



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

INSTITUTO DE BIOLOGÍA

Metabolitos constitutivos e inducidos de Annona muricata L.

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO
DOCTORA CIENCIAS BIOLÓGICAS

P R E S E N T A

Christian Anabí Riley Saldaña

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. ALMA ROSA GONZÁLEZ ESQUINCA

INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS. UNICACH

COTUTORA:

DRA. MARÍA DEL ROCÍO CRUZ ORTEGA

INSTITUTO DE ECOLOGÍA. UNAM

COMITÉ TUTOR:

DR. MARIANO MARTÍNEZ VÁZQUEZ

INSTITUTO DE QUÍMICA. UNAM

CD. MX.

FEBRERO, 2019



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.



OFICIO CPCB/132/2019

Asunto: Oficio de Jurado para Examen de Grado.

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión del Subcomité por Campo de Conocimiento de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 1° de octubre de 2018, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de DOCTORA EN CIENCIAS de la alumna RILEY SALDAÑA CHRISTIAN ANABÍ con número de cuenta 511012040 con la tesis titulada: "Metabolitos constitutivos e inducidos de *Annona muricata* L.", realizada bajo la dirección de la DRA. ALMA ROSA GONZÁLEZ ESQUINCA:

Presidente:	DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA
Vocal:	DRA. MARÍA GRACIELA GARCÍA GUZMÁN
Secretario:	DRA. MARÍA DEL ROCÍO CRUZ ORTEGA
Suplente:	DRA. HERMELINDA MARGARITA VILLEGAS RÍOS
Suplente	DR. MARIANO MARTÍNEZ VÁZQUEZ

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 1° de febrero de 2019.

DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
COORDINADOR DEL PROGRAMA



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

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES.

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM, al Laboratorio de Fisiología y Química Vegetal de la UNICACH por permitirme realizar este posgrado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT-México) por el apoyo invaluable para la realización de los estudios de posgrado, otorgándome la beca.

A la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas por cobijarme para la realización de los experimentales.

A mi Comité Tutorial: la Dra. Alma Rosa González Esquinca, la Dra. Rocío Cruz Ortega y al Dr. Mariano Martínez Vázquez, por todos los cuidados paciencia y cariño mostrado durante este tiempo.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL.

Agradezco profundamente a la Dra. Alma Rosa González Esquinca, por su profundo cariño, por no dejarme desistir en ningún momento y por dejarme ser siempre.

Agradezco a los miembros del jurado: Dra. Hermelinda Margarita Villegas Ríos, a la Dra. Graciela García Gúzman, al Dr. Luis Felipe Jiménez García por la revisión de la tesis, y sus valiosas aportaciones a la misma, aun a pesar de tantas actividades que los ocupan.

A la Dra Lorena M. Luna Cazáres, por su cariño y amistad.

A los compañeros del Laboratorio de Fisiología y Química Vegetal Marisol, Iván, Alfredo, Claudia, Cecilia, Alejandro y Zuleima por la compañía y los gratos momentos compartidos durante el desarrollo de este proyecto doctoral.

A mi familia por su invaluable cariño y valioso apoyo en todo momento.

DEDICATORIAS.

A Mateo Domínguez Riley

por hacer de mí una mejor persona.

A la memoria del mejor amigo que el Universo me pudo dar

Adán Enrique Gómez González.

INDICE.

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
I. INTRODUCCIÓN	5
II. ANTECEDENTES	7
2.1. Mecanismos de reconocimiento planta-patógeno	7
2.2. Interacciones químicas planta-patógeno	17
2.2.1. Fitoanticipinas	18
2.2.2. Fitoalexinas	24
2.2.3. El caso de las anonas	29
III. ESPECIES ESTUDIADAS	34
3.1 <i>Annona muricata</i>	34
3.2 <i>Rhizopus stolonifer</i>	37
3.3 <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	40
IV. PLANTEAMIENTO DE LOS OBJETIVOS	43
V. OBJETIVOS E HIPÓTESIS	44
5.1. Objetivo general	44
5.2. Objetivos particulares	44
5.3. Hipótesis	45
VI. RESULTADOS	46
6.1. Objetivo 1. Determinar la presencia de las acetogeninas y alcaloides mayoritarios en ejemplares adultos	46
6.2. Objetivo 2. Caracterizar el perfil de acetogeninas y alcaloides en plántulas de <i>Annona muricata</i>	53
6.2.1 Acetogenins an alkaloids during the initial development of <i>Annona muricata</i> Z Naturforsch C. 2017; 26;72(11-12):497-506. doi: 10.1515/znc-2017-0060.	53
6.2.2 Presencia de las acetogeninas la <i>laherradurina</i>	

y <i>rolliniastatina-2</i> durante el desarrollo temprano	63
6.3 Objetivo 3. Caracterizar el perfil de acetogeninas y alcaloides en plántulas de <i>Annona muricata</i> que fueron inoculadas con <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> y <i>Rhizopus stolonifer</i>.	68
6.3.1 Respuesta de <i>Annona muricata</i> ante la infección de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> y <i>Rhizopus stolonifer</i> (Artículo)	68
6.4 Objetivo 4. Actividad antifúngica <i>in vitro</i> de extractos orgánicos y alcaloidales frente a <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> y <i>Rhizopus stolonifera</i>	80
6.5 Determinar si los extractos de plántulas inducidas con <i>C. gloeosporioides</i> y <i>R. stolonifer</i> incrementan la actividad antifúngica <i>in vitro</i> sobre <i>C. gloeosporioides</i> y <i>R. stolonifer</i>	86
VII. CONCLUSIÓN	90
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92

INDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadro 1. Genes R y Avr clonados	10
Cuadro 2. Genes de resistencia caracterizados	12
Cuadro 3. Actividad de alcaloides sobre fitopatógenos.	30
Cuadro 4. Alcaloides aislados de <i>Annona muricata</i>	35
Cuadro 5. Acetogeninas con actividades insecticidas	36
Cuadro 6. Acetogeninas determinadas en ejemplares adultos.	48
Cuadro 7. Acetogeninas determinadas en los órganos de <i>A. muricata</i> de ejemplar Adulto	49
Cuadro 8. Alcaloides determinados en los órganos de <i>A. muricata</i> de ejemplar adulto (UA.g⁻¹ de tejido seco)	50
Cuadro 9. Determinación mediante GC-MS de alcaloides en <i>A. muricata</i>	74
Cuadro 10. Rendimientos de los extractos orgánicos y alcaloidales obtenidos de plántulas de <i>A. muricata</i>.	82
Cuadro 11. Actividad de los extractos (% de inhibición) sobre <i>C. gloeosporioides</i>.	82
Cuadro 12. Actividad de los extractos (%) de plántulas inducidas con <i>C. gloeosporioides</i> sobre <i>C. gloeosporioides</i>	86
Cuadro 13. Actividad de los extractos (%) de plántulas inducidas con <i>C. gloeosporioides</i> sobre <i>R. stolonifer</i>	87
Cuadro 14. Actividad de los extractos (%) de plántulas inducida con <i>R. stolonifer</i> sobre <i>C. gloeosporioides</i>	87
Cuadro 15. Actividad de los extractos (%) de plántulas inoculadas con <i>R. stolonifer</i> sobre <i>R. stolonifer</i>	88

Figura 1. Interacción entre genes de resistencia (R) y avirulencia (Avr)	9
Figura 2. Dos tipos de fitoanticipinas presentes en avena y jitomate	19
Figura 3. Ejemplos de fitoalexinas presentes en diferentes plantas	25
Figura 4. A. Morfología microscópica de <i>Rhizopus stolonifer</i>.	39
Figura 5. Presencia de acetogeninas constitutivas en donde se observa el mismo perfil en: A. plántulas con 6 hojas; B. Ejemplar adulto.	51
Figura 6. Presencia de alcaloides constitutivos en donde se observa el mismo perfil en: A. plántulas con 6 hojas; B. Ejemplar adulto	52
Figura 7. Contenido de la laherradurina y la rolliniastatina-2 en raíces.	64
Figura 8. Contenido de la Laherradurina y rolliniastatina-2 en tallos	65
Figura 9. Contenido de la Laherradurina y rolliniastatina-2 en hojas	66
Figura 10 Planta inoculada con <i>C. gloeosporioides</i>.	71
Figura 11. Síntoma de antracnosis en hojas, los círculos en rojo señalan la antracnosis foliar.	71
Figura 12. Obtención de tejido infectado con <i>C. gloeosporioides</i>	72
Figura 13. Aislamiento de <i>C. gloeosporioides</i> a partir de tejido infectado	71
Figura 14. Raíces de <i>A. muricata</i> de plántulas inoculadas con <i>R. stolonifer</i>	73
Figura 15. Respuesta de las acetogeninas vs <i>C. gloeosporioides</i>	80
Figura 16. Respuesta de los alcaloides vs <i>C. gloeosporioides</i>	81
Figura 17. Respuesta de las acetogeninas vs <i>R. stolonifer</i>	82
Figura 18. Respuesta de los alcaloides vs <i>R. stolonifer</i>	83

RESUMEN.

La familia Annonaceae se caracteriza por producir dos tipos de moléculas las llamadas “acetogeninas de anonáceas” y los alcaloides del tipo bencilisoquinolínico. En este trabajo se demuestra que *Annona muricata* es una especie con un metabolismo secundario activo desde etapas tempranas de su desarrollo. Se determinó la presencia de nueve metabolitos constitutivos que se distribuyen en toda la planta y que son detectados desde la etapa de germinación hasta los adultos en fructificación; cuatro metabolitos son acetogeninas: *cis*- anonacina-10-one, *cis*-uvariamicina-IV, mosinone y muricina B y cinco son alcaloides, identificados como anonaina, asimilobina, coreximina, reticulina y nornuciferina.

En la búsqueda de cambios en estos dos tipos de metabolitos se infectaron hojas de plántulas con *C. gloeosporioides* y raíces con *R. stolonifer*. Aunque no se identificó la presencia de moléculas nuevas (fitoalexinas), cuando las plántulas son infectadas con *C. gloeosporioides* se observa un incremento del 20% de la acetogenina muricina B, así como de la anonaina en hojas (8%) y raíces (10%). En los tallos se incrementa la reticulina (10%) y nornuciferina (1200%); mientras que la inducción con *R. stolonifer* sólo evidenció el incremento de 10% de la nornuciferina en los tallos.

Para conocer si estos alcaloides y acetogeninas constitutivos son metabolitos implicados en la defensa se midió la actividad antifúngica *in vitro* de los extractos orgánicos (hexánicos y metanólicos) y alcaloidales de raíces, tallos y hojas de plántulas sin inocular e inducidas con los hongos *C. gloeosporioides* y *R. stolonifer*.

Los extractos hexánicos de plántulas sin inocular no presentaron actividad sobre *C. gloeosporioides* ni sobre *R. stolonifer*, pero sí los extractos metanólicos (79.4%) y alcaloidales (71%), de las hojas sobre *R. stolonifer*, los extractos metanólicos y alcaloidales de raíces fueron los más activos (98% y 91.8% respectivamente).

La actividad antifúngica *in vitro* de extractos de plántulas previamente inoculadas con *C. gloeosporioides* y *R. stolonifer* mostró respuestas contrastantes a las observadas con los extractos de plántulas sin inocular.

Los extractos hexánicos, de plántulas inoculadas con *C. gloeosporioides* no tuvieron actividad sobre ninguno de los dos hongos, mientras que con los extractos alcaloidales tras la inoculación, incrementan su actividad, en tallos hasta 64.28%, mientras que en hojas hasta 79.6%, las raíces mantuvieron su potencia; solo la actividad de hojas frente a *R. stolonifer* se incrementa.

La actividad *in vitro* de los extractos de plántulas que fueron inoculadas con *R. stolonifer* se incrementó en todos los órganos tanto para *C. gloeosporioides* como para *R. stolonifer*, sobre todo los extractos alcaloidales de raíces frente a *C. gloeosporioides*. Es sorprendente que la inoculación con *R. stolonifer* dispara, de alguna forma, la defensa hacia *C. gloeosporioides*.

La inoculación de las plántulas con *C. gloeosporioides* y *R. stolonifer* indujo la biosíntesis de al menos una acetogenina y cuatro alcaloides; la mayor respuesta fue de los tallos no importando el sitio de inoculación, siendo el alcaloide nor-nuciferina el de mayor incremento. La inducción de estos metabolitos en *A. muricata* incrementó la potencia antifúngica en las plántulas, lo que podría sugerir que están vinculadas al menos en la defensa de estos hongos.

En conclusión el metabolismo de las plántulas de *A. muricata* se expresa desde etapas tempranas del desarrollo con una plasticidad metabólica órgano-específica que responde a la inducción de los fitopatógenos *C. gloeosporioides* y *R. stolonifer* incrementando las concentraciones de algunos metabolitos constitutivos sugiriendo que algunas de estas moléculas participan en el mecanismo de defensa de esta especie.

ABSTRACT.

The Annonaceae family is characterized by producing two types of molecules named "acetogenins of annonaceae" and benzyloisoquinoline alkaloids. In this work it is demonstrated that *Annona muricata* is a species with active secondary metabolism from early stages of its development, the presence of nine constitutive metabolites distributed throughout the plant and detected from the germination stage to fruiting adult specimens was determined, four of them are acetogenins, *Cis*-annonacin-10-one, *Cis*-uvariamcin-IV, mosinone and muricin B and five alkaloids identified as anonaine, asimilobine, coreximine, reticuline and nornuciferine.

In search of changes in these two types of metabolites, seedling leaves were infected with *C. gloeosporioides* and roots with *R. stolonifer*. Although the presence of new molecules (phytoalexins) was not identified when the seedlings are infected with *C. gloeosporioides*, a 20% increase in acetogenin muricine B as well as anonaine in leaves (8%) and roots (10%) is observed. In stems, reticuline (10%) and nornuciferine (1200%) were increased while induction with *R. stolonifer* only increased 10% of nornuciferine in the stems.

In order to know if these alkaloids and acetogenins constitutive are metabolites involved in the defense, the *in vitro* antifungal activity of the organic (hexane and methanol) and alkaloid extracts from roots, stems and leaves of healthy and induced seedlings with the fungi *Colletotrichum gloeosporioides* and *Rhizopus stolonifer* was measured.

The hexane extracts from the non-inoculated seedling showed no activity in both *C. gloeosporioides* and *R. stolonifer* but the methanol (79.4% inhibition) and alkaloid (71% inhibition) extracts from leaves on *R. stolonifer*. The methanol and alkaloid extracts from roots were the most active (98% and 91.8% inhibition, respectively).

The *in vitro* antifungal activity of extracts from inoculated seedling with *C. gloeosporioides* and *R. stolonifer* showed contrasting responses to those observed in non-inoculated seedling extracts. The hexane extracts of inoculated seedling with *C. gloeosporioides* did not show activity on fungi tested while alkaloid extracts after inoculating increase its activity in stems up to 64.28% inhibition, 79.6% inhibition with leaves and the roots maintain its activity, only against *R. stolonifer* the leaves activity increase. The *in vitro* activity of extracts from inoculated seedling

with *R. stolonifer* increased in every plant organ in both fungi specially root alkaloid extracts against *C. gloeosporioides*. It was unexpected that the inoculation with *R. stolonifer* triggers in some way the defense towards *C. gloeosporioides*.

The seedling inoculation with the fungi induced the biosynthesis of at least one acetogenin and four alkaloids. The highest response was from the stems, regardless of the inoculation site, with the alkaloid normuciferine being the one with the highest increase. The induction of these metabolites in *A. muricata* increased the antifungal potency in seedlings, which could suggest that are linked at least in the defense against these fungi.

In conclusion, *A. muricata* seedlings metabolism is expressed from early stages of development with an organ-specific metabolic plasticity that responds to induction of the *C. gloeosporioid* and *R. stolonifer* phytopathogens by increasing concentrations of some constitutive metabolites, suggesting some these molecules participates in defense mechanism of this species.

I. INTRODUCCIÓN.

A lo largo de su ciclo de vida las plantas se encuentran en continua interacción con el medio en que habitan, por tanto, están sometidas frecuentemente a factores de estrés tanto biótico y abiótico. El estrés biótico está representado, por organismos tales como hongos, bacterias y herbívoros. Las plantas no pueden defenderse con facilidad, son sésiles y “como tal” carecen de sistema inmune, no obstante, la muerte por enfermedad es una situación excepcional (Whenham *et al.*, 1986), ello supone el desarrollo y perfeccionamiento a lo largo de la evolución, de sistemas altamente efectivos para detener o contrarrestar infecciones causadas por microorganismos, o por el ataque de herbívoros, mecanismos que les permiten sobrevivir en ambientes diversos y adversos.

Las plantas sintetizan metabolitos secundarios, ahora llamados metabolitos especializados (Pichersky, 2011) que constituyen compuestos de defensa química ante el ataque de diversos organismos. Estos metabolitos pueden ser de dos tipos: constitutivos o inducidos. Los **constitutivos** existen *per se* en la planta y no dependen de una respuesta a un patógeno, aunque son parte del mecanismo de defensa de la planta; se consideran barreras químicas preformadas y heredadas resultado de la producción por parte de la planta de una diversidad de moléculas entre ellas alcaloides, fenoles, polifenoles, aceites esenciales y terpenos (Dixon, 2003). Por otro lado, si a pesar de las barreras constitutivas el patógeno se establece, las plantas pueden activar mecanismos de defensa con el fin de detener la infección, a través de los llamados mecanismos de defensa **inducidos**, cuya biosíntesis involucra reacciones o activación de moléculas en tejidos que están en contacto directo con él o los patógenos, aunque la biosíntesis también se puede dar en los tejidos no infectados. Éstas moléculas producidas como respuesta al ataque de patógenos son comúnmente llamadas **fitoalexinas** (fenoles, flavonoides, alcaloides, terpenos) (Müller & Börges, 1940). En contraste con la resistencia constitutiva, la resistencia inducida se basa en el reconocimiento del invasor y eventos subsecuentes de señalización que conducen a la activación de las defensas químicas, lo que permite a la planta poder librarse o aminorar el daño producido.

Se ha documentado en Anonáceas que desde las primeras etapas de desarrollo (*Annona macrophyllata*, *A. lutescens* y *A. purpurea*) se biosintetizan metabolitos especializados (Cowan, 1999; Jeong *et al.* 2010 en De la Cruz, *et al.* 2013), Esta hace posible analizar el perfil constitutivo de una especie desde las primeras etapas de desarrollo y cómo interactúan con otros organismos

como herbívoros y patógenos. Con base en este conocimiento se es posible analizar la interacción biótica para conocer la respuesta de las plantas en cuanto a la biosíntesis de metabolitos inducidos.

Es una característica de la familia Annonaceae la presencia de metabolitos secundarios como alcaloides y acetogeninas (Leboeuf *et al.* 1982; Cave *et al.* 1987; Bermejo *et al.*, 2005). Por lo que especies de ésta familia representa buenos modelos de estudio para entender sobre la dinámica e interacción que establecen los metabolitos secundarios durante el ataque de hongos patógenos.

En particular, *Annona muricata* biosintetiza alcaloides y acetogeninas con diversas actividades biológicas entre ellas son citotóxicos, inhibidores del complejo I mitocondrial con actividad insecticida, Wu *et al.*, 1995, Zeng *et al.*, 1995, Jaramillo *et al.*, 2000, Champy *et al.*, 2004) por lo que estas moléculas podrían estar vinculadas con el mecanismo de defensa de la planta. Si esto es así, la inducción de una respuesta de defensa ante patógenos habituales como *Colletotrichum gloeosporioides* y *Rhizopus stolonifer* alterará el perfil de metabolitos constitutivos o inducirá la biosíntesis de algunos otros. Para probar ésta hipótesis, en éste trabajo se determinaron los metabolitos que constituyen el perfil metabólico secundario de defensa de *A. muricata*, y se evaluó si éste se modifica por la infección de los hongos *Colletotrichum gloeosporioides* y *Rhizopus stolonifer*.

II. ANTECEDENTES

Los hongos fitopatógenos son una de las principales causas de enfermedades en toda clase de cultivos, ante esto, las plantas han desarrollado estrategias para contrarrestar la presencia de estos patógenos, generando respuestas de defensa que les permiten disuadir y hacer frente a los diversos organismos que las atacan, permitiéndoles una oportunidad de sobrevivencia, al limitar o eliminar el avance de los patógenos. Estos mecanismos han sido documentados y asociados al sistema de defensa de las plantas.

2.1 Mecanismos de reconocimiento planta-patógeno.

Bajo condiciones naturales las plantas están en continuo contacto con organismos patógenos tales como virus, bacterias, hongos y nematodos (Agrios, 2005). Una vez que el patógeno invade la planta a través de aperturas naturales o atravesando la pared celular, hay modificaciones en las células cercanas a la invasión y en la mayoría de los casos estas bloquean el avance del patógeno (Halverson & Stacey, 1986; Heath, 2000; Anaya, 2003; Vivanco *et al.*, 2005). Las interacciones entre plantas y microorganismos patógenos pueden ser compatibles cuando el patógeno no es reconocido por la planta, de tal forma que ésta es invadida o incompatible cuando la planta reconoce al patógeno y bloquea su crecimiento. (Heath, 2000; De Wit, 1997; Diaz, 2009). Los patógenos pueden ser biótrofos, es decir, que no causan la muerte celular del hospedero o bien necrótrofos cuando matan a la célula, otros son hemibiótrofos, combinan las dos fases de crecimiento, tal es el caso de *Colletotrichum gloeosporioides* el cual inicia su fase de crecimiento como biotrófo asegurando su alimento y en su fase final crece necrótróficamente (Parker & Gilbert, 2004; Cerón *et al.*, 2006; Parker & Gilbert, 2010). Un ejemplo de un biotrófo es el hongo *Cladosporium fulvum* que crece en el espacio intercelular de las hojas del jitomate (*Solanum lycopersicum*); después de doce días de infección hay una acumulación de micelio alrededor del tejido vascular y los conidióforos salen de los estomas. (Martín-Hernández *et al.*, 2000). *Alternaria alternata* es un hongo necrótrofo; que produce un cáncer del tallo en plantas de jitomate (Parker & Gilbert, 2004; Egusa *et al.*, 2009; Parker & Gilbert, 2010).

Las plantas reconocen diversas secuencias de moléculas encontradas en patógenos que se conocen como **patrones moleculares asociados a los patógenos (PAMP**, por sus siglas en inglés)

(Pitzschke *et al.*, 2009) y que son inductores generales de reconocimiento (no específicos), entre ellos la flagelina de bacterias y la quitina de los hongos; el reconocimiento se lleva a cabo mediante proteínas extracelulares, las cuales a su vez activan a las llamadas **proteínas cinasas activadas por mitogenos (MAPK)** que inducen la respuesta de defensa (Romeis, 2001; Zipfel *et al.*, 2004), por ejemplo la flagelina es percibida por *Arabidopsis thaliana* a través del receptor FLS2 que se compone de un dominio rico en repeticiones de leucina (LRR) y otro dominio quitinasa, que tras la percepción de la flagelina activa una cascada de señales compuestas por quinasas (**MAPK**). La activación de esta señal por la flagelina tiene como resultado la restricción de la invasión bacteriana contribuyendo a la resistencia (Zipfel *et al.*, 2004). Este es un mecanismo conocido como una respuesta de defensa basal en donde esta no evita la colonización del patógeno, pero limita la extensión de su difusión (Glazebrook, 1997).

Se sabe también que durante la infección las plantas pueden reconocer efectores a través de un sistema de vigilancia mediado por proteínas específicas de resistencia (R) (Gabriel & Rolfe, 1990; Dangl & Jones, 2001). Los primeros efectores identificados se denominaron genes Avr (de avirulencia) dado que su actividad se detecta a través de los denominados genes de resistencia o genes R (De Wit, 1992; Dangl & Jones, 2001; Belkhadir *et al.*, 2004).

Harold Henry Flor (1942, 1955) estudió la genética de la interacción entre la planta del lino (*Linum usitatissimum*) y la roya de ese cultivo causada por el hongo *Melampsora lini* (estudios basados en cruzamientos entre diferentes variedades de lino y diferentes aislamientos del hongo), y examinó las reacciones entre progenies de estas dos clases de cruzamientos deduciendo que el lino y el hongo, a lo largo de su evolución paralela, habían desarrollado sistemas génicos complementarios que determinaban su interacción. Como resultado de estas investigaciones, se formuló la hipótesis denominada gen por gen. La cuales establece que las plantas contienen genes de resistencia (*R*) que se activan específicamente con los patógenos que contienen genes de avirulencia complementarios (*Avr*). La explicación funcional más simple de la interacción entre los genes *Avr* y *R*, es que el primero codifica o genera ligandos específicos que interactúan físicamente con un receptor que es codificado por un gen *R* (Figura 1), son escasos otros datos experimentales que apoyen esta interacción directa de las proteínas (Gabriel & Rolfe 1990; Belkhadir *et al.*, 2004). Una alternativa sugerida por Dangl & Jones (2001), es que las proteínas *R* evolucionaron para reconocer las funciones de los factores de avirulencia del

patógeno, más que reconocer directamente a las proteínas Avr. Esta propuesta dio origen a la hipótesis denominada “**del guardian**”, que sugiere un reconocimiento indirecto de los factores Avr, esta hipótesis postula que las proteínas de los genes *R* forman parte de un complejo multiprotéico que incluiría blancos moleculares para los factores Avr del patógeno. La interacción (Avr-proteínas del complejo) conduciría a la activación de las proteínas R en interacciones incompatibles (hospedero resistente-patógeno avirulento) pero no así en interacciones compatibles (hospedero susceptible-patógeno virulento).

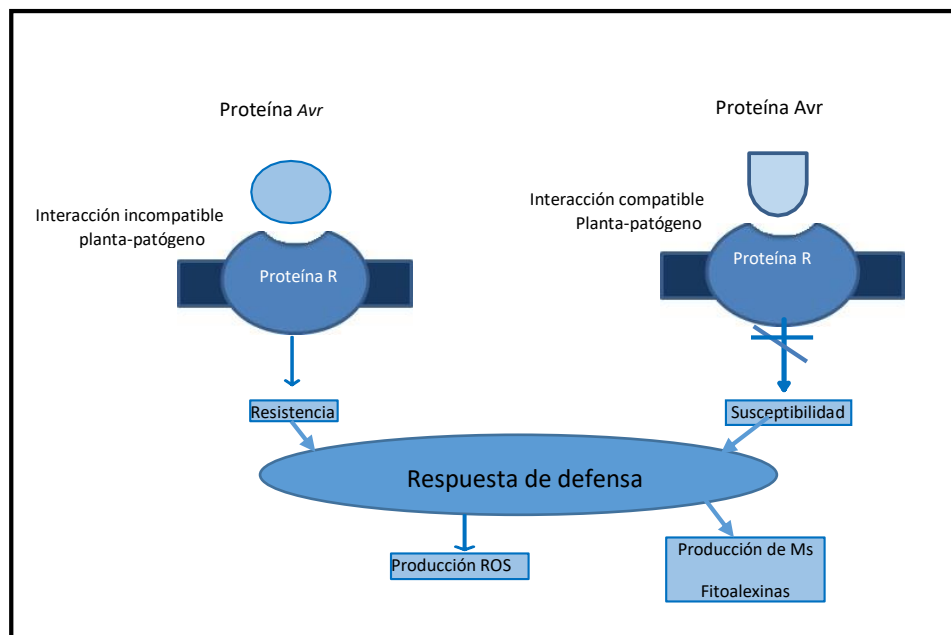


Fig.1. Interacción entre genes de resistencia (R) y avirulencia (Avr) (modificado de Gabriel & Rolfe, 1990)

Con el desarrollo de técnicas moleculares, específicamente con la clonación posicional y el marcaje de transposones se han aislado genes R de diversas especies de plantas que confieren resistencia a virus, bacterias, hongos y nematodos (Cuadro 1) (Lawrence *et al.*, 1995; Song *et al.*, 1995; Ellis & Jones 1998; Takken & Josten 2000). El primer gen de resistencia aislado fue el gen Pto de la planta de jitomate (*Solanum lycopersicum*) que le confiere resistencia a la bacteria *Pseudomonas syringae* cepa DC3000. También ha sido posible predecir la estructura y la posible localización de las proteínas codificadas por los genes R (Takken & Josten 2000; Ellis *et al.*, 2000; Borrás-Hidalgo, 2004).

Cuadro 1. Genes R y Avr clonados (tomado de Takken & Josteen, 2000).

Planta	Gen R	Localización de la proteína	Gen Avr	Patógeno
Jitomate (<i>Solanum lycopersicum</i>)	<i>prf</i>	Intracelular	<i>AvrPto</i>	<i>Pseudomonas syringae pv tomate</i>
	<i>Mi</i>		---	<i>Meloidogyne incognita, macrosiphum euphorbia</i>
	<i>I2c</i>		---	<i>Fusarium oxysporum</i>
	<i>I2</i>		---	<i>Fusarium oxysporum</i>
Arabidopsis (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	<i>RPS2</i>	Intracelular	<i>AvrPt2</i>	<i>Pseudomonas syringae pv tomate</i>
	<i>RPM1</i>		<i>AvrRpm1, avrB</i>	<i>Pseudomonas syringae pv maculicola</i>
	<i>RPS5</i>		<i>AvrPphB</i>	<i>Pseudomonas syringae dc3000</i>
	<i>RPP8</i>		<i>AvrRpp8</i>	<i>Perenospora parasitica</i>
	<i>Rpp5</i>		---	
	<i>RPS4</i>		<i>AvRps4</i>	<i>Pseudomonas syringae pv. Pisi</i>
	<i>Rpp1</i>		---	<i>Perenospora parasitica</i>
Arroz (<i>Oriza sativa</i>)	<i>Xa1</i>	Intracelular	---	<i>Xanthomonas oryzae pv. Oryzae</i>
	<i>Pib</i>		---	<i>Magnaporthe grisea</i>
Papa (<i>Solanum tuberosum</i>)	<i>Rx</i>	Intracelular	Proteína de cápside	Virus x de la papa
	<i>Gpa2</i>		---	<i>Globodera rostochiensis</i>
Trigo (<i>Triticum sp</i>)	<i>Cre3</i>	Intracelular	---	<i>Heterodera avenae</i>
	<i>Pi-ta</i>	Intracelular	<i>AcrVrPITA</i>	<i>Magnaporthe grisea</i>
Capsicum (<i>Capsicum annum</i>)	<i>Bs2</i>	Intracelular	<i>AcrBs2</i>	<i>Xanthomonas campestris</i>
Maíz (<i>Zea mais</i>)	<i>Rpl-d</i>	Intracelular	---	<i>Puccinia sorghi</i>

Cebada (<i>Hordeum vulgare</i>)	<i>Mla</i>	Intracelular	---	<i>Erysiphe graminis</i>
Tabaco (<i>Nicotiana tabacum</i>)	<i>N</i>	Intracelular	Replicasa	Virus del mosaico del tabaco
Lino (<i>Linum usitatissimum</i>)	<i>L6 ,L11-12</i>	Intracelular	---	<i>Melampsora lini</i>
	<i>M</i>		---	
Arroz (<i>Oriza sativa</i>)	<i>Xa21</i>	Extracelular	---	<i>Xanthomonas oryzae pv. Oryzae</i>
Jitomate (<i>Solanum lycopersicum</i>)	<i>Cf-2</i>	Extracelular	---	<i>Cladosporium fulvum</i>
	<i>Cf-4</i>		<i>Avr2</i>	
	<i>Hcr9-4E</i>		<i>Avr4</i>	
	<i>Cf-5</i>		<i>Avr4E</i>	
	<i>Cf-9</i>		<i>Avr5</i>	
Remolacha (<i>Beta vulgaris</i>)	<i>HSI^{pro-1}</i>	Extracelular	---	<i>Heterodera schachtii</i>

(---, no descrito)

La mayor parte de los genes R codifican proteínas de ubicación citoplásmica (intracelular), contienen un dominio de unión a nucleótidos llamado NBS (por sus siglas en inglés nucleotide binding site) y otro dominio rico en leucinas llamado LRR, (por leucine-rich repeats), este último dominio posee una secuencia de alrededor de 30 aminoácidos y al parecer la variabilidad de los aminoácidos presentes les confiere la especificidad del reconocimiento (Borrás-Hidalgo, 2004; Dangl & Jones, 2001; McDowell & Woffenden, 2003). Este hecho ha sido documentado solo en *Arabidopsis thaliana* y se estima que existen alrededor de 150 genes R con este tipo de dominios lo que corresponde al 1% de su genoma (Meyers *et al.*, 1999).

De acuerdo al dominio que comparten las proteínas que son codificadas por los genes R, se agrupan en 5 clases que se describen a continuación (Cuadro 2) (Ellis, *et al.*, 2000).

Cuadro 2. Genes de resistencia caracterizados (tomado de Lehmann, 2002).

Clase	Gen	Planta	Patógeno	Característica de la proteína R
1	<i>Cf-2</i> <i>Cf-4</i> <i>Cf-5</i> <i>Cf-9</i>	Jitomate (<i>Solanum lycopersicum</i>)	<i>Cladosporium fulvum</i>	Extracelular LRR
	<i>Hs1pro1</i>	Remolacha (<i>Beta vulgaris</i>)	<i>Heterodera schtii</i>	
2	<i>Xa21</i>	Arroz (<i>Oriza sativa</i>)	<i>Xanthomona oryzae</i>	Extracelular LRR/dominio cinasa
	<i>N</i>	Tabaco (<i>Nicotiana tabacum</i>)	<i>Virus del mosaico del tabaco</i>	
3	<i>L6</i>	Lino (<i>Linum usitatissimumy</i>)	<i>Melamnospora lini</i>	TIR/NBS/LRR R
4	<i>RPP5</i>	Arabidopsis (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	<i>Peronospora parasitica</i>	CC/NBS/LRR
	<i>RPS2</i>		<i>Pseudomonas syringae</i> (<i>AvrRpt2</i>)	
	<i>RPM1</i>		<i>Pseudomonas syringae</i> (<i>AvrRp1/AvrB</i>)	
5	<i>Pto</i>	Jitomate (<i>Solanum lycopersicum</i>)	<i>Pseudomonas syringae</i> (<i>Avr Pto</i>)	Intracelular proteína quinasa ser/thr

La primera clase de estas proteínas R poseen dominios de reconocimiento extracelular, por lo que se ha sugerido en términos generales, que estos dominios pudieran conferir una función centinela capaz de realizar el reconocimiento extracelular, sin embargo, no existen reportes que corroboren esta posible función (Gabriel, 1999).

1). Genes R que codifican para proteínas con dominios repetidos ricos en leucina (LRR). Estos genes de resistencia se caracterizan porque las proteínas que codifican contienen una región LRR extracelular y no presentan ningún otro tipo de dominio. El domino LRR contiene

leucinas y otros aminoácidos hidrofóbicos y puede contener también prolinas y asparaginas en intervalos regulares. Dentro de los genes que codifican esta proteína se encuentran los genes R del jitomate *Cf2*, *Cf4*, *Cf5* y *Cf9* (*Solanum lycopersicum*) los cuales confieren resistencia sobre cepas de *Cladosporium fulvum* que posee los genes correspondientes Avr; estudios con transposones marcados y con la clonación de estos genes pusieron en evidencia que los genes Cf poseen dominios repetidos ricos en leucina (Ellis *et al.*, 2000a; Borrás-Hidalgo, 2004). Otras proteínas R que muestran este tipo de dominio extracelular son la HS1 de remolacha que confiere resistencia a *Xanthomonas oryzae* en arroz (Takken & Joosten 2000).

2). Genes R que codifican para proteínas con dominios repetidos ricos en leucina (LRR) y dominio serina/treonina cinasa. Proteínas que posee un dominio repetido rico en leucina (LRR) extracelular y un dominio serina/treonina cinasa intracelular. El gen *Xa21* de *Oryza sativa* es el único gen reportado con dominios repetidos ricos en leucina y con dominio serina/treonina cinasa; los estudios en plantas mutantes de *O. sativa* señalaron que el gen *Xa21* dota de resistencia a esta planta frente a la bacteria *Xanthomonas oryzae*, mismo que fue aislado por clonación posicional en plantas mutantes de arroz en donde se observó que las plantas portadoras del gen *Xa21* mostraban altos niveles de resistencia al patógeno cuando estas eran infectadas. Así mismo encontraron que *Xa21* codifica proteínas con dominio repetido rico en leucinas y un dominio serina/treonina cinasa (Song *et al.*, 1995; Ellis & Jones, 1998; Ellis *et al.*, 2000a).

