142.
- Trejo I (1998) Distribución y diversidad de selvas bajas de México: relaciones con el clima y el suelo, Ph.D. Thesis, Facultad de Ciencias, UNAM, Mexico, DF.
- Trejo RI, & Dirzo R (2000) Deforestation of seasonally dry tropical forest towards its northern distribution: a national and local analysis in Mexico. *Biological Conservation* 94: 133-142.
- Trejo Vázquez, I (1999) El clima de la selva baja caducifolia en México. *Invest. Geogr. Bol.* 39: 40-51
- Tyree MT, Engelbrecht, BM, Vargas G, & Kursar TA (2003) Desiccation tolerance of five tropical seedlings in Panama. Relationship to a field assessment of drought performance. *Plant Physiology*, 132(3), 1439-1447.
- Valdez-Hernández M, Andrade JL, Jackson PC & Rebolledo-Vieyra M (2010) Phenology of five tree species of a tropical dry forest in Yucatan, Mexico: effects of environmental and physiological factors. *Plant and soil*, 329(1), 155-171.
- Valladares F (2004) El ambiente lumínico de los sotobosques ibéricos. *Quercus*, (215), 28-34.
- Valladares F, Arrieta S, Aranda I, Lorenzo D, Tena D, Sánchez D, Suarez F, And Pardos JA (2005) Quantitative estimation of phenotypic plasticity. *Journal of Ecology* 94: 1103–1116.
- Valladares F, Gianoli E, & Gómez JM (2007) Ecological limits to plant phenotypic plasticity. *New Phytologist*, 176(4), 749-763.
- Valladares F, Skillman J, Pearcy Rw (2002) Convergence in light capture efficiencies among tropical forest understory plants with contrasting crown architectures: a case of morphological compensation. *American Journal of Botany* 89: 1275.
- Valladares F, Wright J, Lasso E, Kitajima K y Pearcy R (2000) Plastic phenotypic response to light of 16 congeneric shrubs from a Panamanian rainforest. *Ecology* 2(81), 1925-1936
- Vance NC, Kelsey RG and Sabin TE (1994) Seasonal and tissue variation in taxane concentrations of *Taxus brevifolia*. *Phytochemistry*. 36:1241-1244

- Villar R & Merino J (2001) Comparison of leaf construction costs in woody species with differing leaf life-spans in contrasting ecosystems. *New Phytologist*, 151(1), 213-226.
- Vitousek PM & Denslow JS (1986) Nitrogen and phosphorus availability in treefall gaps of a lowland tropical rainforest. *The Journal of Ecology*, 1167-1178.
- Wink M (1998) Introduction Chapter. In: Roberts M.F. & M. Wink (Eds.) Alkaloids: Biochemistry, ecology and medicinal applications; Plenum, New York, pp 1-7, 486
- Wink M (2006) Importance of plant secondary metabolites for protection against insects and microbial infections. *Advances in Phytomedicine*, 3, 251-268.
- Wink M (2010) Biochemistry, Physiology and Ecological Function of Secondary Metabolites. Chapter 1, Introduction. *Annual Plant Reviews* 40:1-19
- Wink M (2010) Introduction: biochemistry, physiology and ecological functions of secondary metabolites”, en *Biochemistry of plant secondary metabolism*. Michael Wink (ed). *Annual plant reviews* 40: 1-19.
- Wink M. (2010) Introduction: biochemistry, physiology and ecological functions of secondary metabolites”, en *Biochemistry of plant secondary metabolism*. Michael Wink (ed), *Annual plant reviews*; 40: 1-19.
- Wink, M (1987) Quinolizidine alkaloids: Biochemistry, metabolism, and function in plants and cell suspension cultures. *Planta Medica*. 53:509-514
- Wright IJ, Reich PB, Westoby M, Ackerly DD, Baruch Z, Bongers F, Cavender-Bares J, Chapin FS, Cornelissen JHC, Diemer Metal (2004) The leaf economics spectrum worldwide. *Nature* 428: 821–827
- Wright SJ (2005) Tropical forests in a changing environment. *Trends in Ecology & Evolution*, 20(10), 553-560.
- Wu TS, Wang ML and Wu PL (1996) Seasonal variations of carbazole alkaloids in *Murraya euchrestifolia*. *Phytochemistry*. 43: 785–789.
- Yamarte M, Avilán L, Marín M, Rendiles E, Tales MJ, Solarte J and Maldonado R, (2004) Fenología floral del guanábano (*Annona muricata*) injertado sobre combinaciones de patrones y a pie franco *Rev. Fac. Agron.* 204(21)1: 91-101

Yordanov I, Velikova V & Tsonev T (2000) Plant responses to drought, acclimation, and stress tolerance. *Photosynthetica*, 38(2), 171-186.

Zamora-Cornelio LF, Ochoa-Gaona S, Vargas Simón G, Castellanos Albores J, H.J. de Jong Bernardus (2010) Germinación de semillas y clave para la identificación de plántulas de seis especies arbóreas nativas de humedales del sureste de México. *Rev. biol. trop.* 58(2): 717-732

Zamora-Natera F, García-López P, Ruiz-López M, Herrera JM, Rodríguez-Macias R, Pedrosa M and Muzquiz M (2008) Composition and alkaloid profile of *Lupinus exaltatus* Zucc. During its development. Proceedings of the 12th International Lupin Conference, Fremantle, Western Australia. International Lupin Association, Canterbury, New Zealand. ISBN 0-86476-153-8.

Zhu JK (2002) Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual review of plant biology*, 53, 247.

Zlatev ZS, & Yordanov IT (2004) Effects of soil drought on photosynthesis and chlorophyll fluorescence in bean plants. *Bulg J Plant Physiol*, 30(3-4), 3-18.

Anexo 1

Datos utilizados en los análisis de la tesis: biomasa, crecimiento relativo, curvas p-v, potenciales al amanecer, curvas de respuesta a la luz, marchas diurnas y contenidos de liriodenina

Cuadro 6. Biomasa de plántulas

Biomasa de raíces plántulas de *A. lutescens* en dos condiciones de luz (sol y sombra, sin riego, las plantas se cosecharon a los 0 (T1), 15 (T2) y 25 (T3) días sin riego. Medias (X), Desviación estándar (sd)

Peso de las raíces en los tres tiempos de cosecha

		T1	T 2	T 3
Sol Testigo	planta	Raíces (g)	Raíces (g)	Raíces (g)
	1	0.082777	0.1079	0.3817
	2	0.0986	0.159	0.3964
	3	0.0795	0.1051	0.2546
	4	0.0591	0.124	0.2701
	5	0.07999425	0.1294	0.8162
	6	0.07286475	0.1251	0.4238
	X	0.078806	0.12508333	0.4238
	sd	0.01290806	0.0193119	0.20432976
Sol estrés	1	0.082777	0.0596	0.2131
	2	0.0986	0.1442	0.2027
	3	0.0795	0.1299	0.2546
	4	0.0591	0.0949	0.2401
	5	0.07999425	0.1012	0.3051
	6	0.07286475	0.1059	0.24312
	X	0.078806	0.10595	0.24312
	sd	0.01290806	0.02942671	0.03610376
	Sombra testigo	1	0.064	0.259
2		0.0346	0.24881	0.4918
3		0.13705	0.3121	0.3939
4		0.085825	0.2897	0.4882

	5	0.07905	0.3009	0.3787
	6	0.07015	0.2822	0.40644
	X	0.07844583	0.28211833	0.44060667
	sd	0.03373196	0.02430244	0.05291995
<hr/>				
Sombra estrés	1	0.064	0.1961	0.3016
	2	0.0346	0.12	0.3975
	3	0.13705	0.1216	0.34955
	4	0.085825	0.1594	0.1703
	5	0.07905	0.15805	0.2288
	6	0.07015	0.15103	0.28355
	X	0.07844583	0.15103	0.28855
	sd	0.03373196	0.02821215	0.08165725

Biomasa de tallos plántulas de *A. lutescens* en dos condiciones de luz (sol y sombra, sin riego, las plantas se cosecharon a los 0 (T1), 15 (T2) y 25 (T3) días sin riego. Medias (X), Desviación estándar (sd).

Peso de los Tallos en los tres tiempos de cosecha

		T1	T 2	T 3
Sol Testigo	planta	Tallos (g)	Tallos (g)	Tallos (g)
	1	0.0452	0.0576	0.2956
	2	0.0756	0.135	0.3593
	3	0.093	0.0805	0.2139
	4	0.1028	0.091	0.4002
	5	0.072	0.1022	0.423
	6	0.08123	0.09326	0.3384
	X	0.078305	0.09326	0.3384
	sd	0.01983691	0.02554099	0.07582256
<hr/>				
Sol estrés	1	0.0952	0.0956	0.191
	2	0.0756	0.152	0.201

	3	0.13	0.1295	0.2668
	4	0.1028	0.1596	0.2423
	5	0.072	0.1508	0.2611
	6	0.08123	0.1275	0.23244
	X	0.092805	0.13583333	0.23244
	sd	0.02168845	0.02357326	0.03099991
<hr/>				
Sombra testigo	1	0.045299	0.205	0.3957
	2	0.0687412	0.2952	0.4093
	3	0.078101	0.358	0.3779
	4	0.03142	0.2987	0.4025
	5	0.0558903	0.32835	0.3985
	6	0.0551371	0.29705	0.35678
	X	0.05576477	0.29705	0.39011333
	sd	0.01655237	0.05133019	0.01940815
<hr/>				
Sombra estrés	1	0.045299	0.1708	0.3398
	2	0.0687412	0.1312	0.3361
	3	0.078101	0.1319	0.33795
	4	0.03142	0.1621	0.1659
	5	0.0558903	0.151	0.1997

Biomasa de hojas plántulas de *A. lutescens* en dos condiciones de luz (sol y sombra, sin riego, las plantas se cosecharon a los 0 (T1), 15 (T2) y 25 (T3) días sin riego. Medias (X), Desviación estándar (sd)

Peso de los Tallos en los tres tiempos de cosecha

		T1	T 2	T 3
Sol Testigo	planta	Hojas (g)	Hojas (g)	Hojas (g)
	1	0.064969	0.079	0.3893
	2	0.074321	0.1381	0.433
	3	0.07122	0.0761	0.3389

	4	0.04221	0.09773	0.5641
	5	0.06673	0.1039	0.5152
	6	0.06478667	0.09898	0.4481
	X	0.06403944	0.09896833	0.4481
	sd	0.0113354	0.02226584	0.08193717
<hr/>				
Sol estrés	1	0.044969	0.0989	0.2334
	2	0.074321	0.1627	0.2304
	3	0.08542	0.105	0.2346
	4	0.04221	0.2164	0.1835
	5	0.06673	0.1346	0.2935
	6	0.06478667	0.13152	0.23508
	X	0.06307278	0.14152	0.23508
	sd	0.01676446	0.04325198	0.03492377
<hr/>				
Sombra testigo	1	0.1519	0.2817	0.5669
	2	0.16803	0.4925	0.6684
	3	0.2188	0.3711	0.3957
	4	0.193415	0.3842	0.61765
	5	0.1608	0.37765	0.3951
	6	0.10123	0.38143	0.52875
	X	0.16569583	0.38143	0.52875
	sd	0.03990988	0.06694966	0.11351245
<hr/>				
Sombra estrés	1	0.1519	0.2667	0.4036
	2	0.16803	0.2129	0.3903
	3	0.2188	0.1915	0.39695
	4	0.193415	0.2974	0.2971
	5	0.1608	0.2398	0.3982