Las siguientes clases de genes R codifican para proteínas que se localizan en el citoplasma, al parecer reconocen los productos Avr que llegan hasta el interior de la célula del hospedero. Muchos genes de resistencia que codifican para proteínas con dominio LRR también codifican para secuencias de aminoácidos con alta similitud a dominios de unión a nucleótidos (NBS). Estos dominios se encuentran en proteínas con capacidad para unir a nucleótidos de trifosfato (ATP, GTP) y participan en transducción de señales. La presencia de NBS en algunas proteínas R sugiere que la unión a ATP o GTP es esencial para el funcionamiento (Pan *et al.*, 2000; Dangl & Jones, 2001).

3). Genes R que codifican para proteínas con dominios semejantes a los receptores Toll/interleucina-1 (TIR-NBS-LRR). Este tipo de proteínas son un subtipo de las proteínas NBS- LRR que se caracterizan por presentar en la posición amino terminal, el receptor TIR, se les

denomina así por presentar homología con los dominios de señalización intracelular TOLL de *Drosophila melanogaster* y los receptores (IL)-1 de mamíferos (Ellis *et al.*, 2000a). Lawrence *et al.*, (1995) mediante la inserción de transposones marcados en el lino utilizando *Agrobacterium*, clonaron y aislaron el gen L6, indicando que plantas que expresaban el gen *L6* eran resistentes a *Melamnospora lini*, también evidenciaron que los genes *N*, *RPS2* y *L6* poseen similitudes importantes como la homología en la secuencia de aminoácidos presentes en las proteínas, entre ellos se destaca la presencia de un sitio NBS y dominios TIR. Las proteínas *N* de *Nicotiana tabacum* y *RPS5* de *Arabidopsis thaliana* son las responsables de la resistencia al virus del mosaico del tabaco y *Peronospora parasitica* respectivamente (Takken & Josteen, 2000; Lehmann, 2002). El gen *RPS2* también ha sido identificado en otras especies, por ejemplo, Yu *et al.*, (1996), mapearon genes análogos de resistencia (RGA) para la pudrición de las raíces de la soya por *Phytophthora sojae* identificando al gen *Rps2* como el gen de resistencia a este patógeno. Otros genes también han sido señalados con esta estructura, Leister *et al.*, (1996) obtuvieron productos de PCR en papa que eran homólogos a los genes de resistencia conocidos y al locus de resistencia *R7* del tizón tardío producido por *Phytophthora infestans*. La comparación de secuencias de aminoácidos de genes de resistencia presentes en el lino (*L6* y *L11*), reveló que estos genes son similares en las regiones TIR y NBS, pero difieren en la sustitución de 33 aminoácidos en la región TIR, lo que podría indicar que estas regiones le confieren especificidad en la resistencia (Ellis, *et al.*, 2000b).

4). Genes que codifican para proteínas con dominio coiled/coil. Este es otro subtipo de proteínas NBS-LRR. Actualmente no se conoce la función de estos dominios en los genes *R*, sin embargo, son conocidos por su papel durante la homo y heterodimerización de factores de transcripción eucarióticos (Martin, 1999). Los estudios de Lawrence *et al.*, (1995) señalan que las proteínas *RPS1* y *RPM1* tienen una estructura proteica similar del tipo CC-NB-LRR. Estas proteínas son las responsables de la resistencia de *Arabidopsis thaliana* frente a la bacteria *Pseudomonas syringae*, así mismo *AvrRpt2* y *AvrRPM1* son dos de los efectores de *P. syringae* en la interacción de dicho patógeno con *Arabidopsis*. Ambos interactúan de forma indirecta con genes *R* de *Arabidopsis*, el primero con la proteína *RPM1* (*Resistance to P. syringae pv. Maculicola 1*) y el segundo con la proteína *RPS1* (*Resistant to P. syringae 1*) (Kunkel *et al.*, 1993). Yu *et al.*, (1996), mapearon RGA encontrando que el gen *RPS1* es el gen de resistencia a

Phytophthora. Recientemente en la soya se ha clonado el gen R (*Rps1k*) clasificado dentro del grupo de genes CC- NBS-LRR que confieren resistencia a *Phytophthora sojae*, que es causante de la pudrición de raíces y tallos (Gao & Bhattacharyya, 2008).

5) Genes R que codifican para proteínas con dominio actividad de proteína cinasa de serina/treonina. Grupo de proteínas estructuralmente más sencillas, codifican para proteínas con dominios actividad serina/treonina. El gen *Pto* de la planta de jitomate (*Solanum lycopersicum*) es el gen que le confiere resistencia a *Pseudomonas syringae* que lleva el gen de avirulencia *AvrPto* (Ellis *et al.*, 2000a). La clonación de ADNc del gen *Pto* y el análisis de los aminoácidos reveló secuencias similares a los dominios serina/treonina sinasa sugiriendo un rol del gen *Pto* en las vías de transducción de señales, no se ha identificado otro gen R con estas características (Martin *et al.*, 1993). Estas proteínas sólo presentan este dominio, no contienen regiones LRR, pero requieren de la presencia de genes vinculados NBS-LRR para su actividad, sin embargo la actividad cinasa le proporciona una función clave en las vías de señalización mediadas por cascadas de fosforilación durante la activación de la resistencia, pues la modulación del estado de fosforilación es uno de los mecanismos más comunes que usan las células para controlar la actividad de las proteínas (Ellis *et al.*, 2000a, Belkhadir *et al.*, 2004).

La información hasta ahora generada indica que la activación de defensa contra patógenos en plantas, al menos en los sistemas de raza-cultivar, esta mediada por la interacción de proteínas Avr y R como predice la hipótesis gen por gen. Esta es la base del reconocimiento y tiene como consecuencia la activación de una cascada de señales que, en última instancia, induce la defensa. En otras palabras, los genes *R* no son los responsables directos de la resistencia, pero sí tienen una función determinante de la especificidad del reconocimiento actuando como iniciadores de la defensa. (Glazebrook, 2001). Tras la percepción del patógeno se activan rápidamente una serie de respuestas de defensa que incluyen flujo de iones Ca^{++} , alcalinización del espacio extracelular, estallido oxidativo mediante la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), producción de NO, actividad proteínquinasa y expresión de genes asociados a defensa (Nürnberger & Scheel 2001). También, entre las funciones de estos genes se incluyen el reforzamiento de la pared celular por lignificación, la producción de agentes antimicrobianos y un tipo de muerte celular denominada respuesta hipersensible (HR) en el lugar de entrada del patógeno (Halverson & Stacey, 1986; Heath, 2000).

Entre la expresión de genes relacionados con la defensa cabe destacar la de algunas familias génicas que codifican para proteínas relacionadas con la patogénesis (PR) (Klessig, 1994). Estas proteínas son activadas por el ácido salicílico, ácido jasmónico y el etileno. Las primeras PR se detectaron en experimentos de susceptibilidad (con producción de HR) con plantas de tabaco y el virus TMV (White, 1979; Mauch-Mani & Métraux, 1998). Estas proteínas han sido detectadas en varias especies de plantas y se clasifican de acuerdo a su actividad, por ejemplo, las proteínas PR2 son glucanasas, cuya actividad es degradar el principal componente de la pared celular de hongos, así las PR3, PR8 y PR11 presentan actividad quitinasa (Van Loon *et al.*, 2006).

Entre los componentes de señalización en la célula vegetal se encuentran el ácido salicílico, jasmónico y el etileno; el ácido salicílico es sintetizado por las plantas cuando son atacadas por patógenos biótrosos, *Arabidopsis* posee dos enzimas ICS, ICS1 e ICS2., Los mutantes que carecen de una enzima ICS1 funcional tienen problemas severos para la producción de ácido salicílico ya que la enzima ICS es una enzima clave para la biosíntesis de ácido salicílico y con ello se ve reducida su resistencia a patógenos (Wildermuth *et al.*, 2001). El ácido jasmónico se biosintetiza a partir del ácido α -linoleico y a través de una ruta enzimática que incluye reacciones de oxigenación, ciclación, reducción y por último β -oxidación (Browse, 2009). Mutantes de algunas enzimas de la ruta de producción del JA han mostrado ser susceptibles a algunos patógenos, tal es el caso del triple mutante *fad3-2, fad7-2, fad8* (fatty acid desaturation) que es deficiente del precursor ácido α -linoleico y que muestra susceptibilidad al hongo *Phytophthora jasmonium*, susceptibilidad que es revertida con la aplicación de ácido jasmónico indicando así que el ácido jasmónico es una molécula implicada en la respuesta de defensa de la planta (Vijayan *et al.*, 1998). Existe una comunicación cruzada entre la señalización del ácido salicílico y el ácido jasmónico-etileno. La relación entre el ácido jasmónico y el etileno ha sido observada con los genes *ERF* en donde las señalizaciones por etileno y JA son necesarias para la expresión del gen *ERF1*, confirmando la conexión entre la señalización de ambas hormonas. De hecho, la expresión constitutiva de *ERF1* induce la expresión de genes de defensa en mutantes alterados en la señalización por ácido jasmónico o etileno (*coi1* y *ein2* respectivamente) (Lorenzo *et al.*, 2004).

Un factor importante en la evolución de las plantas ha sido los llamados metabolitos secundarios vegetales, en un tiempo considerados como sustancias de desecho, y que incluyen conjunto de sustancias químicas no relacionadas, como por ejemplo alcaloides, terpenos (aceites

esenciales) y fenoles (glucósidos, sustancias cianogénicas, saponinas y flavonoides). Hoy en día se sabe que estas moléculas cumplen funciones relevantes en la interacción de las plantas con otros organismos (atracción, repulsión, defensa y producción), por ello Pirchesky en el 2011 los llamo metabolitos especializados.

Dentro de los roles de defensa química que desarrollan las plantas pueden dividirse en dos tipos básicos: las pasivas o constitutivas y las dinámicas o inducidas (Anaya, 2003)

Con las defensas químicas constitutivas las plantas han formado numerosos compuestos químicos a lo largo de su vida, los han incorporado a sus tejidos con el propósito de defenderse, estos metabolitos pueden tener funciones en la planta, de intoxicar, repeler, mientras que las defensas activadas en una planta, a través de una interacción con fitopatógenos, herbívoros o depredador, se incluye la biosíntesis de nuevas estructuras químicas, si no, también cambios en la concentración de los compuestos ya existentes (Anaya, 2003).

2.2 Interacciones químicas planta-patógeno.

Una respuesta de la interacción planta-patógeno es la biosíntesis de metabolitos secundarios caracterizados como compuestos de bajo peso molecular que por lo general son no esenciales para el proceso metabólico básico de las plantas, y que derivan principalmente de las rutas isoprenoides, fenilpropanoides o de los policetidos y ácido shiquímico (Dixon, 2001). Los metabolitos secundarios que están implicados en los mecanismos de defensa, entre ellos los que tienen actividad antifúngicas, pueden ser constitutivos o inducidos (Osbourn, 1996a; Papadopoulou *et al.*, 1999; Anaya, 2003). Las defensas químicas constitutivas pueden existir en las plantas sanas en formas biológicamente activas o inactivas pudiéndose estas últimos activarse en respuesta a la infección por patógenos o al daño al tejido, lo que a menudo implica la activación de enzimas, que son liberadas como resultado de la ruptura de las células, a estos metabolitos se les ha denominado fitoanticipinas, término propuesto por Manfield en 1982 (VanEtten *et al.*, 1995). Mientras que las denominadas fitoalexinas (término propuesto por Müller y Börges en 1941), son compuestos químicos que se producen o se biosintetizan de *novo* en respuesta al ataque de un patógeno, sin embargo, la distinción entre fitoanticipinas y fitoalexinas no siempre es obvia, porque depende exclusivamente del papel que cumplan en la planta siendo que en algunos casos

un metabolito secundario puede ser constitutivo (fitoanticipina) para una planta y fitoalexina en otra, por ejemplo la flavonona sekurametina es un metabolito constitutivo en plantas de zarzaparrilla negra (*Ribis nigrum*) e inducido en el arroz (*Oryza sativa*) (Grayer & Harbone, 1994, Dixon, 2001).

2.2.1 Fitoanticipinas

Son moléculas preformadas con actividades antifúngicas, es decir que se producen de manera permanente en la planta independientemente del ataque de un patógeno, estos metabolitos son una barrera a la propagación de hongos en los tejidos de la planta (Mansfield, 1982; Vivanco *et al.*, 2005) y son de naturaleza química diversa entre ellos saponinas, fenoles y alcaloides.

Las **saponinas** son glicósidos que se encuentran ampliamente distribuidos en las plantas, formadas por una aglicona de origen terpenico o esteroideal (Piñol y Palzón, 1993). Una saponina conocida es la avenacina A-1 (Figura 2), producida por las células epidérmicas de las raíces de *Avena sativa* (avena) la cual la protege específicamente contra infecciones de *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, en estudios *in vitro* se ha observado que este hongo es capaz de infectar a plantas mutantes deficientes de esta saponina (Morrissey & Osbourn, 1999; Trojanawska & Therelfall, 2000). Otros trabajos señalan que especies de avena (*Avena longiglumis*) que no contiene avenacina A-1, son susceptibles a la infección por el hongo *G. graminis* var. *tritici*, el cual es sensible a la avenacina A-1. Adicionalmente mutantes de *Avena strigosa* deficientes de avenacina A-1 muestran un incremento en la susceptibilidad a este y otros patógenos que infectan las raíces de la avena tales como *Fusarium avenaceum*, *F. gramineum* y *F. culmorum* (Morrissey & Osbourn, 1999; Trojanawska & Therelfall, 2000; Thomas *et al.*, 2006). Así mismo las hojas del jitomate (*Solanum lycopersicum*) producen la saponina α -tomatina (Figura 2), presente en toda la planta, pero su concentración cambia en los diferentes tejidos; el contenido de α -tomatina es mayor en tejidos jóvenes y en frutos verdes (0.07-1.14mg/g de peso fresco). El principal sitio de biosíntesis es el tejido meristemático (Friedman, 2002), estudios *in vitro* señala que esta saponina proporciona resistencia frente de *Cladosporium fulvum* (Osbourn, 1996b; Mert-Türk, 2006). La digitonina presente en *Digitalis* sp. la vuelve resistente a varios patógenos entre ellos algunas especies de *Fusarium*, *Cladosporium herbarum*, *Alternaria alternata* y *Botrytis*

cinerea (Pavlik *et al.*, 2000).

Otras saponinas producidas de forma constitutiva están presentes en forma inactiva y se activan en respuesta al ataque de un patógeno o daño del tejido. En hojas de *Avena sativa* (avena) se encuentran los avenacosidos A y B biológicamente inactivos (Morrisey & Osbourn, 1999), pero son convertidos en saponinas activas desglucoavenacosidos A y B respectivamente, en respuesta al ataque de ciertos patógenos por una glucosil hidrolasa (avenacosidasa) (Osbourn, 1996a; Morrisey & Osbourn, 1999), la activación de estos avenacosidos ha sido observada cuando las plantas de avena son invadidas por los patógenos *Dreschleria avenacea* y *Stagonospora avenae* (Morrisey & Osbourn, 1999; Hughes *et al.*, 2004, Owatworakit *et al.*, 2013).

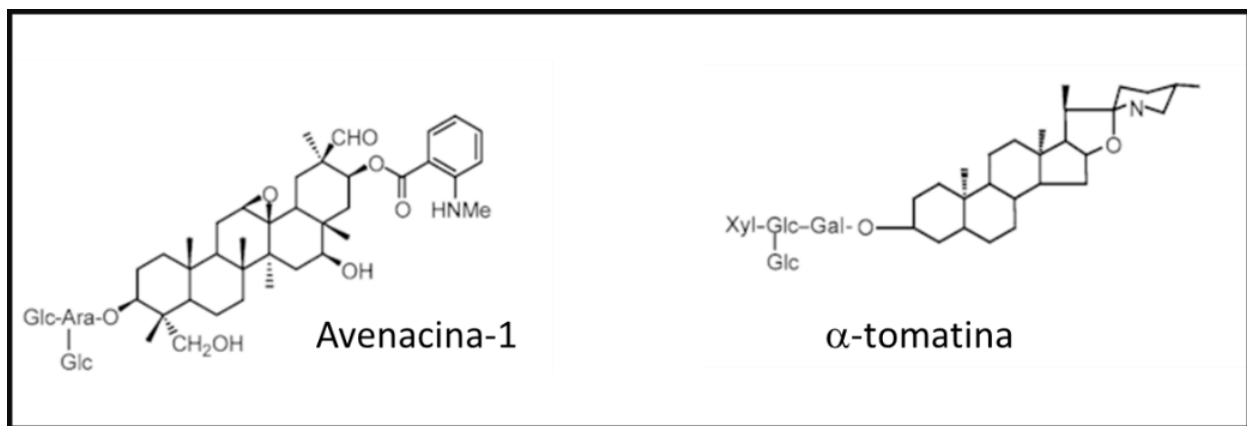


Fig. 2. Dos tipos de fitoanticipinas presentes en avena y jitomate (Owatworakit *et al.*, 2013).

La resistencia de frutos verdes a la descomposición por hongos se ha asociado con la presencia de saponinas antifúngicas (Morrisey & Osbourn, 1999, Owatworakit *et al.*, 2013). La cáscara de la fruta del mango verde (*Manguifera indica*) contiene una mezcla de dos saponinas antifúngicas (5-alkyl resorcinol-5-12- cis-heptadecenil resorcinol y 5-pentadecilo resorcinol) al parecer la disminución en la concentración de estos compuestos durante la maduración del fruto va acompañada de la susceptibilidad a *Colletotrichum gloeosporioides* (Osbourn, 1996; Karunanayake *et al.*, 2011). Al igual que en el mango ocurre con el de aguacate (*Persea americana*) la cáscara verde contiene monoenos y dienos (1-acetoxi-2,4-dihidroxi-n-heptadeca-16-eno y 1-acetoxi-2-hidroxi-4-oxo-heneicoso-12,15-dieno), la cantidad de estos compuestos

disminuye durante la maduración del fruto, y al disminuir se produce más rápidamente la enfermedad, lo que sugiere que la presencia de niveles inhibitorios de estas sustancias antifúngicas en la cáscara de la fruta verde puede detener el crecimiento del patógeno (Morrisey & Osbourn, 1999).

Como resultado de la interacción planta-patógeno, estos últimos han desarrollado mecanismos de respuesta ante las defensas producidas por las plantas; se ha documentado que algunos hongos son capaces de detoxificar algunas saponinas, esto ha sido demostrado en el hongo *Gaeumannomyces graminis* var. *avenae* el cual produce una enzima extracelular llamada avecinasa, que detoxifica la avenacina A-1 por la liberación de la molécula de D-glucosa presente en esta saponina debido a ello este hongo es capaz de infectar las raíces de la avena (Bowyer *et al.*, 1995; Morrisey & Osbourn, 1999, Diaz, 2009). *Fusarium avenaceum* y *Botrytis cinerea* hongos patógenos de la avena también son capaces de tolerar las concentraciones producidas de avenacina A-1; *B. cinerea*, no solo es capaz de degradar la avenacina A-1, sino también se ha documentado que tolera las saponinas α -tomatina y digitonina las cuales presentan actividad antifúngica *in vitro* (Quidde *et al.*, 1999). Mutantes de *G. graminis* var. *avenae* y *B. cinerea* producidos por interrupción específica del gen de la avecinasa no producen esta enzima y son incapaces de infectar las raíces de la avena lo que indica que esta enzima es determinante para la patogenicidad de estos hongos. La presencia de avecinasas en estos y otros patógenos de la avena sugiere un mecanismo de resistencia común en los hongos que habitan las raíces de esta especie (Morrisey & Osbourn, 1999; Papadopoulou *et al.*, 1999; Trojonawska & Terelfall, 2000; Mugford & Osbourn, 2013). De igual manera otras saponinas pueden ser hidrolizadas por hongos como *Fusarium neocosporiellum* (*Neurospora vasinfecta* var. *vasinfecta*), capaz de hidrolizar la sayasaponina-1 de *Medicago trunculata* para la producción de la aglicona soyapogenol B que es inactiva (Watanabe *et al.*, 2004). *Septoria lycopersici* tolera altas concentraciones de α -tomatina *in vitro* por degradación de la saponina por la enzima tomasinasa. La introducción del gen de la tomasinasa de *S. lycopersici* en patógenos que normalmente no degradan la α -tomatina como, por ejemplo, *Cladosporium fulvum* resultó en mutantes que fueron más tolerantes a la α -tomatina (Melton *et al.*, 1998).

El mecanismo de acción de las saponinas no está del todo claro, en algunos estudios se ha referido que preparados de membranas lipídicas artificiales en presencia de saponinas, muestran

grandes poros, por lo que se cree que la saponina forma complejos con los esteroides de las membranas celulares y produce grandes poros alterando su permeabilidad y como resultado las células se lisan (Morrisey & Osbourn, 1999; Owatworakit *et al.*, 2013). La Saponina SC2 de *Solanum chrysotrichum* causa grandes cambios en las membranas celulares de la levadura *Candida albicans*, la membrana se separa de la pared y se desintegra (Herrera- Arellano *et al.*, 2007). Mutantes de *Neocospora solani* (*Nectria solanum*) (telemorfo de *Fusarium solani* (*Fusarium solanum*)) deficientes de esteroides, son más tolerantes a la α -tomatina *in vitro* y pueden infectar frutos verdes ricos en α -tomatina (Morrisey & Osbourn, 1999; Owatworakit *et al.*, 2013). Otro indicio que señala que el mecanismo de acción de estas moléculas es debido a su habilidad de formar complejos con esteroides en las membranas de los hongos es que los Oomicetes de las especies de *Phytium* y *Phytophthora* no se dañan por la α -tomatina debido a que estos no poseen esteroides en sus membranas (Friedman, 2002; Owatworakit *et al.*, 2013). Ito *et al.*, (2007), señalan que α -tomatina *in vitro* no induce la lisis celular en las cepas sensibles de *Fusarium oxysporum*, pero si la muerte celular programada por la posible activación de vías de señalización, a través de la tirosina quinasa y la proteína G, la cual lleva a una acumulación intracelular de Ca^{++} y a la producción de especies reactivas de oxígeno (H_2O_2).

Los **terpenos** presentan actividad contra hongos fitopatógenos aunque la información sobre estas moléculas referidas a esta actividad es escasa, las especies de la leguminosa *Hymenea* tienen un compuesto antifúngico en las hojas que se denomina óxido de cariofileno, el cual se encuentra dentro de una mezcla de sesquiterpenos. De toda esa mezcla ese compuesto es el único capaz de inhibir al hongo *Pestilopsis subcuticularis* (Arrhenius & Langenheim, 1983). El triterpeno azadarictina *in vitro* ha mostrado actividad frente a *Colletotrichum* sp., *Helminthosporium* sp. y *Cercospora* sp. (Grainger y Ahmed 1988). Los sesquiterpenos tales como la reitina y lubimina de la papa (*Solanum tuberosum*), el capsidiol del chile (*Capsicum annum*) el 2,7dihidroxicadalenol del algodón (*Gossypium hirsutum*) han sido señalados con esta actividad (Sepúlveda *et al.*, 2003).

Otro grupo de compuestos que se produce de manera constitutiva en las plantas y que se ha implicado en el mecanismo de defensa de estas, son los **fenoles**, compuestos de estructura aromática con uno o varios grupos hidroxilos, libres o sustituidos. La estructura básica es el fenol, pero en su mayoría son polifenoles. (Piñol y Palazón, 2008).

Uno de los ejemplos que demostró que los fenoles proveen de resistencia a las enfermedades por hongos es el caso de su presencia en los catafilos de la cebolla (*Allium cepa*) que acumulan catecol y ácido protocatequico que evitan que sea infectada por *Colletotrichum circinans*, de hecho el ácido protocatéquico y el catecol en los catáfilos de la cebolla roja reducen la germinación de las esporas de *C. circinans* por debajo del 2%, a diferencia de la cebolla blanca que no produce estos compuestos y cuya tasa de germinación es mayor al 90%. (Link *et al.*, 1929; Walker *et al.*, 1955; Lattanzio *et al.*, 2006; Riveros, 2010). Mutantes de cebada mostraron una resistencia al ataque de *Fusarium*, las hifas fueron incapaces de penetrar las semillas de este mutante, ya que además de protocianidinas acumula pequeñas cantidades de dihidroquercetina, que *in vitro* es un inhibidor del crecimiento de *Fusarium* (Skadhauge *et al.*, 1997; Lattanzio *et al.*, 2006). En *Artemisa giraldii* se encuentra la flavona 4'6,7-trihidroxi-3'5'-dimetoxi-flavona responsable de la resistencia frente a *Aspergillus flavus* (Zheng *et al.*, 1996). La naringenina y el kaemferol aislados del arroz (*Oryza sativa*) inhiben la esporulación de *Pericularia oryzae* a concentraciones de 7µg/mL (Padmavati *et al.*, 1997). La leutona, presente en *Lupinus albus* es la responsable de la resistencia frente a *Bipolaris zeicola* (*Helmistosporium carbone*) (Seigler, 1998). De igual manera las flavononas naringina y tangeretina de *Citrus aurantium* (naranja agria) poseen actividad contra el patógeno *Penicillium notatum*, la tangeretina se localiza principalmente en el flavedo de las frutas, mientras que la naringina se encuentra en el albedo localizado por debajo del flavedo, actuando como primera y segunda barrera de defensa respectivamente. (Arcas *et al.*, 2000). Los flavonoides cirsimaritina, cirsilinol e hispidilina presentes en las hojas de *Arrabidaea brachypoda* han mostrado actividad frente a *Cladosporium spaeropermum* (Alcerito *et al.*, 2002). Estudios *in vitro* mostraron que compuestos fenólicos la hunemanina y norsanguinarina aisladas de *Eschscholzia californica*, son capaces de inhibir completamente la esporulación de *Alternaria brassicae*, *Helminthosporium pennisetti*, *Fusarium lini* a concentraciones de 1000 ppm (Shingh *et al.*, 2009).

Al parecer estos compuestos más que inhibir el crecimiento de los hongos impiden la germinación de las esporas y con ello las plantas que los producen tratan de evitar la infección.

El mecanismo de acción de los fenoles tampoco está del todo claro, pero se ha demostrado que los alcoholes fenólicos (timol, carvacrol, eugenol) son fuertes inhibidores de los procesos enzimáticos atribuidos principalmente a sus características lipofílicas (Knoblock *et al.*, 1989;

Lucini *et al.*, 2006; Pepelijnjak *et al.*, 2003), también inhiben a las enzimas que reaccionan con los grupos sulfhidrilos de los aminoácidos lo que conduce a su inactivación. Los flavonoides y flavononas también forman complejos con los aminoácidos nucleofílicos de las proteínas lo que conduce a su inactivación (Cowan, 1999).

Los **alcaloides** son compuestos que poseen un nitrógeno heterocíclico que generalmente se biosintetizan a partir de aminoácidos, tales como el triptófano, fenilalanina, lisina, arginina u ornitina (Piñol y Palazón, 1993).

La mayoría de las actividades antifúngicas reportadas de los alcaloides está basada en la inhibición del crecimiento y germinación de esporas, esta actividad podría sugerir el posible papel que estos metabolitos desempeñan en la planta que los produce. Berberina alcaloide bensilisoquinolinico aislado de *Fumaria indica* (capa de reina) inhibió significativamente la germinación *Helminthosporium* spp., *Curvularia lunata*, *Erysipe cichoracearum* y *Fusarium udum* a concentraciones 1.5 ug/mL (Sarma *et al.*, 1999). La actividad *in vitro* de este alcaloide frente a hongos patógenos de la planta, sugiere que este alcaloide está implicado en la defensa hacia estos hongos. El crecimiento de los hongos *Rhizoctonia solani*, *Pyricularia grisea*, el fungoide *Phytophthora infestans* y *Puccinia recondita* su crecimiento es inhibido por el alcaloide pipernonalina aislado de *Piper longum* (35, 75, 91 y 100 % respectivamente), este mismo alcaloide inhibe el crecimiento *in vivo* de *Puccinia recondita* a concentraciones de 0.5 mg/mL (Lee *et al.*, 2001). Según Ashok *et al.*, (2008) securina alcaloide aislado de plantas de *Phyllanthus amarus* (quinina de pobre), inhibe la germinación de las esporas de los hongos *Alternaria brassicola*, *Curvularia lunata* y *C. pallenscen* y *Curvularia speciferum* (*Helminthosporium spiciferum*) a 200 ug/mL.

Otros alcaloides han sido evaluados para conocer la actividad antifúngica frente a hongos patógenos de otras plantas. Los alcaloides isoquinolinicos hunnemanina y norsanguinarina obtenidos de *Eschscholtzia californica* presentaron actividad antifúngica frente a diferentes hongos fitopatógenos, Hunnemanina exhibió 100% de inhibición (1000 ppm) de la germinación de las esporas de *Alternaria brassicae*, *Helminthosporium penniseti* y *Fusarium lini*, mientras que norsanguinarina provocó 100% de inhibición frente a *A. brassicicola* y *Curvularia eragrostidis* (*Curvularia maculans*) a la misma concentración (Singh *et al.*, 2009).

Se cree que el efecto inhibitorio de estos metabolitos en el crecimiento de

microorganismos patógenos está dado por las propiedades que tienen de intercalarse con el ADN, de detener la biosíntesis de proteínas, inducir la apoptosis e inhibir las enzimas del metabolismo de los carbohidratos (Wink & Schimmer, 1999).

Otros compuestos inactivos como la 1,4- benzoxazina producida de forma constitutiva en plantas de *Zea mays* es hidrolizada en respuesta al ataque de patógenos originando los ácidos hidroxinámicos DIBOA Y DIMBOA, compuestos con actividad antifúngica sobre *Exserohilum turcicum* (*Helminthosporium turcicum*), *Phaeosphaeria nodorum* (*Stagonospora nodorum*), *Microdochium nivale*, *Fusarium fujikuroi* (*Fusarium moniliformes*), *Fusarium culmorum* y *Gaeumannomyces graminis* (Morrysey & Osbourn, 1999; Sachalcli *et al.*, 2012) como las concentraciones de estos compuestos son más altas en las plantas jóvenes unos días después de la germinación y luego disminuyen, se sugiere que estas moléculas actúan como defensa preformada en etapas juveniles del crecimiento (Dixon, 2001).

De los grupos de compuestos mencionados las saponinas son comúnmente referidas como moléculas de defensa, sin embargo, cualquier metabolito producido de forma constitutiva que presente actividad antifúngica sobre organismos presentes en la planta podría ser considerado como una fitoanticipina.

2.2.2 Fitoalexinas

Las fitoalexinas constituyen un grupo químicamente heterogéneo que a diferencia de las fitoanticipinas no se encuentran en los tejidos sanos de las plantas, sino que se biosintetizan en respuesta al ataque de patógenos o al estrés abiótico, probablemente como resultado de la biosíntesis *de novo* de las enzimas (Müller & Börges, 1940; Anaya, 2003). La acumulación de fitoalexinas representa una respuesta de defensa inducida asociada con la resistencia a enfermedades en plantas, estos compuestos por lo general se acumulan más rápido y a niveles altos en plantas resistentes (Mert- Turk, 2002; Vivanco *et al.*, 2005).

De entre las fitoalexinas más conocidas destacan las pertenecientes a las Fabáceas como la pisatina, faseolina y la wyerona. También entre las solanáceas el capsidiol, rishitina, lubimina y filburerina en las Malvaceaeas, el gossipol, en las Pináceas, pinosilvina y en los cítricos, seselina (Rossal & Manfield, 1977; Hammerschmidt, 1999; Lattancio *et al.*, 2006) (Figura 3).

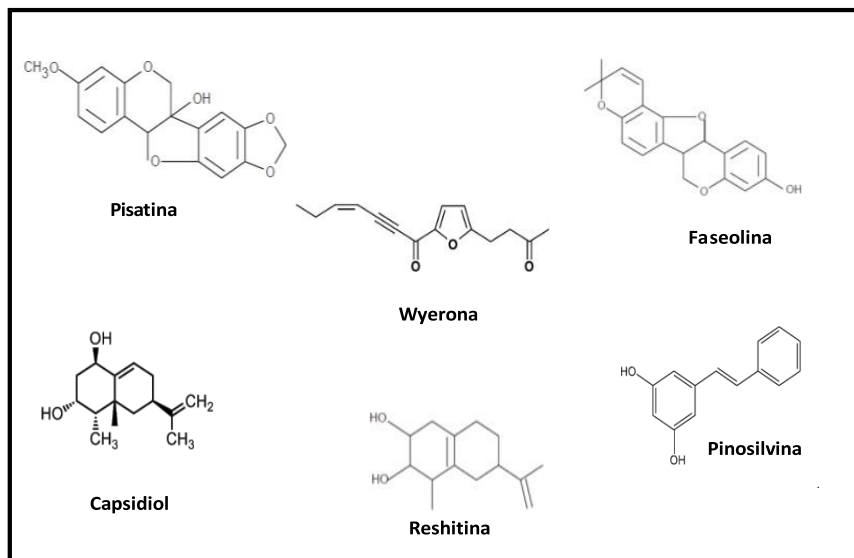


Fig 3. Ejemplos de fitoalexinas presentes en diferentes plantas (Lattancio *et al.*, 2006)

La mayoría de la fitoalexinas han sido identificadas en las familias Fabaceae y Solanaceae, pero en otras familias se han detectado dos o tres clases de metabolitos secundarios de este tipo, por ejemplo, en el jitomate (*Solanum lycopersicum*) se producen dos poliacetilenos (farcarinol y falcarindiol) y un sesquiterpenoide risitina (Ebel, 1986)

Durante la interacción incompatible planta-patógeno, las plantas responden con la biosíntesis de fitoalexinas específicas para su defensa; por ejemplo, los epicótilos de *Pisum sativum* infectados con *Aphomyces eutiches*, acumulan pisatina hasta 20 veces más que las concentraciones que inhiben el crecimiento micelial *in vitro* (ED 100 \geq 100 μ g/mL) (Pueppke & VanEtten, 1976), en hojas de *Cassia fistula* y *Morinda tomentosa* infectadas con los hongos *Phomopsis* sp. y *Curvularia* sp. respectivamente, se han aislado ácido *o*-cumarico, mientras que en hojas sanas este compuesto estaba sustituido por *p*-cumarico (Abraham, 1988). También el casbeno es un diterpeno inducido en plántulas de *Ricinus comunis* infectadas con *Rhizopus stolonifer* (Dudley *et al.*, 1986). Los frutos de *Citrus limon* infectados con *Penicillium digitatum*, acumulan en el flavedo escoparona (150 μ g/g de droga fresca) (Kim, 1991), en hojas de *Camelina sativa* se producen la camalexina y methoxicamalexina por la invasión del hongo *Alternaria brassica* (Browne *et al.*, 1991). La fitoalexina poliacetilénica wyerona se incrementa en cotiledones del haba (*Vicia faba*) que fueron inoculados con los patógenos *Botrytis cinerea* y *B.*

allii. La cantidad más alta de wayerona se indujo por *B. cinerea* (943 µg/g peso fresco), mientras que con *B. allii* se produjo 325 µg/g peso fresco (Soylu *et al.*, 2002).