Cuadro 7. Análisis de crecimiento relativo (ARG, NAR, LAR, SLA, RGR y R/S) de *A. lutescens* en dos condiciones de luz (sol y sombra, sin riego, los periodos de tiempos fueron T1 del día 0 al 15 y T2 del 15 al 25 días sin riego. Medias (X), Desviación estándar (sd)

Tasa de Crecimiento absoluto (ARG)			
		T1	T 2
Sol	planta		
	1	0.0051554	0.05480667
	2	0.0183579	0.05044
	3	0.001798	0.03638
	4	0.010862	0.06144467
	5	0.01167758	0.09459333
	6	0.00984586	0.05953067
	X	0.00961612	0.05953256
	sd	0.00571479	0.01935956
<hr/>			
Sol estrés			
	1	0.0031154	0.02556
	2	0.0210379	0.01168
	3	0.006948	0.02610667
	4	0.026679	0.013
	5	0.01678758	0.03154
	6	0.01460386	0.023048
	X	0.01486196	0.02182244
	sd	0.00874267	0.00786081
<hr/>			
Sombra testigo			
	1	0.00874267	0.00786081

2	0.0484501	0.04676667
3	0.07651388	0.03553267
4	0.0607249	0.00842
5	0.066194	0.03571667
6	0.07111597	0.01102667
X	0.06606919	0.02659144
sd	0.01027181	0.01525134

Sombra estrés

1	0.0372401	0.02742667
2	0.01927288	0.04398667
3	0.0011049	0.04263
4	0.030824	0.00096
5	0.02531097	0.01852333
6	0.03166029	0.02524333
X	0.02423552	0.02646167
sd	0.01287217	0.0160269

Tasa de asimilación neta (NAR)

		T1	T 2
Sol	planta		
	1	0.005227828	0.024723924
	2	0.017691917	0.021351442
	3	0.001829349	0.019729593
	4	0.011826394	0.027437333
	5	0.01188291	0.042012481
	6	0.009967718	0.027267073
	X	0.009737686	0.027086974

	sd	0.005570781	0.007944021
<hr/>			
Sol estrés	1	0.003030526	0.018721225
	2	0.020026929	0.007543772
	3	0.008967185	0.019422526
	4	0.037384413	0.011730812
	5	0.017466035	0.018777105
	6	0.016693762	0.019185763
	X	0.017261475	0.015896867
	sd	0.011698373	0.005032893
<hr/>			
Sombra testigo	1	0.02327488	0.012132428
	2	0.041638204	0.008636691
	3	0.030288447	0.002562331
	4	0.038598227	0.009820923
	5	0.040480472	0.003700256
	6	0.039925938	0.00614504
	X	0.035701028	0.007166278
	sd	0.007321775	0.003691191
<hr/>			
Sombra estrés	1	0.019885124	0.008489674
	2	0.012314429	0.015876967
	3	0.000716929	0.015607966
	4	0.016833119	0.000364913
	5	0.015710063	0.006098345
	6	0.019205307	0.008723834
	X	0.014110828	0.009193616
	sd	0.007097721	0.005900068

Porción de área foliar (LAR)

		T1	T 2	T 3
Sol	planta			
	1	4.53317626	4.2459518	
	2	3.1161077	3.17300185	
	3	3.89343264	3.86532306	
	4	3.59437655	3.47597087	
	5	3.59295329	2.90904259	
	6	3.71728831	3.41194189	
	X	3.74122246	3.51353868	
	sd	0.46588572	0.48026979	
<hr/>				
Sol estrés	1	2.87633428	3.2426892	
	2	3.0555663	2.87845309	
	3	2.36587685	2.53525411	
	4	2.42449656	1.96783965	
	5	3.28253419	2.87223851	
	6	3.1111452	2.37166256	
	X	2.8526589	2.64468952	
	sd	0.3777882	0.44914878	
<hr/>				
Sombra testigo	1	4.78151892	3.64666701	
	2	3.63984202	3.22026562	
	3	2.95980441	2.9896568	
	4	3.31029916	2.99937412	
	5	3.29605774	2.7479564	
	6	4.20961013	3.22673441	
	X	3.69952206	3.13844239	
	sd	0.67763248	0.3055288	
<hr/>				
Sombra estrés	1	4.72189787	3.91038824	

2	4.41925288	3.74381336
3	3.50907676	3.78975394
4	4.14149547	4.2135162
5	3.96730486	4.46935106
6	4.78484098	4.02356579
X	4.25731147	4.02506477
sd	0.48532985	0.27587343

Área foliar específica (SLA)

		T1	T 2	T 3
Sol	planta			
	1	13.7844957	12.5464104	
	2	10.0705853	9.33405352	
	3	13.3584909	11.3993103	
	4	14.1146138	9.62660247	
	5	11.686391	9.57885358	
	6	12.2197381	10.2091475	
	X	12.5390525	10.449063	
	sd	1.52494755	1.26778133	
<hr/>				
Sol	estrés			
	1	10.7030669	8.61554771	
	2	9.39879405	8.02892369	
	3	8.1929117	8.50969702	
	4	9.52425656	5.93948112	
	5	10.1320818	8.32512926	
	6	9.68920362	6.83151011	
	X	9.60671911	7.70838148	
	sd	0.84067503	1.08130423	

Sombra testigo	1	9.92655186	9.48262738
	2	6.4586532	7.27298377
	3	6.93202449	8.63399426
	4	6.30954152	7.42062498
	5	7.042607	7.79673366
	6	9.78113934	7.98107348
	X	7.7417529	8.09800625
	sd	1.65978811	0.83047032
Sombra estrés	1	9.28612483	9.74518746
	2	8.24694434	9.40599357
	3	7.58615819	9.60221356
	4	7.55607771	8.88527388
	5	8.13144154	9.67372272
	6	10.7086472	9.66676418
	X	8.58589898	9.49652589
	sd	1.21472727	0.32100074

Análisis de crecimiento relativo clásico (RGR)

		T1	T 2
Sol	planta		
	1	0.08462601	0.05453403
	2	0.09244561	0.06665019
	3	0.1120263	0.0608191
	4	0.12394281	0.06167058
	5	0.1005857	0.06351424
	6	0.10999251	0.06205736
	X	0.10318541	0.06206029
	sd	0.0142726	0.00399749

Sol estrés	1	0.09907793	0.14500723
	2	0.09244561	0.11576311
	3	0.13109471	0.10314872
	4	0.12394281	0.16018221
	5	0.1005857	0.13402918
	6	0.10999251	0.12371829
	X	0.10952321	0.13030812
	sd	0.01519278	0.0205669
Sombra testigo	1	0.14063995	0.10574953
	2	0.20596339	0.1426925
	3	0.11525858	0.12048055
	4	0.12863887	0.1211127
	5	0.13194011	0.12078536
	6	0.11721846	0.12250253
	X	0.13994323	0.12252297
	sd	0.0336949	0.01180499
Sombra estrés	1	0.14063995	0.07818621
	2	0.20596339	0.09017389
	3	0.11525858	0.08648915
	4	0.12863887	0.09043513
	5	0.13194011	0.08299425
	6	0.11720522	0.08531977
	X	0.13994102	0.08559973
	sd	0.03369669	0.00462433

Proporción raíz/parte aérea (R/S)

		T1	T 2	T 3
Sol	planta	r/s	r/s	r/s

	1	0.75136381	0.78989751	0.55730764
	2	0.65767971	0.58220432	0.50031554
	3	0.48410669	0.67113665	0.4605644
	4	0.4075581	0.65702326	0.28009955
	5	0.57661825	0.62785056	0.86996376
	6	0.49901666	0.65074906	0.53884298
	X	0.56272387	0.66314356	0.53451564
	sd	0.12578583	0.06945256	0.19205709
<hr/>				
Sol estrés	1	0.51681037	0.30642674	0.50212064
	2	0.65767971	0.45821417	0.46986555
	3	0.36904651	0.55394456	0.50777822
	4	0.4075581	0.25239362	0.56387976
	5	0.57661825	0.35459005	0.55012622
	6	0.49901666	0.40884874	0.52002053
	X	0.50445493	0.38906965	0.51896515
	sd	0.10638801	0.10867838	0.03408549
<hr/>				
Sombra testigo	1	0.32454526	0.53215533	0.50342822
	2	0.14613264	0.31586899	0.45634221
	3	0.46160168	0.42806199	0.50917787
	4	0.38172438	0.42422024	0.47855707
	5	0.36480636	0.42620397	0.47719254
	6	0.44862378	0.41592973	0.45897937
	X	0.35457235	0.42374004	0.48061288
	sd	0.1044762	0.06255134	0.02003953
<hr/>				
Sombra estrés	1	0.32454526	0.44822857	0.40570352
	2	0.14613264	0.34873583	0.54721916
	3	0.46160168	0.37600495	0.47564294
	4	0.38172438	0.3468988	0.36781857

5	0.36480636	0.40442682	0.38267269
6	0.44870987	0.38522165	0.44430342
X	0.3545867	0.38491944	0.43722672
sd	0.1144621	0.0380078	0.06695008

Cuadro 8. Curvas presión-volumen de *A. lutescens* en dos condiciones de luz (sol y sombra, sin riego, las plantas se cosecharon a los 0, 15 días sin riego. Inverso del potencial hídrico ($1/\Psi$), Contenido relativo de agua (CRA).

	Estrés sombra				Testigo sombra					
	$1/\Psi$	1-CRA	$1/\Psi$	1-CRA	$1/\Psi$	1-CRA	$1/\Psi$	1-CRA	$1/\Psi$	1-CRA
1	3.33	0	2.85714	0	3.33333	0	2.2222	0	2	0
2	2.857	0.0089	2.5	0.00195	2.5	0.0144	1.666	0.0026	1.6666	0.00625
3	2	0.03043	2.2222	0.00367	1.666	0.02122	1.53846	0.00558	1.33333	0.01060
4	1.818	0.03373	2	0.00714	1.17647	0.03068	1.37931	0.00904	1.14285	0.01588
5	1.666	0.0370	1.6666	0.0112	0.90909	0.03374	1.25	0.0132	1.08108	0.01938
6	1.538	0.04333	1.42857	0.01301	0.83333	0.03843	1.21212	0.01457	1.08108	0.02497
7	1.428	0.04573	1.37931	0.01482	0.81632	0.04525	1.111	0.01657	0.97560	0.0278
8	1.212	0.05038	1.37931	0.01743	0.78433	0.04798	1	0.02052	0.95235	0.02968
9	1.142	0.05512	1.21212	0.02105	0.75471	0.05190	0.95238	0.02167	0.90901	0.03418
10	1.025	0.06018	1.11111	0.02626	0.72727	0.05675	0.90909	0.02465	0.90909	0.03748
11	0.909	0.06561	1.08108	0.03088	0.72727	0.07030	0.83333	0.03205	0.83333	0.04137
		436	108	78	273	851	333	829	333	368
12	0.888	0.0704	1	0.03471	0.71428	0.08317	0.66666	0.06077	0.83333	0.04595
13	0.769	0.07586	0.95238	0.03560	0.70175	0.09841	0.625	0.07176	0.8	0.05061
14	0.740	0.09680	0.83333	0.06029	0.67796	0	0.6152	0.09030	0.76923	0.06615
15	0.666	0.10973	0.74074	0.06574	0.65577	0.1359	0.55555	0.10109	0.66666	0.08841
16	0.555	0.16486	0.625	0.09272	0.58829	0.24893				
17	0.526	0.18239								

	Estrés Sol						Testigo Sol					
	1		2		3							
	1/Ψ	1-CRA	1/Ψ	1-CRA	1/Ψ	1-CRA	1/Ψ	1-CRA	1/Ψ	1-CRA	1/Ψ	1-CRA
1	3.33333333	0	2.85714286	0	0.3	0	2.22222222	0	2.85714286	0	2	0
2	2.85714286	0.0097377	2.22222222	0.00346417	0.45	0.0044033	1.666666	0.0027131	2.22222222	0.00492386	1.66666667	0.02064612
3	2	0.0188775	1.81818182	0.00738135	0.55	0.0096628	1.4285714	0.0088394	1.66666667	0.00793289	1.25	0.02294961
4	1.66666667	0.0312633	1.42857143	0.01140512	0.7	0.0159008	1.33333333	0.0104148	1.48148148	0.00911826	1.21212121	0.02693095
5	1.25	0.0446741	1.33333333	0.01465611	0.8	0.0211603	1.25	0.0138281	1.42857143	0.01604814	1.11111111	0.02840974
6	1	0.0564619	1.25	0.01700109	0.9	0.0265014	1.1764705	0.0166287	1.42857143	0.01768943	1.05263158	0.03142418
7	0.90909091	0.064320	1.17647059	0.01982573	1	0.0314347	1.0810810	0.0195168	1.25	0.02662533	0.97560976	0.03460926
8	0.90909091	0.07286239	1.08108108	0.02499534	1.1	0.03836588	1.02564103	0.02336776	1.11111111	0.02963436	0.93023256	0.03753839
9	0.88888889	0.07961049	1	0.02771338	1.15	0.04329922	0.95238095	0.02660599	1.08108108	0.03866144	0.88888889	0.03907405
10	0.85106383	0.08781071	0.97560976	0.02979188	1.175	0.0477433	0.88888889	0.03028181	1.02564103	0.04139692	0.81632653	0.04447731
11	0.81632653	0.09396088	0.95238095	0.03157726	1.2	0.05304358	0.83333333	0.03343252	0.97560976	0.04604723	0.8	0.049909
12	0.78431373	0.10378406	0.90909091	0.03826578	1.3	0.06160558	0.76923077	0.04192193	0.88888889	0.04805325	0.76923077	0.0626493
13	0.76923077	0.11967199	0.83333333	0.04239614	1.475	0.08672076	0.75471698	0.04673552	0.83333333	0.05771861	0.71428571	0.06347401
14	0.74074074	0.13291193	0.76923077	0.04700616	1.625	0.12781832	0.72727273	0.05391213	0.76923077	0.06501322	0.66666667	0.07666932
15	0.66666667	0.18749466	0.66666667	0.06408719	1.8	0.13063155	0.55555556	0.08340627	0.74074074	0.07066655	0.625	0.07848936
16	0.55555556	0.26710515	0.625	0.07661151	1.85	0.14261834	0.52631579	0.1002	0.625	0.13750342		

Cuadro 9. Potenciales hídricos al amanecer de plántulas y árboles jóvenes *A. lutescens*

	Días sin riego			
	Testigo	15 días	30 días	50 días
Sombra	0.6	1.5	2.3	3.9
	0.7	2	2.5	3.8
	0.7	1.5	2.7	3.9
	0.75	1.3	2.1	3.7
	0.7	1.1	2.1	3.9
	0.7	1.5	2.3	4
Promedio	0.69+0.04	1.48+0.28	2.33+0.2	3.87+0.089
Sol	0.9	2.2	2.9	4
	0.8	2.3	2.5	3.9
	0.8	2.4	2.8	4
	0.8	2	2.7	3.9
	0.8	2.1	2.8	4.5
	0.8	1.9	2.9	4
	Promedio	0.82+0.038	2.15+0.1	2.767+0.17

Potenciales hídricos al amanecer en plántulas jóvenes en campo plántulas de *A. lutescens*

	Ma yo	Junio	Juli o	Agosto	Septiem bre	Octubre	Noviem bre	Diciemb re	Enero	Febrero	Mar zo	Ab ril
1		0.2	0.3	0.15	0.3	0.3	1.7	2.4	3.4	4	4.5	4.5
2		0.3	0.2	0.25	0.25	0.6	1.4	2.5	3.6	4	4.5	4.5
3		0.15	0.2	0.2	0.3	0.81	1.8	2.8	4	4.5	4.5	4.5
4		0.25	0.3	0.3	0.2	0.8	2	2.5	4	4.5	4.5	4.5
5		0.2	0.2	0.2	0.2	0.75	2.1	3	4	4.5	4.5	4.5
x		0.22	0.2	0.22	0.25	0.652	1.8	2.64	3.8	4.3	4.5	4.5
s		0.05700	0.0	0.05700	0.05	0.21393	0.27386	0.25099	0.28284	0.27386	0	0
d		877	5	877		924	128	801	271	128		

Cuadro 10. Curvas de respuesta a la luz y conductancia estomática de plántulas de *A. lutescens* en dos condiciones de luz (sol y sombra)

Plántulas crecidas bajo sombra								
Asimilación instantánea de CO ₂							Promedio	
PAR	h1	h2	h3	h4	h5	h6	X	SD
0	-1.71	-1.41	-1.56	-2	-1.07	-1.2	-1.49166667	0.34067091
50	1.03	0.815	0.69	0.41	0.955	1.35	0.875	0.3194057
75	1.7	1.6	1.63	1.12	1.6	1.91	1.59333333	0.25966645
100	2.71	2.16	2.1	1.41	2.59	2.85	2.30333333	0.5303458
200	4.46	3.31	3.07	2.28	3.36	3.9	3.39666667	0.74115226
400	5.39	4.02	3.64	2.64	3.87	4.52	4.01333333	0.91628962
600	5.65	4.14	3.66	2.79	4.16	4.81	4.20166667	0.97565192
800	5.72	4.24	3.76	2.82	4.36	4.89	4.29833333	0.9852597
1000	5.8	4.4	3.72	2.89	4.84	5.17	4.47	1.04494976
1500	5.73	4.25	3.2	3.15	4.89	5.34	4.42666667	1.08750479

Plántulas crecidas bajo sombra								
Conductancia estomática							Promedio	
PAR	h1	h2	h3	h4	h5	h6	promedio	desviación
0	0.0326	0.0389	0.0369	0.0318	0.0113	0.0167	0.02803333	0.01131542
50	0.0424	0.0438	0.042	0.0396	0.014	0.0328	0.03576667	0.01135494
75	0.0532	0.0452	0.051	0.0419	0.0236	0.0352	0.04168333	0.01096256
100	0.0593	0.0487	0.0544	0.0431	0.0366	0.0505	0.04876667	0.00807259
200	0.0685	0.053	0.056	0.0439	0.0375	0.064	0.05381667	0.01174145
400	0.0766	0.0559	0.057	0.0446	0.0385	0.064	0.0561	0.01360529
600	0.0819	0.0546	0.0556	0.0446	0.0406	0.0647	0.057	0.01489792
800	0.086	0.0547	0.0574	0.0459	0.0459	0.0615	0.05856667	0.01482156
1000	0.0914	0.0557	0.0566	0.0466	0.0482	0.0633	0.0603	0.01640219

Plántulas crecidas bajo sol							Promedio	
Asimilación instantánea de CO ₂							promedio	desviación
PAR	h1	h2	h3	h4	h5	h6		
0	-0.543	-1.49	-0.6	-0.529	-1.17	-0.841	-0.86216667	0.39267871
50	1.75	1.47	1.2	1.83	1.36	1.76	1.56166667	0.25561038
75	2.76	2.15	1.36	2.5	1.82	2.76	2.225	0.55963381
100	3.75	2.27	1.86	2.66	2.6	3.67	2.80166667	0.75940547
200	5.89	4.09	3.17	4.59	4.25	6.14	4.68833333	1.13282685
400	6.82	4.62	3.86	5.58	6.34	8.04	5.87666667	1.51780983
600	7.51	5.04	4.19	5.62	6.75	8.65	6.29333333	1.65474671
800	7.9	5.66	4.34	5.64	7	8.77	6.55166667	1.64059034
1000	8.11	6.51	4.4	5.99	7.19	8.94	6.85666667	1.6080257
1500	8.03	6.03	5.06	6.03	7.36	9.15	6.94333333	1.51255634

Plántulas crecidas bajo sol							Promedio	
Conductancia estomática							promedio	desviación
PAR	h1	h2	h3	h4	h5	h6		
0	0.0107	0.0154	0.05	0.0116	0.07	0.0603	0.03633333	0.0268389
50	0.0229	0.024	0.054	0.028	0.0833	0.0709	0.04718333	0.02610942
75	0.0332	0.0424	0.059	0.0288	0.096	0.0903	0.05828333	0.02897878
100	0.0559	0.0554	0.064	0.0301	0.106	0.1	0.06856667	0.02906425
200	0.0761	0.06	0.072	0.0525	0.111	0.105	0.07943333	0.02374672
400	0.0818	0.065	0.0768	0.0638	0.116	0.115	0.0864	0.02356336
600	0.0966	0.0685	0.0817	0.067	0.117	0.12	0.0918	0.02329489
800	0.101	0.0778	0.082	0.056	0.115	0.115	0.09113333	0.02337577
1000	0.1	0.0809	0.0766	0.0594	0.115	0.116	0.09131667	0.02275666
1500	0.0983	0.0796	0.0676	0.0649	0.116	0.109	0.08923333	0.02164391

Parámetros derivados de las Curvas de Respuesta a la Luz. Punto de saturación de luz (P. de sat) punto de compensación de luz (P. de comp) asimilación máxima de CO₂(Amax)