Algunos reportes de la inducción de fitoalexinas señalan que los metabolitos inducidos se biosintetizan en zonas cercanas a la penetración del hongo por ejemplo las plantas de *Sorghum bicolor* (sorgo) en respuesta a la infección del hongo *Bipolaris maydis* producen un éster del ácido cafeico, este compuesto se acumula en células cercanas a la invasión, mientras que cuando son infectadas por *Colletotrichum graminicola* biosintetizan la apigenidina (0.91 ng) y luteolina (0.48 a 1.20 ng) (Snayder & Nicholson 1990; Whartoon & Nicholson, 2000) lo que pareciera indicar que la biosíntesis de estos compuestos sería en las células cercanas a la invasión. Los tallos y raíces de plántulas de limón (*Citrus limon*) inoculadas con *Phytophthora citrophthora* biosintetizan 6,7 dimetoxicumarina (escoparona), que se detecta en concentraciones más altas en tejidos de tallo infectado (1 nmol/g de peso fresco), mientras que en las puntas de las raíces a concentraciones menores (0.8 nmol/g de peso fresco), la presencia de este compuesto en células adyacentes a la infección (0.5 a 10 cm del margen de la lesión) no fue detectado. (Sulittyowati & Anderson, 1990). Las fitoalexinas fitocassanos A y E fueron detectadas en las hojas de arroz infectadas con *Magnaporthe grisea* observándose que la acumulación de fitocassanos fue más abundante en los bordes de las lesiones necróticas, lo que indica que estas pudieran prevenir la posterior propagación de los hongos de la zona infectada. (Umemura *et al.*, 2003).

Una tendencia actual en la investigación de las fitoalexinas está dirigida a la producción de estas moléculas en cultivos de tejidos celulares. Las células de *Papaver somniferum* infectadas con *Alternaria pellicillata* (*Dendryphion penicillatum*) producen el alcaloide sanguinerina, el incremento de este alcaloide es proporcional a la adición del inductor (Cline & Cosia, 1998). Las células de *Arabidopsis thaliana* cuando son elicitadas con *Phytophthora sojae* biosintetizan calamexina y ácido cinámico, mientras que las células de *Petroselinum crispum* inducidas con el mismo hongo producen furocomarinas y ácido benzoico; en estos mismos cultivos celulares se observó que los compuestos producidos no estaban disponibles de la misma manera ya que tanto la calemixina como las furocomarinas se encuentran en forma soluble y los ácidos benzoico y cinámico unidos a la pared celular (Hahlbrock, *et al.*, 2003). Estos datos ponen en evidencia que las plantas pueden producir fitoalexinas distintas para contrarrestar un mismo tipo de hongo.

Es evidente que la respuesta de las células (biosíntesis de fitoalexinas) ante la invasión del

patógeno puede darse a diferentes tiempos y algunos compuestos producidos pueden ser más activos que otros. La elicitación de células de *Catharantus roseus* con *Phytium verxans* induce la biosíntesis del alcaloide catarantina (de 0 a 1.7 $\mu\text{g}/100\text{ mL}$) y estimula la producción de ajmalacina (de 1.7 a 3.35 $\mu\text{g}/100\text{ mL}$) a las 24 h después de la inducción, de igual manera induce la producción de serpentina (de 2.55 a 5.1 $\mu\text{g}/100\text{ mL}$) a los 7 días después de la inoculación (Nef *et al.*, 1991). También se ha encontrado una acumulación de cumarinas (umbeliferona) en cultivos de células de hipocotilos de *Ammi majus* inducidas con fracciones de la pared celular de *Phytophthora megasperma glycinea* (Harmerski, 1990). La inducción y acumulación en cotiledones de soya de las fitoalexinas (gliceolina I, II y III, y el coumestrol) se observó con cuatro especies de *Aspergillus*: *A. sojae*, *A. oryzae*, *A. niger* y *A. flavus* las máximas concentraciones de gliceolina (955 $\mu\text{g}/\text{g}$ de peso fresco), se encontraron al tercer día de la inoculación con *A. sojae*, las otras especies de *Aspergillus* produjeron gliceolina en concentraciones menores. La concentración máxima de coumestrol (27,2 $\mu\text{g}/\text{g}$ de peso fresco) se obtuvo a partir de cotiledones de soya inoculadas con *A. niger*. (Boué, 2000). En células de *Hypericum perforatum* estimuladas con *Colletotrichum gloesporioides* se induce la biosíntesis de xantonas (4mg/g de peso fresco) (Conciencao *et al.*, 2006). En cultivos celulares (callos) de *Mammillaria huitzilopochtli* se observó la producción de fitoalexinas cuando estos fueron infectados con *Fusarium moniliforme*, la biosíntesis de estos compuestos fue observada 4 días después de la inoculación (Zepeda *et al.*, 2009).

La producción de fitoalexinas se ha correlacionado con la resistencia a patógenos y se asocia con la inducción de una serie de genes que codifican para enzimas específicas responsables de su biosíntesis, entre ellas la fenilalanina amonio liasa (PAL), la chalcona sintasa (CHS) y la chalcona isómerasa (CHI) (Cuypers *et al.*, 1988; Matern *et al.*, 1995; De Wit, 1997; Schmidt *et al.*, 1998). Por ejemplo, se ha identificado a gliceolina I en células de soya, fitoalexina de naturaleza fenólica sintetizada por la PAL; además se ha observado que inductores de algunos hongos presentes en vegetales incrementan la velocidad de transcripción del RNAm para su expresión. Hain (1993), transfirió el gen implicado en la biosíntesis de fitoalexinas tipo estilbeno en *Vitis vinifera* a plantas de tabaco observándose en respuesta a la inoculación con *Botrytis cinerea* la acumulación de RNAm en células alrededor del sitio de infección de la estilbeno sintasa, enzima específica para biosíntesis del resveratrol, ofreciendo evidencias del sitio de biosíntesis del

compuesto. Durante la infección de *Solanum tuberosum* por el fungoide *Phytophthora infestans* se induce la actividad y la expresión de los genes de las enzimas fenilalanina amonio liasa, tirosina descarboxilasa y la de la enzima HCA-CoA-tiramina: HCA transferasa que participan en la biosíntesis de la feruloiltiramina y de la *p*-cumaroiltiramina (Matern *et al.*, 1995; Schmidt *et al.*, 1998).

La camalexina es una fitoalexina caracterizada de *Arabidopsis*, es un alcaloide indólico con un anillo de tiazol (ciclización de la cisteína), en la posición 3 del indol. La infección o el tratamiento de *Arabidopsis* con inductores (*Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*) induce la producción de camalexina y la expresión de los genes de la vía del triptófano, estos genes posiblemente representen un sistema común de genes necesarios para la producción del indol, de un precursor del triptófano y posiblemente de la camalexina. Estudios de marcaje y de plantas mutantes han demostrado que el ácido antanílico, es un precursor de la camalexina, pero no el triptófano. Las suspensiones celulares de *Arabidopsis* también acumulan el indol e incorporan el indol marcado y el ácido antranílico en la camalexina. Una propuesta de la ruta biosintética sugiere que el indol-3-carboxaldehído sea un precursor que se condensa con la cisteína para formar los precursores inmediatos a camalexina. Esto es apoyado por los hechos de que indol-3-carboxaldehído está presente en *Arabidopsis* y que el ácido antanílico ¹⁴C se incorpora en este aldehído (Hammerschmidt, 1999).

Algunos estudios evidencian que los patógenos pueden metabolizar la fitoalexinas, señalando que la mayoría de los patógenos desarrollan un mecanismo de detoxificación, lo cual es muy importante en la interacción planta-patógeno. VanEtten (1995) señala que la virulencia de *Nectria haemococca* a los chicharos está basada en la habilidad del patógeno de detoxificar la pisatina, indicando que este proceso era debido a la desmetilación de la pisatina por pisatina desmetilasa. La clonación del gen *pda*, gen de la pisatina desmetilasa, la interrupción o transformación de este gen a *pda* ha señalado que al parecer no es el único factor implicado en la desmetilación de la pisatina, pero este gen provee las herramientas necesarias para tratar de comprender el proceso de detoxificación de la pisatina; así mismo, la virulencia de *Gibberella pulicaris* parece estar asociada a su capacidad de detoxificar la fitoalexina ricitina de la papa, sin embargo el mecanismo aún no está del todo claro (Weltring *et al.*, 1997).

Todas estas investigaciones sugieren que estos metabolitos son parte de sistemas de

defensa específicos de la planta y que están mediados por señales que impactan el desarrollo de mecanismos de resistencia al patógeno.

2.2.3 El caso de las anonas

Del género *Annona* se han aislado metabolitos secundarios de naturaleza química diversa, entre ellos polifenoles (ácido caféico y *p*-cumárico y procianidina), flavonoides (Kaemferol), terpenos (β -cariofileno, α y β pineno) y glucósidos cianogénicos (Leboeuf *et al.*, 1980), pero se caracteriza por producir alcaloides bensilisoquinolínicos (ABI) y acetogeninas específicas de esta familia (ACG) (Lebouef *et al.*, 1980; Cave *et al.*, 1997; Alali *et al.*, 1999). Hasta ahora considerados como constitutivos. El papel de defensa contra hongos fitopatógenos de estos metabolitos producidos por plantas de este género, está escasamente documentado para el alcaloide liriodenina por de la Cruz *et al.*, 2011, sin embargo, algunos metabolitos presentes en *Annona*, también aislados de otras especies de plantas tienen actividad antifúngica, así el ácido catequico, kaemferol y α y β pineno, son referidos como metabolitos constitutivos de defensas en especies como *Allium cepa* y *Oriza sativa* (Padmavati *et al.*, 1997; Lattanzio *et al.*, 2006) lo que sugiere que estos metabolitos podrían estar cumpliendo roles de defensa en las especies de esta familia.

La revisión bibliográfica realizada hasta hoy muestra que la actividad más reportada es la relativa a los fitopatógenos, que pudieran relacionarse con el posible papel que desempeñen en las plantas que lo producen. Por lo menos 9 alcaloides producen inhibición conjuntamente contra 28 fitopatógenos (Cuadro 3). Resaltan por su espectro y potencia inhibitoria las oxoaporfinas liriodenina, lisicamina y roemerina. La mayoría de los organismos sensibles son hongos, entre los que destacan por los daños agrícolas que causan, *Aspergillus niger* causante del deterioro de semillas y considerada la enfermedad principal de las semillas de cacahuete (*Arachys hypogea*) y del arroz (*Oryza sativa*), *Alternaria kikuchiana* que provoca la enfermedad del tizón foliar (manchas foliares que deterioran bruscamente las hojas) de 62 especies, entre ellas las del jitomate (*Solanum lycopersicum*), la pera (*Pyrus communis*) y la papaya (*Carica papaya*), a tal grado que se le considera responsables de al menos el 20% de las pérdidas agrícolas (IS-MP Minet, 2011).

Los alcaloides tienen actividades variables, y dependen tanto de la molécula como del microorganismo en cuestión, así, en ensayos de difusión, la liriodenina exhibe una actividad frente

a *A. niger* desde 400 µg/disco mientras que en *A. fumigatus* de 25 µg/mL; o moléculas como la roemerina y coridina que logran inhibir totalmente el crecimiento radial de *Alternaria kikuchiana* en ensayos *in vitro*.

También hay moléculas que tienen actividad sobre organismos muy diferentes, entre ellas, la lisicamina y la liriodenina son capaces de inhibir a las bacterias *Agrobacterium tumefaciens* y *Xanthomonas campestris* con 10 ug/disco (Khan, Kihara & Omoso, 2002). Liriodenina es la molécula que mayor número de reportes presenta, se documenta su actividad frente a 20 hongos y 2 bacterias fitopatógenas. La mayoría de las evaluaciones son *in vitro* y solo la liriodenina ha sido evaluada en campo (Hufford *et al*, 1980). La actividad de estos alcaloides sugiere entonces un papel de defensa antimicrobiano de protección para la planta (Cuadro 3).

Cuadro 3. Actividad de alcaloides sobre fitopatógenos.

Alcaloide	Patógeno		Patología	Actividad	Referencia
Coridina	<i>Alternaria kikuchiana</i>	Hongo	Tizón foliar	100% de mortalidad	Deng <i>et al.</i> , 2006
Dicretina	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	Hongo	Deterioro de Semillas	30 ug/mancha	Puvanendran <i>et al</i> , 2008
Liriodenina	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Bacteria	Agallas o tumores del cuello	10 ug/disco	Khan <i>et al.</i> , 2002
	<i>Xanthomonas campestris</i>	Bacteria	Manchas foliares	10 ug/disco	
	<i>Aspergillus niger</i>	Hongo	Deterioro de semillas	400 ug/disco	Rahman <i>et al.</i> , 2005
	<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16888	Hongo	Deterioro de semillas	3.1 ug/mL	Hufford <i>et al.</i> , 1980
	<i>Aspergillus flavus</i>	Hongo	Deterioro de semillas	400 ug/disco	Rahman <i>et al.</i> , 2005
	<i>Aspergillus versicolor</i>	Hongo	Deterioro de semillas	400 ug/disco	

<i>Aspergillus fumigatus</i>	Hongo	Deterioro de semillas	25 ug/mL	Hufford <i>et al.</i> , 1980
<i>Aspergillus glaucus</i>	Hongo	Deterioro de semillas	200 umol/mL	De la Cruz <i>et al.</i> , 2011
<i>Syncephalastrum racemosum</i>	Hongo	Deterioro de semillas	3.1 ug/mL	Hufford <i>et al.</i> , 1980
<i>Helminthosporium teres</i>	Hongo	Manchas pardas de la cebada	38 ug/mL	Wu, 2006
<i>Plasmopora viticola</i>	Hongo	Tizón de la uva	38 ug/mL	Hufford <i>et al.</i> , 1980
<i>Pericularia oryzae</i>	Hongo	Quemado del arroz	40 ug/mL	
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	Hongo	Podredumbre del trigo	2ug; 100 ug	Monteiro <i>et al.</i> 2007
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	Hongo	Hongo endofítico de las raíces	12.5 ug/mL	
<i>Lenzites betulina (macro)</i>	Hongo	Podredumbre blanca	0.76 mg/mL	Wu, 2006
<i>Trametes versicolor</i>	Hongo	Pudrición de la corteza	3.50 ug/mL	
<i>Laetiporus Sylphureus</i>	Hongo	Podredumbre parda o café	2 ug/mL	
<i>Gloephyllum trabeum</i>	Hongo	Pudrición parda	2 ug/mL	
<i>Fomitopsis pinicola</i>	Hongo	Pudrición parda o café	2 ug/mL	
<i>Botrytis fabae</i>	Hongo	Mancha chocolate	38 ug/mL	Hufford <i>et al.</i> , 1980

	<i>Erysiphe polygoni</i>	Hongo	Cenicilla del frijol	300 ug/mL	Wu, 2006
	<i>Rhizopus stolonifer</i>	Hongo	Pudrición blanda	200 umol/mL	De la Cruz <i>et al.</i> , 2011
Lisicamina	<i>Rhizopus oryzae</i>	Hongo	Pudrición blanda	200 ug/disco	Conserva <i>et al.</i> , 2005
	<i>Rhizopus oligosporus</i>	Hongo	Pudrición blanda	200ug/disco	
	<i>Trichoderma spp.</i>	Hongo	Micoparásito necrótrofo	200 ug/disco	
	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Bacteria	Agallas o tumores del cuello	10 ug/ disco	
	<i>Xanthomonas campestris</i>	Bacteria	Manchas foliares	10ug/disco	
Nordicentrina	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	Hongo	Pudredumbre del trigo	6 ug/mancha	Puvanendran <i>et al.</i> , 2008
Roemerina	<i>Alternaria kikuchiana</i>	Hongo	Tizón foliar	100%	Deng <i>et al.</i> , 2007
	<i>Sphaceloma fawcettii</i>	Hongo	Deterioro de frutos, hojas	85%	
	<i>Mycosphaerella sentina</i>	Levadura	Tizón de la hoja de pera	100%	
	<i>Xanthomonas citri</i>	Bacteria	Cancrocis de los cítricos	100%	
Sampinginina	<i>Aspergillus flavus</i>	Hongo	Deterioro de semillas	0.76 ug/mL	Deng <i>et al.</i> , 2007
Thalifolina	<i>Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici</i>	Hongo	Pudrición del tomate	100 ug	Patiño y Cuca, 2010
Xylopina	<i>Cryptococcus neoformans</i>	Hongo	Deterioro de semillas	62.5-1000 ug/mL	Tsai <i>et al.</i> , 1989

Si bien, la mayoría de estos alcaloides no han sido evaluados sobre su función en la defensa de las plantas, la actividad antifúngica mostrada por estos, hacia una diversidad de fitopatógenos sugiere su participación como fitoanticipinas.

Las ACG parecen tener blancos en otros sistemas biológicos ya que pueden ser herbicidas e insecticidas (Cave *et al.*, 1997; Alali *et al.*, 1999).

La inducción de fitoalexinas en especies de *Annona*, tampoco ha sido reportada, sin embargo, hay indicios de que los ABI son inducidos en especies de otras familias, por ejemplo, Cline & Coscia (1987) reportan la acumulación de sanguinerina (460 ug/g de peso fresco), en cultivos celulares en suspensión de *Papaver bracteratum* cuando las células son estimuladas con *Dendryphion penicillatum*, este alcaloide también es inducido en células de *Papaver somniferum* después de 79 h de haber sido inducidas con *Botrytis* (Brossi, 1991). Del mismo modo se ha observado que enzimas implicadas en la biosíntesis de alcaloides de este tipo se incrementan en células que han sido infectadas con hongos. Alcantara *et al.*, (2005) evaluaron cultivos celulares de opio (*Papaver somniferum*) para determinar si los niveles de las enzimas CYP80B1, BBE y COR tratadas con un homogenizado del hongo *Botrytis cinerea*, se modificaban en respuesta al tratamiento del inductor encontrando que los niveles de la enzima CYP80B1 y BBE, (que no eran perceptibles en el extracto control), se incrementan a partir de las 5 h de la adición del inductor, en el caso de la enzima COR los niveles permanecieron iguales al control. La enzima CYP80B1(N- metilcoclaurina hidrolasa) cataliza el paso entre la (S)-N-metilcoclaurina a (S)-3'-hidroxi-N- metilcoclaurina intermediario para la formación de reticulina, el punto de diversificación de los alcaloides bensilisoquinilicos (Liscombe & Fachinni, 2008). Estos resultados son evidencia de las estas enzimas implicadas en la biosíntesis de que los ABI responden al ataque de patógenos y con ello producen alcaloides específicos relacionados con la defensa de la planta a un patógeno en particular.

III. ESPECIES ESTUDIADAS

3.1 *Annona muricata*

Descripción botánica

Árbol pequeño, de ocho metros de altura o menos, follaje caedizo, las ramas jóvenes pubescentes, posteriormente glabras; hojas con peciolo de 5 mm de longitud delgadas, lustrosas, ovadas a oblongas, 8-15 cm de longitud, 3-6 cm ancho, ligeramente obtusas en la base; flores solitarias, terminales u opuestas a las hojas; pedicelo de 1.5-2 cm de longitud, seríceos; pétalos interiores pequeño; fruto ovoide o oblongo-ovoide, 15-20 cm de largo, cubierto con tubérculos parecidos a espinas curvas y flexibles, presenta frutos agregados (sincárpicos) ; semillas negras de 1.5 cm de largo, por lo general cada fruto contiene entre 120 y 170 semillas (Standley & Steyemark., 1946).

Ubicación taxonómica

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliidae

Orden: Magnoliales

Familia: Annonaceae

Género: *Annona*

Especie: *Annona muricata* L. (MBG, 2018).

De *Annona muricata* se han aislado 18 alcaloides, todos bencilisoquinolínicos, distribuidos en diferentes partes de la planta, pero principalmente extraídos de las hojas (Cuadro 4), a ninguno le ha sido evaluado su potencial antifúngico sobre hongos fitopatógenos, sin embargo, se señala con frecuencia su actividad sobre bacterias, hongos y protozoarios de interés médico lo que demuestra parte de su potencial biológico.

Cuadro 4. Alcaloides aislados de *Annona muricata*

Nombre	Estructura vegetal	Referencia
Anomuricina	R, T, C, H	Leboueuf <i>et al.</i> , 1982, Morton, 1987; Cave <i>et al.</i> , 1987; Philipov <i>et al.</i> , 1994; Hasrat <i>et al.</i> , 1997; Lannuzel <i>et al.</i> , 2002
Anomurina	R, T, C, H	
Anonaina	H	
Annonaina	F	
Annonamina	H	
Asimilobina	F	
Atherosperminina	R, T, C, H	
Coclorina	R, T, C, H	
Coreximina	R, T, C, H	
(R)-O,O-dimetilcoclorina	H	
Estefarina	R, T, C, H	
Isolaurelina	H	
(R)-4'O-metilcoclorina	H	
(S)-norcoridina	H	
Nornuciferina	F	
N-falti, acilriptamina	S	
N-Metilcoclorina	Hojas	
Reticulina	R, T, C, H	
Xylopina	H	

R=raíces, T= tallos, C= cortezas, H= hojas, F= frutos, S= semillas

Otro grupo característico de esta familia son las llamadas “acetogeninas de anonáceas” (ACG), son moléculas de 35 y/o 37 átomos de carbono que se caracterizan por una larga cadena alifática sin ramificaciones y con una γ -lactona en un extremo de la cadena, presentan algunos sustituyentes oxigenados, tales como hidroxilos, cetonas y epóxidos, poseen típicamente de uno a tres anillos tetrahidrofuranicos (THF) y en algunas ocasiones anillos tetrahidropiránicos (THP), así como dobles y triples enlaces. La clasificación de estas moléculas ha variado conforme al

incremento en número y tipo de ellas, de tal manera que por lo menos existen tres clasificaciones: Cave *et al* (1997), Alali *et al.*, (1999) y Bermejo *et al.*, (2005). En cada una de ellas se retoman los criterios del trabajo anterior, en este caso citaremos la última clasificación de Bermejo *et al.*, (2005) donde las sistematiza en 22 grupos de acuerdo a las siguientes características estructurales: anillos tetrahidrofurano (THF), tetrahidropirano (THP), epoxy y sistemas de γ -lactona. Estos compuestos al igual que los alcaloides presentan diferentes actividades biológicas, entre ellas las antitumorales, citotóxicas, antiparasíticas, herbicidas e insecticidas (González-Esquinca, 2005).

En lo referente a su posible papel en la planta, son escasos los reportes que se pueden encontrar. Tienen propiedades antialimentarias, insecticidas y antifungicas (cuadro 5). Las ACG reportadas son por lo general del tipo bis tetrahidrofurano. La potencia de estas moléculas ha sido evaluada principalmente en larvas de organismos folípagos, particularmente en especies de *Spodoptera*, por ejemplo, gigantetronenina provoca mortalidad al 100% de larvas de *S. frugiperda* (gusano cogollero del maíz) y en concentraciones más pequeñas efectos alimentarios (Blessin *et al.*, 2010). Asimicina muestra toxicidad sobre *Blatella germanica* (cucaracha alemana) a 1000 ppm, mientras que uvaricina sobre *Malocosoma americana* (polilla americana; toxicidad letal media a 40 ppm) (Ahammadsahib *et al.*, 1993; Alali *et al.*, 1999).

Cuadro 5. Acetogeninas con actividades insecticidas

Compuesto	Organismo		Actividad	Referencia
Annonacina	<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	Escarabajo de la papa	antialimentario	Guadaño <i>et al.</i> , 2003
	<i>Spodoptera littoralis</i>	Rosquilla negra	86 % mortalidad a larvas	González-Coloma <i>et al.</i> , 2002
Annomontacina	<i>Blatella germanica</i>	Cucaracha alemana	TL ₅₀ a 1000 ppm	Alali <i>et al.</i> , 1999
Asimicina				
Bullatacina				
Escuamocina	<i>Spodoptera frugiperda</i>	Cojollero de maíz	80%	Colom <i>et al.</i> , 2007
	<i>Spodoptera littoralis</i>	Rosquilla negra	64%	González-Coloma <i>et al.</i> , 2002

Gingantreocina	<i>Blatella germanica</i>	Cucaracha alemana	TL ₅₀ a 1000 ppm	Alali <i>et al.</i> , 1999
cis-annonacina-10-one	<i>Spodoptera frugiperda</i>	Cojollero de maíz	100% (larva) y antialimentario (80%)	Blessin <i>et al.</i> , 2010
Densicomacina-1				
Gigantetronenina				
Murihexocina-B			100% (larva)	
Rolliniastatina 1	<i>Spodoptera littoralis</i>	Rosquilla negra	40.3 %	González-Coloma <i>et al.</i> , 2002
Rolliniastatina 2			29.7 %	
Laherradurina			86%	
Uvaricina	<i>Malacosoma americana</i>	Polilla americana	TL ₅₀ a 40 ppm	Ahammadsahib <i>et al.</i> , 1993

De *Annona muricata* se han aislado 102 acetogeninas obtenidas principalmente de las semillas y hojas (Moghadamtousi *et al.*, 2015). Solo a rolliniastatina-2 se le determinó actividad antialimentaria sobre larvas de *Spodoptera frugiperda* y actividad antifúngica contra *C. albicans* (González-Coloma *et al.*, 2002; Riley, 2007).

3.2 *Rhizopus stolonifer*

Rhizopus stolonifer significa “que en el pie de la raíz lleva un vástago”, su significado proviene del griego rhiza (raíz) y pous (piel) y del latín stolo-onis (vástago) y fero (portar) (Pontón *et al.*, 2002). Este fitopatógeno se encuentra clasificado dentro del Phylum Zygomycota; Orden mucorales; Familia Mucoraceae; Género *Rhizopus*; Especie *Rhizopus stolonifer* (Pontón *et al.*, 2002; Agrios, 2007).

R. stolonifer es conocido también como moho negro del pan, se considera como un hongo que provoca la pudrición blanda en frutos maduros, en todas las áreas de producción alrededor del mundo. Se han registrado pérdidas desde 50 hasta el 100% en el área de producción (Ogawa, 1995). Además, es un hongo que se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza (Northover & Zhou, 2002; Zhang *et al.*, 2004). Comúnmente vive como saprófito y en ocasiones como parásito oportunista (Carlile & Watkinson, 1994).

Condiciones óptimas para su crecimiento

R. stolonifer es uno de los mucorales más frecuentes que tiene una distribución amplia en todo el planeta. Su temperatura de crecimiento varía desde 10 hasta 33°C, con una temperatura óptima de 25 °C. Este fitopatógeno se ve afectado severamente por temperaturas menores de 5°C. Con frecuencia se encuentra en suelos con arena, en la composta, en el polvo de las casas, en la pulpa de la madera, estiércol, panales de abejas, nidos y plumas de aves, así como en diferentes frutos y semillas (Pontón et al., 2002). Las esporas de *R. stolonifer* no son abundantes en el aire libre, aunque su frecuencia aumenta en lugares donde hay humedad y se acumula vegetación muerta (Velázquez del Valle *et al.*, 2008).

Características morfológicas

Es un hongo filamentoso presenta un micelio cenocítico y que asexualmente produce esporangioforos largos, aéreos sin ramificar (Carlile & Watkinson 1994; Agrios, 2007), de color pardo oscuro que nacen de un nudo de rizoides bien desarrollado, hasta formar una columnela al interior del esporangio; las esporas pueden ser de diferentes formas como: elipsoidales, globosas y angulares, la superficie lisa o presentan ornamentaciones, en forma de estría, y a lo largo de la espора y son de color oscuro (Hernández-Lauzardo *et al.*, 2006) (Figura 4). Cuando estas esporangiosporas se encuentran sobre una superficie que mantiene las condiciones adecuadas para la germinación y desarrollo del hongo, las esporas germinan y se forman los estolones que son hifas que se adaptan a la superficie y que junto con los rizoides forman puntos de contacto con la superficie y se da lugar a la formación de más estolones que se desarrollan en todas las direcciones (Villanueva, 2004; Agrios, 2007).

Produce esporas sexuales denominadas, zigosporas dentro de un zigosporangio con pared gruesa, rugosa y de color negro, representan la etapa latente o invernante del hongo, que cuando germina forma el esporangio y gran cantidad de miosporas.

Generalmente los esporangióforos se unen en grupos de tres (Villanueva, 2004; Agrios, 2007).

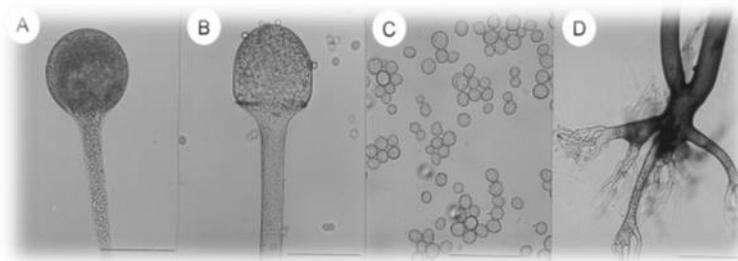


Fig 4. A. Morfología microscópica de *Rhizopus stolonifer*. A. esporangio y esporangioforo; B. Columnella; C. esporangiosporas; D. rizoides y estolones. Escala Bar 20 mm. Tomado de Jin-Hyeuk *et al.*, 2001.

Infección

Generalmente la infección por *R. stolonifer* en frutos y vegetales ocurre primordialmente durante la fase postcosecha, dado que en esa fase los productos sufren lesiones que permiten la entrada del hongo (Bautista-Baños *et al.*, 2014; Velázquez-del Valle *et al.*, 2008). Es importante que las heridas sean recientes para que las esporas germinen. Una vez germinadas las esporas, se producen hifas, estas secretan enzimas pectinolíticas que degradan y disuelven las sustancias pécticas de la lámina media en las células, dando lugar a la pérdida de cohesión entre ellas, provocando que las rodee una sustancia líquida, lo que da como resultado la pudrición blanda. Posteriormente, secreta enzimas celulolíticas que provocan la completa desintegración de las células de los tejidos vegetales (Barkai-Golan 2001; Bautista-Baños *et al.*, 2014).

Síntomas de la pudrición blanda

Una vez que el hongo se ha establecido en el hospedero, la zona de infección se torna oscura, como si estuviese embebida en agua, en consecuencia, se torna blanda y acuosa. Mientras las células vegetales no hayan muerto el micelio crece intercelularmente sin invadirlas hasta que las células mueren, los productos infectados rápidamente se colapsan y derraman un líquido claro, de lo que resulta una grave contaminación a frutos vecinos, así la pudrición avanza con gran rapidez (Bautista-Baños *et al.*, 2014; Velázquez-del Valle *et al.*, 2008).

En poco tiempo las hifas del hongo crecen hacia fuera a través de las heridas del fruto y cubren las zonas afectadas con la producción de esporangióforos; el hongo se extiende hasta la superficie de las porciones sanas de los frutos afectados; al principio se desprende un olor

ligeramente agradable y posteriormente un olor rancio; finalmente los órganos se momifican o se degradan formando una masa aguanosa (Ogawa *et al.*, 2004; Agrios, 2007).

3.3. *Colletotrichum gloeosporioides*

El género *Colletotrichum* comprende una amplia gama de especies en donde *C. gloeosporioides*, *C. acutatum* y *C. orbiculare* son las más importantes (Cannon *et al.*, 2000) desarrolla un micelio con hifas septadas y ramificadas, inmerso, con coloración hialina hasta un castaño palido. El acérvulo es subcuticular, epidermal con un estroma hialino o de color castaño cuyas células tienen una pared densa o gruesa. Las setas presentes o ausentes, originalmente irregulares, más o menos fuertes con una pared gruesa septada. Conidióforos septados, ramificados en la base de color castaño claro o completamente hialinos, presentan conidias hialinas, aseptadas de forma cilíndrica, fusiforme que durante la germinación se torna de color castaño pálido (Holliday, 1995).

La presencia o ausencia de setas puede diferenciar los géneros *Gloesporium* de *Colletotrichum*, aunque algunos autores mencionan que este criterio se ve modificado por la formación de estas estructuras en diferentes condiciones externas.

Las formas de *Colletotrichum* pueden ser determinadas por un sin número de patrones naturales, entre los que figuran desde saprótrofos hasta parásitos especializados con un amplio rango de hospederos. Los conidios se producen en masas mucilaginosas, de color rosa, bastante conspicuas y típicamente hundidas; el patógeno forma lesiones necróticas en tallos, hojas, frutos, siendo denominada antracnosis (Jenkis, 1993).

C. gloeosporioides ocasionalmente produce sus ascosporas en peritecios sobre frutos invernantes en algunos hospederos, como en el tomate de árbol, pero casi nunca forma dicha estructura reproductora en otros hospederos. Sin embargo, en todos los hospederos el hongo se produce profusamente y forma masas rosas de conidias en forma de acérvulos (Romero, 1999).

Infección

Los síntomas de la antracnosis provocada por *C. gloeosporioides* en *A. muricata* se presentan en las hojas, lo que se conoce como antracnosis foliar; en el fruto, donde ocasiona momificación o pudrición seca y, en los botones florales. En las hojas se manifiesta como lesiones o manchas necróticas de coloración café o marrón oscuro, casi negro y de borde definido. En los botones

florales se presentan lesiones definidas de forma variable, hundidas, de color marrón claro u oscuro, especialmente hacia la base de los sépalos y pétalos. En el fruto, los síntomas iniciales son manchas de forma irregular o redondeadas de tamaño variable, de color marrón oscuro y deprimidas o hundidas formando especies de chancros (García, 1988).

Los primeros estadios para el desarrollo de la enfermedad son esencialmente los mismos para todas las especies de *Colletotrichum*. Los restos de hojas, tallos y frutos dentro del dosel constituyen también fuentes de inóculo para el comienzo de brotes de enfermedades estacionales, lo cual enfatiza la importancia de las habilidades saprofiticas de muchas especies de *Colletotrichum*. (Prusky *et al.*, 2000).

Cuando el patógeno se encuentra fuera del hospedero, el desarrollo de las enfermedades está restringido por el requerimiento de agua durante todas las fases del ciclo de la enfermedad ya que las esporas de la antracnosis necesitan una película de humedad en la superficie de la planta para su germinación y penetración a la epidermis, una vez desarrollada la infección las lesiones se extienden y se producen esporas nuevas que se mantienen unidas a la lesión por un mucílago de tal forma que no pueden ser separadas por el viento. Las condiciones ambientales que favorecen la infección involucran un rango de temperaturas entre 22 y 32 °C y una humedad relativa mayor al 92 %. Así mismo, las lluvias frecuentes facilitan la diseminación de las conidias en el campo. El hongo presenta una alta variabilidad genética la cual se manifiesta en la existencia de muchas razas fisiológicas del patógeno que difieren en su grado de patogenicidad (Waller, 1992).

Residuos de material vegetal infectado son una de las fuentes principales de inóculo para causas epidémicas, *Colletotrichum* puede sobrevivir como espora o como micelio en restos de vegetales hasta por dos años. Esta capacidad de sobrevivir en estado latente en el hospedero, le permite establecerse cuando las condiciones medio ambientales o fisiológicas del hospedero son las adecuadas, por lo que también puede tener el papel de oportunista (Prusky *et al.*, 2000). La variabilidad en la latencia del patógeno está supeditada a las condiciones fisiológicas del patógeno y a los patrones climáticos que ocurren durante el ciclo de los cultivos perennes (Waller, 1992).

Una vez que deja su fase latente e inicia su fase activa en los tejidos jóvenes susceptibles, permite un ciclo epidémico rápido, de tal forma que los niveles de enfermedad crecen aceleradamente durante los breves periodos cuando las fases susceptibles del cultivo coinciden con las condiciones de humedad (Prusky *et al.*, 2000).

Algunos estudios sobre la epidemiología y control de la antracnosis señalan que la mayor concentración de esporas de *C. gloeosporioides* coincide con la mayor humedad relativa (Waller, 1992).