	Sombra			Sol		
	P. de sat	P. de comp	Amax	P. de sat	P. de comp	A max
1	453	24	7.21	645	9	8.7
2	399	36	2.39	951	15	9.17
3	453	31	5.6	981	9	7.83
4	408	30	5.126	657	9	7.06
5	592	15	6.149	798	21	8.97
6	543	15	6.6	774	12	10.52
X	474.67 +76.87	25.17+8.7	5.5+1.69	801+141.9	12.5+4.8	8.708+1.18

Cuadro 11. Marchas diurnas fotosintéticas de plántulas de *A. lutescens* en dos condiciones de luz (sol y sombra, sin riego, las plantas se cosecharon a los 0, 15, 30 y 50 días sin riego)

		Plántulas de sombra						
		15 días	25 días	40 días	50 días	sd	sd	sd
Testigo	07:00	-0.6495	0.7311	0.2287	0.2257	1.384	0.4241	0.1555
	09:00	3.96667	6.6633	4.0933	5.4367	1.8198	1.3593	1.6483
	11:00	4.18333	5.5617	3.48	3.395	1.8572	1.445	1.9261
	14:30	2.001	3.7267	2.8198	1.3943	1.3972	1.498	1.4593
	18:00	1.2345	1.3095	1.7017	1.262	0.2971	0.3905	0.7031
Estrés	07:00	0.2474	0.8893	0.0899	0.1442	0.2918	0.3343	0.1365
	09:00	3.61	4.675	1.8133	1.0915	0.8219	0.4586	0.6281
	11:00	3.3952	3.3517	1.3713	0.6771	1.7154	1.1925	0.8287
	14:30	0.86467	2.3712	1.5795	-0.034	0.354	1.5334	0.4933
	18:00	0.855	0.4135	0.3035	0.2519	0.3343	2.6246	2.2313

		Plántulas crecidas bajo sol							
		15 días	25 días	40 días	50 días	Sd	sd	sd	sd
Testigos	0	-3.31167	1.727833	-1.06083	-0.93717	1.674711	0.991443	0.739671	0.263167
	7200	-0.0745	1.570667	0.931833	0.813333	0.641846	0.568664	0.416486	0.564158
	14400	1	1.92959	1.598679	1.79739		0.785169	0.812182	0.547818
	21600	1.212933	3.271667	2.423333	0.39	1.658816	0.460583	0.295883	1.090217
	36000	0.073833	0.332333	-0.2995	0.368943	1.19767	2.13276	0.505774	1.320904
Estrés	0	-1.78167	0.233667	-0.80117	-1.03368	0.424049	0.424049	0.739671	0.991443
	7200	-0.39767	1.316333	0.9945	0.790333	0.394885	0.394885	0.416486	0.568664
	14400	1.01	1.231795	1.074808	0.828985	0.399788	0.399788	0.812182	0.785169
	21600	0.698622	2.788	1.296667	0	0.407512	0.407512	0.295883	0.460583
	36000	-0.839	-1.3785	-0.19167	0.00775	1.079309	1.079309	0.505774	2.13276

Cuadro 12. Marchas diurnas fotosintéticas en árboles jóvenes de *A. lutescens* en el campo experimental

		planta									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Octubre	0	1.3	3.6	-8.3	-2.7	-3.7	1.9	-3	-0.3	0.9	1.8
	7200	12.2	1.8	1.2	0.8	2.4	2	2.3	0.4	6.7	1.2
	14400	6.6	10.9	5.6	12.1	0.8	12.6	3.3	8.5	4	1.4
	21600	6	11	6	10	1	10.6	3	6	2	1
	36000	0.6	2.1	0.7	-0.2	-2.3	1	1.2	0.6	-4	0.1
Noviembre	0	-7	-11.6	-3.4	-4	-1.7	-1.5	-3.4	-3.8	-4.8	0.1
	7200	0.3	0.9	1.9	0	0.2	0.6	2.3	1	1.7	1.8
	14400	4.6	2.9	2.7	0.2	2.6	2.3	0.3	4.9	2.7	3.2
	21600	4.4	0.7	3.4	12.2	2.3	0	1.5	0.2	1.45	0.22
	36000	-1.4	1.4	-0.1	0	0.6	0.7	0.8	-2.2	-1.3	-3.5
Diciembre	0	-1.2	-1	-1.1	-	-	-	-	-	-	-

7200	1	-3.4	-1.2	-	-	-	-	-	-	-
14400	0.5	-1.1	-0.3	-	-	-	-	-	-	-
21600	0	1.4	0.7	-	-	-	-	-	-	-
36000	-0.2	-1	-0.6	-	-	-	-	-	-	-

Cuadro 13. Promedios de los contenidos de liriodenina en plántulas, plantas jóvenes y árboles adultos de *A. lutescens*

	Raíces jóvenes	raíces adultos	Tallos jóvenes	Tallos adultos	Hojas jóvenes	Hojas adultos	Estrés (raíces, tallos, hojas)	Plántulas sombra	Plántulas sol
JUN	3.799	37.5661	1.396	3.7358	4.1441	2.9905	0	15.5744 594	20.7013 521
JUL	4.8539	26.6788	0.3051	-	11.2549	0	15 días	54.4458 563	82.0772 19
AUG	3.9863	32.7219	0.7701	-	13.5445	0	25 días	72.9410 21	54.1317 573
SEP	3.521	33.0451	0.4224	6.4182	3.95	4.3897	40 días	177.749 642	76.5516 812
OCT	1.5941	66.1725	0.32	6.5162	3.7012	14.4066	0	11.4327	33.23279 861
NOV	7.6203	52.709	0.3223	5.5192	14.0468	6.6225	15 días	4.991140 565	14.05075 238
DEC	0.2405	340.32	0.3905	-	17.0537	-	25 días	1.219655 879	16.46664 98
JAN	227.303	12.2081	0.4409	3.8248	16.3056	7.0132	40 días	14.5505 989	3.292209 949
FEB	264.0837	344.299	0.4024	2.3443	-	2.5696	0	5.7772	8.875
MAR	278.2606	182.176	0.4502	2.4197	-	1.0879	15 días	20.53011 118	12.098
APR	775.5347	377.562	0	2.5244	-	2.5466	25 días	27.1623	24.72548 368
MAY	54.8603	0.6971	0.7319	3.4002	-	3.5503	40 días	19.1423	-

Anexo 2

Fotografías de *Annona lutescens*

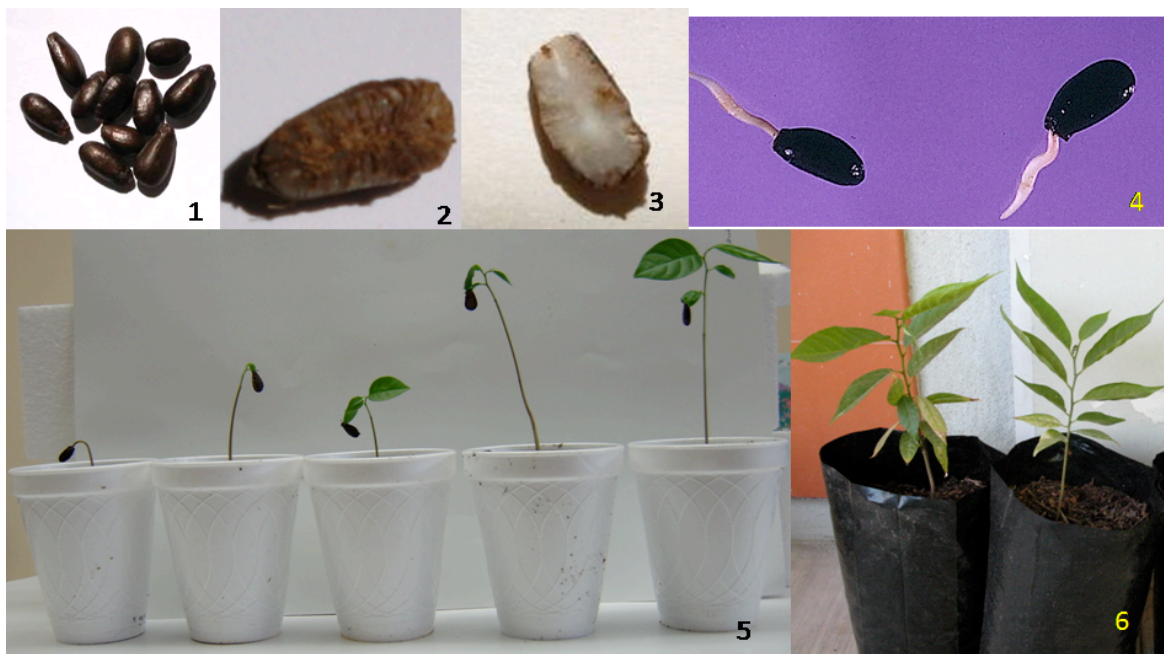


Figura 25. Germinación y desarrollo de plántulas de *Annona lutescens*. 1) Semillas secas, 2) semilla sin testa, 3) embrión descubierto, 4) semillas germinadas, 5) desarrollo de plántulas, 6) plántulas al inicio de los experimentos



Figura 26. Ejemplo de hojas de las plántulas crecidas en el sombreadero.



Figura 27. Ambiente del área experimental, 1 y 2) cobertura del parche de Selva Baja Caducifolia donde se sembraron los árboles jóvenes (inicio de la sequía), 3) árbol joven de *A. lutescens* sembrado en el parche.



Figura 28. Árboles adultos de *A. lutescens*. 1) Árbol en el inicio de la sequía, 2) Árbol en la estación de lluvia, 3) cosecha de raíces, 4) hojas 5 y 6) flores en diferentes etapas de desarrollo 7) fruto maduro