IV. PLANTEAMIENTO DE LOS OBJETIVOS

Annona muricata, es una especie cultivada, que aún de su manejo fitosanitario presenta, en estado adulto, moléculas que han sido reportadas con actividad antifúngica y que podrían ser parte del mecanismo de defensa de esta planta; entre ellas se encuentran las llamadas “acetogeninas de anonáceas” (Moghadamtousi *et al.*, 2015) y los alcaloides bencilisoquinolínicos (Leboueuf *et al.*, 1982, Morton, 1987; Cave *et al.*, 1987; Philipov *et al.*, 1994; Hasrat *et al.*, 1997; Lannuzel *et al.*, 2002). Se desconoce si la biosíntesis de estas moléculas es constitutiva o inducida por factores endógenos como las etapas fenológicas (plántulas vs adultos) o exógenos como la interacción con hongos u otro tipo de organismos. Por ello, en este trabajo se plantearon las siguientes preguntas: ¿Cuál es el perfil constitutivo de acetogeninas y alcaloides de *A. muricata*?; ¿Este perfil se modifica con las etapas fenológicas?; ¿Cuándo se establece el perfil?; ¿Es órgano- específico?; ¿Es inducible por hongos fitopatógenos? y en todo caso, ¿la respuesta es generalizada para ambos hongos?; ¿Las acetogeninas y alcaloides estarían implicados en un mecanismo de defensa?.

V. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

5.1 Objetivo general

Determinar si los alcaloides y acetogeninas aisladas de *Annona muricata* son moléculas implicadas en la defensa de las plántulas de esta especie contra hongos patógenos.

5.2 Objetivos particulares

- i. Determinar la presencia de las acetogeninas y alcaloides mayoritarios en ejemplares adultos
- ii. Caracterizar el perfil de acetogeninas y alcaloides en plántulas de *A. muricata*.
- iii. Caracterizar el perfil de acetogeninas y alcaloides en plántulas que fueron inducidas con *Colletotrichum gloeosporioides* y *Rhizopus stolonifer*.
- iv. Determinar la actividad antifúngica *in vitro* de extractos y compuestos frente a *C. gloeosporioides* y *R. stolonifer*.
- v. Determinar si los extractos de plántulas inducidas con *C. gloeosporioides* y *R. stolonifer* incrementan la actividad antifúngica *in vitro* sobre *C. gloeosporioides* y *R. stolonifer*.

5.3 Hipótesis

Se conoce que el metaboloma de las especies vegetales se modifica, entre otras causas, como respuesta a infecciones por microorganismos patógenos, entonces es factible suponer que la infección de *Annona muricata* con los hongos *Colletotrichum gloeosporioides* y *Rhizopus stolonifer* modificará el perfil químico de esta especie caracterizado por la biosíntesis de acetogeninas y alcaloides bencilisoquinolínicos, algunos de ellos con probada actividad antimicrobiana *in vitro*.

VI. RESULTADOS

A continuación, se presentan los métodos y resultados de acuerdo a cada uno de los objetivos planteados, iniciando con una síntesis de los antecedentes más relevantes.

6.1 Objetivo 1. Determinar la presencia de las acetogeninas y alcaloides mayoritarios en ejemplares adultos.

Acetogeninas y alcaloides de ejemplar adulto de *Annona muricata*

Los metabolitos secundarios pueden o no biosintetizarse, almacenarse o distribuirse en diferentes órganos, lo que por lo general está relacionado con la función que desempeñan (Shoji & Hashinomoto, 2011; Nicolson, 2007; García-Mateos *et al.*, 2007). Además, en plantas su biosíntesis está estrechamente relacionada con la floración (Anaya, 2003), otros más con la foliación y con la defensa de la herbivoría (Iranbakhsh *et al.*, 2006). Algunos metabolitos se encuentran desde el inicio del desarrollo de la planta, acumulándose en embriones o endospermos o pueden biosintetizarse en algunas etapas del desarrollo, por ejemplo, en *Annona macrophyllata* el alcaloide liriodenina se produce al inicio de la germinación (De la Cruz & González-Esquinca, 2012).

De *Annona muricata* se conocen 18 alcaloides todos del tipo belcilioquinolinico, se encuentran distribuidos en diferentes partes de la planta y han sido aislados preferentemente de las hojas (Leboueuf *et al.*, 1982; Morton, 1987; Cave *et al.*, 1987; Philipov *et al.*, 1994; Lannuzel *et al.*, 2002). Así mismo se conocen 102 acetogeninas obtenidas principalmente de las semillas y hojas (Wu *et al.*, 1995; Cavé *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 1998; Zafra-Polo *et al.*, 1998; Liaw *et al.*, 2002; Chang *et al.*, 2003; Bermejo *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2008).

Material y métodos

Recolecta de material vegetal de ejemplar adulto

Se recolectaron 300 g de raíces, tallos y hojas de un ejemplar adulto de *A. muricata* en fructificación de 5 años de edad ubicado en la comunidad Dr. Domingo Chanona, municipio de Villaflores, Chiapas, México. Se seleccionaron las raíces a partir de su cercanía al tallo, en tanto que la corteza de los tallos y las hojas se obtuvieron de las ramas secundarias. Cada tejido u órgano se cortó con

tijeras de poda y fueron guardados a temperatura ambiente en bolsas de papel estraza hasta sequedad, posteriormente se pulverizaron en un molino de mano para su posterior utilización.

Obtención de extractos acetogénicos y alcaloidales

Para la obtención de los perfiles de acetogeninas, se utilizaron 10 g de material vegetal seco obtenido de cada tejido u órgano. Se realizó una extracción con 100 mL de hexano J.T BaKer grado reactivo a reflujo continuo en un equipo Soxhelt, durante ocho horas, tres veces, el extracto se concentró a presión reducida en un rotaevaporador Camafro VV2000 y se conservó en frascos de cristal, hasta su análisis en High Performance Liquid Chromatography (HPLC).

Al material vegetal restante de la extracción hexánica se le realizó una extracción alcaloidal mediante el método ácido-base (González-Esquinca, 2001). Las muestras desengrasadas, se humedecieron con una disolución saturada de Na_2CO_3 , y se dejaron secar durante 24 horas a temperatura ambiente.

Determinación de acetogeninas

Para determinar la identidad de las acetogeninas en hojas, tallos y raíces, se realizó una revisión bibliográfica de los espectros de absorción UV de cada acetogenina aislada hasta ahora de *A. muricata*, considerando además los órganos de donde fueron aisladas en ejemplares adultos (Cuadro 6).

Se utilizó un cromatógrafo de líquidos de alto rendimiento acoplado con un detector UV de matriz de fotodiodos (HPLC-DAD) (Perkin Elmer Flexar) en fase inversa (Diámetro de partícula Spheri-5 RP-18, 250 x 4,6 mm id, 5 μm). La fase móvil consistió en acetonitrilo-metanol-agua (JT Baker) (80:10:10 isocrática). El flujo fue de 1 ml min^{-1} y la temperatura del compartimiento de la columna se mantuvo a 30°C. Se usó detección UV a 220 nm. El volumen de la muestra analizada fue de 20 μl a 1 mg. mL^{-1} disuelta en metanol.

Cuadro 6. Acetogeninas determinadas en ejemplares adultos.

Acetogeninas	Pico máximo de Absorción UV	Tejido	Referencia
Muricina B	210	Hojas	Pérez Gutiérrez, 2007
<i>cis</i> -annonacina-10-one	209	Semillas	Rieser <i>et al.</i> , 1996
Mosinone	202	Corteza de tallo	Alali <i>et al.</i> , 1999
<i>cis</i> -uvariamicin IV	221.3	Raíces	

Las acetogeninas laherradurina y rolliniastatina-2 utilizadas como referencia fueron obtenidas de un estudio previo de semillas de *Annona macrophyllata* (De la Cruz, 2001). Ambas acetogeninas fueron identificadas y determinadas por el Dr. Diego Cortés del Departamento de Farmacología de la Universidad de Valencia, España.

El análisis se realizó bajo las mismas condiciones que los extractos. Se cuantificaron mediante las curvas $Y = 2592.3 X - 204427$, $R^2 = 0.992$; $Y = 1031.7 X + 88656$, $R^2 = 0.998$. Con límites inferiores de cuantificación de 8 $\mu\text{g} / \text{ml}$. Para corroborar la presencia de ambas acetogeninas, los extractos además fueron dopados.

Determinación de alcaloides en ejemplar adulto

La determinación de los alcaloides, se llevó a cabo mediante el método empleado por Egydio *et al.*, (2013) bajo las siguientes condiciones: un volumen de 1 μL de las muestras disueltas en metanol a $5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ se analizaron en un equipo de GC/MS de Perkin Elmer Modelo Clarus 680 GC acoplado a un espectrómetro Clarus SQ8T MS, con un split a 1:20. La columna capilar utilizada como fase estacionaria fue una Elite-1 de Perkin Elmer (32 m x 0.32 mm y 0.25 mm de grosor de película). Se utilizó Helio como gas acarreador a un flujo de $1.2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Las condiciones de la temperatura de la columna consistieron inicialmente de 150°C por 1 min, con un incremento de $10^\circ\text{C min}^{-1}$ hasta 280°C y mantenida a ese grado por 16 min. La temperatura del inyector fue de 300°C . La fragmentación de masas fue recolectada a 70 ev con $2.89 \text{ scans}\cdot\text{s}^{-1}$ y los fragmentos fueron detectados de 50 a 500 Da, la temperatura de la fuente de iones y la del cuadrupolo fue de 270°C .

Resultados

Acetogeninas

Se determinó la presencia de seis acetogeninas en los órganos del ejemplar adulto de *A. muricata* *cis*-anonacin-10-one, *cis*-uvariamicina-IV, mosinona, muricina B, laherradurina y rolliniastatina-2 (Cuadro 7).

Cuadro 7. Acetogeninas determinadas en los órganos de *A. muricata* de ejemplar adulto

Compuesto	Raíces	Tallos	Hojas
cis-anonacina-10-one	0b	0b	527.77±45.30a
cis-uvariamicina-IV	228.04±16.79b	775.49±60.61a	0c
Mosinona	527.90±23.60b	802.81±65.32a	249.39±7.85c
Muricina B	0b	0b	16.80±17.81a
Laherradurina	1.86±0.02	5.75±0.47	6.7±0.01
Rolliniastatina-2	1.18±1.86	19.28±3.05	5.88±0.05

La acetogenina mosinone se distribuye en toda la planta, es más abundante en los tallos seguida de las raíces y las hojas, la biosíntesis de esta molécula inicia en las raíces en plántulas en etapa de primordio foliar; Laherradurina y rolliniastatina-2 también se encuentran distribuidas en toda la planta, laherradurina es más abundante en las hojas, mientras que rolliniastatina-2 lo es en los tallos; *cis*-anonacina-10-one y muricina B son acetogeninas con una distribución restringida a las hojas, ambas acetogeninas inician su biosíntesis en las hojas en etapa de primordio foliar (Riley-Saldaña *et al.*, 2017) y se mantiene hasta el ejemplar adulto. *cis*-uvariamicina-IV se distribuye en las raíces y los tallos, siendo más abundante en los tallos, esta molécula tiene una biosíntesis muy temprana (radícula de 1 cm).

Alcaloides

En los órganos de *A. muricata* se detectaron cinco alcaloides asimilobina, anonaina, coreximina, nornuciferina y reticulina (Cuadro 8).

Cuadro 8. Alcaloides determinados en los órganos de *A. muricata* de ejemplar adulto (UA.g⁻¹ de tejido seco)

Compuesto	Raíces	Tallos	Hojas
Asimilobina	131.28±26.20c	443.65±29.44a	289.47±4.24a
Nornuciferina	130.24±4.09b	65.82±2.9c	433.29±35.27a
Anonaina	130.86±5.93c	363.1±8.74b	597.12±38.25a
Reticulina	121.67±6.37c	150.96±30.6b	2372.91±51.55a
Coreximina	122.77±1.56b	0 c	325.65±46.2a

Cuatro de los cinco alcaloides se distribuyen en toda la planta a excepción de coreximina que no fue detectada en los tallos de los adultos. En las hojas se encontró la mayor concentración de estos alcaloides, el alcaloide más abundante es reticulina (2372.91 UA.g⁻¹ de tejido seco, P=0.001), anonaina es el segundo alcaloide más abundante (597.12 UA.g⁻¹ dry tissue, P=0.001) mientras que coreximina es el alcaloide menos abundante.

Hasta ahora de *A. muricata* se han aislado 102 acetogeninas y 18 alcaloides de raíces, tallos, hojas, semillas y cortezas de árboles adultos (cuadro 4, Wu *et al.*, 1995; Leboeuf *et al.*, 1996; Hasrat *et al.*, 1997a ; Hasrat *et al.*, 1997b; Matsushige *et al.*, 2012), en este trabajo solo fue posible detectar seis acetogeninas y cinco alcaloides.

Reticulina y nornuciferina son los alcaloides de biosíntesis más temprana, su producción inicia cuando las radículas tienen 1 cm de longitud, reticulina es un alcaloide que ya había sido aislado en las raíces y los tallos y las hojas, mientras que nornuciferina sólo había sido reportado en los frutos de la especie, en este trabajo fue detectado en todos los órganos de *A. muricata* en etapa de plántula (Riley-Saldaña *et al.*, 2017). Anonaina y asimilobina también ya habían sido reportados en las hojas y las semillas de *A. muricata* respectivamente, en este estudio detectamos a esta moléculas en los tres órganos evaluados, ambos alcaloides también son de biosíntesis temprana ya que fueron detectados cuando la radícula alcanza 2 y 5 cm de longitud, la biosíntesis de estas moléculas, depende del material de reserva y es un aporte de la planta madre, mientras que

coreximina había sido reportada en todos los órganos de la planta (Leboeuf *et al.*, 1996) nosotros no la detectamos en los tallos.

Discusión

En ejemplares adultos fue posible determinar la presencia de todas las acetogeninas y alcaloides encontrados en el desarrollo temprano (Riley-Saldaña, 2017) (Figura 5 y 6), siendo su distribución órgano-específica variable, en tanto que los alcaloides con excepción de la coreximina se encuentran distribuidos en toda la planta de tal manera que la maquinaria enzimática responsable de la biosíntesis de ambos tipos de moléculas se activa desde el desarrollo temprano y permanece al menos hasta la etapa de fructificación.

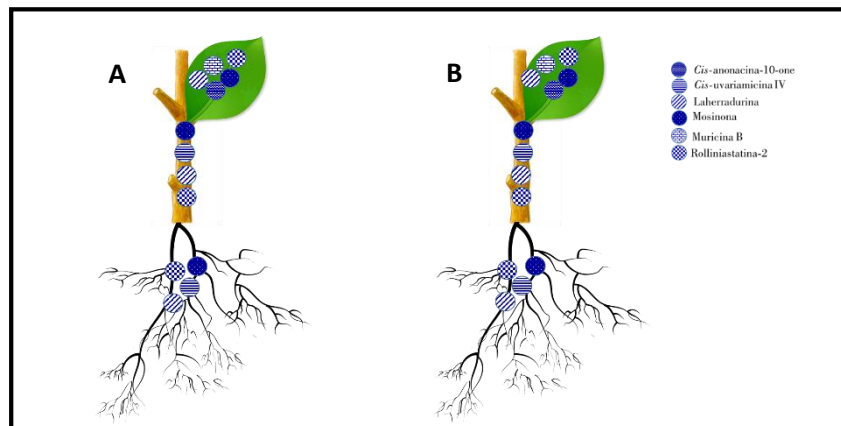


Fig 5. Presencia de acetogeninas constitutivas en donde se observa el mismo perfil en: A. plántulas con 6 hojas; B. Ejemplar adulto.

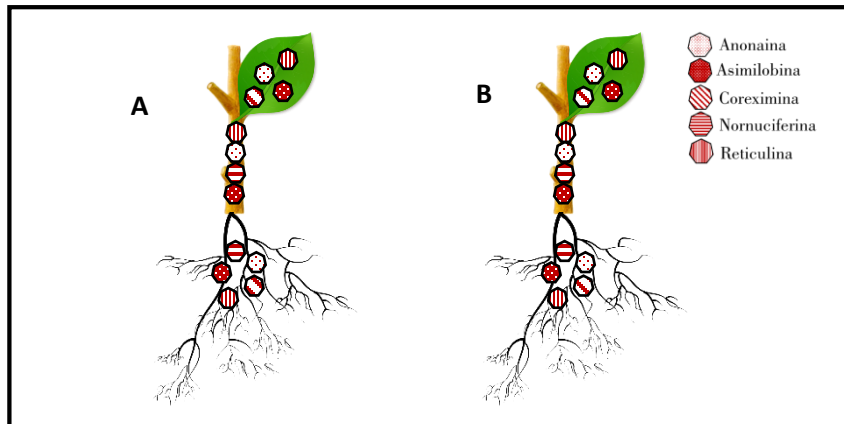


Fig 6. Presencia de alcaloides constitutivos en donde se observa el mismo perfil en: A. plántulas con 6 hojas; B. Ejemplar adulto

6.2 Objetivo 2. Caracterizar el perfil de acetogeninas y alcaloides en plántulas de *Annona muricata*

6.2.1 Acetogenins and alkaloids during the initial development of *Annona muricata*

Z Naturforsch C. 2017; 26:72(11-12):497-506. doi: 10.1515/znc-2017-0060.

Christian Anabí Riley-Saldaña, María del Rocío Cruz-Ortega, Mariano Martínez Vázquez, Iván De-la-Cruz-Chacón, Marisol Castro-Moreno and Alma Rosa González-Esquinca*

Acetogenins and alkaloids during the initial development of *Annona muricata* L. (Annonaceae)

<https://doi.org/10.1515/znc-2017-0060>

Received March 3, 2017; revised August 10, 2017; accepted August 24, 2017

Abstract: In plants, the presence and distribution of specialized metabolites during the early stages of development are not documented enough, even though their biosynthesis is one of the most important strategies for survival. In this study, five alkaloids and four acetogenins were detected in *Annona muricata* L. during early development seedling, including three phases of root emergence and three of seedling formation. Hexane and alkaloid extracts were obtained from each organ, which were analyzed in a gas-mass chromatograph and in a high-performance liquid chromatograph coupled with a photodiode array UV detector (HPLC-DAD). This research shows the presence of the acetogenins *cis*-uvarimicin IV, mostnone, murictina B, and *cis*-annonacin-10-one, as well as of the alkaloids reticuline, coreximine, anonatine, astmilobine, and normucifertine, both groups with a variable organ-specific distribution, related with the formation of organs and tissues.

Keywords: Annonaceae; germination; secondary metabolites; seedlings.

1 Introduction

Seed germination and seedling formation are marked by the metabolic activation that triggers the set of gradual and progressive changes in size, structure, and function. The plants invest the resources, endowed by the mother plant, in the form of reserve material, to accomplish the mechanisms that allow them to develop and establish themselves in the ecosystem [1–3]. Among these mechanisms are the division, expansion, and cellular differentiation that result from the differential expression of the genetic material. When the plant becomes an autotrophic organism, the metabolic costs are supported by photosynthesis [1].

During this initial process, plants are exposed to multiple biotic and abiotic factors that lead to death, making it a critical phase of their life. At this stage, so vulnerable to predation and environmental changes, plants activate mechanisms for their defense and survival [4], which may be physical (such as the development of pubescences or thorns) or chemical (such as the production of specialized metabolites). These are dependent on the increase of the biomass, on the reserve material stored in the seeds and, when the plant grows, on the photosynthesis.

In contrast to the morphological, physiological, and genetic aspects of germination and seedling development, knowledge about metabolites specialized in defense or protection is less documented. However, its biosynthesis is one of the most important strategies for its survival, and it has been analyzed especially in studies on herbivory [5]. Research on metabolites specialized in early development has reported around 200 molecules, including alkaloids, cyanogenic glycosides, anthocyanins, flavonoids, and simple phenols [6].

The presence and organ-specific distribution of specialized metabolites during these stages is variable among species. This distribution can be part of different strategies such as the defense of roots against insects, microorganisms, and parasites of the soil [7], or of leaves and stems against herbivores and pathogens, or as protection against UV radiation [8], among others.

Among plants, the Annonaceae family is characterized by having a specialized active metabolism, with privileged biosynthetic routes for the production of alkaloids

*Corresponding author: Alma Rosa González-Esquinca, Laboratorio de Fisiología y Química Vegetal, Instituto de Ciencias Biológicas, Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas, Libramiento Norte Poniente 1150, Col. Lajas Maciel, C.P. 29039 Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México, E-mail: aesquinca@unicach.mx
Christian Anabí Riley-Saldaña, Iván De-la-Cruz-Chacón and Marisol Castro-Moreno: Laboratorio de Fisiología y Química Vegetal, Instituto de Ciencias Biológicas, Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas, Libramiento Norte Poniente 1150, Col. Lajas Maciel, C.P. 29039 Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México
María del Rocío Cruz-Ortega: Laboratorio de Aleopatía, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México Ciudad Universitaria, 3000 Delegación Coyoacán, C.P. 04360 Ciudad de México, México
Mariano Martínez Vázquez: Laboratorio de Productos Naturales, Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México

and “annonaceous acetogenin” molecules. Both are toxic substances and have diverse biological activities [9–14]. A few species have reported the presence of more than 934 benzylisoquinoline alkaloids [15–17] and more than 540 acetogenins [18]. These metabolites have been isolated from different organs and tissues of adult plants, and as far as it has been possible to deduce, the two metabolic pathways are expressed during all the stages of life, but the diversity of its metabolites is possible to find in different organs and moments. As for the alkaloids, organ-specific variation during early development has only been described in two studies, referring to the oxoaporphin alkaloid liriodenine. De-la-Cruz and González Esquinca reported [19] that the variation of liriodenine in *Annona diversifolia* is associated with the degree of development and differentiation of tissues, so this alkaloid was first detected in the endosperm of the seeds at 5 and 10 days of imbibition, later in the radicle and the hypocotyl, reaching its maximum concentration in six-leaved seedlings (2827.1 nmol g⁻¹ dry matter), but was not found in cotyledons and leaves. These data allow us to infer and prove that the alkaloid forms part of the antifungal defense system on *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb. Fr.) and *Aspergillus glaucus* L. fungi isolated from the same seeds and which disappear just as the radicle emerges [20].

From *Annona muricata* L., a popular species in traditional medicine and widely studied, have been isolated 99 acetogenins [21] and 10 alkaloids of fruits, leaves, roots, and seeds [15, 16, 22–24]. With the exception of the acetogenins rolinsastatin-2 and laherradurin [25], the moment in which the biosynthesis of these compounds is initiated and its location or variation in the plant is unknown. Understanding the presence and distribution of alkaloids and acetogenins during the early stages of the plant development contributes to the understanding of the dynamics of specialized metabolism, as well as it provides some elements to guide research on the defense mechanisms in which these specialized metabolites participate. Therefore, this study had as an objective to determine the distribution pattern and its dependence to stages of early development of four acetogenins and five benzylisoquinoline alkaloids, constitutive compounds of *A. muricata*.

2 Materials and methods

2.1 Stages of growth evaluated

Two phenological stages were analyzed: root emergence (phases 1, 2, and 5 cm of radicle) and the formation of



seedlings (leaf primordium phases (Fp), two leaves and six leaves). A total of six development phases were analyzed, which, in order to establish analogies with other phenological works, were quadrated to stages 0 and 1 according to the BBCH scale [26] (Table 1).

In order to obtain the plants in different stages of their development, the germination of 1000 seeds was induced using the technique of “between paper” [27], in rolls of brown paper with 50 seeds, which were placed in plastic containers of 1 L with 150 mL of water. The seeds were washed every third day to prevent the appearance of fungi, and changes of paper and water were also made. Then, 200 seeds were harvested in the root emergence stage, while another 500 seeds were kept in paper rolls until reaching the Fp stage. After reaching this stage, the seeds were sowed in 500-mL extruded polystyrene foam cups, with previously sterilized soil, in an autoclave FE-397 (Felsa, Jalisco, México) until reaching the two- (2 Lf) and six-leaf (6 Lf) phases. The whole experiment was maintained inside a Conviron® series CMP4030 germination chamber (Conviron, Winnipeg, Canada) with a controlled environment at 28 °C, with a 12-h photoperiod, fluorescence lamps at an intensity of 500 μM m⁻² s⁻¹, and a relative humidity between 65% and 75%. From each stage of development, radicles, roots, stems, and leaves were carefully separated with pruning shears. Each organ was placed in brown paper bags and made to dry at room temperature for 4 days.

2.2 Obtaining acetogenic and alkaloidal extracts

To obtain the acetogenin profiles, 2 g of dry plant material was used per phase. An extraction with hexane J.T. Baker was made, with a reactive grade, at a continuous reflux, in a Soxhlet equipment, for 8 h, three times. The extract was concentrated under reduced pressure in a rotavaporator Caframo VV2000 and stored in glass jars until its high-performance liquid chromatograph (HPLC) analysis. The remaining vegetal material from the hexane extraction was performed with an alkaloidal extraction by the acid-base method [28]. After thorough grinding, samples were moistened with a saturated Na₂CO₃ solution and left to dry for 48 h at room temperature. Alkaloids were extracted with CHCl₃ by constant stirring for 1 h, and then filtered and washed with distilled water. The CHCl₃ phases were extracted into a 1-M HCl solution before being alkalitized to pH 9.5 with a saturated solution of Na₂CO₃. They were then re-extracted with CHCl₃ and dried with anhydrous Na₂SO₄, filtered, and evaporated at about 25 °C to obtain

Table 1: Morphophysiological characteristics of germination and seedling development of *A. muricata*.

Stages	Escale BBCH	Growth phases (days)	Morphophysiological events	Keys
	05	1 cm of radicle (12–14)	Mobilization of substances of endosperm reserves, elongation of radicle	Rd1
	06	2 cm of radicle (15–17)	Mobilization of substances of endosperm reserves, elongation of radicle	Rd2
	07	5 cm of radicle (20–22)	Differentiation of the embryonic axis in radicle and hypocotyl. Mobilization of substances from the endosperm reserves	Rd5
	11	With foliar primordium (25–28)	Partially open green cotyledons. First pair of true leaves and separated from the apex of the stem. Branched root. Photosynthesis	Fp
	12	With two leaves (30–35)	First pair of leaves in their final size. Independence of the seedling. Photosynthesis	2 Lf
	16	With six leaves (60–64)	Six dark green leaves, developed root system. Vegetative growth. Photosynthesis	6 Lf

Stages and phases growth were adjusted to BBCH scale (Biologische Bundesanstalt, Bundessortenamt und Chemische Industrie).

total alkaloids. All reagents and solvents were supplied by JT Baker, San Pedro Xalostoc, Edo de México, México.

2.3 Acetogenin determination

To determine the identity of the acetogenins, both the UV absorption spectrum and the organ from which it was isolated in other works with *A. muricata* were considered (Table 2).

The method using a high-performance liquid chromatograph HPLC coupled with a photodiode array UV detector (HPLC-DAD) (Perkin Elmer Flexar, Norwalk, CT, USA) in reverse phase (Spheri-5 RP-18, 250 × 4.6 mm i.d., 5- μ m particle diameters (Perkin Elmer Instruments). The mobile phase consisted of acetonitrile-methanol-water

Table 2: UV absorption wavelength (maximum peak) of acetogenins detected from *A. muricata*.

Acetogenin	Peak maximum UV absorption	Tissue	Reference
Muricin B	210	Leaf	[29]
cis-annonacin-10-one	209	Seeds	[30]
Mosinone	202	Stem bark	[31]
cis-uvariamicin IV	221.3	Roots	[31]

(J.T. Baker) (80:10:10 isocratic) [32]. The flow rate was 1 mL min⁻¹, and the temperature of the column compartment was held at 30 °C. UV detection at 220 nm was used. The analyzed sample volume was 20 μ L at 1 mg mL⁻¹ dissolved in methanol.

2.4 Determination of alkaloids

The determination of the alkaloids was carried out by the method employed by Egydio et al. [33] with some modifications under the following conditions: a volume of 1 μ L of the samples dissolved in methanol at 5 mg mL⁻¹ was analyzed in a GC/MS Perkin Elmer Clarus Model 680 GC (Waltham, MA, USA), coupled to a Clarus SQ8T MS spectrometer (Waltham, MA, USA), with a 1:20 split. The capillary column used as a stationary phase was a Perkin Elmer Elite-1 (32 m × 0.32 mm and 0.25-mm sheet thickness). Helium was used as the carrier gas at a flow of 1.2 mL min⁻¹. The column temperature conditions were initially at 150 °C for 1 min, with an increase of 10 °C min⁻¹–280 °C and maintained at that grade for 16 min. The temperature of the injector was 300 °C. Also, mass fragmentation was collected at 70 eV with 2.89 scans s⁻¹ and the fragments were detected from 50 to 500 Da. The temperature of the ion source and that of the quadrupole was 270 °C.

2.5 Data analysis

The results of each molecule detected during germination and the seedling stage ($n=3$) are expressed in units of absorbance per gram of dry plant material ($\mu\text{A g}^{-1}\text{mv}$). To determine the accumulation dynamics of each molecule during the development of the seedlings, the relative abundance was calculated, taking into account the area of the chromatograms. Relative abundance = [(amount detected at \times time/highest amount detected in a particular tissue) $\times 100$].

2.6 Statistical analysis

To compare the differences in the concentration of alkaloids and acetogenins in the stages of development evaluated, the nonparametric Kruskal-Wallis test was performed, and to separate between treatments, a post-hoc Mann-Whitney test was made. Variations of the molecules during the development with polynomial regressions were performed in the Past program (Natural History Museum, University of Oslo, Oslo, Norway). Differences were considered significant at a level of $p \leq 0.05$.

3 Results

During the two stages of growth, it was possible to detect the presence of four acetogenins and five alkaloids with variable organ distribution (Figure 1).

3.1 Acetogenins and alkaloids in roots

In the roots, two acetogenins were detected from the early stages of growth: *cis*-uvartimicin IV ($p=9.104 \times 10^{-05}$, $\chi^2=25.955$) when the radicle just emerges (Rd1), and mostnone ($p=3.918 \times 10^{-05}$, $\chi^2=27.839$), 25 days later, when the Fp has been reached. The most abundant acetogenin in the development phase of Fp is mostnone, while *cis*-uvartimicin IV is in the 2 Lf. In this tissue, both molecules persist during the 2 Lf to 6 Lf (Figure 2A).

Five alkaloids were found (Table 3), namely, anonaine, normuciferine, and reticuline from early stages, at the beginning of germination, when the radicle reaches 1 cm in length (Rd1). On the other hand, the astimilobine ($p=4.192 \times 10^{-05}$, $\chi^2=27.686$) alkaloid appears when the radicle measures 5 cm (Rd5); and coreximine (3.65×10^{-05} , $\chi^2=27.99$) at 30 days, when the seedling has reached the Fp. In the roots these compounds increase in relation to

the development of the plant, being more abundant in the 2 Lf seedling, with the exception of astimilobine and anonaine ($p=0.000112$, $\chi^2=25.507$), which remains constant during leaf formation (Figure 2B).

3.2 Acetogenins and alkaloids in stems

In the stems as in the roots, the presence of the acetogenins *cis*-uvartimicin IV ($p=0.008929$, $\chi^2=9.42$) and mostnone ($p=0.002964$, $\chi^2=11.58$) was determined. These appear for the first time in the foliar Fp and both increase in the 6 Lf seedling, with *cis*-uvartimicin IV being more abundant than mostnone in the two stages (Figure 2C).

Four alkaloids were identified, two of them normuciferine ($p=0.001867$, $\chi^2=12.567$) and reticuline ($p=0.001495$, $\chi^2=13.011$) are found in the stem of seedlings with prmtordium leaf, while anonaine ($p=0.0001495$, $\chi^2=13.011$) and astimilobine ($p=0.001278$, $\chi^2=13.325$) appear only in seedlings with six leaves. With the exception of astimilobine, very abundant in the stems of seedlings in the 6 Lf, the other alkaloids show a similar amount throughout the development. Unlike the roots, in this organ, coreximine was not detected (Figure 2D).

3.3 Acetogenins and alkaloids in leaves

In the leaves, the presence of *cis*-anonactin-10-one ($p=0.001867$, $\chi^2=12.57$), mostnone ($p=0.003624$, $\chi^2=11.18$), and muricin B ($p=0.001888$, $\chi^2=12.5$) was determined; two of them were not detected in roots and stems (muriacin B and *cis*-anonactin-10-one). The three acetogenins appear during the Fp. *cis*-anonactin-10-one increases its concentration as the plant develops; the opposite occurs with muricin B, whose content decreases as the plant develops. Mostnone exhibits a more erratic behavior (Figure 2E).

Four alkaloids were found in leaf seedlings: anonaine ($p=0.001495$, $\chi^2=13.011$) and reticuline ($p=0.01495$, $\chi^2=13.011$) were detected in 2 Lf seedlings, while astimilobine ($p=0.001278$, $\chi^2=13.325$) and coreximine ($p=0.001278$, $\chi^2=13.25$) were found in six seedlings after 5 days. The levels of these alkaloids in the plant increase in relation to its development (Figure 2F).

3.4 Accumulation dynamics

Acetogenins and alkaloids in *A. muricata* occur in different organs and at different times (accumulation dynamics). The richness (number) and abundance of alkaloids

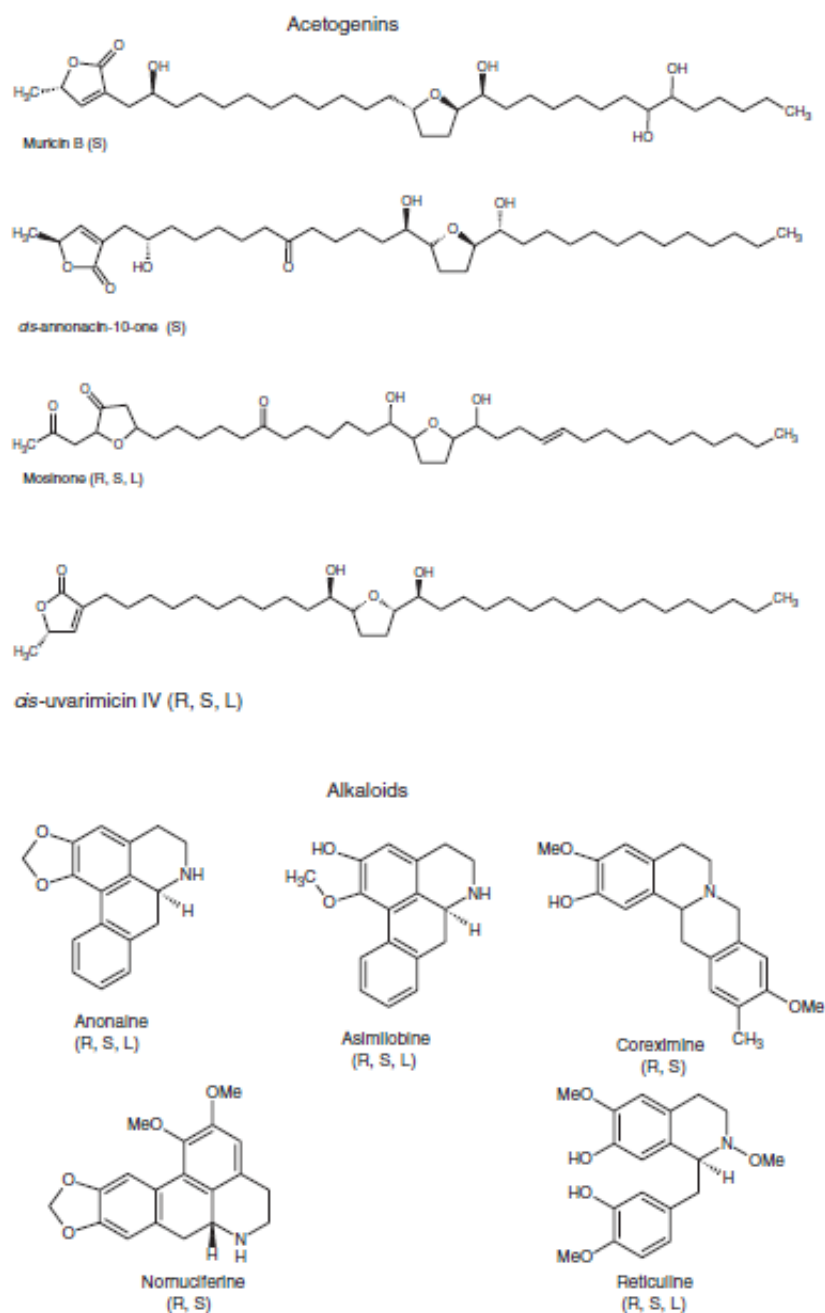


Figure 1: Acetogenins and alkaloids detected in the developmental stages of *A. muricata* seedlings. Their presence in roots (R), stems (S), and leaves (L) are indicated.

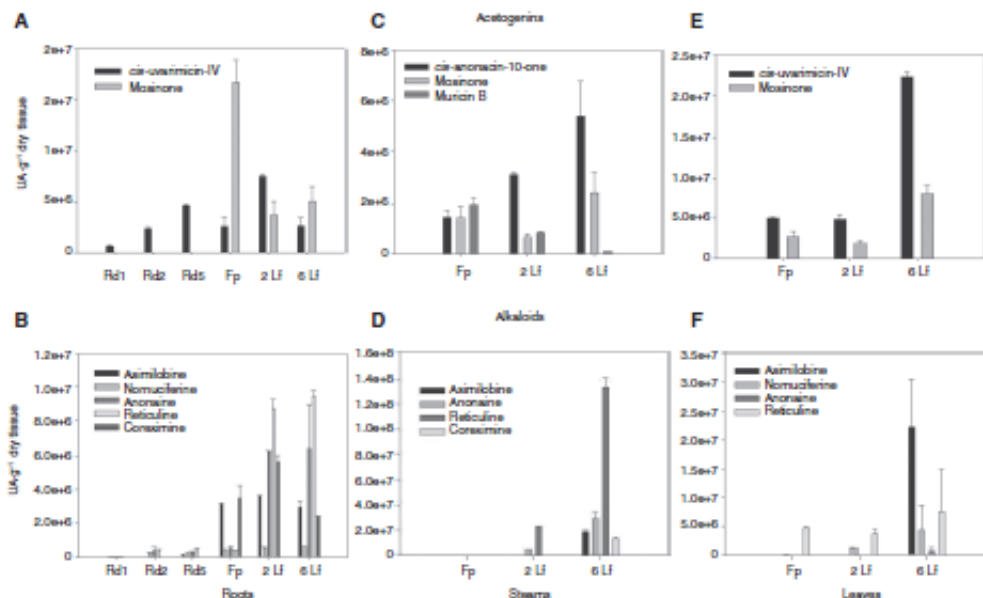


Figure 2: Ontogenetic variation and organ-specific distribution of acetogenins and alkaloids during the early development of *A. muricata*. Roots (A, B); stems (C, D); leaves (E, F). The values represent the average of three replicates, and standard deviations are indicated. The difference between means was considered significant at 95% confidence interval.

Table 3: Mass spectrometry data for the five identified alkaloids from *Annona muricata*.

Alkaloid	EI-MS M/Z (relative intensity, %)
Anonaine	265, 264 (100), 207 (53.6), 102 (34.48)
Asimilobine	267 (43.14), 266 (100), 252 (36.25), 250 (22.13), 236 (15.48)
Coreximine	327 (29.28), 207 (27.54), 178 (100), 176 (33.61), 151 (24.12), 150 (71.67)
Nornuciferine	281 (43.29), 280 (100), 250 (19.79), 221 (14.94)
Reticuline	329, 192 (100), 207 (16.62), 193 (13.37), 177 (27.32)

increase as the plant develops, with the highest concentration being observed during the 6 Lf. In contrast, there is no similar pattern in acetogenins: while their abundance is the same in the 6 Lf, each molecule has a unique dynamic (Figure 3).

4 Discussion

Different morphophysiological events occur during the initial phases of *A. muricata* development (Table 1). After

imbibition and during the metabolism's activation, the reservoirs are mobilized to start elongation and embryo differentiation, the aperture of the testa, and the emergence of the radicle. At the same time, the specialized metabolism (secondary metabolism) is expressed, a fact which is documented in 99 species of different families [6]. Important metabolic investments are also destined within the Annonaceae, especially for alkaloid and acetogenin biosyntheses, clearly established within this family, as is documented in multiple systematized reports by Cavé et al. [34] and Lucto et al. [17], among others.

The ontogenetic relation between the specialized metabolism and the development of the plant in Annonaceae has been documented in *A. diversifolia* Saff. (synonym of *Annona macrophyllata* Donn. Sm), by De la Cruz and González-Esquinca [19], alongside the biosyntheses of Iridodentine during the seed's imbibition. Also, in a paper by Brechú-Franco et al. [35], it was demonstrated that idioblasts (specialized cells that contain alkaloids and acetogenins) are formed during the development of the radicle and the hypocotyl.

In the present study, it was found that the biosyntheses of both alkaloids and acetogenins in *A. muricata* occurs simultaneously during the initial stages of development.

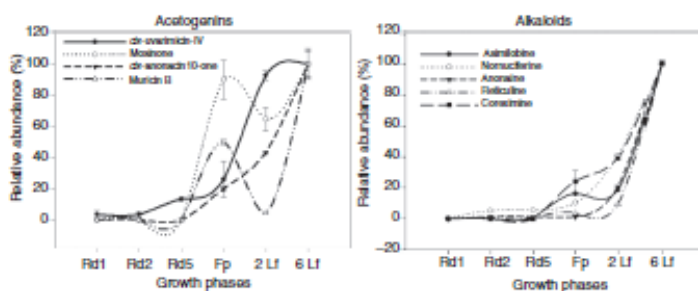


Figure 3: Comparison of relative abundances (accumulation dynamics) of acetogenins and alkaloids during six phases of initial development of *A. muricata*. The relative abundances were calculated: (amount detected at \times time/highest amount detected in a particular tissue) $\times 100$.

Both types of molecules appear in variable proportions, developmental stages, and organs, signaling their crucial role in the plant development. The documented acetogenins had been found before in the stems, roots, leaves, and seeds of adult specimens [18, 32, 34, 36–48], but it was not until now that their presence was detected in the early stages of development.

Four monotetrahydrofuran acetogenins were detected in the early stages. These include *cts-uvarimicin IV*, *mostnone*, *muricin B*, and *cts-annonacin-10-one*; all of them related with organ differentiation. *cts-uvarimicin IV* and *mostnone* appear in the roots when growth still depends on reserve material, with only one report of its presence in the roots of an adult specimen [49], while *muricin B* and *cts-annonacin-10-one* are only present when the plant is photosynthetically active. Both acetogenins can be found also in the leaves and seeds of adult plants [50], a trait that could indicate their dependence on photosynthesis. The presence of these acetogenins in the plant's photosynthetic phases, indicate a kind of survival function that occurs in the vulnerable stages of development. Also, it was noted that the acetogenins *laherradurin* and *rolinastatin-2* were present in *A. muricata* seedlings [25], where it serves a larvicidal function. González-Coloma et al. [51] reported that *laherradurin* is more active than *rolinastatin-2* on *Spodoptera littoralis* Boisduval, a folivore, with an 86% and 29.7% mortality rate, respectively. The biosynthesis of Annonaceae acetogenins is not known, but with some methods, such as the isolation of precursors, as well as the presence of numerous asymmetric centers and biomimetic hemisyntheses, it is thought that acetogenins originated from a precursor of three carbon atoms and a fatty acid [34]. The latter is very abundant in the seeds of the species of the Annonaceae family.

The insecticidal activity of *cts-annonacin-10-one*, in *A. muricata* has only been demonstrated on *Oncopeltus*

fasciatus Dallas and on *Spodoptera frugiperda* Smith and Abbo [52, 53] or fungicidal properties, as shown by *scuamocin*, *scuamocin G*, and *scuamostatn*, on *Phytophthora infestans* Mont [54]. These acetogenins have not been found in *A. muricata* before or in the present analysis; nonetheless, the presence of these molecules must suppose an evolutionary advantage, which enables the plants to adapt to their environment.

The following alkaloids were detected in the early developmental stages of *A. muricata*: *reticuline*, *corextmine*, *anonaine*, *astmlobine*, and *normucferine* (Figure 1). These have also been found in the organs of other adult plants. These alkaloids, in a similar manner to the acetogenins, show a spatial-temporary and organ-specific distribution.

Reticuline serves as an intermediary alkaloid within the diversification in the biosynthetic pathway that produces six benzylisoquinoline alkaloid synthetases [55]. It has been found in the roots, stems, and leaves of adult *A. muricata* specimens [15, 16, 22–24], although their presence in their seeds are undocumented. In the present study, *reticuline* was detected in radicle emergence, specifically, in roots of over 1 cm in length (Rd1), which signals an early biosynthesis that depends on the endosperm's reserved material. However, *reticuline* is also present all over the seedling, during its early phase, and its biosynthesis depends on photosynthetic activity. In both cases, a considerable energy cost is produced, which is to be expected from an *ad hoc* biosynthetic machinery, whose presence repeats frequently in these and other specialized metabolites.

Anonaine, an aporphinic alkaloid, is the most found alkaloid in plants of the Annonaceae family after *liriodenine* [17]. There is no evidence of its presence in *A. muricata* seeds. Thus, *anonaine*, and its biosynthesis, occurs in roots during the early development stage.

Furthermore, it is possible to detect anonaine on leaves when these start to develop, in the same way as liriodenine, produced during imbibition and emergence of the radicle, while both are located in the seedlings, leaves, roots, hypocotyls, and stems of *A. diversifolia* [19]. The fact that anonaine can be found only in the stems of the six-leaved seedlings allow us to infer the lack of transport from the roots, as well as the biosynthetic machinery that might be present in the leaves. Anonaine has important fungicidal properties against dermatophyte fungus and bacteria [56].

Asimilobine, another aporphine, and the third most reported alkaloid in the specimens from the Annonaceae family [17], is found in roots (that have reached 5 cm in length), also in leaves, when the seedling has two and six leaves, and has been reported in fruits also [22, 57].

Additionally, the presence of normuciferine in the fruits [22, 57], alongside its early detection, enables us to infer that it could be (at least initially) a contribution from the mother plant, in contrast with the other alkaloids.

Finally, corextmine, a protoberberine alkaloid, appears to be dependent on the photosynthetic activity of the plant, as it is only found in the leaves' development stages [23, 58]. The same result is also found in adult *A. muricata* specimens. For the biosyntheses of this type of alkaloids, a major number of enzymes seems to be involved than in the biosyntheses of aporphinics [24].

Pathway diversification in the biosyntheses of specialized metabolites and its distribution along the seedling enable us to infer that the plant invests more resources in the protection of life-dependent organs, such as the leaves due to their photosynthetic function, or the roots with their important role in water and nutrient transportation [5]. Therefore, roots and leaves would have a bigger production and accumulation of alkaloids and acetogenins. Implicated within the mechanisms of biosynthetic regulation, it is possible to find genes, enzymes, cells, tissues, and organelles, all of which depend on a process linked to organelle and tissue differentiation. Accordingly, the seedling posts resources from distinct reservoirs for its development and simultaneously for specialized metabolite biosyntheses. Acetogenin and alkaloid variations throughout development is characteristic of the specialized metabolism's dynamics, modulated by gene expression, which, in turn, is different for every molecule (Figures 7 and 8). As it has been demonstrated in seedlings of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh [6, 59–62]. This species produces anthocyanins after 3–5 days of sprouting; likewise, in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don, catharanthine, tabersonine, cindoline, and vincristine alkaloids accumulate after 7–10 days of sprouting [6, 63–65].

The neurotoxic activity found in four of the five detected alkaloids, as well the cytotoxic and pesticide activity of the acetogenins [51], enables us to suppose that these compounds are produced and maintained all along the complete development of the plant, as part of the defense systems against distinct pathogen species. Paired with the aforementioned process, at least in the case of alkaloids, there is, during early development, a diversification of the biosynthetic pathway beginning with reticuline [66], its main intermediary, which leads to protoberberine or aporphinoid biosyntheses. Although, to date, the biosynthetic pathway of alkaloids of species of the Annonaceae family is not known, there is no *in vivo* interconversion between them.

The increment of some alkaloids is related with some phytohormones, for example, the exogenous addition of gibberellic acid (GA₃) specifically in morphine's yield [67]. Likewise, IAA's metabolism is tightly related with the specialized metabolism in some species, as is the case of plants in the order Capparales, which include *Arabidopsis*, where indolic glucosinolates and other indolic defense compounds (camalexin) are formed, starting from the biosynthetic pathway of indol acetic acid [68]. This suggests a relation between gibberellins' and auxins' expression, formed during division, elongation, and differentiation of cells alongside [67] the development of roots and leaves and the expression of the specialized metabolism.

5 Conclusion

During its first steps' stages of development, *A. muricata* expresses the biosyntheses of diverse acetogenins and alkaloids. This fact is related among the multiple biosynthetic processes that are linked alongside the formation of tissues and organs. To be sure, the importance of the expression for the plant is manifested the biosyntheses capable of initiating and being preserved from the sprouting until (at least) the seedling stage. In some cases, this synthesis depends on the apparition of leaves or can even be organ specific. Even though the understanding of these processes still appears partial and fragmentary (being related mostly within defense systems), the type of studies, such as the present, can be directed toward the research of the importance the processes have for the plants that produce them.

Acknowledgments: We are indebted to the Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México. This work was supported, in part, by a grant

from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT 184108-2013; INFRA2014-01-000226293) from the Mexican Research Council.

References

- Bewley JD, Black M. Seeds. Physiology of development and germination, 2nd ed. New York: Springer, 1994.
- Pritchard SL, Charlton WL, Baker A, Graham IA. Germination and storage reserve mobilization are regulated independently in *Arabidopsis*. *Plant J* 2002;31:639–47.
- Bewley JD, Bradford K, Hilhorst H, Nonogaki H. Seeds physiology of development, germination and dormancy, 3rd ed. New York: Springer, 2013.
- Vivanco JM, Costo E, Loyola-Vargas VM, Flores HE. Mecanismos químicos de defensa en las plantas. *Investig Cienc* 2005;34:68–75.
- Kaplan I, Halitschke R, Kessler A, Sardaneli S, Denno RF. Constitutive and induced defenses to herbivory in above- and belowground plant tissues. *Ecology* 2008;89:392–406.
- De la Cruz Chacón I, Riley-Saldaña CA, González-Esquinca AR. Secondary metabolites during early development plant. *Phytochemistry Rev* 2013;12:47–64.
- Baetz U. Root exudates as integral part of belowground plant defence. Chapter 3. In: *Belowground defence strategies in plants*. Cham, Switzerland: Springer, 2016: 45–67.
- Mierziak J, Kostyn K, Kulma A. Flavonoids as important molecules of plant interactions with the environment. *Molecules* 2014;19:16240–65.
- Peretra MN, Justino AB, Martins MM, Peixoto LG, Vilela DD, Santos PS, et al. Stephalagine, an alkaloid with pancreatic lipase inhibitory activity isolated from the fruit peel of *Annona crassiflora* Mart. *Ind Crops Prod* 2017;97:324–9.
- Muganza DM, Fruth B, Nzunzu JL, Tuentner E, Foubert K, Cos P, et al. *In vitro* antiprotozoal activity and cytotoxicity of extracts and isolated constituents from *Greenwayodendron suaveolens*. *J Ethnopharmacol* 2016;193:510–6.
- Meira CS, Guimarães ET, Macedo TS, da Silva TB, Menezes LR, Costa EV, et al. Chemical composition of essential oils from *Annona vupretorum* Mart. and *Annona squamosa* L. (Annonaceae) leaves and their antimalarial and trypanocidal activities. *J Essent Oil Res* 2015;27:160–8.
- Liaw CC, Liou JR, Wu TY, Chang FR, Wu YC. Acetogenins from Annonaceae. In: Kinghorn AD, Falk H, Gibbons S, Kobayashi J, editors. *Progress in the chemistry of organic natural products*. New York: Springer International Publishing, 2016.
- Prabhakaran K, Ramasamy G, Doraisamy U, Mannu J, Rajamani MJ. Polyketide natural products, acetogenins from graptola (*Annona muricata* L), its biochemical, cytotoxic activity and various analyses through computational and bio-programming methods. *Curr Pharm Des* 2016;22:5204–10.
- Rakotomanga M, Razakantoanina V, Raynaud S, Loiseau PM, Hocquemiller R, Jauregutierrez G. Antiplasmodial activity of acetogenins and inhibitory effect on *Plasmodium falciparum* adenylate translocase. *J Chemother* 2004;16:350–6.
- Leboeuf M, Cavé A, Bhaumik PK, Mukherjee BR. The phytochemistry of the Annonaceae. *Phytochemistry* 1982;21:2783–813.
- Cavé AM, Leboeuf M, Waterman PG. The aporphinoid alkaloids of the Annonaceae. Chapter 4. In: Pelletier SW, editor. *Alkaloids: chemical and biological perspectives*, New York, USA: Wiley, 1987:133–270.
- Lúcio AS, da Silva Almeida JR, da-Cunha EV, Tavares JF, Barbosa Filho JM. Chapter alkaloids of the Annonaceae: occurrence and a compilation of their biological activities. *Alkaloids Chem Biol* 2016;74:233–409.
- Bermejo A, Figadère B, Zafra-Polo MC, Barrachina I, Estornell E, Cortés D. Acetogenins from Annonaceae: recent progress in isolation, synthesis y mechanisms of action. *J Nat Prod* 2005;22:269–303.
- De la Cruz Chacón I, González-Esquinca AR. Liriodenine alkaloid in *Annona diversifolia* during early development. *N Prod Res* 2012;26:42–9.
- De la Cruz Chacón I, González-Esquinca AR, Guevara Fefer P, Jiménez García LF. Liriodenine, early antimicrobial defense in *Annona diversifolia*. *Z Naturforsch C Biosci* 2011;66c:377–84.
- Sohel ZM, Mehran F, Sonia N, Gokula M, Hapitpah MA, Habsah AK. *Annona muricata* (Annonaceae): a review of its traditional uses, isolated acetogenins and biological activities. *Int J Mol Sci* 2015;16:15625–58.
- Hasrat J, Bruyne TD, Backer JP, Vauquelin G, Vlietinck A. Isoquinoline derivatives isolated from the fruit of *Annona muricata* as 5-HT_{2C} receptor agonists in rats: unexploited antidepressive (lead) products. *J Pharm Pharmacol* 1997;49:1145–9.
- Lannuzel A, Michel PP, Caparros-Lefebvre D, Abaul J, Hocquemiller R, Ruberg M. Toxicity of Annonaceae for dopaminergic neurons: potential role in atypical parkinsonism in Guadeloupe. *Mov Disord* 2002;17:84–90.
- Kobake Y, Okuda K, Kamizono M, Matsumoto N, Tanahashi T, Hara H, et al. Detection and determination of reticuline and N-methylcoclaurine in the Annonaceae family using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B* 2004;806:75–8.
- González-Esquinca AR, De-La-Cruz-Chacón I, Castro-Moreno M, Orozco-Castillo JA, Riley-Saldaña CA. Alkaloids and acetogenins in Annonaceae development: biological considerations. *Rev Bras Frutic* 2014;36:01–16.
- Hess MG, Barralts H, Bleiholder L, Buhr T, Eggers H, Hack RS. Use of the extended BBCH-scale – general for the description of the growth stages of mono- and dicotyledonous weed species. *Weed Res* 1997;37:441–3.
- Reglas Internacionales para el ensayo de semillas 1976. Ministerio de Agricultura. Dirección General de Producción Agraria, Madrid 1976;23–32.
- González-Esquinca AR. Contribución al estudio del Genero *Annona* (Annonaceae), análisis fitoquímico de tres especies del estado de Chiapas. Tesis. UNAM 2001.
- Pérez Gutiérrez RM. Handbook of compounds with cytotoxic activity isolated from plants. New York: Nova Science Publishers, Inc., 2007.
- Rieser MJ, Gu ZM, Fang XP, Zeng L, Wood KV, McLaughlin JL. Five novel mono-tetrahydrofuran ring acetogenins from the seeds of *Annona muricata*. *J Nat Prod* 1996;59:100–8.
- Alali FA, Xiao-Xi L, McLaughlin JL. Annonaceous acetogenins: recent progress. *J Nat Prod* 1999;62:504–40.
- Gromek D, Hocquemiller R, Cavé A. Qualitative and quantitative evaluation of annonaceous acetogenins by high performance liquid chromatography. *Phytochem Anal* 1999;5:133–40.

33. Egydio AP, Vallvassoura TA, Santos DY. Geographical variation of Isoquinoline alkaloids of *Annona crassiflora* Mart. from Cerrado, Brazil. *Biochem Syst Ecol* 2013;46:145–51.
34. Cavé A, Figadère B, Laurens A, Cortes D. Acetogenins from Annonaceae. *Forsch Chem Org Naturst* 1997;70:81–288.
35. Brechó-Franco AE, Laguna Hernández G, De la Cruz Chacón I, González-Esquínca AR. In situ histochemical localisation of alkaloids and acetogenins in the endosperm and embryonic axis of *Annona macrophyllata* Donn. Sm. Seeds during germination. *Eur J Histochem* 2016;61:2568.
36. Wu FE, Zhao GK, Zeng L, Zhang Y, Schwedler JT, McLaughlin JL, et al. Additional bioactive acetogenins, annomutacin and (2*R*, 4*R*-trans and cis)-10*R*-annonacin-A-ones, from the leaves of *Annona muricata*. *J Nat Prod* 1995;58:1430–7.
37. Chang FR, Wu YC. Novel cytotoxic annonaceous acetogenins from *Annona muricata*. *J Nat Prod* 2001;64:925–31.
38. Kim GS, Zeng L, Alali F, Rogers LL, Wu FE, Sastrodihardjo S, et al. Muricoreacin and murihexocin C, mono-tetrahydrofuran acetogenins, from the leaves of *Annona muricata*. *Phytochemistry* 1998;49:565–71.
39. Zafra-Polo MC, Figadère B, Gallardo T, Tormo J, Cortes D. Natural acetogenins from Annonaceae, synthesis and mechanisms of action. *Phytochemistry* 1998;48:1087–117.
40. Kim GS, Zeng L, Alali F, Rogers LL, Wu FE, McLaughlin JL, et al. Two new mono-tetrahydrofuran ring acetogenins, annomuricin E and muricapenocin, from the leaves of *Annona muricata*. *J Nat Prod* 1998;61:576–9.
41. Gleye C, Raynaud S, Fournéau C, Laurens A, Laprévotte O, Serant L, et al. Cohibins C and D, two important metabolites in the biogenesis of acetogenins from *Annona muricata* and *Annona nutans*. *J Nat Prod* 2000;63:1192–6.
42. Liaw X, Chang F, Lin C, Chou C, Chiu H, Wu M, et al. New cytotoxic monotetrahydrofuran annonaceous acetogenins from *Annona muricata*. *J Nat Prod* 2002;65:470–5.
43. Rieser MI, Kozłowski JF, Wood KV, McLaughlin JL. Muricatalcin: a simple biologically active acetogenin derivative from the seeds of *Annona muricata* (Annonaceae). *Tetrahedron Lett* 1991;32:1137–40.
44. Myint SH, Cortes D, Laurens A, Hocquemiller R, Lebeuf M, Cavé A, et al. Solamin, a cytotoxic mono-tetrahydrofuran γ -lactone acetogenin from *Annona muricata* seeds. *Phytochemistry* 1991;30:3335–8.
45. Chang F, Liaw X, Lin C, Chou C, Chiu H, Wu Y. New adjacent bis-tetrahydrofuran annonaceous acetogenins from *Annona muricata*. *Planta Med* 2003;69:241–6.
46. Luna JD, De Carvalho JM, De Lima MR, Bieber LW, Bento ED, Franck X, et al. Acetogenins in *Annona muricata* L. (Annonaceae) leaves are potent molluscicides. *Nat Prod Res* 2006;20:253–7.
47. Zeng L, Wu FE, Oberlies NH, McLaughlin JL, Sastrodihardjo S. Five new monotetrahydrofuran ring acetogenins from the leaves of *Annona muricata*. *J Nat Prod* 1996;59:1035–42.
48. Cortes D, Figadère B, Cavé A. Bis-tetrahydrofuran acetogenins from Annonaceae. *Phytochemistry* 1993;32:1467–73.
49. Patel MS, Patel JK. A review on a miracle fruits of *Annona muricata*. *J Pharmacogn Phytochem* 2016;5:137–48.
50. González-Coloma A, Guadaño A, De Inés CD, Martínez-Díaz R, Cortes D. Selective action of acetogenin mitochondrial complex I inhibitors. *Z Naturforsch C* 2002;57:1028–34.
51. Álvarez O, Barrachina I, Ayala I, González MC, Moys P, Neske A, et al. Toxic effects of annonaceous acetogenins on *Oncopeltus fasciatus*. *J Pest Sci* 2008;81:85–9.
52. Blessing LD, Colom OÁ, Popich S, Neske A, Bardón A. Antifeedant and toxic effects of acetogenins from *Annona montana* on *Spodoptera frugiperda*. *J Pest Sci* 2010;83:307–10.
53. Dang QL, Kim WK, Nguyen CM, Choi YH, Choi GI, Jang KS, et al. Nematicidal and antifungal activities of annonaceous acetogenins from *Annona squamosa* against various plant pathogens. *J Agric Food Chem* 2011;59:11160–7.
54. Facchini PJ, De Luca V. Opium poppy and Madagascar periwinkle: model non-model systems to investigate alkaloid biosynthesis in plants. *Plant J* 2008;54:763–84.
55. Paulo MD, Barbosa-Filho J, Lima EO, Mata RF, de Cassia R, Barbosa BB, et al. Antimicrobial activity of benzylisoquinoline alkaloids from *Annona satmanii* DC. *J Ethnopharmacol* 1992;36:39–41.
56. Hasrat I, Pieters L, de Backer JR, Vauquelin G, Vlietinck A. Screening of medicinal plants from suriname for 5-HT1A ligands: bioactive isoquinoline alkaloids from the fruit of *Annona muricata*. *Phytomedicine* 1997;4:133–40.
57. Leboeuf M, Cavé A, Bhaumik P, Mukherjee B, Mukherjee R. The phytochemistry of the annonaceae. *Phytochemistry* 1980;21:783–813.
58. dependent expression. *Plant Mol Biol* 1991;16:175–85.
59. Kubasek WL, Shirley BW, McKillop A, Goodman HM, Briggs W, Ausubel FM. Regulation of flavonoid biosynthetic genes in germinating *Arabidopsis* seedlings. *Plant Cell* 1992;4:1229–36.
60. Shirley BW, Kubasek WL, Storz G, Bruggemann E, Koornneef M, Ausubel FM, et al. Analysis of *Arabidopsis* mutants deficient in flavonoid biosynthesis. *Plant J* 1995;8:659–71.
61. Kubasek WL, Ausubel FM, Shirley BW. A light-independent developmental mechanism potentiates flavonoid gene expression in *Arabidopsis* seedlings. *Plant J Plant Mol Biol* 1998;37:217–23.
62. Balsevich I, De Luca V, Kurz WG. Altered alkaloid pattern in dark grown seedlings of *Catharanthus roseus*. The isolation and characterization of 4-desacetoxystyindoline: a novel indole alkaloid and proposed precursor of vindoline. *Heterocycles* 1986;24:2415–21.
63. DeLuca V, Balsevich I, Tyler RT, Eilert U, Panchuk BD, Kurz WG. Biosynthesis of indole alkaloids: developmental regulation of the biosynthetic pathway from tabersonine to vindoline in *Catharanthus roseus*. *J Plant Physiol* 1986;125:147–56.
64. Aerts RI, Gist D, Carollis E, Luca V, Baumann TW. Methyl jasmonate vapor increases the developmentally controlled synthesis of alkaloids in *Catharanthus* and *Cinchona* seedlings. *Plant J* 1994;5:635–43.
65. Beaudoin GA, Facchini PJ. Benzylisoquinoline alkaloid biosynthesis in opium poppy. *Planta* 2014;240:19–32.
66. Ljung K. Auxin metabolism and homeostasis during plant development. *Development* 2013;140:943–50.
67. Normanly J. Approaching cellular and molecular resolution of auxin biosynthesis and metabolism. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010;2:a001594.

6.2.2 Presencia de las acetogeninas la *laherradurina* y *rolliniastatina-2* durante el desarrollo temprano.

En las últimas décadas los estudios químico de especies de la familia Annonaceae se han incrementado debido a los hallazgos de moléculas con alto potencial para la medicina (González-Esquinca *et al.*, 2014) entre ellas las acetogeninas *laherradurina* y *rolliniastatina-2* encontradas en muchas especies de Anonaceas (*Annona macrophyllata*, *A. purpurea*, *A. muricata*, *A. reticulata*) no obstante se desconoce su función que realiza en la planta que los produce; en busca de este significado en este apartado se presenta un primer acercamiento para conocer su distribución en la planta y el momento en que la planta invierte recursos para su biosíntesis.

Método

Para la cuantificación de estas acetogeninas se realizaron extractos de los diferentes órganos señalados.

Las acetogeninas *laherradurina* y *rolliniastatina-2* utilizadas como referencia fueron obtenidas de un previamente de semillas de *Annona macrophyllata* (De la Cruz, 2001). Ambas acetogeninas fueron identificadas y determinadas por el Dr. Diego Cortés del Departamento de Farmacología de la Universidad de Valencia, España.

Se realizó el análisis por HPLC, según datos contenidos en el apartado 6.1 (pág. 48)

Análisis estadístico.

Los valores en la concentración de los dos compuestos en las fases de desarrollo fueron analizados por una ANOVA simple para la determinación de las diferencias significativas. El programa utilizado fue R.

Resultados

Ambas acetogeninas se encuentran durante el desarrollo temprano, pero en órganos y momentos distintos como a continuación se describe.

Raíces

En las raíces tanto la herradura como la rolliniastatina-2 se encuentran presentes en todas las etapas de desarrollo temprano de *A. muricata* en general rolliniastatina-2 en menor concentración misma que se incrementa durante el desarrollo hasta llegar a $59.37 \mu\text{g/gDW}^{-1}$ en la etapa de 6 hojas, mientras que la mayor concentración de la herradura se detectó durante la germinación en radículas de 1 cm ($54.91 \mu\text{g/gDW}^{-1}$, $P \leq 0.05$) para su posterior disminución durante el desarrollo, (Figura 7).

Al parecer la biosíntesis de ambas acetogeninas se da en tiempos distintos, la herradura en radícula de 1 cm ($54.91 \mu\text{g/gDW}^{-1}$; $P \leq 0.05$), mientras que la rolliniastatina-2 aparece siete días después en las radículas de 5 cm y en cantidades más pequeñas ($0.55 \mu\text{g/gDW}^{-1}$).

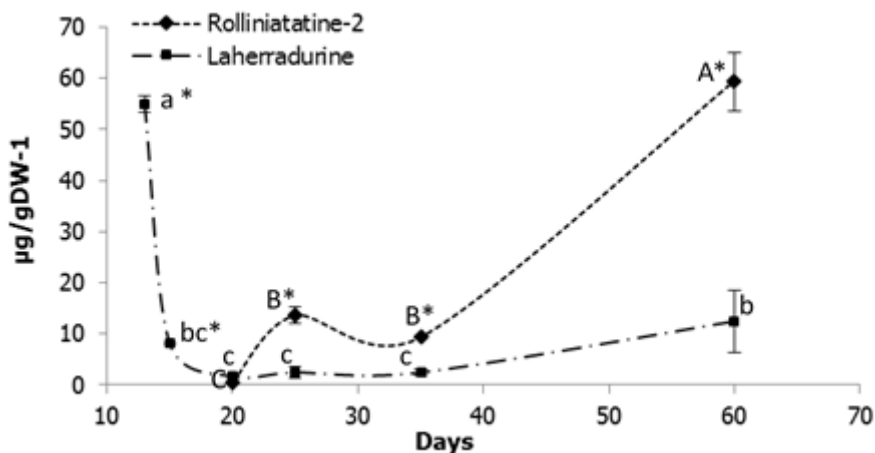


Fig 7. Contenido de la laherradurina y la rolliniastatina-2 en raíces. Los valores se representan como el promedio de 3 repeticiones y su desviación estándar. Las letras señalan las diferencias estadísticas significativas entre las fases de desarrollo, mayúsculas (rolliniastatina-2), minúsculas (laherradurina), mientras que el asterisco señala las diferencias entre los compuestos en cada fase de desarrollo.

Tallos

La determinación de las acetogeninas en tallos, se realizó en plántulas con primordio foliar, con 2 y 6 hojas.

Ambas acetogeninas están presentes y tienen el mismo comportamiento durante el crecimiento del tallo. La laherradurina y la rolliniastatina-2 se detectan en los tallos con primordio

foliar (10.83 y $7.38 \mu\text{g/gDW}^{-1}$ respectivamente) incrementándose rápidamente casi al doble de su valor en la etapa de dos hojas (17.07 y $18.25 \mu\text{g/gDW}^{-1}$ respectivamente), en general la rolliniastatina-2 se encuentra en mayores concentraciones en todas las etapas y al parecer su concentración se mantiene conforme la planta crece (Figura 8).

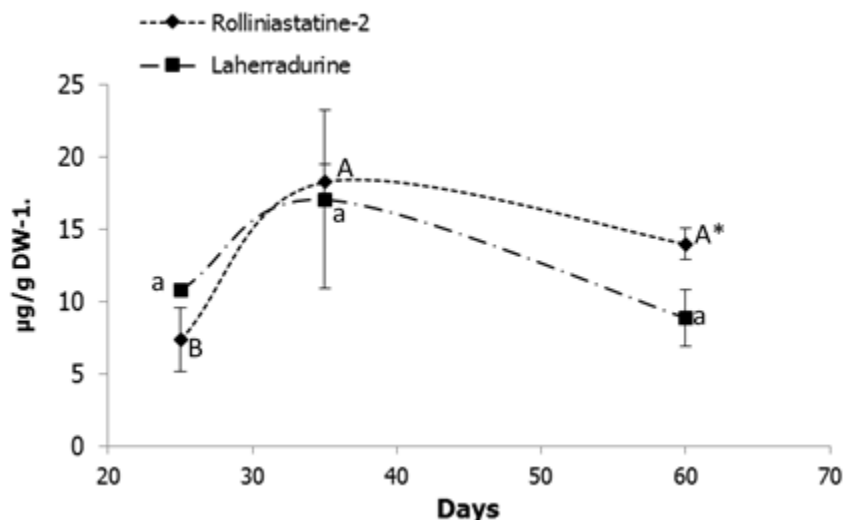


Fig 8. Contenido de la Laherradurina y rolliniastatina-2 en tallos. Los valores se representan como el promedio de 3 repeticiones y su desviación estándar. Las letras señalan las diferencias estadísticas significativas entre las fases de desarrollo, mayúsculas (rolliniastatina-2), minúsculas (laherradurina), mientras que el asterisco las diferencias entre los compuestos en cada fase de desarrollo.

Hojas

Tanto la rolliniastatina-2 como la laherradurina se encuentran en las hojas en todas las fases de desarrollo evaluadas. En general tienen el mismo comportamiento y a diferencia de las raíces y los tallos, laherradurina está en mayores concentraciones, la cantidad de laherradurina es muy pequeña en los primordios foliares ($3.72 \mu\text{g/gDW}^{-1}$, $P \geq 0.05$) alcanzando su mayor concentración en la etapa de dos hojas ($80.94 \mu\text{g/gDW}^{-1}$, $P \leq 0.05$) para posteriormente disminuir en plántulas con 6 hojas ($3.01 \mu\text{g/gDW}^{-1}$); el comportamiento de rolliniastatina-2 en este órgano es similar al de la laherradurina, es decir la mayor acumulación del compuesto ocurre en etapa de 2 hojas y la menor en cuando las plántulas tienen 6 hojas (60 días) (Figura 9).