Anexo 3

Índice de cuadros y figuras

FIGURAS

Figura 1. Distribución de los Bosques Tropicales Caducifolios en México según Trejo & Dirzo (2002).	7
Figura 2. Selva Baja Caducifolia de la Depresión Central de Chiapas en la estación seca	22
Figura 3. Diseño general	28
Figura 4. Precipitaciones mensuales (Pre) y temperatura media mensual durante el periodo experimental. Estación meteorológica de Plan de Ayala.	29
Figura 5. Promedios mensuales históricos (1970-2001) de precipitación y temperaturas. (CONAGUA).	
Figura 6. Método del trabajo con árboles adultos en el campo	31
Figura 7. Diseño del trabajo con árboles jóvenes sembrados en el campo experimental	32
Figura 8. Distribución de plántulas en el sombreadero. En cada fila había seis plántulas en déficit hídrico y seis testigos.	33
Figura 8. Diseño del trabajo con plántulas en el sombreadero	35
Figura 10. Semillas de <i>A. lutescens</i> a) BBCH 00, b) BBCH 02, c) BBCH 05, d) BBCH 06, e) Semilla abierta.	41
Figura 11. Desarrollo de plántulas a) BBCH 09, b) BBCH 11, c) BBCH 02, d) BBCH 04, e) BBCH 09	45
Figura 12. Desarrollo de hojas en árboles adultos a) BBCH 11-16 b) BBCH 18-19	46
Figura 13. Desarrollo de flores y floración a) BBCH 53, b) BBCH 54, c) BBCH 55, d) BBCH 60, e) BBCH 63, f) BBCH 65	47
Figura 13. Desarrollo de frutos a) BBCH 71, b) BBCH 73, c) BBCH 75, d) BBCH 79, e) BBCH 82	48
Figura 14. Cuantificación de biomasa de plántulas de <i>Annona lutescens</i> bajo estrés hídrico y dos condiciones lumínicas.	56
Figura 15. Análisis de crecimiento relativo. AGR (tasa de crecimiento absoluto); RGR (tasa de crecimiento relativo); NAR (tasa de asimilación neta); LAR (índice de área foliar); SLA (área foliar específica); R/S (raíz/tallo). 1 primer periodo, 2 segundo periodo. n=6	58
Figura 16. a) Potenciales hídricos al amanecer en plántulas en los diferentes tratamientos de déficit de riego y b) en jóvenes durante la temporada de sequía P= 0.0001 n=6	61
Figura 17. Potenciales hídricos al amanecer (Ψ_{pd}) de juveniles. P=0.000, n=5	61
Figura 18. Curvas de respuesta a la luz en plántulas crecidas bajo sol y sombra	60
Figura 19. Plantas crecidas bajo el 10% de luz solar (sombra) a) y plantas crecidas bajo el 50% de luz solar (sol)	63
Figura 20. Marchas diurnas fotosintéticas de plántulas en el sombreadero en diferentes condiciones hídricas y lumínicas a y b, plantas bajo sol, c y d= plantas bajo sombra C= testigo, E= estrés, L= ligero 10 días, L-M= ligero moderado 20 días, M= moderado 20 días y S= severo 50 días sin riego, n= 12	64
Figura 21. Ganancia de carbono diaria en plántulas expuestas a diferentes tratamientos de déficit hídrico y luz. n=10, P=0.01. a) sombra b) sol	65
Figura 22. Marchas diurnas de octubre y noviembre. n=10	66
Figura 23. Asimilación diaria de carbono y su relación con la disminución del potencial hídrico. Se observa una relación moderadamente fuerte entre ambas variables. n=10, P= 0.0085	66
Figura 24. Contenido mensual de liriodenina en Raíces, Tallos y Hojas. Los valores presentados son medias de árboles adultos (n=6) y de árboles jóvenes (n=5), las letras muestran diferencias significativas mensuales (LSD-Test; P<0.05)	74
Figura 23. Liriodenina en árboles maduros y jóvenes en las estaciones de lluvia y sequía. n=36, las letras representan las diferencias significativas	75
Figura 24. Liriodenina durante los tratamientos de estrés hídrico. n=6.	77
Figura 25. Germinación y desarrollo de plántulas de <i>Annona lutescens</i> . 1) semillas secas, 2) semilla sin testa, 3) embrión descubierto, 4) semillas germinadas, 5) desarrollo de plántulas, 6) plántulas al inicio de los experimentos	
Figura 26. Ejemplo de hojas de las plántulas crecidas en el sombreadero	
Figura 27. Ambiente del área experimental, 1 y 2) cobertura del parche de Selva Baja Caducifolia donde se sembraron los árboles jóvenes (inicio de la sequía), 3) árbol joven de <i>A. lutescens</i> sembrado en el parche.	
Figura 28. Árboles adultos de <i>A. lutescens</i> . 1) árbol en el inicio de la sequía, 2) árbol en la estación de lluvia, 3) cosecha de raíces, 4) hojas 5 y 6) flores en diferentes etapas de desarrollo 7) fruto maduro	

CUADROS

Cuadro 2. Codificación BBCH de las etapas fenológicas de <i>A. lutescens</i> .	42
Cuadro 3. Parámetros de las curvas Presión Volumen de plántulas de <i>A. lutescens</i> en dos condiciones lumínicas y dos grados de déficit hídrico.	56
Cuadro 4. Parámetros derivados de las curvas de respuesta a la luz.	59
Cuadro 5. Variación organoespecífica mensual de lirioidenina en árboles jóvenes y adultos de <i>A. lutescens</i> .	65
Cuadro 6. Biomasa de plántulas	97
Cuadro 7. Análisis de crecimiento relativo	101
Cuadro 8. Curvas presión-volumen	109
Cuadro 9. Potenciales hídricos al amanecer de plántulas y árboles jóvenes	111
Cuadro 10. Curvas de respuesta a la luz y conductancia estomática	112
Cuadro 11. Marchas diurnas fotosintéticas	114
Cuadro 12. Marchas diurnas fotosintéticas en árboles jóvenes	115
Cuadro 13. Promedios de los rendimientos de lirioidenina en plántulas, árboles jóvenes y árboles adultos	116

Influence of seasonal variation on the phenology and liriodenine content of *Annona lutescens* (Annonaceae)

Marisol Castro-Moreno · Clara Leonor Tinoco-Ojangurén ·
Ma. del Rocío Cruz-Ortega · Alma Rosa González-Esquinca

Received: 15 March 2012 / Accepted: 25 December 2012
© The Botanical Society of Japan and Springer Japan 2013

Abstract *Annona lutescens* Saff. (Annonaceae) grows as a native tree in Chiapas, Mexico in Tropical Dry Forest habitat. Like most Annonaceae, it biosynthesizes benzylisoquinoline alkaloids, mostly liriodenine. To determine the influence of seasonal changes in the accumulation of liriodenine, the monthly variation of liriodenine content in roots, stems and leaves of mature and young trees was observed. These parts of young and mature *A. lutescens* trees were collected monthly over a 1 year period and the alkaloids were extracted; the liriodenine was quantified by high-resolution liquid chromatography. The phenological stages of the species were also assessed (leaf development, flowering and fruiting) using the Biologische Bundesanstalt, Bundessortenamt und Chemische Industrie (BBCH) scale. The analysis of both young and mature trees showed a significant increase in the liriodenine concentration occurs

within roots during the dry season, which coincides with leaf fall. A significant decrease also occurred at the beginning of the rainy season (the period of leaf growth); the liriodenine content for the next rainy season did not reach the levels of the previous dry season. The climatic variation induced phenological and physiological changes in this species.

Keywords Alkaloids · Annonaceae · Phenology · Tropical Dry Forest

Introduction

Plants synthesize a wide variety of secondary metabolites (SM), whose functions have been confirmed by analysis of different hypotheses. One hypothesis states plants use SM for protection from different types of stress, including environmental stress, an excess of UV radiation and water stress (Facchini 2001; Schäffer et al. 2004; Szabó et al. 2003). These compounds have also been shown to be effective as a defensive mechanism against herbivores and pathogens or as an attractant for pollinators and/or dispersers (Fraenkel 1959; Wink 1987, 2010). Furthermore, SM could be considered as reserve metabolites of carbon skeletons and nitrogen (Wink 1998, 2010). Alkaloids are among the most studied molecules. In some species, a variation in the production of SM, caused by phenological and environmental changes, has been documented (Brooks and Feeny 2004).

Few systematic studies address the variation in levels of alkaloids in different plants organs. Variations in organ-specific distribution of alkaloids, which can change during ontogeny, have been reported in some shrub species. Wu et al. (1996) produced one of the first studies, discussing

M. Castro-Moreno · A. R. González-Esquinca (✉)
Laboratorio de Fisiología y Química Vegetal, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas, Libramiento Norte Poniente 1150 Colonia, Lajas Maciel C.P. 29039, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México
e-mail: aesquinca@unicach.mx

M. Castro-Moreno
Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria 3000 Delegación Coyoacán, C.P. 04360 Distrito Federal, México

C. L. Tinoco-Ojangurén
Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Luis Donaldo Colosio S/N, C.P. 83000 Unidad Hermosillo, Sonora, México

M. R. Cruz-Ortega
Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, 3000 Delegación Coyoacán, C.P. 04360 Distrito Federal, México

the seasonal variation of carbazole alkaloids in *Murraya euchrestifolia*. Wu et al. (1996) showed climate does not always affect the production of alkaloids; for example, bis-7-hydroxygirinimbine-A and murrayazolidine production depend on the season, while girinimbine production is not dependent on the season. Likewise, in the herb *Hydrastis canadensis* (Ranunculaceae), the berberine alkaloid does not exhibit significant seasonal variations, while the alkaloid hydrastine does (Douglas et al. 2010). In *Psychotria umbellata* (Paranhos et al. 2009) all organs contained varying concentrations of indole alkaloidal glucoside psychollatine which is found most abundantly in the flowers. However, this distribution does not change with the seasons. Also, seasonal variation and the effect of abiotic factors on the content of alkaloids have been described in some tree species. For example, in *Taxus brevifolia*, Vance et al. (1994) and, in *Taxus baccata*, Hook et al. (1999) reported seasonal variation in levels of taxoids. A variety of factors may cause this variation such as variations among cultivars, geographical and climatic characteristics of the site and types of soil.

In *Delphinium barbeyi*, *Papaver somniferum* and *Catharanthus roseus*, for example, the concentration of alkaloids increased when these plants were exposed to water stress (Höft et al. 1996; Jaleel et al. 2007; Szabó et al. 2003). In *Merendera montana*, alkaloids accumulate in the roots during the winter, when drought occurs (Gómez et al. 2003). Although alkaloids have been considered as nitrogen reserves, the production of alkaloids is often induced by stressful environmental events (Höft et al. 1996); nevertheless the variation in alkaloid production caused by increased levels of stress has not yet been sufficiently documented. The alkaloid-producing plants inhabiting Tropical Dry Forest (TDF) are good models scientists can use to gain a deeper understanding of the impact of abiotic stress because the TDF experiences harsh seasonal changes, with a sharp contrast between precipitation levels of the dry and rainy seasons, resulting in major phenological changes in the plants of this region (Borchert 1999). The mild temperatures and high soil moisture levels at the beginning of the dry season combined with additional usable light hours caused by a lack of cloudiness result in favorable conditions for plant development. The higher temperatures seen from February to April cause the drought to intensify and the plants enter a period of tolerance so they can survive the more extreme conditions.

Like other Annonaceae, *A. lutescens* produces benzylisoquinoline alkaloids, including liriodenine, the most abundant oxoaporphine alkaloid in this family (De la Cruz and González-Esquinca 2012), which has been found in mature fruiting trees (González-Esquinca 2001), in the seed germination and seedling stages of different aged plants (Alfaro 2006; Castro 2005) and mainly in roots

(González-Esquinca 2001). Initial data (Abrajan et al. 1999) showed alkaloid content varies when the plants were harvested in areas with different climatic conditions. These data suggest that the environment, in combination with the phenological stages of plant growth, can modulate biosynthesis of this alkaloid; therefore, this study examines the organ-specific variations of liriodenine content and the influence of the environment on their regulation in young and mature trees of *A. lutescens* during an annual cycle.