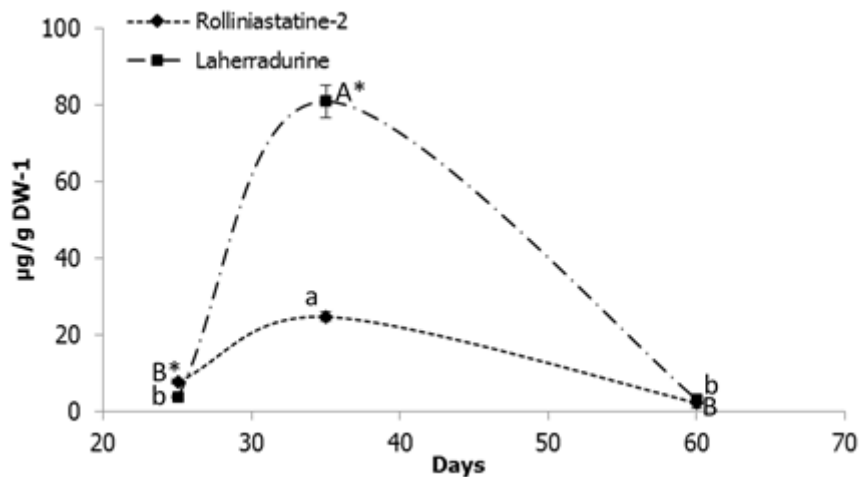


Fig 9. Contenido de la Laherradurina y rolliniastatina-2 en hojas. Los valores representan el promedio de 3 repeticiones y su desviación estándar. Las letras señalan las diferencias estadísticas significativas entre las fases de desarrollo, mayúsculas (rolliniastatina-2), minúsculas (laherradurina), mientras que el asterisco las diferencias entre los compuestos en cada fase de desarrollo.

Discusión

De ejemplares adultos de *Annona muricata* se han aislado 102 acetogeninas (Wu et al., 1995, 2001; Cavé et al., 1997; Alali et al., 1997, 1999; Zafra-Polo et al., 1998; Kim et al., 1999; Gleye et al., 1998; Yu et al., 2000; Liaw et al., 2002, 2003; 2004; Chang 2001; Bermejo et al., 2005; Luna et al., 2005; Li et al., 2008), entre ellas, la rolliniastatina-2, annonacina, annonacinona, annomontacina, murisolina, xylomaticina, muricina H, muricina I, *cis*-annomontacina, *cis*-corossolone y annocatalina (Chih-Chuang, et al. 2002), no se ha documentado la presencia de ninguna acetogenina durante el desarrollo temprano de la planta, con esta investigación se reporta la presencia de laherradurina y de la rolliniastatina-2 en raíces, tallos y hojas durante la germinación y la etapa de plántula; tanto la rolliniastatina-2 ($5 \mu\text{g/gDW}^{-1}$) como la laherradurina ($21.55 \mu\text{g/gDW}^{-1}$) se detectan en las radículas, al inicio de la germinación, resultados que sugieren que su biosíntesis inicial está asociada al material de reserva de las semillas y no a la fotosíntesis, al igual que el alcaloide lirioidenina detectado también en etapas tempranas de desarrollo en *A. macrophyllata* (De la Cruz Chacón & González-Esquinca, 2011). También es notable, que por alguna razón, ambos procesos biosintéticos están desfasados, ya que laherradurina se detecta en

radículas de 1 cm, mientras que la rolliniastatina-2, 7 días después en radículas de 5 cm, regulación espacio-temporal que podría deberse a la diferenciación de los tejidos y/o a las estrategias de defensa frente a microorganismos para su sobrevivencia.

Una vez establecida la etapa de plántula, ambas acetogeninas se incrementan considerablemente (laherradurina $141.67 \mu\text{g/gDW}^{-1}$; rolliniastatina-2 $156.78 \mu\text{g/gDW}^{-1}$), entendiendo entonces que las plántulas invierten además del material de reserva, recursos fotosintéticos para su producción. En las plántulas, también hay diferencias de concentración entre las raíces y las hojas, se produce más rolliniastatina-2 en las raíces (2 veces más en etapa de dos hojas y 26 veces más en etapa de seis hojas) que en las hojas en donde la laherradurina se encuentra en mayor cantidad (40 veces más en etapa de dos hojas). La diferencia de concentración de las ACG en raíces y hojas pudiera explicarse de varias formas al considerar el papel de defensa que se atribuye a los metabolitos especializados (McKey, 1974): 1) que una ACG sea más potente que la otra, por ejemplo laherradurina posee mayor actividad sobre larvas de *Spodoptera littoralis* que la rolliniastatina-2 (86 y 29.7 % de mortalidad respectivamente) (González-Coloma *et al.*, 2002); 2) que la planta invierta mayores recursos para la protección de los órganos indispensables para su vida, como las hojas por su función fotosintética o para la protección de raíces por su importante papel en el transporte de nutrimentos y agua (Kaplan *et al.*, 2008), por lo tanto, las hojas y raíces, contendrían una mayor cantidad de estas dos acetogeninas.

La toxicidad de estas moléculas (He *et al.*, 1997; Castro *et al.*, 2010) junto con su abundancia durante su desarrollo temprano, en que la especie es muy vulnerable al ataque de patógenos y/o herbívoros, presupone su papel en los mecanismos de defensa, como se predice en la teoría de la defensa óptima (McKey, 1974) que señala que las defensas producidas por las plantas son costosas por lo que deben ser asignadas a los órganos de mayor valor, en este caso las hojas y las raíces. El metabolismo secundario asociado a las acetogeninas se expresa de manera temprana y permanece durante las distintas etapas fenológicas de la planta y tanto laherradurina como la rolliniastatina-2, pudieran ser metabolitos constitutivos de defensa, lo que debiera corroborarse en plántulas mediante ensayos *in vitro* e *in vivo*. Aunado a esto la laherradurina no había sido reportada con anterioridad en *A. muricata*.

6.3 Objetivo 3. Caracterizar el perfil de acetogeninas y alcaloides en plántulas de *Annona muricata* que fueron inoculadas con *Colletotrichum gloeosporioides* y *Rhizopus stolonifer*.

6.3.1 *Respuesta de Annona muricata ante la infección de Colletotrichum gloeosporioides y Rhizopus stolonifer (Artículo)*

Introducción

Todos los organismos dentro de un ecosistema están interconectados unos con otros por medio de redes que se establecen cuando comparten un mismo hábitat, interactúan entre sí de diferentes formas, para alimentarse y desarrollarse o para reproducirse. Las interacciones están temporal, física o químicamente reguladas, de modo que la supervivencia de las especies sea un hecho. Las plantas han evolucionado durante millones de años junto con sus herbívoros, patógenos y simbiontes mutualistas (Kenn, 1992; Barrera *et al.*, 2018) y han establecido relaciones que en la naturaleza difícilmente las llevan a su extinción, ello supone el desarrollo y perfeccionamiento a lo largo de la evolución, de sistemas de defensa altamente efectivos para detener o contrarrestar infecciones por microorganismos o prevenir y disuadir el ataque de herbívoros, a fin de cuentas, mecanismos que les permiten sobrevivir en ambientes diversos y adversos.

Las plantas de la familia Annonaceae se caracterizan por la presencia de las llamadas “acetogeninas de anonáceas” y de alcaloides bencilisoquinolínicos (Jolad *et al.*, 1982; Zafra-Polo *et al.*, 1998; Alali *et al.*, 1999, Bermejo *et al.*, 2005), que son metabolitos secundarios constitutivos en las especies de la familia. Estos metabolitos se expresan desde etapas tempranas de la germinación, como ha podido demostrarse en *Annona macrophyllata* (De La Cruz-Chacón, 2012), *A. lutescens* (Castro-Moreno, 2013) y en *A. muricata* (Riley *et al.*, 2017) y permanecen durante la vida de las plantas. De estos metabolitos se desconoce su función para las especies que lo producen, aunque se sabe que al menos el alcaloide oxoaporfínico liriodenina se eleva por encima del nivel basal o constitutivo cuando plantas de *A. lutescens* están sujetas a un estrés hídrico (Castro-Moreno *et al.*, 2013) y que existe una evidente relación que implica un control antifúngico durante la germinación de *A. macrophyllata*, lo que supone una plasticidad en la biosíntesis de este alcaloide y por tanto su induccionibilidad y la inversión de recursos en etapas vulnerables en

donde la prioridad es el crecimiento y supervivencia. La inducción biótica o abiótica, en sí misma, significa una estrategia evolutiva, planteada como mecanismo de defensa para mantener el fitness de las especies. Los alcaloides y acetogeninas de anonáceas son moléculas que presentan *in vitro* diversas actividades biológicas, entre ellas, los mecanismos de defensa contra fitopatógenos, como lo han demostrado los alcaloides coridina (Deng *et al.* 2006), dicretina (Puvanendran *et al.*, 2008), lisicamina (Conserva *et al.*, 2005) nordicentrina (Puvanendran *et al.*, 2008), roemerina y sampinginina (Deng *et al.*, 2007), thalifolina (Patiño y Cuca, 2010), xylopina (Tsai *et al.*, 1989) y liriodenina (Hufford *et al.*, 1980; Khan *et al.*, 2002; Rahman *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2006; Monteiro *et al.*, 2007). También están las actividades insecticidas desplegadas por las acetogeninas de anonáceas uvaricina (Ahammadsahib *et al.*, 1993) asimicina (Alali *et al.*, 1999) rolliniastatina-1 (González-Coloma *et al.*, 2002) gigantetronenina (Blessin *et al.*, 2010).

Aunque los árboles de *Annona muricata* producen altas cantidades de compuestos con actividad biológica son frecuentemente atacados por hongos que producen enfermedades comunes en las plantaciones comerciales. Entre estos se encuentran *Colletotrichum gloeosporioides* que provoca la antracnosis y *Rhizopus stolonifer* responsable de la pudrición de raíces y semillas de la especie; los árboles de esta especie también son susceptibles al ataque de larvas de la avispa *Bephratelloides cubensis*. Sin embargo y acorde con la teoría de la defensa óptima (Fenny, 1976 en Rhoades y Cates, 1976) es factible que *A. muricata* pueda incrementar o diversificar la producción de alcaloides y acetogeninas como respuesta al establecimiento de estos dos hongos en su superficie. Este trabajo constituye un primer reporte sobre el incremento de alcaloides y acetogeninas en plántulas de *A. muricata* inducidos por la infección de *C. gloeosporioides* y *R. stolonifer*.

Método.

Diseño experimental

El diseño experimental fue factorial en bloques completamente al azar con dos tratamientos (inoculadas y sin inocular) con 5 repeticiones cada una.

Material biológico.

Obtención de plántulas

Los frutos (70) para la obtención de semillas se recolectaron en una plantación en el Municipio de Reforma, Chiapas. Las semillas (1000) se sembraron en rollos de papel húmedo mediante la técnica “entre papel” (Ministerio de Agricultura, 1976), éstos se colocaron en una germinadora Conviron® con ambiente controlado (28 °C con fotoperíodo de 12 h lámparas de fluorescencia a una intensidad de 500 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, y una humedad relativa entre 65 y 75 %) hasta obtener plántulas en etapa de primordio foliar, las que se trasplantaron a vasos de unicel de 500 mL con suelo obtenido de la región previamente esterilizada en autoclave en recipientes tetrapack reciclados con capacidad de 1L. Las plántulas se mantuvieron en un cuarto bioclimático bajo condiciones controladas hasta que contaron con 6 hojas, bajo estas mismas condiciones se realizó la inducción.

Obtención de inóculos de *Colletotrichum gloeosporioides* y *Rhizopus stolonifer*

Se sembraron conidios obtenidos a partir de cepas puras de *C. gloeosporioides* (HM562712) y *R. stolonifer* (NACF0010) en papa dextrosa agar (PDA) y se incubaron durante 7 días a 27°C, posteriormente se colocaron discos de micelio de 5 mm en medio líquido dextrosa papa, que se mantuvo en agitación constante durante 7 días para *C. gloeosporioides* y 4 días para *R. stolonifer*, para la inoculación de las partes aéreas con *C. gloeosporioides* y de raíces con *R. stolonifer* de (Agostini & Timmer, 2002) se ajustó el número de conidios en una cámara de Neubauer (1×10^6 conidios/mL).

Inoculación de plántulas con *Colletotrichum gloeosporioides*.

Se seleccionaron 50 plántulas de *A. muricata* con 6 hojas. 25 plántulas para llevar a cabo la inoculación y 25 para el testigo. Mediante aspersión se inoculó cada planta (5 mL) con 1×10^6 conidios/mL de *C. gloeosporioides*, cerciorándose que la aspersión fuera homogénea en todas las hojas, las plántulas testigo fueron asperjadas con agua destilada estéril, bajo las mismas condiciones que las plántulas inoculadas. Cada plántula se cubrió con una bolsa de plástico transparente para crear un ambiente húmedo (Figura 10). Se colocaron en una germinadora con condiciones controladas (27 °C, 50 % de humedad relativa, 12 h luz/12 h oscuridad). La aparición de síntomas se monitoreo todos los días; al tercer día de la inoculación se observaron los síntomas

de la infección en las hojas (Figura 11). Al séptimo día después de la inoculación se tomaron muestras de contenido variable (6-7 g) de hojas, tallos y raíces para verificar la infección y para la obtención de extractos hexánicos (presencia de acetogeninas de anonáceas) y extractos alcaloidales (presencia de alcaloides) (modificado de Agostini & Timmer 1992, Álvarez *et al.*, 2004, Santos, 2006, Villanueva-Arce, 2008). Se hicieron tres repeticiones.



Fig. 10. Planta inoculada con *C. gloeosporioides*.



Fig. 11. Síntoma de antracnosis en hojas, los círculos en rojo señalan la antracnosis foliar.

La presencia de *C. gloeosporioides* en plántulas se determinó por la siembra en agar PDA de fragmentos de hojas que presentan signos de antracnosis.

Para ello, se realizaron cortes de 2x2 cm de hojas, el material vegetal se desinfectó con hipoclorito al 1% durante 5 minutos, posteriormente fue lavado con agua destilada estéril 3 veces. Cada corte de hojas fue colocado en cajas Petri con PDA, las cajas se incubaron a 25 °C durante 7 días o hasta observar el crecimiento micelial, posteriormente se realizaron explantes de micelio, para ello se realizaron discos de micelio de 5 mm de diámetro y fueron transferidos a cajas con PDA (Figura 12).

Una vez que el hongo creció se realizaron tinciones del micelio con azul de algodón-lactofenol y se observó al microscopio para conocer la morfología del hongo

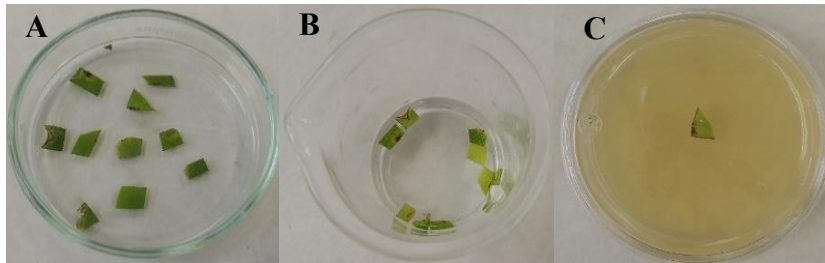


Fig 12. Obtención de tejido infectado con *C. gloeosporioides* A. cortes de hojas; B. desinfección del tejido en hipoclorito; C. Siembra del tejido en agar PDA

Una vez que el hongo creció se realizaron preparaciones utilizado como medio de montaje azul de algodón y se observó al microscopio la morfología (Figura 13).

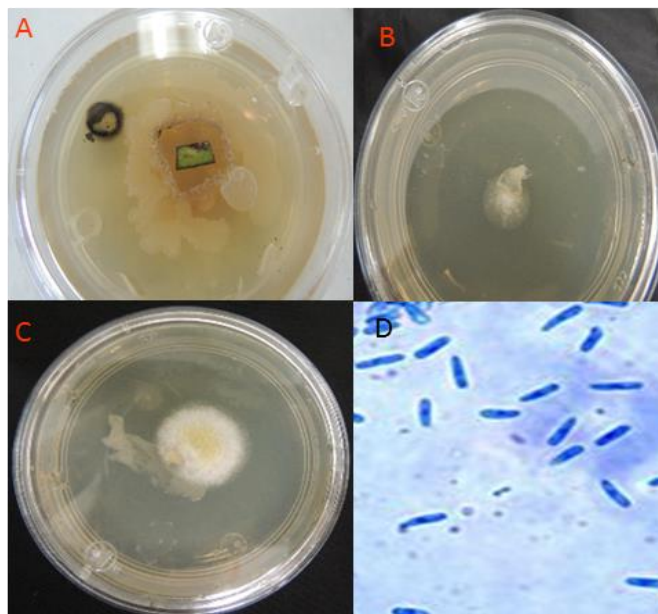


Fig 13. Aislamiento de *C. gloeosporioides* a partir de tejido infectado. A. Crecimiento de *C. gloeosporioides*; B. Explante de *C. gloeosporioides* a partir del aislado de las hojas; C. Crecimiento de *C. gloeosporioides*; D. *C. gloeosporioides* a 100 X

Inoculación de plántulas con *Rhizopus stolonifer*

Se seleccionaron 50 plántulas de *Annona muricata* en etapa de 6 hojas (25 para inoculación y 25 para testigo). Se colocaron discos de micelio de 5 mm en medio líquido dextrosa papa, el medio de cultivo se mantuvo en agitación constante durante 7 días. Posteriormente se realizó la inoculación

de las plántulas con 20 mL de inóculo (1×10^5 de esporas) de *R. stolonifer*. La inoculación se llevó a cabo mediante riego a ras del suelo. Los testigos fueron regados con agua destilada estéril.

Las raíces fueron revisadas cada tercer día, esto con la finalidad de observar síntomas de podredumbre, síntoma característico de la patología. Al séptimo día posterior a la inoculación se observaron los síntomas de la infección (Figura 14). Se tomaron muestras de contenido variable (6-7 g) de hojas, tallos y raíces para la obtención de extractos hexánicos (presencia de acetogeninas de anonáceas) y extractos alcaloidales (presencia de alcaloides). Se hicieron tres repeticiones.

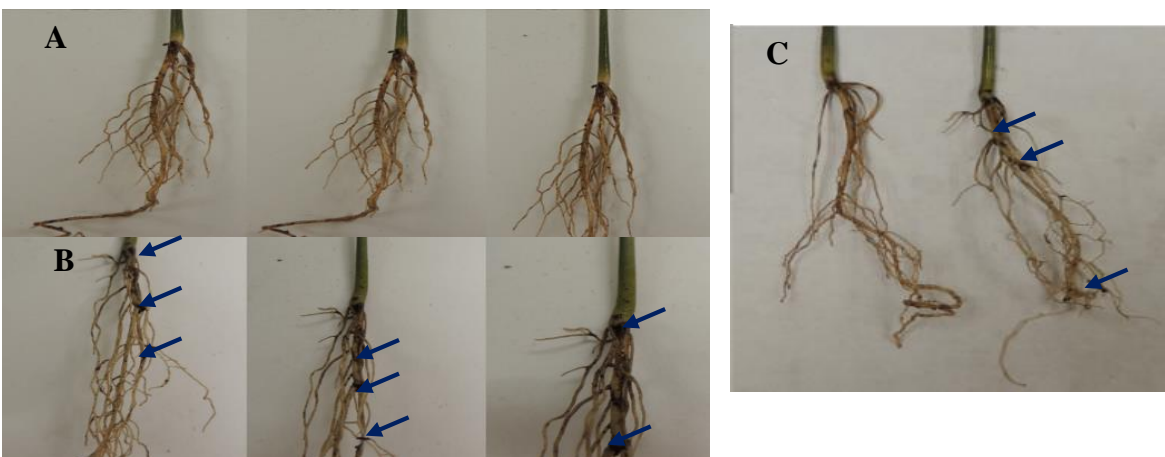


Fig 14. Raíces de *A. muricata* de plántulas inoculadas con *R. stolonifer*. A. raíces de plántulas control; B. raíces de plántulas inoculadas; C. Comparación entre raíces control e inoculadas. Las flechas azules indican las zonas blandas del tejido.

Obtención de los extractos hexánicos

De cada uno de los órganos, tanto de plántulas control como de las inoculadas, se realizaron extracciones con hexano (50 mL) J.T Baker grado reactivo de 3 a 4 g de material vegetal, a reflujo continuo, en un equipo Soxhlet, durante 8 horas, tres veces. Se reunieron las tres repeticiones y se recuperó el solvente en un rotaevaporador marca Camafro VV2000. Los extractos hexánicos se conservaron en viales de cristal hasta su análisis

Determinación de acetogeninas.

Para determinar la identidad de las acetogeninas en hojas, tallos y raíces tanto de plántulas inoculadas como control, se realizó una revisión bibliográfica de los espectros de absorción UV de

cada acetogenina aislada hasta ahora de *A. muricata*, considerando además los órganos de donde fueron aisladas de ejemplares adultos (Cuadro 9).

Cuadro 9. Determinación mediante GC-MS de alcaloides en *A. muricata*

Alcaloides	EI-MS M/Z (relative intensity, %)
Anonaina	265, 264 (100%), 207 (53.6 %), 102 (34.48)
Asimilobina	267 (43.14 %), 266 (100 %), 252 (36.25), 250 (22.13), 236 (15.48 %)
Coreximina	(22.13), 236 (15.48), 327 (29.28), 207 (27.54), 178 (100), 176 (33.61)
Nornuciferina	281 (43.29), 280 (100 %), 250 (19.79 %), 221 (14.94 %)
Reticulina	329 (), 192 (100 %), 207 (16.62 %), 193 (13.37 %), 177 (27.32)

Se utilizó un cromatógrafo de líquidos de alto rendimiento acoplado con un detector UV de matriz de fotodiodos (HPLC-DAD) (Perkin Elmer Flexar) en fase inversa (Diámetro de partícula Spheri-5 RP-18, 250 x 4,6 mm id, 5 μ m). La fase móvil consistió en acetonitrilo-metanol-agua (JT Baker) (80:10:10 isocrática). El flujo fue de 1 ml min⁻¹ y la temperatura del compartimiento de la columna se mantuvo a 30°C. Se usó detección UV a 220 nm. El volumen de la muestra analizada fue de 20 μ l a 1 mg.mL⁻¹ disuelta en metanol.

Obtención de extractos alcaloidales

La obtención de alcaloides totales se realizó por el método ácido-base descrito por González (2001). Las muestras secas y molidas se empaparon con una solución de carbonato de sodio saturada (100 g/L) y se dejaron secar, para luego extraerlas con cloroformo durante una hora, posteriormente se filtraron y se realizaron 3 lavados con agua destilada; los extractos orgánicos se extrajeron con una solución ácida (HCl 1 N), la fase ácida se basificó hasta pH 9 con carbonato de sodio (Na₂CO₃); los alcaloides se obtuvieron de esta fase acuosa con cloroformo agitando vigorosamente, por último los extractos se lavaron con agua destilada y se elimina el exceso de agua con Sulfato de Sodio (Na₂SO₄). Los extractos alcaloidales se mantuvieron a temperatura ambiente hasta su utilización.

Determinación de alcaloides

La determinación de los alcaloides, se llevó a cabo mediante el método empleado por Egydio *et al.*, (2013) bajo las siguientes condiciones: un volumen de 1 μL de las muestras disueltas en metanol a $5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ se analizaron en un equipo de GC/MS de Perkin Elmer Modelo Clarus 680 GC acoplado a un espectrómetro Clarus SQ8T MS, con un split a 1:20. La columna capilar utilizada como fase estacionaria fue una Elite-1 de Perkin Elmer (32 m x 0.32 mm y 0.25 mm de grosor de película). Se utilizó Helio como gas acarreador a un flujo de $1.2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Las condiciones de la temperatura de la columna consistieron inicialmente de 150°C por 1 min, con un incremento de $10^\circ\text{C min}^{-1}$ hasta 280°C y mantenida a ese grado por 16 min. La temperatura del inyector fue de 300°C . La fragmentación de masas fue recolectada a 70 ev con $2.89 \text{ scans}\cdot\text{s}^{-1}$ y los fragmentos fueron detectados de 50 a 500 Da, la temperatura de la fuente de iones y la del cuadrupolo fue de 270°C .

Resultados

A. muricata vs *Colletotrichum gloeosporioides*.

Acetogeninas

Fue posible detectar tanto en plántulas control como en plántulas inoculadas con *C. gloeosporioides* o con *R. stolonifer* cuatro acetogeninas, una de ellas, mosinona, en todos los órganos y tres, *cis*-uvariamicina IV, muricina B y *cis*-anonacina-10-one, con distribución órgano específica. Sin embargo, solamente una (muricina B) responde a la inoculación.

Mosinona es una acetogenina que, aunque se distribuye en toda la planta, se encuentra en mayor cantidad en los tallos, no se incrementa ni disminuye en ninguno de los órganos de las plántulas de *A. muricata* cuando estas son infectadas por *C. gloeosporioides* (Figura 15).

cis-uvariamicina IV se detecta en los tallos y las raíces, esta acetogenina tampoco presenta variaciones en las plántulas inoculadas (Figura 15).

Muricina B y *cis*-anonacina-10-one son acetogeninas que se encuentran solamente en las hojas; en plántulas infestadas con *C. gloeosporioides*, *cis*-anonacina-10-one no muestra cambios significativos, es decir, esta molécula no responde a la presencia del patógeno, mientras que muricina B muestra un incremento de 20% en las hojas de *A. muricata* ($p=0.0077$) (Figura 15).

Alcaloides

Tanto en plántulas control como en plántulas inoculadas fue posible detectar los alcaloides asimilobina, anonaina, nornuciferina, coreximina y reticulina.

Asimilobina es un alcaloide que se distribuye en toda la plántula, en las hojas no se observaron cambios, mientras que, aunque sin significancia estadística, en los tallos se encontró un incremento de 10% y en raíces del 8% ($p=0.055$ y $p=0.566$) en plántulas que fueron inoculadas (Figura 16), la anonaina también se encuentra distribuida en las hojas y raíces, y ambos órganos responden a la infección del hongo (8 y 10%; $p=0.0298$ y $p=0.0281$, respectivamente) (Figura 16), la reticulina, distribuida en toda la planta, es más abundante en los tallos sin embargo tanto en las hojas como en los tallos de plantas infectadas se incrementan en 10%, siendo este incremento solo significativo en los tallos ($p=0.0289$) y la nornuciferina se encuentra en raíces y tallos, incrementándose en los tallos con la infección del hongo 12 veces (1200%) ($p=0.031$) (Figura 16)

Annona muricata* vs *Rhizopus stolonifer

Acetogeninas

Las cuatro acetogeninas detectadas en plántulas inoculadas (*cis*-anonacina-10-one, *cis*-uvariamicina-IV, mosinona y muricina B) no mostraron respuesta a la infección con el hongo *R. stolonifer* (Figura 17).

Alcaloides

En el análisis de los cinco alcaloides detectados (asimilobina, anonaina, coreximina, nornuciferina y reticulina) en las plántulas de *A. muricata* infectadas con *R. stolonifer* se observó que sólo nornuciferina se incrementó 10% ($p=0.050$) en las raíces de plantas inoculadas (Figura 18).

Discusión

Las plantas conviven con otros organismos y se establecen diversas interacciones desde el mutualismo hasta el antagonismo, estas últimas, representadas por herbívoros o microorganismos patógenos. Las plantas activan sistemas de defensa entre las que se encuentran la producción de moléculas tóxicas diferentes tipos de metabolitos, como fenoles (Devi & Reddy, 2002), terpenos

(Howell *et al.*, 1999), antocianinas (Huang & Backhouse, 2005), alcaloides (Nef *et al.*, 1991), glucósidos cianogénicos (Osbourn, 1996b; Morrysey & Osbourn, 1999; Hueghes *et al.*, 2004), entre otros (Hostettmann *et al.*, 1995; Morrissey *et al.*, 1999, Thomas *et al.*, 2006).

La respuesta de las plantas ante el ataque de patógenos puede resultar en un incremento de concentraciones de los metabolitos constitutivos, o también en la biosíntesis *de novo* de otros metabolitos, o de ambos, por ejemplo, inducción de la biosíntesis de catarantina *Catharanthus roseus* por la inducción con *Pythium verxans* (0 a 1-7 µg/100 mL) y al mismo tiempo el incremento de ajmalacina (de 1.73 a 3,35 µg/100mL) (Nef *et al.* 1991). Las plántulas de *A. muricata*, en las primeras etapas de desarrollo, producen acetogeninas y alcaloides constitutivos, entre ellos las acetogeninas *cis*-anonacina-10-one, muricina B, mosinona, *cis*-uvariamicina IV y los alcaloides anonaina, coreximina, reticulina, asimilobina y nornuciferina (Riley *et al.*, 2017), sin embargo, se desconoce si estos metabolitos secundarios participan en los mecanismos en la defensa de la planta, por ello, en esta investigación se analizaron los cambios de estas moléculas en función de su infección por los hongos patógenos *C. gloeosporioides* y *R. stolonifer* con que son infestadas las plántulas de dos meses de edad. Se descubrió que *C. gloeosporioides* induce una respuesta más plástica del perfil alcaloidal que las acetogeninas, ya que casi todos los alcaloides se modifican, en tanto que de todas las acetogeninas, sólo una (muricina B) cambia.

La muricina B se detecta a partir de que la planta es fotosintéticamente activa, parece entonces, que su biosíntesis estuviera en función del primordio foliar (Riley-Saldaña *et al.*, 2017), la inversión de recursos en la biosíntesis de esta molécula en etapas de desarrollo temprano de *A. muricata* y el incremento en su concentración (20%) cuando las hojas son infectadas por *C. gloeosporioides*, señala alguna función de esta acetogenina para la planta. Así mismo, el hecho de que las acetogeninas de anonáceas sean moléculas con potente actividad citotóxica e insecticida (Tolosa *et al.*, 2014; Moghadamtousi *et al.*, 2015; Miao *et al.*, 2015; Prabhakaran *et al.*, 2016; Costa *et al.*, 2017) aunado a la actividad antifúngica mostrada por las acetogeninas escuamocina, escuamocina G y escuamostatina-A *in vitro* e *in vivo* sobre *Phytophthora infestans* (Dang *et al.*, 2011) podrían ser indicios de su participación en el mecanismo de defensa de la planta; sin embargo, no se encontraron reportes en los que se haya explorado la actividad antifúngica o insecticida de esta molécula.

A diferencia de las acetogeninas los alcaloides si se incrementan bajo la inducción de *C. gloeosporioides* y *R. stolonifer*. *C. gloeosporioides* indujo el incremento de cuatro de los cinco alcaloides detectados (asimilobina, anonaina, reticulina y nornuciferina) y aunque la inoculación se realizó en las hojas, el incremento de alcaloides se observó también en los tallos y en menor proporción en las raíces, coreximina fue el único alcaloide que no respondió a la presencia de *C. gloeosporioides*, mientras que *R. stolonifer* solo indujo una mayor concentración de nornuciferina en los tallos de *A. muricata*. Con mucho, la nornuciferina es el alcaloide que más se sobreexpresa con *C. gloeosporioides* (1200%, $p=0.031$) e incluso el único que responde a *R. stolonifer*.

La inducción de metabolitos secundarios en especies de *Annona* no ha sido documentada, sin embargo hay indicios de que el mismo tipo de alcaloides que contienen las especies de Anonáceas (BIQ), responden a inductores bióticos como los patógenos fúngicos de las plantas ya sean específicos o no de las especies, por ejemplo, Cline & Coscia (1987) reportan que la sanguinerina en cultivos celulares de *Papaver bracteatum* se incrementa hasta en dos órdenes de magnitud cuando el cultivo es inducido con una preparación de *Dendryphon*, un patógeno específico del género (*Solanum*), observando también que la respuesta es inductor dosis dependiente (120 mg de peso fresco (1.5mL del inductor), produce alrededor de 460 microgramos por gramo de peso fresco acumulados en las células del tejido. Así mismo, Alcantara *et al.*, 2005 evaluaron cultivos celulares de opio (*P. somniferum*) para determinar si los niveles de la enzima CYP80B1 (N metilcoclaurina hidrolasa), BBE (berberine brigne enzyme) y COR (codeína reductasa) tratadas con un homogenizado del hongo *Botrytis cinerea*, se modifican en respuesta al tratamiento del inductor encontrando que los niveles de la enzima CYP80B1 y BBE (no perceptibles en el extracto control), se incrementan a partir de las 5 h de la adición del inductor, la enzima CYP80B1 cataliza un paso antes de la formación de la reticulina punto de diversificación de los alcaloides bensilisoquinolinicos, enzimas implicadas en la biosíntesis de estos compuestos que responden al ataque de patógenos y con ello producen moléculas específicas relacionadas (Liscombe & Facchini, 2008). Estos resultados demuestran que la maquinaria genética para la producción de enzimas, implicadas en la biosíntesis de alcaloides, responde al ataque de patógenos y por tanto podrían relacionarse con los sistemas de defensa química de las plantas.

Los datos encontrados en *A. muricata* también señalan una especificidad de respuesta al microorganismo, misma que ha sido documentada con diferentes líneas celulares (Antony &

Vijayan, 2016; Daddiouaissa & Amid, 2018; Mittal *et al.*, 2018), *A. muricata* es más sensible a la infección por *C. gloeosporoides* que es un fitopatógeno habitual en los cultivos de guanábana. También que la inducción del metabolito puede darse en órganos diferentes a la inoculación, es decir que la biosíntesis puede ocurrir en diferentes órganos o que puede desplazarse de sus sitios biosintéticos.

Durante el desarrollo temprano, con excepción de la coreximina, los alcaloides se biosintetizan muy pronto, cuando la radícula recién emerge y las acetogeninas con excepción de la *cis-uvariamicina IV*, se biosintetizan cuando la plántula es fotosintéticamente activa, la inversión en la biosíntesis temprana y su persistencia dos meses después (etapa de 6 hojas), así como su inducción diferencial tanto por el microorganismo como por el órgano y el metabolito secundario de respuesta, implica un papel preponderante, que bien podría ser la defensa frente a diferentes microorganismos u otras especies.

Conclusión

Nuestros datos señalan que tanto alcaloides como acetogeninas son moléculas que pueden inducirse por el ataque de fitopatógenos, que existe una especificidad de respuesta siendo mayor con *C. gloeosporoides* que habitualmente produce la antracnosis de las anonas y que por tanto el metabolismo de estas moléculas está sujeto a una plasticidad que se establece como respuesta a las interacciones bióticas de estas especies.

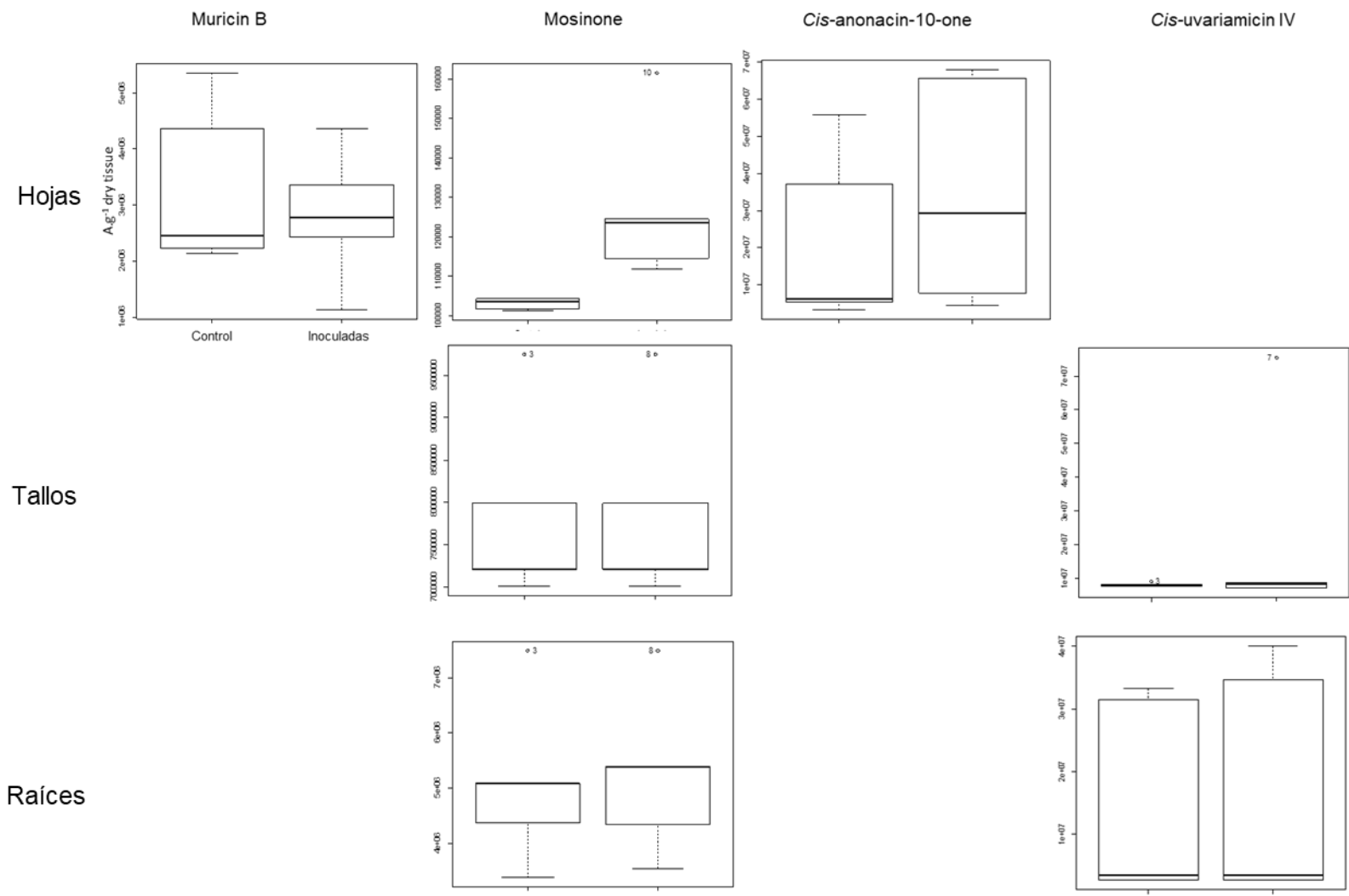


Fig 15. Respuesta de las acetogeninas vs *C. gloeosporioides*

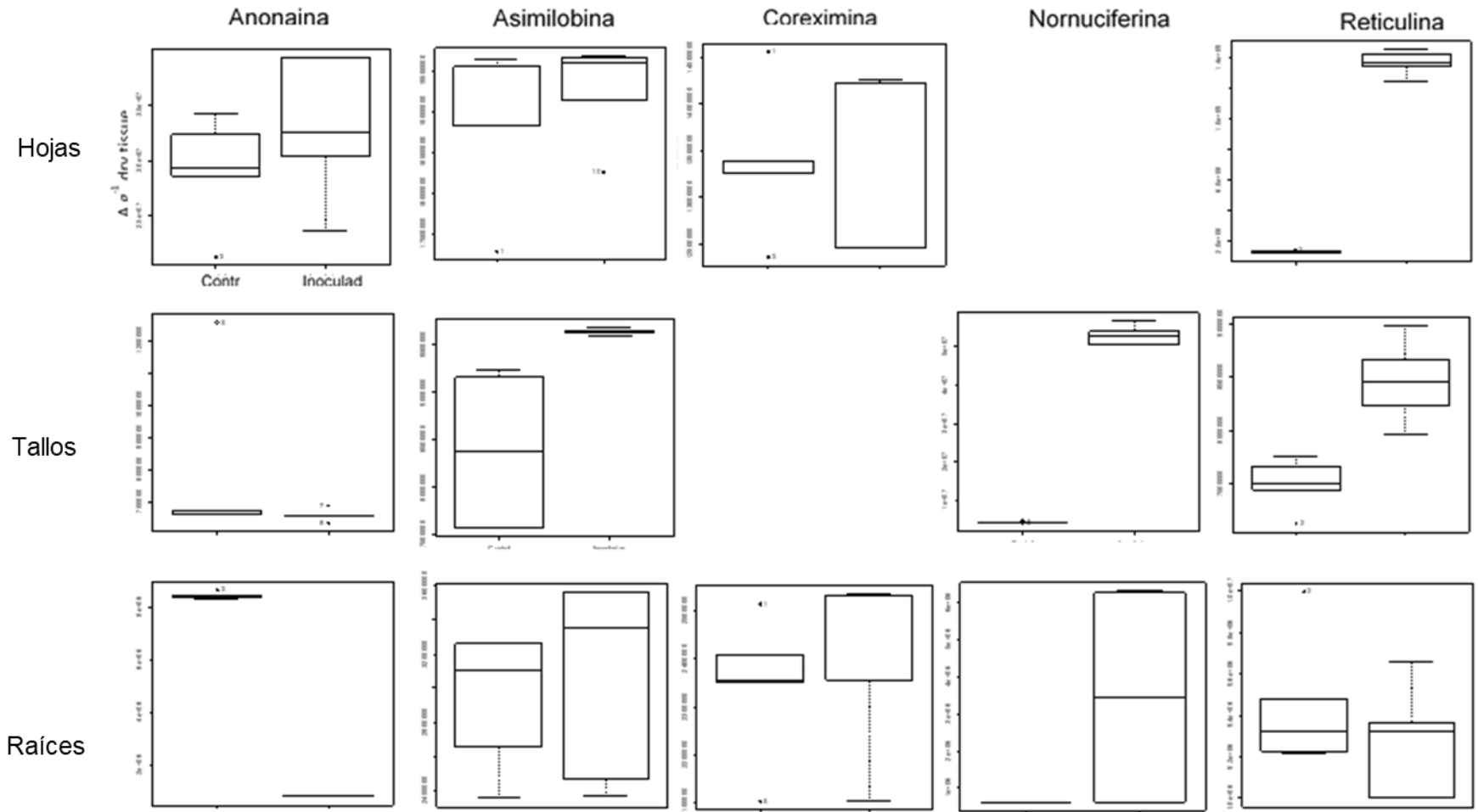


Fig 16. Respuesta de los alcaloides vs *C. gloeosporioides*

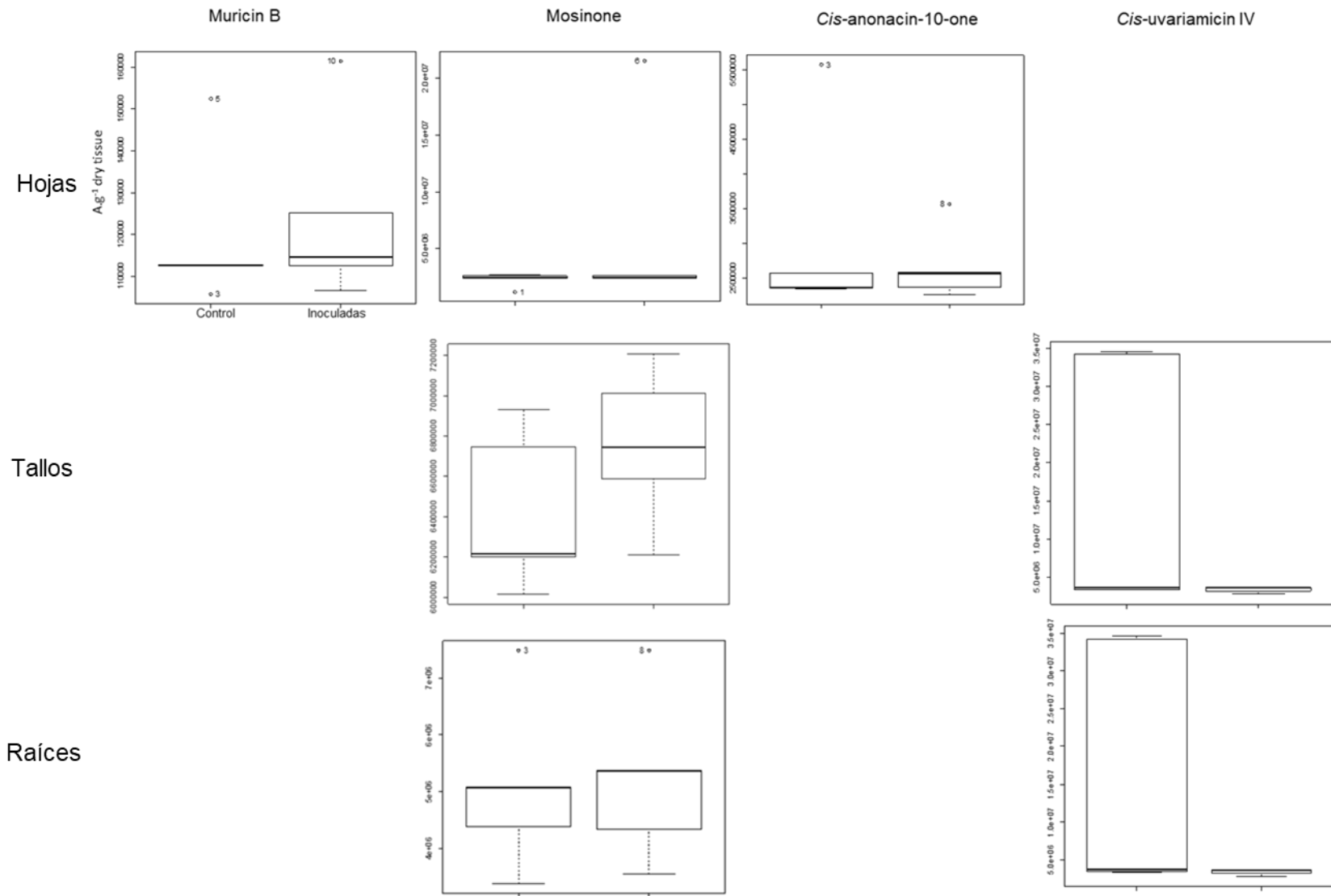


Fig 17 . Respuesta de las acetogeninas vs *R. stolonifer*

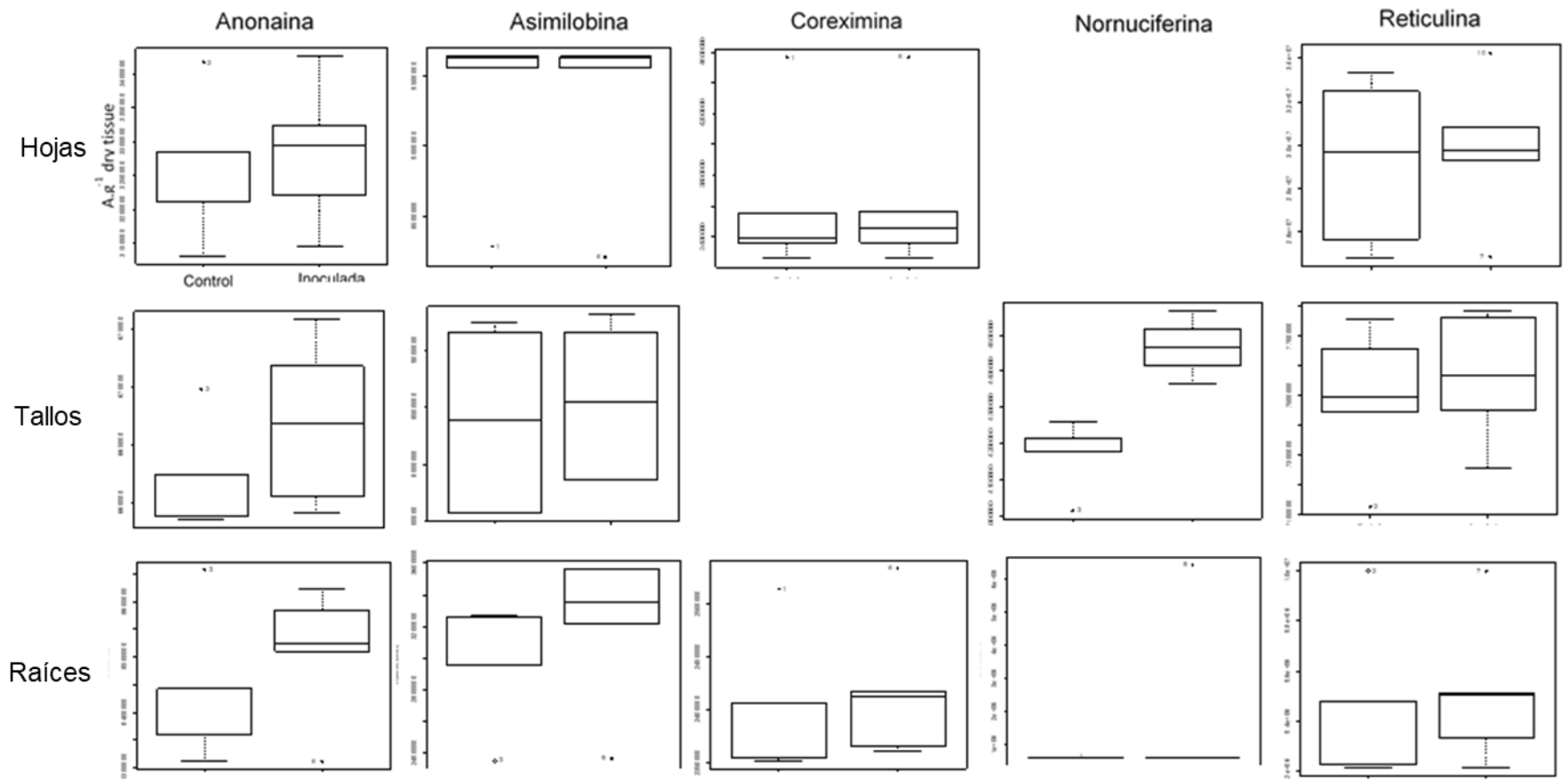


Fig 18. Respuesta de los alcaloides vs *R. stolonifer*

6.4 Objetivo 4. Actividad antifúngica *in vitro* de extractos orgánicos y alcaloidales frente a *Colletotrichum gloeosporioides* y *Rhizopus stolonifer*

Introducción

Annona muricata (guanábana), frecuentemente es infectada por *Colletotrichum gloeosporioides* agente causal de la antracnosis, su presencia se caracteriza por la aparición de manchas oscuras en las hojas, flores y pedúnculos, además este hongo causa la pudrición negra en todas las etapas de desarrollo de los frutos (Aguilar, 2010; MAG, 2011); otro patógeno importante de la guanábana es *Rhizopus stolonifer* que causa la podredumbre blanda o acuosa de frutos, (enfermedad poscosecha) y podredumbre de raíces (Nishijima *et al.*, 1990; Qing y Shipin, 2000; Rondón y Rondón, 2009). No obstante la susceptibilidad a la infección o a la enfermedad esta pudiera estar atenuada por las acetogeninas y alcaloides que *A. muricata* produce y que han sido reportados con actividad insecticida y larvicida (Lebouef *et al.*, 1982; Cave *et al.*, 1997; Alali *et al.*, 1999); las plantas adultas de esta especie también biosintetizan alcaloides y acetogeninas (Lebouef *et al.*, 1982, Cavé *et al.*, 1987; Philipov *et al.*, 1994; Hasrat *et al.*, 1999a; Lanazed *et al.*, 2002; Riley *et al.*, 2017) y de las cuales se ha reportado actividades biológicas. Uno de los primeros pasos para conocer si este grupo de moléculas están o no vinculadas con los mecanismos de defensa frente a fitopatógenos es la evaluación *in vitro* de la actividad de sus órganos frente a estos fitopatógenos, por lo que la presente investigación tuvo como objetivo determinar la actividad de extractos alcaloidales, hexánicos y metanólicos de raíces, tallos y hojas de plántulas con seis hojas de *A. muricata* sobre *C. gloeosporioides* y *R. stolonifer* bajo la perspectiva de que algunos metabolitos secundarios producidos por *A. muricata* pueden ser parte del mecanismo de defensa.

Material y métodos

Extractos

Para el análisis antifúngico *in vitro* se usaron los extractos obtenidos de plántulas según el método citado en el apartado 6.3 (pág. 73-74).

Ensayo antifúngico *in vitro* con extractos orgánicos y alcaloidales

La determinación de la actividad antifúngica de extractos hexánicos, metanólicos (orgánicos) y alcaloidales frente a *Colletotrichum gloeosporioides* y *Rhizopus stolonifer*, se realizó mediante el método de inhibición del crecimiento micelial (IHCR) de acuerdo a Amini & Sidovich (2010), el cual consistió en mezclar 250 µg/mL de cada extracto en agar de dextrosa y papa (PDA por sus siglas en inglés) el extracto hexánico fue disuelto en DMSO (dimetil sulfóxido), mientras que los metanólicos y alcaloidales fueron disueltos en metanol sin sobrepasar el 2.5 % del volumen final en agar. Después de 48 horas de prueba de esterilidad, se colocaron discos de 5 mm de diámetro del micelio de cada hongo en PDA y se registró la actividad hasta que testigo alcanzó a cubrir la superficie del agar (5 cm de diámetro). La determinación de la actividad se realizó por quintuplicado y se expresó en porcentaje de inhibición de acuerdo a la fórmula de Pandey *et al.*, (1982) citado en Amini & Sidovich (2010).

$$\% \text{ de inhibición} = \left[\frac{(D_c - D_t)}{D_c} \right] \times 100$$

Dónde: D_c = es el diámetro del crecimiento en el medio sin extracto; y D_t = diámetro del crecimiento en el medio con extractos o fungicida estándar.

Análisis estadístico

Todas las evaluaciones se realizaron por quintuplicado y se analizaron los resultados mediante un análisis de varianza con el 95 % de confiabilidad. Se separaron en grupos para determinar las diferencias entre los extractos. Todos los análisis se realizaron con el programa estadístico computacional R y Past, ambos de uso libre.

Resultados

Se obtuvieron nueve extractos, (3 órganos y 3 polaridades) diferentes. los extractos de mayor polaridad (metánolicos) y menor polaridad (hexánicos) fueron más abundantes (Cuadro 10).

Cuadro 10. Rendimientos de los extractos orgánicos y alcaloidales obtenidos de plántulas de *A. muricata*.

Órgano	Rendimiento (mg/gv)		
	Hexánico	Alcaloidal	Metanólico
Raíces	1.867	0.9079	1.900
Tallos	1.956	0.8907	1.998
Hojas	1.500	1.201	2.010

Actividad sobre *Colletotrichum gloeosporioides*.

Dos de los extractos evaluados inhibieron el crecimiento micelial de *C. gloeosporioides* (Cuadro 11), se observaron diferencias entre los órganos y entre el tipo de extracto, la mayor actividad fue desarrollada por las hojas tanto del extracto alcaloidal como del metanólico con una inhibición de 71 y 79.4 % respectivamente ($P \leq 0.05$), seguida por los extractos de tallos (41.6 y 51 %) y raíces (39.3 y 29 %) ($P \geq 0.05$). Puede relativizarse que la actividad de las hojas supera hasta dos veces la de las raíces. Los extractos metanólicos son más activos ($P \leq 0.05$) que los alcaloidales en los tallos y las hojas mientras que en las raíces ocurre lo contrario

Cuadro 11. Actividad de los extractos (% de inhibición) sobre *C. gloeosporioides*.

Extracto	Órgano		
	Raíces	Tallos	Hojas
Alcaloidal	39.3 ±1.1 Ac	41.6±1.1 Bb	71±1.7 Ba
Metanólico	29±1.5 Bc	51±1.7 Ab	79.4±1.8 Aa
Hexánico	-	-	-

Valores con distinta letra indican diferencias significativas. Las mayúsculas diferencias entre los extractos (columna) y las minúsculas entre órganos (filas)

Actividad de extractos sobre *R. stolonifer*

La actividad de los extractos alcaloidales y metanólicos sobre este fitopatógeno fue más potente que sobre *C. gloeosporioides*, las raíces fueron los órganos más activos, siendo el extracto metanólico el de mayor potencia (98%) ($P \leq 0.05$), en los tallos el extracto alcaloidal fue el más activo (87.2 %) ($P \leq 0.05$) y en las hojas hubo una inhibición del 79.7 %.

Una comparación entre todos los extractos indica que las raíces son las más activas ($P \leq 0.05$), seguidas de los tallos y hojas en sentido inverso al efecto visto sobre *C. gloeosporioides*

Cuadro 11. Actividad de los extractos (% de inhibición) sobre *R. stolonifer*

Extracto	Órgano		
	Raíces	Tallos	Hojas
Alcaloidal	91.8±1.6 Ba	87.2±1 Ab	71±1.7 Bc
Metanólico	98±1.1 Aa	82.6±2.3 Bb	79.7±1.5 Ac
Hexánico	-	-	-

Valores con distinta letra indican diferencias significativas. Las mayúsculas indican diferencias entre los extractos (columna) y las minúsculas entre órganos (filas)

Discusión

La actividad de los extractos metanólicos fue mayor ($P \leq 0.05$) tanto para *C. gloeosporioides* como para *R. stolonifer*, tal diferencia señala que en el extracto metanólico existen otros compuestos diferentes a los alcaloides que pudieran tener efecto sobre los hongos. Se ha reportado la inhibición del crecimiento micelial de *C. gloeosporioides* con extractos metanólicos de otras especies de plantas; Barrera *et al* (2002) reportaron la inhibición del 90 % del crecimiento micelial de este hongo con extractos metanólicos de semillas de *Pithecellobium dulce* a 5 mg/mL, los cuales contenían diversas saponinas triterpénicas. Igualmente, Bautista *et al* (2002) señalaron la actividad de extractos metanólicos de hojas y tallos de *Annona reticulata* sobre este patógeno con una inhibición de (22.5 y 27.5 % respectivamente) a 5 mg/mL, mientras que *R. stolonifer* fue inhibido por extractos metanólicos de hojas de *Cestrum nocturnum* con una actividad de 18 y 62 % a concentraciones de 5 y 10 mg/mL respectivamente (Barrera *et al.*, 2008). Al parecer la

actividad mostrada por los extractos metanólicos de *A. muricata* sobre estos hongos es mayor ya que en una concentración menor (100 ug/mL) se inhibe el crecimiento micelial de *C. gloeosporioides* y *R. stolonifer*. La actividad de extractos alcaloidales de otras especies sobre estos patógenos no ha sido reportada. En este estudio, siempre independientemente del órgano hubo una inhibición que alcanzo hasta 92 % en *R. stolonifer*.

En general, todos los órganos, con uno u otro extracto, tuvieron actividad sobre estos hongos patógenos lo que hace suponer que *A. muricata* produce una o varios compuestos de forma constitutiva que se distribuyen en toda la planta o bien que en cada órgano hay la presencia de compuestos con actividad antifúngica. Con ambos hongos se observa una correlación entre la actividad antifúngica y el órgano que comúnmente es afectado por el patógenos, las hojas son frecuentemente invadidas por *C. gloeosporioides*; igualmente las raíces son habitualmente infectadas por *R. stolonifer*. La actividad antifúngica observada parece estar acorde con la presencia de metabolitos secundarios como alcaloides y las acetogeninas (Riley-Saldaña *et al.*, 2017). No se han encontrado reportes sobre la actividad antifúngica de estas acetogeninas y alcaloides sobre hongos fitopatógenos. Los alcaloides han sido reportados con actividades antimicrobianas, antivirales y antioxidantes (Boulogne *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2013; Soares *et al.*, 2015 Costa *et al.*, 2017), mientras que las acetogeninas sólo *cis*-anonacin-10-one ha sido reportada con actividad insecticida sobre larvas de *Spodoptera frugiperda* (Blessin *et al.*, 2010). Cabe destacar que en plántulas con 6 hojas *Colletotrichum gloeosporioides* y *Rhizopus stolonifer* también indujeron la producción de metabolitos secundarios. Se pudo observar la dinámica del perfil químico tanto de alcaloides como de acetogeninas, particularmente una de una de las cuatro acetogeninas (muricina B) respondió a la inducción (incremento del 20 %) cuando las plántulas fueron expuestas a *C. gloeosporioides*, sin embargo, no se observó actividad antifúngica de extractos hexánicos en donde se encuentran este tipo de moléculas, mientras los extractos alcaloidales y metanólicos fueron los más potentes, durante la inducción se observó un incremento en cuatro de los cinco alcaloides detectados (asimilobina, anonaina, reticulina, nornuciferina) en respuesta a *C. gloeosporioides*, estas moléculas tienen una biosíntesis muy temprana la mayoría de ellos cuando la radícula apenas alcanza 1 cm de longitud.

Conclusión

La actividad antifúngica de los extractos alcaloidales y metanolicos, la premura de la biosíntesis y el incremento en las concentraciones de estos cuando las plantas son inoculadas, pueden sugerir que este grupo de metabolitos especializados están vinculados con los mecanismos de defensa frente a por lo menos estos dos hongos en *Annona muricata*.

6.5 Determinar si los extractos de plántulas inducidas con *C. gloeosporioides* y *R. stolonifer* incrementan la actividad antifúngica *in vitro* sobre *C. gloeosporioides* y *R. stolonifer*

Método

Los extractos para esta evaluación fueron los obtenidos de las plantas inducidas por fitopatógenos, el método para la inoculación de plántulas y evaluación de la actividad antifúngica de los extractos esta detallado en el apartado 6.3 y 6.4 (pág 71, 86).

Resultados

En todos los casos analizados los extractos hexánicos fueron inactivos.

Actividad de plántulas inducidas con *C. gloeosporioides*.

a) Sobre *C. gloeosporioides*

De los extractos alcaloidales, el de hojas fue el más potente (79.6 %) ($P \leq 0.05$), seguidos de los tallos y las raíces (Cuadro 12). La actividad antifúngica mostrada por los extractos alcaloidales de las hojas de plántulas inoculadas con *C. gloeosporioides* y evaluadas con el mismo patógeno se incrementó 1.1 veces en comparación con los extractos de hojas de plántulas sanas, mientras que la actividad de los extractos de los tallos se incrementa 1.5 veces, las raíces conservan su potencia, en ambos tipos de extractos (inoculadas y sanas) las hojas son las más activas seguida de los tallos y las raíces (Cuadro 12).

Cuadro 12. Actividad de los extractos (%) de plántulas inducidas con *C. gloeosporioides* sobre *C. gloeosporioides*

Extracto	Órgano					
	Raíces		Tallos		Hojas	
	Sin inducir	Inducidas	Sin inducir	Inducidas	Sin inducir	Inducidas
Hexánico	0	0	0	0	0	0
Alcaloidal	39.3 ± 1.1	39.0 ± 0.5 C	41.6 ± 1.1	64.3 ± 1.2 B	71 ± 1.7	80.0 ± 2A

b) Sobre *R. stolonifer*.

Los extractos alcaloidales mostraron diferencias significativas entre los órganos (Cuadro 13), no obstante, los de hojas de plántulas inducidas son mayores que los de las sin inducir, no así para el caso de los tallos y las raíces en donde fueron mayores en plantas testigo.

Cuadro 13. Actividad de los extractos (%) de plántulas inducidas con *C. gloeosporioides* sobre *R. stolonifer*

Extracto	Órgano					
	Raíces		Tallos		Hojas	
	Sin inocular	Inoculadas	Sin inocular	Inoculadas	Sin inocular	inoculadas
Hexánico	0	0	0	0	0	0
Alcaloidal	91.8±1.6	81±5 A	87.2±1	85.5±4 A	71±1.7	80±6A

Actividad de Plántulas inducidas con *R. stolonifer*.

a) Sobre *C. gloeosporioides*.

Los extractos alcaloidales muestran una actividad sobresaliente con respecto a este hongo observando que la actividad de extractos de los tallos y de las raíces se incrementan 1.9 y 2.1 veces respectivamente (Cuadro 14), mientras que las hojas 1.2 veces más.

Cuadro 14. Actividad de los extractos (%) de plántulas inducida con *R. stolonifer* sobre *C. gloeosporioides*

Extracto	Órganos					
	Raíces		Tallos		Hojas	
	Sin inducir	Inducidas	Sin inducir	Inducidas	Sin inducir	Inducidas
Hexánicos	0	0	0	0	0	0
Alcaloides	39.3 ± 1.1	82.9 ±2 B	41.6± 1.1	81.3±2 B	71±1.7	89.8 ±1.1A

Actividad de plántulas inducidas con *R. stolonifer*.

a) *R. stolonifer*.

Los extractos alcaloidales presentaron actividad potente sobre *R. stolonifer*, no se observó diferencias significativas entre los órganos (Cuadro 14), la actividad de estos extractos es mayor que la actividad mostrada por los extractos de plántulas sanas (Cuadro 15)

Cuadro 15. Actividad de los extractos (%) de plántulas inoculadas con *R. stolonifer* sobre *R. stolonifer*

Extracto	Órgano					
	Raíces		Tallos		Hojas	
	Sin inocular	inoculadas	Sin inocular	inoculadas	Sin inocular	inoculadas
Hexánicos	0	0	0	0	0	0
Alcaloides	91.8±1.6	100 ±1.1A	87.2±1	100 ±1.1 A	71±1.7	97.77±1.1 A

Discusión

Los extractos hexánicos, en los cuales se encuentran las acetogeninas fueron inactivos tanto para extractos de plántulas inducidas con *C. gloeosporioides* como para las plántulas inducidas con *R. stolonifer*, las acetogeninas no han sido reportadas como moléculas con potencial antifúngico, sus actividades son señaladas como antiparasitarias, citotóxicas, antitumorales, antialimentarias (Wu *et al.*, 1995, Zeng *et al.*, 1996 Jaramillo *et al.*, 2000, Champy *et al.*, 2004; Blessin *et al.*, 2010), con los resultados obtenidos de la actividad antifúngica de estos extractos y los observados en la respuesta de estas moléculas en la inducción, se podría señalar que al parecer las acetogeninas encontradas no están vinculadas al mecanismo de defensa de la planta por lo menos para estos dos patógenos, si bien estas moléculas presentes en *A. muricata* tienen una biosíntesis temprana (Riley-Saldaña *et al.*, 2017) no se encuentran relacionadas con la defensa antifúngica, quizás su posible función se encuentre vinculado a la herviboría como ha sido reportado por González-Coloma *et al.*, 2002 u a otras funciones dentro de la planta.

Los extractos alcaloidales de todos los órganos de las plántulas mostraron potente actividad antifúngica, observándose en general una mayor actividad con las plántulas que fueron inducidas con las esporas de los hongos. Las hojas incrementaron 1.1 veces su actividad sobre *C. gloeosporioides* y *R. stolonifer*, en los tallos hubo un incremento de 1.5 veces sobre *C. gloeosporioides*, mientras que *R. stolonifer* no hubo variación, las raíces no

incrementan su actividad sobre *C. gloeosporioides*, mientras que para *R. stolonifer* fueron más activos los extractos de plántulas sin inocular.

Los extractos alcaloidales de todos los órganos obtenidos con *R. stolonifer* tuvieron una mayor inhibición sobre *C. gloeosporioides*, la actividad de las hojas se potencia 1.2 veces, los tallos 1.9 veces, mientras que las raíces su incremento fue de 2.1 veces con respecto a plántulas sanas o sin inocular, la mayor actividad antifúngica observada sobre *R. stolonifer* tuvo lugar en las hojas 1.3 veces.

La actividad antifúngica se incrementó en los órganos que fueron infectados por los hongos, siendo *C. gloeosporioides* más sensible a los extractos que fueron inoculados con *R. stolonifer*, mostrando que la planta cuando es atacada, en este caso por un hongo, responde con moléculas de defensa hacia otros hongos.

Al parecer, el incremento en la potencia de los extractos alcaloidales puede deberse a la presencia e incremento del alcaloide nornuciferina hasta de 1200 veces con *C. gloeosporioides* y 10 veces con *R. stolonifer*. Para corroborar si este alcaloide es, de alguna forma, responsable de dicha actividad habría que realizar el aislamiento y evaluación antifúngica *in vitro* e *in vivo*. Hasta ahora esta molécula no ha sido evaluada con respecto al potencial antifungico sobre hongos fitopatógenos.

VII. CONCLUSIÓN.

Tanto los estados de desarrollo de los organismos como el ambiente modulan la expresión genética que suele ser diferencial y de gran plasticidad, lo que resulta en una diversidad de metabolitos secundarios, que, en una especie en particular, pueden estar restringidos a estados específicos de desarrollo, es decir depender de una fase en la que están involucrados el tiempo, órganos y células especializadas, o también, estar presentes durante todo el desarrollo.

En *Annona muricata*, la biosíntesis de alcaloides y acetogeninas fue detectada desde la germinación, dependiendo en ambos casos primero del material de reserva de las semillas y después, en las etapas de plántula y adultos, del proceso fotosintético, hechos que implican un metabolismo secundario activo desde el inicio de la vida de la planta. También se pudo documentar que la biosíntesis o acumulación en órganos de estas moléculas es variable, con condiciones espacio-temporales diferentes, que no influyen mayormente sobre la expresión de ambas clases de metabolitos.

El metabolismo secundario también responde a la interacción de las plantas con el ambiente biótico o abiótico, estableciendo redes de comunicación, que son sensibles tanto a diferentes tipos de estrés, como a la deficiencia de nutrientes y agua, a las diferentes intensidades de luz, o a las interacciones con microorganismos, herbívoros y animales. No obstante que los árboles de *A. muricata* producen una diversidad de moléculas con actividad biológica son frecuentemente atacados por hongos que producen enfermedades comunes en las plantaciones comerciales. Entre estos se encuentran *C. gloeosporioides* que provoca la antracnosis y *R. stolonifer* que responsable de la pudrición de raíces y semillas de la especie. Sin embargo y acorde con la teoría de la defensa optima (Fenny, 1975, 1976; Rhoades y Cates, 1976) es factible que *A. muricata* pueda incrementar o diversificar la producción de alcaloides y acetogeninas como respuesta al establecimiento de estos dos hongos en su superficie.

En plántulas control como en las inoculadas con *C. gloeosporioides* se detectaron las acetogeninas: *cis*-uvariamicina IV, muricina B, *cis*-anonacina-10-one y muricina B, siendo esta última la única que responde a la inoculación y los alcaloides: asimilobina, nornuciferina, annonaina, reticulina y coreximina, teniendo la nornuciferina el mayor incremento tras la inoculación. En tanto que las plántulas inoculadas con *R. stolonifer* no mostraron variaciones

con relación a las acetogeninas y sólo el alcaloide nornuciferina tuvo un leve incremento. Se descubrió que *C. gloeosporioides* induce una respuesta más plástica del perfil alcaloidal que *R. stolonifer*, ya que casi todos los alcaloides se modificaron, en tanto que de todas las acetogeninas, sólo cambia la muricina B.

Nuestros datos señalan que los alcaloides y más que las acetogeninas son las moléculas que se inducen por el ataque de estos fitopatógenos, que existe una especificidad de respuesta siendo mayor con *C. gloeosporioides* que habitualmente produce la antracnosis de las anonas.

De las plántulas previamente inoculadas con los dos hongos, se obtuvieron extractos hexánicos y alcaloidales que se probaron frente a ambos fitopatógenos, los extractos acetogénicos no tuvieron actividad, mientras que los alcaloidales sí, encontrando que plántulas previamente infectadas con *C. gloeosporioides* contra la misma cepa de hongos, incrementan hasta 1.5 veces su actividad, en tanto que frente a *R. stolonifer* no hubo diferencias significativas. Las plántulas previamente infectadas con *R. stolonifer* solo tuvieron diferencias significativas, frente a *C. gloeosporioides* incrementado su actividad hasta 2.1%. Esto pareciera indicar, en las condiciones analizadas, que un ataque previo de un fitopatógeno incrementa la actividad antifúngica de las plántulas, siendo *R. stolonifer* el hongo que “despierta” más el metabolismo alcaloidal de plántulas de *A. muricata*.