Methods and materials

Study area

The research was done in the region of Terán, located in the Central Depression of Chiapas, México (16°45'3.2"N, 93°10'00"W). In some parts of this area, TDF still predominates where the weather is a warm sub-humid climate with summer rains (AWo (w)). The average annual temperature is 20 °C with an annual rainfall of 948.2 mm. Climatic data were obtained from the nearest weather station in Plan de Ayala, Tuxtla Gutiérrez, México.

Characteristics of *A. lutescens*

A. lutescens thrives as a tree in the TDF of Chiapas, with annual periods of rain and drought (Miranda and Hernández 1963). Flowering occurs at the beginning of the dry season, while fruits develop during later in the dry season. As a result, seeds are ready to germinate during the rainy season. In the breeding season the plants also experience senescence and leaf fall, typical of most species of TDF (Borchert 1983) as a response to drought.

Phenological record

The phenological phases of plants were described, based on the stages of emergence, transformation or disappearance of an organ. This study used the BBCH-scale to describe the phenological record (Hess et al. 1997). The BBCH-scale uses a two digit code. The first digit describes the major state of development (0–9), and the second one describes the secondary states (0–9) that define short phases of development of each major state. For this investigation BBCH states 1, 5, 6, 7, 8, and 9 were considered because they correspond to the periods of growth, maturity and senescence of leaves, flowers and fruits.

Plant material collection

Young plants: after seeds germinated, 140 plants were selected and grown in the shade until they reached 2 years

old. During the rainy season, the 2-year-old plants were transplanted to an experimental field in the same locality from which the adult trees were collected. These plants were planted in a completely random pattern and five plants were randomly selected each month for harvest. The roots were obtained by careful excavation. Each plant was considered an individual experimental unit; to extract the alkaloids, each plant was separated into roots, stems and leaves.

Adults: six mature trees of *A. lutescens* were monthly collected. At the end of the dry season, all leaves had expired and no leaves were present to be collected. A reference specimen, # 352, is housed at the Herbarium Eizi Matuda of Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas (HEM).

From each tree about 12 g of bark from one of the primary roots was obtained by excavating the base of the stem to expose one of the roots and removing a portion of the bark from the roots with a razor. The roots were covered again to protect the tree. The samples of stem bark and leaves were harvested from five branches of each tree, and each sample was dried in the shade.

Extracting alkaloids

An acid–base selective extraction (González-Esquinca 2001) was applied to the dried and grinded plant material. Samples of 5 g were impregnated with 30 mL of a saturated solution of Na_2CO_3 ; then, they were dried at room temperature throughout approximately 48 h. Once dried, alkaloids were extracted with 100 mL of CHCl_3 and with constant stirring for 1 h. Each sample was filtered, and then washed with distilled water. The chloroform phase was extracted with 60 mL of 1 N HCl. The acid phase was preserved and alkalized with a saturated solution of Na_2CO_3 until reaching pH 9, extracted again with CHCl_3 , and dried with anhydrous Na_2SO_4 . Finally, it got filtered and evaporated in a rotary evaporator at very low temperature; thus obtaining extracts of total alkaloids.

Liquid chromatography analysis was done with an HPLC system (Perkin Elmer Series NCI 900, Norwalk, CT, USA) in reverse phase (Spheri-5 RP-18, 100 mm \times 4.6 mm i.d., 5 mm particle diameters, Perkin Elmer Instruments, Norwalk, CT, USA). The mobile phase consisted of water–methanol (30:70 isocratic). The flow rate was 1 mL min^{-1} , and the temperature of the column compartment was held at 30 °C. UV detection at 254 nm was used.

Identification of liriodenine was done by internal spiking and UV spectrum comparisons were referenced to pure liriodenine. A calibration curve for the quantification liriodenine was constructed by analyzing a series of liriodenine stock solutions containing 500, 250, 125, 62.5, 31.3, 15.6, 7.8 and 3.9 mg mL^{-1} . The curve was linear in this area, with an r^2 value of 0.98. Analytical conditions were determined using a Turbochrom workstation from Perkin

Elmer. Extracts were dissolved at 1 mg mL^{-1} and 20 μL of this solution were analyzed in the HPLC.

Statistical analysis

To compare the variation in the concentration of liriodenine between months and between the rainy season and dry season, repeated analysis of variance (ANOVA) was conducted, by LSD test. Because of variations in the monthly amount of observed liriodenine, the data was \log_{10} transformed. Correlation analysis was used to determine the strength of the relationship between the phenological phases, precipitation and maximum temperatures, and the monthly amount of liriodenine. Statgraph software was employed for the analysis.

Results

Climate data

The adult specimens were collected during 2007; the dry season began in November and ended in mid-May. The drier and hotter months were March and April. Rains started in May and the rainiest months were from July to October. The lowest temperatures were observed in January and the highest in April. In 2007, the rainy period began in the third week of May; plant material was collected at the end of this week.

The young samples were collected during the dry season which began in late October 2009 and ended in May 2010. The driest months were February and March, but the warmest were March and April. The average annual rainfall was greater in that time period than in 2007. The lowest temperatures were observed during January and the highest in April (Fig. 1).

Phenology

Table 1 shows the phenological stages of *A. lutescens* during an annual cycle. During dry season, plants developed flowers and flowered (May and June), fruit formed and matured (July and August), and senescence of leaves and leaf buds (September) occurs. During the rainy season, leaves sprout and develop (January) and the formation of the first flower buds take place.

Organ-specific variation of liriodenine

During the year, in adults and young plants, the alkaloid liriodenine was obtained from roots, stems and leaves of *A. lutescens*. Roots from both adult and young plants had the greatest concentration. This highlights the fact in some months (December, February and April) the increase of

Fig. 1 Monthly precipitation (*Pre*) and mean monthly air temperature (*Temp*) during the experimental period (2007, 2009 and 2010) measured at the Plan de Ayala meteorological station

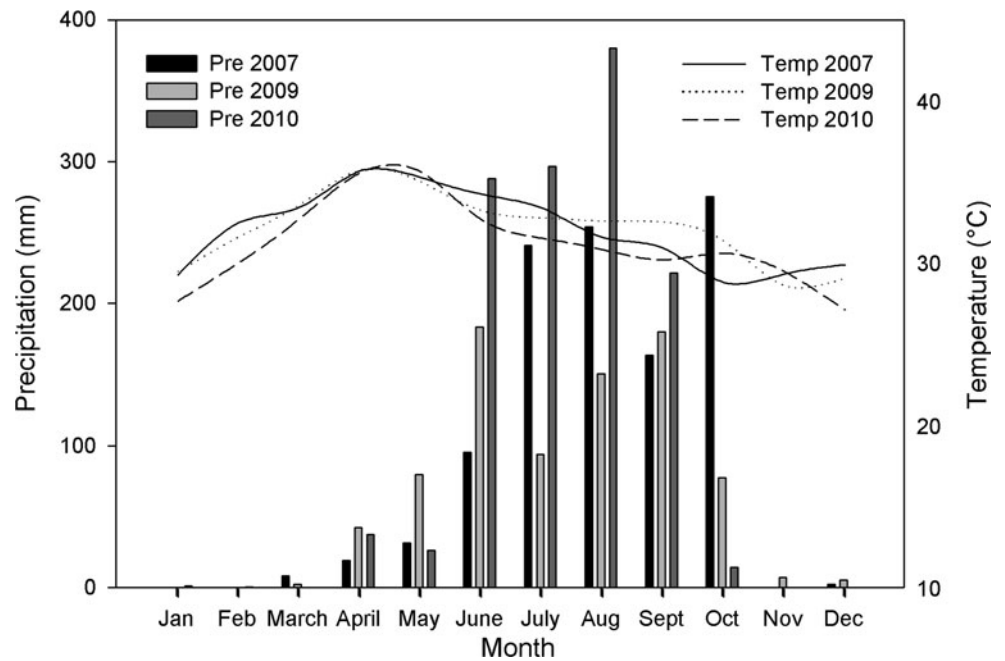


Table 1 Phenological and morphological description of *A. lutescens* during the collecting year, using the BBCH scale described by Hess et al. (1997), Cautin and Agustí (2005)

Season/ month	Phenological characteristics young mature		
	Vegetative		Reproductive
	Young	Mature	Mature
Rainy			
May		0, 11–12: foliar buds and young leaves	–
June	12–13: buds, young leaves and growing, mostly light green	12–13: buds, young leaves and growing, mostly light green	–
July	13–15: branches with leaves in different developmental stages	13–18: branches with leaves in different developmental stages	–
August	13–19: branches with leaves in different developmental stages	14–15: branches with leaves in different developmental stages	–
September	15–19: branches with mature leaves in different developmental stages	15–19: branches with mature leaves in different developmental stages	51–52: some flower buds
October	18–19: branches with mature leaves 80 %	18–19: branches with mature leaves 80 %	53–59–60: slower buds growing
Dry			
November	19, 91: mature leaves, and coriaceous leaves	19: mature leaves 90 %	59–65: flower buds, pre-female flowers, early female flowers and female flowers
December	91–95: Mature leaves with some senescence sings	19, 91: Mature leaves, and coriaceous leaves	66–69–70–73: flowers in different developmental stages: pre-female flowers, early female flowers, female flowers and male flowers. Flowers without petals, little immature fruits
January	91–98: senescence 70 %	91–93: senescence 40 %	73–74: growing fruits
February	99, 00: senescence and expiration of leaves	94–96: senescence 50 to 80 %	75–78: growing fruits and final size green fruits
March	00: latent buds	97–99: expiration of leaves	79–84: final size, green fruits
April	00: latent buds	97–99: expiration of leaves 100 %	85–89: mature fruits

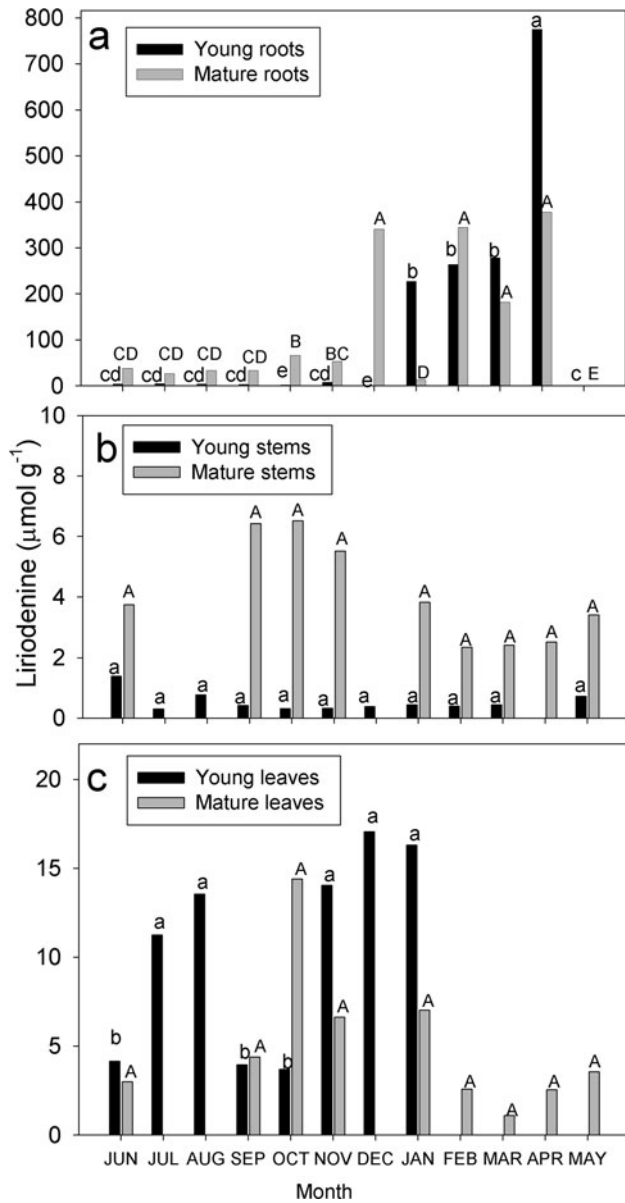


Fig. 2 Monthly liriodenine concentration in roots (a), stems (b), and leaves (c). The values presented are means of mature plants ($n = 6$) and young plants ($n = 5$). The different letters above the columns indicate significant differences (LSD-test; $P < 0.05$)

alkaloids in mature trees can even exceed the concentration found in leaves and stems by 300 times (Fig. 2).

Leaves and stems

Throughout the season, in both adults and young plants, small amounts of liriodenine were found in stem and leaves, without a significant difference between the monthly samples (Figs. 2, 3). In some months, only traces of the alkaloid were found. However, while liriodenine increases in the roots, its proportion in stem and leaves decreases in a moderately strong inverse relationship

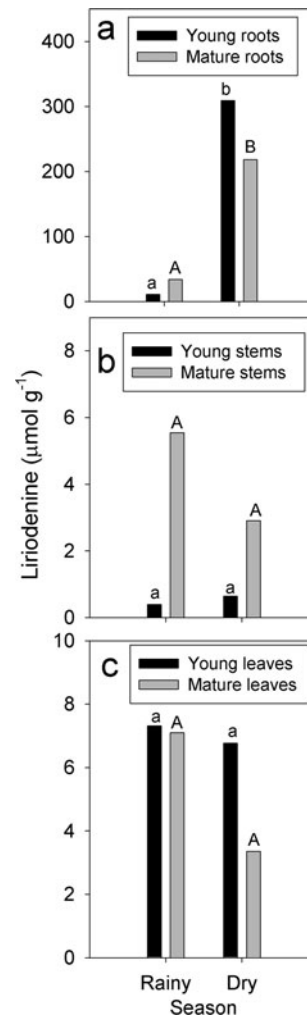


Fig. 3 Liriodenine concentration in the rainy and dry seasons in roots (a) stems (b) and leaves (c) of mature ($n = 36$) and young plants ($n = 30$). The different letters above columns indicate significant differences (LSD-test; $P < 0.05$)

($r = -0.52$, $F = 5.97$, $P = 0.0226$); in February–May the young plants lack leaves (Fig. 2).

Roots

In every month of the rainy season, liriodenine found in the roots of young and adults trees was less than $70 \mu\text{mol/g}$ of tissue, with significant differences in its accumulation ($F = 6.4$, $P = 0.004$). The LSD test in adults shows three different groups: May (e), June, July, August and September (c, d) and October (c).

In mature trees, during the dry season, an exponential growth and a wide variation in the content of liriodenine content was observed (Table 2; Fig. 2). Significant differences were detected in some months (December, February, March and April) and the greatest concentrations of liriodenine were observed in the final stage of the dry season

Table 2 Phenological BBCH stages and comparative means of liriodenine content in roots during collecting years

Season/month	Phenological			Roots	
	Vegetative		Reproductive	liriodenine $\mu\text{mol g}^{-1}$	
	Stage	Young	Mature	Young	Mature
Rainy					
May	00	11	–	54.86 \pm 0.19 c	0.682 \pm 0.03 E
June	11–15	11–15	–	3.79 \pm 0.64 cd	33.26 \pm 11.1 CD
July	12–18	12–18	–	4.85 \pm 0.49 cd	31.59 \pm 10 CD
August	13–19	12–19	–	3.98 \pm 0.39 cd	37.98 \pm 6.67 CD
September	15–19	13–19	51	3.52 \pm 0.73 cd	33.06 \pm 7.6 CD
October	15–19	13–19	51–55	1.59 \pm 0.52 e	66.28 \pm 7.4 B
Dry					
November	18–19	18–19	*55–59 and 61–62	7.62 \pm 1.39 cd	52.71 \pm 11.8 BC
December	91	18–19	*63–69 and 71	0.24 \pm 0.06 e	340.32 \pm 75.7 A
January	91–98	29	71–72	227.30 \pm 17.7 b	12.21 \pm 1.01 D
February	99–00	91–95	81	264.08 \pm 53.5 b	344.3 \pm 100 A
March	00	95–99	81–84	278.26 \pm 18.9 b	182.17 \pm 27.5 A
April	00	99	85–89	775.53 \pm 62.39 b	377.56 \pm 94.9 A

Data of liriodenine content are the means and the SE, $n = 6$, $P \leq 0.0000$, Different alphabets indicate statistical significance different (a, b, c, d, e for young trees and A, B, C, D, E for mature trees)

* Shows two consecutive phases

(February, March and April) when the fruits ripen. The smallest amount of liriodenine was found in May when the trees are in the process of making new leaves.

No relationship was found between the monthly amount of liriodenine and rainfall ($r = 0.32$, $F = 1.58$, $P = 0.228$). Additionally, no relationship was found between monthly temperatures and the amount of liriodenine or with the analyzed phenological states.

Liriodenine levels did vary significantly seasonally. During the dry season, the concentration of liriodenine in the roots increased, going up to 377 $\mu\text{mol/g}$ of tissue; meanwhile, in the rainy season, the average was 30.71 $\mu\text{mol/g}$ of tissue ($F = 29.94$, $P = 0.0001$). In leaves, no significant variation occurred throughout all seasons ($P = 0.06$) but the stems exhibited a slight increase in the amount of the alkaloid present during the rainy season ($P = 0.0135$) although it was never as high as the amount present in the roots (Fig. 3).

During the dry season, the monthly variation of liriodenine content in the roots of young plants varied widely and corresponds to the variation seen in adult trees ($P = 0.0001$). However, the amount of alkaloid increases from 9.69 $\mu\text{mol g}^{-1}$ of tissue in November until the fourth month of the dry season (February), when it reaches 225.54 $\mu\text{mol g}^{-1}$ tissue (a 26 fold increase; $F = 72$, $P = 0.0001$) and at the start of the wet season (April) it increased to 775.53 $\mu\text{mol g}^{-1}$.

The levels of liriodenine in the wet and dry seasons were significantly different ($P = 0.0001$), but high variability is

seen between the first period (October–December) and the second period of the dry season (January–April) based on the analysis that was performed to discriminate levels seen in the first months of drought to reduce the variability of the data ($P = 0.0001$; Fig. 2).

Discussion

The vegetative and reproductive stages of *A. lutescens* could be characterized during the annual cycle. Vegetative growth dominates during the rainy season, including the formation of branches, sprouting and foliage development, while the reproductive stages developed during the dry season.

The young trees showed only vegetative growth stages (BBCH 1, 2 and 9). They are more susceptible to drought than adults and begin to show signs of senescence in the fourth month of drought, while mature trees begin the process of senescence at the end of the fifth month.

The reproductive stage (flowering and fructification) takes place during dry season, with the first flower buds appearing at the beginning of the drought. The flowers of this species go through the same stages the flowers of *Annona cherimola* experience, as described by Cautin and Agustí (2005) transforming from pre-female flowers to female and later to male.

In *A. lutescens* the development of flowers and flowering coincide with a significant decline in liriodenine content in

the roots, unlike what happens in *Psychotria brachyceras* (Schäffer et al. 2004) and *P. umbellata* (Paranhos et al. 2009) in which alkaloid levels decrease in the vegetative parts during flower development and flowering when alkaloids are present in flowers. The authors attribute this shift to a possible defensive role alkaloids may play in the species. In *A. lutescens*, the fruits develop, simultaneously with leaf senescence; also, a slight diminution of the amount of lirioidenine in stems occurs at the same time a significant increase occurs in the roots.

In *A. lutescens*, alkaloid accumulation from February to April begins consistently in adult and young trees which have not yet produced flowers. Hence, this response can be more or less attributed to seasonal changes in temperature and precipitation as seen in the production of some alkaloids in *Murraya euchrestifolia* (Wu et al. 1996) and *Hydrastis canadensis* (Douglas et al. 2010). Signs of leaf senescence and expiration are simultaneous to the highest accumulation of lirioidenine in roots.

In some species (*Crinum macowanii*, *Achnatherum robustum*, *P. somniferum*, *M. montana*) the variation in alkaloid biosynthesis and its organ-specific distribution, have been related to changes on the environmental parameters such as temperature, light and rainfall, which occur each season (Elgorashia et al. 2003; Gómez et al. 2003; Szabó et al. 2003) and in others, to biological parameters, such as phenological development (*Nicotiana attenuata*); moreover, a few studies relate the levels of alkaloids in some plants to environmental and phenological changes (Kessler et al. 2006; Kirk and Vrieling 2010).

Abiotic factors influencing on the production of secondary metabolites include light intensity and exposure time, and changes of temperature and rainfall (Acosta 2003). For example, water stress increases the amount of alkaloids found in plants such as *P. somniferum* (codeine 1.1 times and morphine 4.6 times) and *C. roseus* (serpentine and vinblastine) (Jaleel et al. 2007; Szabó et al. 2003). Zamora-Natera et al. (2008) did not notice any differences in the profile of secondary metabolites of different organs of *Lupinus exaltatus*, although the specific content did vary over time. This resulted in increased levels of alkaloids from 0.91 to 1.20 % of the net weight in flowers and up to 2.1 % in leaf sheaths, with a consistent decrease of alkaloid levels in the vegetative parts; therefore, this suggests alkaloids are important for the protection of fruits during the reproductive stage. The relationship between temporal and organ-specific accumulation of lirioidenine and phenological changes in plants has been connected with the function that these compounds may have in the physiological processes of plants. For example, Chapin et al. (1990) suggested alkaloids may be involved in the storage of nitrogen and the carbon skeletons by making them unavailable to herbivores and so providing a defensive

mechanism for plants; they also suggested some alkaloids may even be used to create other compounds.

Plant senescence and programmed cell death occur during periods of water stress. In this stage, resources which may be useful in the current or upcoming season for sprouting are recycled. However, using these compounds in the creation of molecules such as sugars or amino acids may result in a risk to some species because the absence of these alkaloids would make them easy targets for herbivores and pathogens. Nonetheless, the accumulation of secondary toxic metabolites, such as alkaloids, could be a good survival strategy because this would diminish the plant's palatability to herbivores or susceptibility to pathogenic attack (De la Cruz et al. 2011). In *A. lutescens*, a typical species of the TDF, the reduction of the lirioidenine alkaloid in roots during sprouting and leaf expansion may indicate this substance is used for the construction of molecular nitrogen, since the foliation of plants requires a large investment of energy and reserve materials, originating in the capture and recycling of carbon (Borchert 1993; Borchert et al. 2002; Murphy and Lugo 1986). In this case, the alkaloids provide molecular nitrogen that could contribute in the creation of leaves, by using the recycled material. However, De la Cruz et al. (2011) reported lirioidenine is also active in defense against different fungal phytopathogens, as well as helping in the formation of carbon skeletons and nitrogen metabolism in the formation of new shoots, so lirioidenine could have more than one function and also be part of the defensive mechanisms of *A. lutescens*.

Little research has been conducted using monthly monitoring of secondary metabolites. For example, Fuentes et al. (2001) found significant differences in the alkaloid contents in *Passiflora incarnata* L. but found no relationship between alkaloid content and any particular environmental factor. Therefore, the increase of lirioidenine in *Annona lutescens* during the driest season is consistent with the increase of alkaloids during the dry season in other species such as *Phellodendron amurense*, *Tabernaemontana pachysiphon*, *C. roseus* and *Delphinium barbeyi* (Höft et al. 1996; Jaleel et al. 2007; Ralfphs et al. 1998; Xia et al. 2007). One of the explanations of this increase in alkaloids during dry season is the use of these substances for the protection of plant organs that remain alive during the stress of the dry period.

Lirioidenine was found throughout the year, in stems, leaves and roots. Levels of lirioidenine increase and it is stored in the roots when the driest part of the season appears; also lirioidenine levels change based on the phenological states of fructification (August) and leaves senescence (September). Production and storage of lirioidenine in *A. lutescens* responds to the seasons in the TDF, and could also be related to the increase in temperature,

drought intensity and the storage of nitrogen for the next foliation. The combination of extreme temperatures and drought induce phenological and physiological changes in this species, including a logarithmic increase in liriodenine in young and mature trees in the warmer months of severe drought. The variations in liriodenine content and its distribution in this species during seasonal changes provide data to increase our knowledge of the possible ways some plants adapt to climatic conditions in TDF.

Acknowledgments The authors are thankful and to the CONACyT and with the “Posgrado en Ciencias Biológicas” from Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), this research work is part of a Doctoral Thesis from the “Posgrado en Ciencias Biológicas” from UNAM.

References

- Abrajan HP, Diaz CA, De La Cruz CI, Luna CLM, Pérez AMC y González EAR (1999) Análisis sobre la producción de alcaloides en *Annona lutescens* en diversas condiciones edafoclimáticas. Memoria del II Congreso Internacional de Anonaceas. Tuxtla Gutiérrez. Chiapas. México. 83
- Acosta L (2003) Principios agroclimáticos básicos para la producción de plantas medicinales. *Rev Cubana Plant Med.* 8(1). http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962003000100008&lng=es&nrm=iso
- Alfaro RTJ (2006) Producción de acetogeninas y alcaloides durante la germinación y primeras etapas del desarrollo de *Annona lutescens* Saff. (Annonaceae). Tesis de la Licenciatura en Biología. Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas
- Borchert R (1983) Phenology and control of flowering in tropical trees. *Biotropica* 15:81–89
- Borchert R (1993) Water status and development of tropical trees during seasonal drought. *Trees* 8:115–125
- Borchert R (1999) Climatic periodicity, phenology, and cambium activity in tropical dry forest trees. *IAWA J* 20:239–247
- Borchert R, Rivera G, Hagnauer W (2002) Modification of vegetative phenology in a tropical semi-deciduous forest by abnormal drought and rain. *Biotropica* 34:27–39. doi:10.1111/j.1744-7429.2002.tb00239.x
- Brooks JS, Feeny P (2004) Seasonal variation in *Daucus carota* leaf-surface and leaf-tissue chemical profiles. *Biochem Syst Ecol* 32:769–782
- Castro MM (2005) Efecto del estrés hídrico en la biosíntesis de alcaloides y acetogeninas en plántulas de *Annona lutescens* Saff. Tesis de licenciatura. Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas
- Cautin R, Agustí M (2005) Phenological growth stages of the cherimoya tree (*Annona cherimola* Mill). *Sci Horticult* 105:491–497. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2005.01.035>
- Chapin FSIII, Schulze ED, Mooney HA (1990) The ecology and economics of storage in plants. *Ann Rev Ecol Syst* 21:423–447
- De la Cruz CI, González-Esquinca AR (2012) Liriodenine alkaloid in *Annona diversifolia* during early development. *Nat Prod Res* 26:42–49. doi:10.1080/14786419.2010.533373
- De la Cruz CI, González-Esquinca AR, Guevara FP, Jiménez GLF (2011) Liriodenine, early antimicrobial defense in *Annona diversifolia*. *Z Naturforsch* 66:377–384
- Douglas J, Follett JM, Parmener GA, Sansom CE, Perry NB, Littler RA (2010) Seasonal variation of biomass and bioactive alkaloid content of goldenseal, *Hydrastis canadensis*. *Fitoterapia* 81:925–928
- Elgorashia EE, Drewesb SE, Morrisc C, van Staden J (2003) Variation among three *Crinum* species in alkaloid content. *Biochem Syst Ecol* 31:601–615. doi:10.1016/S0305-1978(02)00222-3
- Facchini P (2001) Alkaloid biosynthesis in plants: biochemistry, cell biology, molecular regulation, and metabolic engineering applications. *Annu Rev Plant Physiol* 52:29–66
- Fraenkel GS (1959) The raison d’être of secondary plant substances. *Science* 129:1466–1470
- Fuentes FVR, Méndez G, Lemes HCM, Rodríguez FCA, Soler BA, González R, López E (2001) Dinámica de acumulación mensual y diaria de alcaloides y flavonoides en *Pasiflora incarnata* L. *Rev Cubana Plant Med* 3:105–111
- Gómez D, Azorin BJ, Viladomat F, Codina C (2003) Seasonal and Spatial Variation of alkaloids in *Merendera montana* in relation to chemical defense and phenology. *J Chem Ecol* 29:1117–1126
- González-Esquinca AR (2001) Contribución al estudio del género *Annona* (Annonaceae): Análisis fitoquímico de tres especies de Chiapas. Disertación de Doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México
- Hess M, Barralis G, Bleiholder H, Buhr L, Eggers TH, Hack H, Stauss R (1997) Use of the extended BBCH scale general for the descriptions of the growth stages of mono- and dicotyledonous weed species. *Weed Res* 37:433–441
- Höft RM, Verpoorte Beck E (1996) Growth and alkaloid contents in leaves of *Tabernaemontana pachysiphon* Stapf (Apocynaceae) as influenced by light intensity, water and nutrient supply. *Oecologia* 107:160–169. doi:10.1007/BF00327899
- Hook I, Christiane P, Ahond A, Guénard D, Guéritte F, Adeline MT, Wang XP, Dempsey D, Breuillet S, Potier P (1999) Seasonal variation of neutral and basic taxoid contents in shoots of European Yew (*Taxus baccata*). *Phytochemistry* 52:1041–1045
- Jaleel CA, Manivannan P, Kishorekumar A, Sankar B, Gopi R, Somasundaram R, Panneerselvam R (2007) Alterations in osmoregulation, antioxidant enzymes and indole alkaloid levels in *Catharanthus roseus* exposed to water deficit. *Colloids Surf B Biointerfaces* 59:150–157
- Kessler A, Halitschke R, Diezel C, Baldwin IT (2006) Priming of plant defense responses in nature by airborne signaling between *Artemisia tridentata* and *Nicotiana attenuata*. *Oecologia* 148:280–292. doi:10.1007/s00442-006-0365-8
- Kirk H, Vrieling K (2010) Species by environment interactions affect pyrrolizidine alkaloid expression in *Senecio jacobaea*, *Senecio aquaticus*, and their hybrids. *J Chem Ecol* 36:378–387. doi:10.1007/s10886-010-9772-8
- Miranda F y Hernández XE (1963) Los tipos de vegetación de México y su clasificación. Colegio de Postgraduados, Chapingo México, pp 29–178
- Murphy PG, Lugo AE (1986) Ecology of tropical dry forest. *Ann Rev Ecol Syst* 17:67–68
- Paranhos JT, Fragoso V, da Silveira VC, Henriques AT, Fett-Neto AG (2009) Organ-specific and environmental control of accumulation of psychollatine, a major indole alkaloid glucoside from *Psychotria umbellata*. *Biochem Syst Ecol* 37:707–715. doi:10.1007/s00442-009-0331-04/1000-2023/0
- Ralfphs MH, Manners GD, Gardner RD (1998) Influence of light and photosynthesis on alkaloid concentration in Larkspur. *J Chem Ecol* 24:167–180
- Schäffer GT, Denardi PD, Cannes DNN, Palma FJ, Teresinha HA, Germano FNA (2004) Environmental and Ontogenetic Control of Accumulation of Brachycerine, a Bioactive Indole Alkaloid from *Psychotria brachyceras*. *J Chem Ecol* 30:2023–2036. doi:10.1023/B:JOEC.0000045592.24785.33

- Szabó B, Lakatos Á, Kőszegi T, Botz L (2003) HPTLC and HPLC determination of alkaloids in poppies subjected to stress. *J Planar Chromatogr Mod TLC* 16:293–297. doi:10.1556/JPC.16.2003.4.9
- Vance NC, Kelsey RG, Sabin TE (1994) Seasonal and tissue variation in taxane concentrations of *Taxus brevifolia*. *Phytochemistry* 36:1241–1244
- Wink M (1987) Quinolizidine alkaloids: biochemistry, metabolism, and function in plants and cell suspension cultures. *Planta Med* 53:509–514
- Wink M (1998) Introduction chapter. In: Roberts MF, Wink M (eds) *Alkaloids: biochemistry, ecology and medicinal applications*, vol 486. Plenum, New York, pp 1–7
- Wink M (2010) Biochemistry, physiology and ecological function of secondary metabolites. Chapter 1 Introduction. *Ann Plant Rev* 40:1–19
- Wu TS, Wang ML, Wu PL (1996) Seasonal variations of carbazole alkaloids in *Murraya euchrestifolia*. *Phytochemistry* 43:785–789
- Xia L, Yang W, Xiufeng Y (2007) Effects of water stress on berberine, jatrorrhizine and palmatine contents in amur cork tree seedlings. *Acta Ecologica Sinica* 27:58–63
- Zamora-Natera F, García-López P, Ruiz-López M, Herrera JM, Rodríguez-Macias R, Pedrosa M, Muzquiz M (2008) Composition and alkaloid profile of *Lupinus x altatus* Zucc. During its development. In: Proceedings of the 12th international lupin conference, Fremantle, Western Australia. International Lupin Association, Canterbury, New Zealand. ISBN: 0-86476-153-8