Finalmente, los metabolitos encontrados, son parte del perfil constitutivo de la especie, sin embargo, algunos de ellos son inducibles por los fitopatógenos, de ahí que pudieran ser el resultado de cambios biosintéticos implicados en el o los mecanismos de defensa de *A. muricata*.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abraham, K. J., Daniel, M., & Sabnis, S. D. (1988). Phytoalexins of *Cassia fistula* Linn. and *Morinda tomentosa* Heyne. *National Academy Science Letters*, 11(4), 101-102.
- Agostini, J. P., & Timmer, L. W. (1992). Selective isolation procedures for differentiation of two strains of *Colletotrichum gloeosporioides* from citrus. *Plant disease*.
- Agrios, G. N. (2005). Introduction to plant pathology. *Elsevier Academic Press Publication*.
- Aguilar-Méndez, M. A., San Martín-Martínez, E., Ortega-Arroyo, L., Cobián-Portillo, G., & Sánchez-Espíndola, E. (2011). Synthesis and characterization of silver nanoparticles: effect on phytopathogen *Colletotrichum gloeosporioides*. *Journal of Nanoparticle Research*, 13(6), 2525-2532.
- Ahammadsahib, K. I., Hollingworth, R. M., McGovren, J. P., Hui, Y. H., & McLaughlin, J. L. (1993). Mode of action of bullatacin: a potent antitumor and pesticidal annonaceous acetogenin. *Life Sciences*, 53(14), 1113-1120.
- Alali, F. Q., Liu, X. X., & McLaughlin, J. L. (1999). Annonaceous acetogenins: recent progress. *Journal of Natural products*, 62(3), 504-540.
- Alcantara, J., Bird, D. A., Franceschi, V. R., & Facchini, P. J. (2005). Sanguinarine biosynthesis is associated with the endoplasmic reticulum in cultured opium poppy cells after elicitor treatment. *Plant physiology*, 138(1), 173-183.
- Alcerito, T., Barbo, F. E., Negri, G., Santos, D. Y., Meda, C. I., Young, M. C. M., & Blatt, C. T. (2002). Foliar epicuticular wax of *Arrabidaea brachypoda*: flavonoids and antifungal activity. *Biochemical Systematics and Ecology*, 30(7), 677-683.
- Alla, M. A., El-Sayed, H. Z., & Riad, S. (2008). Control of *Rhizopus* rot disease of apricot fruits (*Prunus armeniaca* L.) by some plant volatiles aldehydes. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 4(5), 424-433.
- Álvarez, E., Ospina, C. A., Mejía De Los Ríos, J. F., & Llano, G. A. (2004). Caracterización morfológica, patogénica y genética del agente causal de la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*) en guanábana (*Annona muricata*) en el Valle del Cauca.
- Amini, J., & Sidovich, D. (2010). The effects of fungicides on *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* associated with *Fusarium* wilt of tomato. *Journal of plant protection research*, 50(2), 172-178.
- Anaya, A. L. (2003). Ecología química. *Editorial Plaza y Valdés, México*.
- Antony, P., & Vijayan, R. (2016). Acetogenins from *Annona muricata* as potential inhibitors of antiapoptotic proteins: a molecular modeling study. *Drug design, development and therapy*, 10, 1399.
- Arcas, M. C., Botía, J. M., Ortuño, A. M., & Del Río, J. A. (2000). UV irradiation alters the levels of flavonoids involved in the defence mechanism of *Citrus aurantium* fruits against *Penicillium digitatum*. *European Journal of Plant Pathology*, 106(7), 617-622.
- Arrhenius, S. P., & Langenheim, J. H. (1983). Inhibitory effects of *Hymenaea* and *Copaifera* leaf resins on the leaf fungus, *Pestalotia subcuticularis*. *Biochemical systematics and ecology*, 11(4), 361-366.
- Baetz, U. (2016). Root Exudates as Integral Part of Belowground Plant Defence. In *Belowground Defence Strategies in Plants* (pp. 45-67). Springer International Publishing.
- Barkai-Golan, R. (2001). *Postharvest diseases of fruits and vegetables: development and control*. Elsevier.

- Barrera-Necha, L. L., & Bautista-Baños, S. (2008). Actividad Antifúngica de Polvos, Extractos y Fracciones de *Cestrum nocturnum* L. Sobre el Crecimiento Micelial de *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.: Fr.) Vuill. *Revista mexicana de fitopatología*, 26(1), 27-31.
- Barrera-Necha, L., Bautista-Baños, S., Bravo-Luna, L., Bermudez-Torres, K., Garcia-Suarez, F., Jimenez-Estrada, M., & Reyes-Chilpa, R. (2003). Antifungal activity against postharvest fungi by extracts and compounds of *Pithecellobium dulce* seeds (huamuchil). *Acta Horticulturae*, 2, 761-766.
- Bautista Baños, S., Barrera Necha, L. L., Bravo Luna, L., & Bermúdez Torres, K. (2002). Antifungal activity of leaf and stem extracts from various plant species on the incidence of *Colletotrichum gloeosporioides* of papaya and mango fruit after storage. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 20(1).
- Bautista-Baños, S., Bosquez-Molina, E., & Barrera-Necha, L. L. (2014). *Rhizopus stolonifer* (Soft rot). In *Postharvest decay* (pp. 1-44).
- Belkhadir, Y., Subramaniam, R., & Dangl, J. L. (2004). Plant disease resistance protein signaling: NBS–LRR proteins and their partners. *Current opinion in plant biology*, 7(4), 391-399.
- Bermejo, A., Figadere, B., Zafra-Polo, M. C., Barrachina, I., Estornell, E., & Cortes, D. (2005). Acetogenins from Annonaceae: recent progress in isolation, synthesis and mechanisms of action. *Natural Product Reports*, 22(2), 269-303.
- Blessing, L. D. T., Colom, O. Á., Popich, S., Neske, A., & Bardón, A. (2010). Antifeedant and toxic effects of acetogenins from *Annona montana* on *Spodoptera frugiperda*. *Journal of Pest Science*, 83(3), 307-310.
- Boué, S. M., Carter, C. H., Ehrlich, K. C., & Cleveland, T. E. (2000). Induction of the soybean phytoalexins coumestrol and glyceollin by *Aspergillus*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 48 (6), 2167-2172.
- Boulogne, I., Petit, P., Ozier-Lafontaine, H., Desfontaines, L., & Loranger-Merciris, G. (2012). Insecticidal and antifungal chemicals produced by plants: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 10(4), 325-347.
- Bowyer, P., Clarke, B. R., Lunness, P., Daniels, M. J., & Osbourn, A. E. (1995). Host range of a plant pathogenic fungus determined by a saponin detoxifying enzyme. *Science*, 267(5196), 371-374.
- Browne, L. M., Conn, K. L., Ayer, W. A., & Tewari, J. P. (1991). The camalexins: new phytoalexins produced in the leaves of *Camelina sativa* (Cruciferae). *Tetrahedron*, 47(24), 3909-3914..
- Browse, J. (2009). Jasmonate passes muster: a receptor and targets for the defense hormone. *Annual Review of Plant Biology*, 60, 183-205.
- Cannon, P. F., Bridge, P. D., & Monte, E. (2000). Linking the past, present and future of *Colletotrichum* systematics. *Colletotrichum: host specificity, pathology and host-pathogen interaction*, 1-20.
- Carlile, M. J., Watkinson, S. C., & Gooday, G. W. (1994). The fungi. Academic Press, London. *The fungi. Academic Press, London*.
- Cavé, A., Figadère, B., Laurens, A., Coretes, D., (1997). Acetogenins from Annonaceae. *Forsch-chem-org-Naturst.* 70:81-288.
- Cave, A., Leboeuf, M., & Waterman, P. G. (1987). The aporphinoid alkaloids of the Annonaceae. *Alkaloids: chemical and biological perspectives*, 5, 133-270.

- Champy, P., Höglinger, G. U., Féger, J., Gleye, C., Hocquemiller, R., Laurens, A., ... & Michel, P. P. (2004). Annonacin, a lipophilic inhibitor of mitochondrial complex I, induces nigral and striatal neurodegeneration in rats: possible relevance for atypical parkinsonism in Guadeloupe. *Journal of neurochemistry*, 88(1), 63-69.
- Chen, J., Gao, K., Liu, T., Zhao, H., Wang, J., Wu, H., ... & Wang, W. (2013). Aporphine Alkaloids: A Kind of Alkaloids' Extract Source, Chemical Constitution and Pharmacological Actions in Different Botany. *Asian Journal of Chemistry*, 25(18).
- Cline, S. D., & Coscia, C. J. (1988). Stimulation of sanguinarine production by combined fungal elicitation and hormonal deprivation in cell suspension cultures of *Papaver bracteatum*. *Plant physiology*, 86(1), 161-165.
- Conceição, L. F., Ferreres, F., Tavares, R. M., & Dias, A. C. (2006). Induction of phenolic compounds in *Hypericum perforatum* L. cells by *Colletotrichum gloeosporioides* elicitation. *Phytochemistry*, 67(2), 149-155.
- Conserva, L. M., Cynara de Araújo, B. P., & Barbosa-Filho, J. M. (2005). Alkaloids of the Hernandiaceae: Occurrence and a compilation of their biological activities. *The Alkaloids: Chemistry and Biology*, 62, 175-243.
- Costa, M. S., Santana, A. E., Oliveira, L. L., Zanuncio, J. C., & Serrão, J. E. (2017). Toxicity of squamocin on *Aedes aegypti* larvae, its predators and human cells. *Pest management science*, 73(3), 636-640.
- Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*, 12(4), 564-582.
- Daddiouaissa, D., & Amid, A. (2018). Anticancer Activity of Acetogenins from *Annona Muricata* Fruit. *International Medical Journal Malaysia*, 17(3).
- Dang, Q. L., Kim, W. K., Nguyen, C. M., Choi, Y. H., Choi, G. J., Jang, K. S., ... & Kim, J. C. (2011). Nematicidal and antifungal activities of annonaceous acetogenins from *Annona squamosa* against various plant pathogens. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(20), 11160-11167.
- Dangl, J. L., & Jones, J. D. (2001). Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *nature*, 411(6839), 826.
- De la Cruz Chacón, I., & González-Esquinca, A. R. (2012). Liriodenine alkaloid in *Annona diversifolia* during early development. *Natural product research*, 26(1), 42-49.
- De la Cruz-Chacón, I., González-Esquinca, A. R., Fefer, P. G., & Garcia, L. F. J. (2011). Liriodenine, early antimicrobial defence in *Annona diversifolia*. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 66(7-8), 377-384
- De Wit, P. J. (1997). Pathogen avirulence and plant resistance: a key role for recognition. *Trends in Plant Science*, 2(12), 452-458.
- Deng, Y., Li, J., Gao, C., & Yang, L. (2006). Inhibitory activity of the extract from the root tubers of *Stephania kwangsiensis* and its compounds against pathogenic fungi and bacteria. *Plant Protection*, 32(4), 43-46.
- Devi, M. C., & Reddy, M. N. (2002). Phenolic acid metabolism of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) plants inoculated with VAM fungus and *Rhizobium*. *Plant Growth Regulation*, 37(2), 151-156.
- Díaz Puentes, L. N. (2009). Interacciones moleculares entre plantas y microorganismos: saponinas como defensas químicas de las plantas y su tolerancia a los microorganismos. Una revisión. *RET. Revista de Estudios Transdisciplinarios*, 1(2).
- Dixon, R. A. (2001). Natural products and plant disease resistance. *Nature*, 411(6839), 843.

- Dudley, M. W., Dueber, M. T., & West, C. A. (1986). Biosynthesis of the macrocyclic diterpene casbene in castor bean (*Ricinus communis* L.) seedlings: changes in enzyme levels induced by fungal infection and intracellular localization of the pathway. *Plant physiology*, *81*(2), 335-342.
- Ebel, J. (1986). Phytoalexin synthesis: the biochemical analysis of the induction process. *Annual review of phytopathology*, *24*(1), 235-264.
- Egusa, M., Ochi, H., Tsuge, T., Otani, H., & Kodama, M. (2009). Identification of putative defense-related genes in Japanese pear against *Alternaria alternata* infection using suppression subtractive hybridization and expression analysis. *Journal of general plant pathology*, *75*(2), 119.
- Egydio, A. P. M., Valvassoura, T. A., & Santos, D. Y. A. (2013). Geographical variation of isoquinoline alkaloids of *Annona crassiflora* Mart. from cerrado, Brazil. *Biochemical systematics and ecology*, *46*, 145-151.
- Ellis, J., Dodds, P., Pryor, T. 2000a. Structure, function and evolution of plant disease resistance genes. *Current Opinion in Plant Biology*. 3:278-284.
- Ellis, J., Dodds, P., Pryor, T. 2000b. The generation of plant disease resistance gene specificities. *Trends Plant Science*. 5(9):373-379.
- Ellis, J. and Jones, D. 1998. Structure and function of proteins controlling strain-specific pathogen resistance in plants. *Current Opinion in Plant Biology*. 1:288-293.
- Flor, H. H. (1942). Inheritance of pathogenicity in *Melampsora lini*. *Phytopathology*, *32*, 653-669.
- Flor, H. H. (1955). Host-parasite interactions in flax rust-its genetics and other implications. *Phytopathology*, *45*, 680-685.
- Friedman, M. (2002). Tomato glycoalkaloids: role in the plant and in the diet. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*(21), 5751-5780.
- Gabriel, D. W., & Rolfe, B. G. (1990). Working models of specific recognition in plant-microbe interactions. *Annual review of phytopathology*, *28*(1), 365-391.
- Gao, H. and Bhattacharyya M. K. (2008). The soybean-*Phytophthora* resistance locus Rps1-k encompasses coiled coil-nucleotide binding leucine rich repeat-like genes and repetitive sequences. *Plant Biology* 8:29-42.
- García Mateo, R., Soto Hernández, M., Zavala Chávez, F., & Kite, G. (2007). Quinolizidine alkaloids in *Calia secundiflora* (Fabaceae). *Agrociencia*, *41*(2).
- Gilbert, G. S., & Parker, I. M. (2010). Rapid evolution in a plant-pathogen interaction and the consequences for introduced host species. *Evolutionary Applications*, *3*(2), 144-156
- Glazebrook, J., Zook, M., Mert, F., Kagan, I., Rogers, E. E., Crute, I. R., ... & Ausubel, F. M. (1997). Phytoalexin-deficient mutants of *Arabidopsis* reveal that PAD4 encodes a regulatory factor and that four PAD genes contribute to downy mildew resistance. *Genetics*, *146*(1), 381-392.
- González-Coloma, A., Guadano, A., de Inés, C., Martínez-Díaz, R., & Cortes, D. (2002). Selective action of acetogenin mitochondrial complex I inhibitors. *Zeitschrift für Naturforschung C*, *57*(11-12), 1028-1034.
- González-Esquinca, A. R., De-La-Cruz-Chacón, I., Castro-Moreno, M., Orozco-Castillo, J. A., & Riley-Saldaña, C. A. (2014). Alkaloids and acetogenins in Annonaceae development: biological considerations. *Revista Brasileira de Fruticultura*, *36*(SPE1), 01-16.
- Grainge, M., & Ahmed, S. (1988). *Handbook of plants with pest-control properties*. John Wiley & Sons Limited. 470p.

- Grayer, R. J., & Harborne, J. B. (1994). A survey of antifungal compounds from higher plants, 1982–1993. *Phytochemistry*, 37(1), 19-42.
- Hahlbrock, K., Bednarek, P., Ciolkowski, I., Hamberger, B., Heise, A., Liedgens, H., ... & Tan, J. (2003). Non-self recognition, transcriptional reprogramming, and secondary metabolite accumulation during plant/pathogen interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(suppl 2), 14569-14576
- Hain, R., Reif, H. J., Krause, E., Langebartels, R., Kindl, H., Vornam, B., ... & Stenzel, K. (1993). Disease resistance results from foreign phytoalexin expression in a novel plant. *Nature*, 361(6408), 153.
- Halverson, L. J., & Stacey, G. (1986). Signal exchange in plant-microbe interactions. *Microbiological Reviews*, 50(2), 193.
- Hammerschmidt, R. (1999). Phytoalexins: what have we learned after 60 years?. *Annual review of phytopathology*, 37(1), 285-306.
- Hasrat, J. A., De Bruyne, T., DE BACKER, J. P., Vauquelin, G., & Vlietinck, A. J. (1997). Isoquinoline derivatives isolated from the fruit of *Annona muricata* as 5-HTergic 5-HT1A receptor agonists in rats: unexploited antidepressive (lead) products. *Journal of pharmacy and pharmacology*, 49(11), 1145-1149 (a).
- Hasrat, J. A., Pieters, L., De Backer, J. P., Vauquelin, G., & Vlietinck, A. J. (1997). Screening of medicinal plants from Suriname for 5-HT1A ligands: bioactive isoquinoline alkaloids from the fruit of *Annona muricata*. *Phytomedicine*, 4(2), 133-140 (b).
- Heath, M. C. (2000). Hypersensitive response-related death. In *Programmed cell death in higher plants* (pp. 77-90). Springer, Dordrecht.
- Hernández-Lauzardo, A. N., Bautista-Baños, S., Velázquez-del Valle, M. G., & Trejo-Espino, J. L. (2006). Identification of *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.: Fr.) Vuill., causal agent of *Rhizopus rot* disease of fruits and vegetables. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 24(1).
- Herrera-Arellano, A., de los Angeles Martínez-Rivera, M., Hernández-Cruz, M., López-Villegas, E. O., Rodríguez-Tovar, A. V., Alvarez, L., & Tortoriello, J. (2007). Mycological and electron microscopic study of *Solanum chrysotrichum* saponin SC-2 antifungal activity on *Candida* species of medical significance. *Planta medica*, 73(15), 1568-1573.
- Huang, L. D., & Backhouse, D. (2005). Induction of defence responses in roots and mesocotyls of sorghum seedlings by inoculation with *Fusarium thapsinum* and *F. proliferatum*, wounding and light. *Journal of phytopathology*, 153(9), 522-529.
- Hufford, C. D., Sharma, A. S., & Oguntimein, B. O. (1980). Antibacterial and antifungal activity of liriodenine and related oxoaporphine alkaloids. *Journal of pharmaceutical sciences*, 69(10), 1180-1183.
- Hughes, H. B., Morrissey, J. P., & Osbourn, A. E. (2004). Characterisation of the saponin hydrolysing enzyme avenacoside- α -L-rhamnosidase from the fungal pathogen of cereals, *Stagonospora avenae*. *European journal of plant pathology*, 110(4), 421-427.
- Ito, S. I., Ihara, T., Tamura, H., Tanaka, S., Ikeda, T., Kajihara, H., & El-Sayed, M. A. (2007). α -Tomatine, the major saponin in tomato, induces programmed cell death mediated by reactive oxygen species in the fungal pathogen *Fusarium oxysporum*. *FEBS letters*, 581(17), 3217-3222.

- Jaramillo, M. C., Arango, G. J., González, M. C., Robledo, S. M., & Velez, I. D. (2000). Cytotoxicity and antileishmanial activity of *Annona muricata* pericarp. *Fitoterapia*, 71(2), 183-186.
- Kaplan, I., Halitschke, R., Kessler, A., Sardanelli, S., & Denno, R. F. (2008). Constitutive and induced defenses to herbivory in above-and belowground plant tissues. *Ecology*, 89(2), 392-406.
- Karunanayake, L. C., Adikaram, N., Kumarihamy, B. M., Bandara, B. R., & Abayasekara, C. (2011). Role of antifungal gallotannins, resorcinols and chitinases in the constitutive defence of immature mango (*Mangifera indica* L.) against *Colletotrichum gloeosporioides*. *Journal of Phytopathology*, 159(10), 657-664.
- Khan, M. R., Kihara, M., & Omoloso, A. D. (2002). Antimicrobial activity of *Michelia champaca*. *Fitoterapia*, 73(7-8), 744-748.
- Kim, G. S., Zeng, L., Alali, F., Rogers, L. L., Wu, F. E., McLaughlin, J. L., & Sastrodihardjo, S. (1998). Two new mono-tetrahydrofuran ring acetogenins, anomuricin E and muricapentocin, from the leaves of *Annona muricata*. *Journal of Natural Products*, 61(4), 432-436.
- Kim, J. J., Ben-Yehoshua, S., Shapiro, B., Henis, Y., & Carmeli, S. (1991). Accumulation of scoparone in heat-treated lemon fruit inoculated with *Penicillium digitatum* Sacc. *Plant Physiology*, 97(3), 880-885.
- Klessig, D. F. (1994). Salicylic acid, active oxygen species and systemic acquired resistance in plants. *Trends in cell biology*, 4(9), 334-338.
- Knobloch, K., Pauli, A., Iberl, B., Weigand, H., & Weis, N. (1989). Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. *Journal of Essential Oil Research*, 1(3), 119-128.
- Kunkel B.N., Bent A.F., Dahlbeck D., Innes R.W. and Staskawicz B.J., (1993). RPS2, an *Arabidopsis* disease resistance locus specifying recognition of *Pseudomonas syringae* strains expressing the avirulence gene *avrRpt2*. *Plant Cell*, 5, 865-75.
- Lannuzel, A., Michel, P. P., Caparros-Lefebvre, D., Abaul, J., Hocquemiller, R., & Ruberg, M. (2002). Toxicity of Annonaceae for dopaminergic neurons: potential role in atypical parkinsonism in Guadeloupe. *Movement Disorders*, 17(1), 84-90.
- Lattanzio, V., Lattanzio, V. M., & Cardinali, A. (2006). Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. *Phytochemistry: Advances in research*, 661(2), 23-67.
- Lawrence, G. J., Finnegan, E. J., Ayliffe, M. A., & Ellis, J. G. (1995). The L6 gene for flax rust resistance is related to the *Arabidopsis* bacterial resistance gene RPS2 and the tobacco viral resistance gene N. *The Plant Cell*, 7(8), 1195-1206.
- Leboeuf, M., Cavé, A., Bhaumik, P. K., Mukherjee, B., & Mukherjee, R. (1980). The phytochemistry of the Annonaceae. *Phytochemistry*, 21(12), 2783-2813.
- Lee, S. E., Park, B. S., Kim, M. K., Choi, W. S., Kim, H. T., Cho, K. Y., ... & Lee, H. S. (2001). Fungicidal activity of piperonaline, a piperidine alkaloid derived from long pepper, *Piper longum* L., against phytopathogenic fungi. *Crop Protection*, 20(6), 523-528.
- Lee, S. E., Park, B. S., Kim, M. K., Choi, W. S., Kim, H. T., Cho, K. Y., ... & Lee, H. S. (2001). Fungicidal activity of piperonaline, a piperidine alkaloid derived from long pepper, *Piper longum* L., against phytopathogenic fungi. *Crop Protection*, 20(6), 523-528.

- Lehmann, P., (2002) Structure and evolution of plant disease resistance genes. *Journal of Applied Genetics*. 43(4): 403-414. 38.
- Leister, D., A. Ballvora, F. Salamini and Gebhardt C. (1996). A PCR based approach for isolating pathogen resistance genes from potato with potential for wide application in plants. *Nature Genetic* 14:421-429.
- Leister, D., Ballvora, A., Salamini, F., & Gebhardt, C. (1996). A PCR-based approach for isolating pathogen resistance genes from potato with potential for wide application in plants. *Nature genetics*, 14(4), 421.
- Li, D.-Y.; Yu, J.-G.; Zhu, J.-X.; Yu, D.-L.; Luo, X.-Z.; Sun, L.; Yang, S.-L. Annonaceous acetogenins of the seeds from *Annona muricata*. *J Asian Nat Prod Res* 2001; 3: 267–276.
- Liaw, X.; Chang, F.; Lin, C.; Chou, C.; Chiu, H.; Wu, M.; Wu, Y. 2002. New cytotoxic monotetrahydrofuran annonaceous acetogenins from *Annona muricata*. *Journal of Natural Products*. 65 (4):470-475.
- Link, K. P., Dickson, A. D., & Walker, J. C. (1929). Further observations on the occurrence of protocatechuic acid in pigmented onion scales and its relation to disease resistance in the onion. *Journal of Biological Chemistry*, 84(2), 719-725.
- Liscombe, D. K., & Facchini, P. J. (2008). Evolutionary and cellular webs in benzyloisoquinoline alkaloid biosynthesis. *Current opinion in biotechnology*, 19(2), 173-180.
- Ljung, K. Auxin metabolism and homeostasis during plant development. *Development* 2013; 140:943-950.
- Lorenzo, O., Chico, J. M., Sánchez-Serrano, J. J., & Solano, R. (2004). JASMONATE-INSENSITIVE1 encodes a MYC transcription factor essential to discriminate between different jasmonate-regulated defense responses in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 16(7), 1938-1950.
- Lucini, E. I., Zunino, M. P., López, M. L., & Zygadlo, J. A. (2006). Effect of Monoterpenes on Lipid Composition and Sclerotial Development of *Sclerotium cepivorum* Berk. *Journal of Phytopathology*, 154(7-8), 441-446.
- Mansfield, J. W. (1982). Role of phytoalexins in disease resistance. *Phytoalexins/general editors, JA Bailey and JW Mansfield*.
- Martin, G. B. (1999). Functional analysis of plant disease resistance genes and their downstream effector. *Current Opinion In Plant Biology*. 2: 273-274. N
- Martin-Hernandez, A. M., Dufresne, M., Hugouvieux, V., Melton, R., & Osbourn, A. (2000). Effects of targeted replacement of the tomatinase gene on the interaction of *Septoria lycopersici* with tomato plants. *Molecular plant-microbe interactions*, 13 (12), 1301-1311.
- Matern, U. (1991). Coumarins and other phenylpropanoid compounds in the defense response of plant cells. *Planta medica*, 57(S 1), S15-S20.
- Mauch-Mani, B., & Métraux, J. P. (1998). Salicylic acid and systemic acquired resistance to pathogen attack. *Annals of Botany*, 82(5), 535-540.
- McDowell, J. M., & Woffenden, B. J. (2003). Plant disease resistance genes: recent insights and potential applications. *TRENDS in Biotechnology*, 21(4), 178-183.
- McKey, D. 1974. Adaptive patterns in alkaloid physiology, *Am. Nat.* 108, 305-320
- Melton, R. E., Flegg, L. M., Brown, J. K., Oliver, R. P., Daniels, M. J., & Osbourn, A. E. (1998). Heterologous expression of *Septoria lycopersici* tomatinase in *Cladosporium fulvum*: effects on compatible and incompatible interactions with tomato seedlings. *Molecular plant-microbe interactions*, 11(3), 228-236.

- Mert-Türk, F. (2006). Saponins versus plant fungal pathogens. *J Cell Mol Biol*, 5, 13-17.
- Meyers, B. C., Kozik, A., Griego, A., Kuang, H., & Michelmore, R. W. (2003). Genome-wide analysis of NBS-LRR-encoding genes in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 15(4), 809-834.
- Miao, Y., Xu, X., Yuan, F., Shi, Y., Chen, Y., Chen, J., & Li, X. (2016). Four cytotoxic annonaceous acetogenins from the seeds of *Annona squamosa*. *Natural product research*, 30(11), 1273-1279.
- Ministerio de Agricultura Ganadería (MAG). 2011. Guanábana (*Annona muricata* L) Annonaceae, disponible en: <http://www.mag.go.cr/> [Consultada: 2 noviembre de 2011].
- Mittal, R., Chaudhry, N., & Mukherjee, T. K. (2018). Targeting breast cancer cell signaling molecules PI3K and Akt by phytochemicals Cannabidiol, Nimbin and Acetogenin: An in silico approach. *J Biomed*, 3, 60-63.
- Moghadamtousi, S., Fadaeinasab, M., Nikzad, S., Mohan, G., Ali, H., & Kadir, H. (2015). *Annona muricata* (Annonaceae): a review of its traditional uses, isolated acetogenins and biological activities. *International journal of molecular sciences*, 16(7), 15625-15658.
- Moghadamtousi, S., Fadaeinasab, M., Nikzad, S., Mohan, G., Ali, H., & Kadir, H. (2015). *Annona muricata* (Annonaceae): a review of its traditional uses, isolated acetogenins and biological activities. *International journal of molecular sciences*, 16(7), 15625-15658.
- Monteiro, M. C. M., Leptokarydis, I. H., Silva, G. H., da Silva, V. C., Bolzani, V. S., Young, M. C. M., & Lopes, M. N. (2007). Chemical constituents of stems from *Michelia champaca* L.(Magnoliaceae). *Eclética Química*, 32(3), 13-17
- Morrissey, J. P., & Osbourn, A. E. (1999). Fungal resistance to plant antibiotics as a mechanism of pathogenesis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63(3), 708-724.
- Morton, J. F. (1966). The soursop, or guanabana (*Annona muricata* Linn.). *Florida State Horticultural Society. University Of Miami. Pdf*.
- Müller, K.O., and Borger, H. (1940). Experimentelle untersuchungen über die Phytophthora-resistem der kartoffel. *Arb. Biol. Reichsanstalt. Landw. Forstw. Berlin* 23, 189-231.
- Müller, U. (2002). Chemical crop protection research. Methods and challenges. *Pure and applied chemistry*, 74(12), 2241-2246.
- Nef, C., Rio, B., & Chrestin, H. (1991). Induction of catharanthine synthesis and stimulation of major indole alkaloids production by *Catharanthus roseus* cells under non-growth-altering treatment with *Pythium vexans* extracts. *Plant cell reports*, 10(1), 26-29.
- Nef, C., Rio, B., & Chrestin, H. (1991). Induction of catharanthine synthesis and stimulation of major indole alkaloids production by *Catharanthus roseus* cells under non-growth-altering treatment with *Pythium vexans* extracts. *Plant cell reports*, 10(1), 26-29.
- Nicolson, S. W., & Thornburg, R. W. (2007). Nectar chemistry. In *Nectaries and nectar* (pp. 215-264). Springer, Dordrecht.
- Nishijima, W. T., Ebersole, S., & Fernandez, J. A. (1989, June). Factors influencing development of postharvest incidence of Rhizopus soft rot of papaya. In *Symposium on Tropical Fruit in International Trade* 269 (pp. 495-502).

- Nishijima, W. T., Ebersole, S., & Fernandez, J. A. (1989, June). Factors influencing development of postharvest incidence of *Rhizopus* soft rot of papaya. In *Symposium on Tropical Fruit in International Trade 269* (pp. 495-502).
- Northover, J., & Zhou, T. (2002). Control of rhizopus rot of peaches with postharvest treatments of tebuconazole, fludioxonil, and *Pseudomonas syringae*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 24(2), 144-153.
- Ogawa J. M. (1995). Plagas y enfermedades de los frutales con hueso. Editores ; Ogawa J.M. Zehr, E.I., And Bird, G.W. American Phytopathological Society. Daly City, CA, USA. 122
- Osborn, A. (1996b). Saponins and plant defence—a soap story. *Trends in plant science*, 1(1), 4-9
- Osborn, A. E. (1996). Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. *The plant cell*,
- Owatworakit, A., Townsend, B., Louveau, T., Jenner, H., Rejzek, M., Hughes, R. K., ... & Mugford, S. T. (2013). Glycosyltransferases from oat (*Avena*) implicated in the acylation of avenacins. *Journal of Biological Chemistry*, 288(6), 3696-3704.
- Padmavati, M., Sakthivel, N., Thara, K. V., & Reddy, A. R. (1997). Differential sensitivity of rice pathogens to growth inhibition by flavonoids. *Phytochemistry*, 46(3), 499-502.
- Pan, Q., Wendel, J., Fluhr, R. 2000. Divergent evolution of plant NBS-LRR resistance gene homologues in dicot and cereal genomes. *Journal of Molecular Evolution*. 50:203-213.
- Papadopoulou, K., Melton, R. E., Leggett, M., Daniels, M. J., & Osborn, A. E. (1999). Compromised disease resistance in saponin-deficient plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(22), 12923-12928.
- Parker, I. M., & Gilbert, G. S. (2004). The evolutionary ecology of novel plant-pathogen interactions. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.*, 35, 675-700.
- Patiño, O. J., & Cuca, L. E. (2011). Monophyllidin, a new alkaloid L-proline derivative from *Zanthoxylum monophyllum*. *Phytochemistry Letters*, 4(1), 22-25.
- Pavlik, M., Váňová, M., Laudová, V., & Harmatha, J. (2000). Digitonin as a model biologically active saponin forming specific quality of *Digitalis* sp. in bioassays in vitro. *Rostlinná Výroba*, 46(8), 343-347.
- Pepeljnjak, S., Kosalec, I., Kalodera, Z., & Kuštrak, D. (2003). Natural antimycotics from Croatian plants In: Rai, M., K., & Mares, D.,(Editors) *Plant Derived Antimycotics*, Binghamton.
- Philipov, S., Machev, K., Tsankova, E., & Navas, H. R. (1994). Liriodenine from *Annona muricata* seeds. *Fitoterapia*, 65, 555.
- Pichersky, E., & Lewinsohn, E. (2011). Convergent evolution in plant specialized metabolism. *Annual review of plant biology*, 62, 549-566.
- Piñol, M. T.; Palazón, J. (1993). Metabolismo Secundario. En: *Fisiología y Bioquímica Vegetal*. Azcon-Bieto, J. Talón, M. (eds). Editorial Interamericana McGraw Hill. España. 581 pp.
- Pitzschke, A., Schikora, A., & Hirt, H. (2009). MAPK cascade signalling networks in plant defence. *Current opinion in plant biology*, 12(4), 421-426.
- Pontón, J., Moragues, M. D., Gené, J., Guarro, J., & Quindós, G. (2002). *Hongos y actinomicetos alergénicos*. Bilbao: Revista Iberoamericana de Micología.
- Prabhakaran, K., Ramasamy, G., Doraisamy, U., Mannu, J., & Rajamani Murugesan, J. (2016). Polyketide natural products, acetogenins from graviola (*Annona muricata* L), its biochemical, cytotoxic activity and various

- analyses through computational and bio-programming methods. *Current pharmaceutical design*, 22(34), 5204-5210.
- Prusky, D., McEvoy, J. L., Leverentz, B., & Conway, W. S. (2001). Local modulation of host pH by *Colletotrichum* species as a mechanism to increase virulence. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 14(9), 1105-1113.
- Pueppke S.G. and VanEtten H. D. (1976). The relation between pisatin and the development of *Aphanomyces eluteiches* in diseased *Pisum sativum*. *Phytopathology*. 66:1174-1185.
- Puvanendran, S., Wickramasinghe, A., Karunaratne, D. N., Carr, G., Wijesundara, D. S. A., Andersen, R., & Karunaratne, V. (2008). Antioxidant Constituents from *Xylopiya championii*. *Pharmaceutical Biology*, 46(5), 352-355.
- Qing, F., & Shiping, T. (2000). Postharvest biological control of Rhizopus rot of nectarine fruits by *Pichia membranefaciens*. *Plant Disease*, 84(11), 1212-1216.
- Qing, F., and Shiping, T. (2000). Postharvest biological control of Rhizopus rot of nectarine fruits by *Pichia membranefaciens*. *Plant Disease* 84:1212-1216. 40
- Quidde, T., Büttner, P., & Tudzynski, P. (1999). Evidence for three different specific saponin-detoxifying activities in *Botrytis cinerea* and cloning and functional analysis of a gene coding for a putative avenacinase. *European Journal of Plant Pathology*, 105(3), 273-283
- Rahman, M. M., Lopa, S. S., Sadik, G., Islam, R., Khondkar, P., Alam, A. K., & Rashid, M. A. (2005). Antibacterial and cytotoxic compounds from the bark of *Cananga odorata*. *Fitoterapia*, 76(7-8), 758-761.
- Reglas Internacionales para el ensayo de semillas 1976. Ministerio de Agricultura. Dirección General de Producción Agraria,
- Rhoades, D. F., Cates, R. G., Wallace, J. W., & Mansell, R. L. (1976). Biochemical interactions between plants and insects. *Recent Advances in Phytochemistry*, 10, 168-213.
- Riley Saldaña, C. 2007. Tesis: Actividad antimicrobiana y Citotóxica de *Annona diversifolia*. UNICACH.
- Riley-Saldaña, C. A., del Rocío Cruz-Ortega, M., Vázquez, M. M., De-la-Cruz-Chacón, I., Castro-Moreno, M., & González-Esquinca, A. R. (2017). Acetogenins and alkaloids during the initial development of *Annona muricata* L. (Annonaceae). *Zeitschrift für Naturforschung C*, 72(11-12), 497-506.
- Romeis, T. (2001). Protein kinases in the plant defence response. *Current opinion in plant biology*, 4(5), 407-414.
- Rossall, S., Mansfield, J. W., & Price, N. C. (1977). The effect of reduced wycerone acid on the antifungal activity of the phytoalexin wycerone acid against *Botrytis fabae*. *Microbiology*, 102(1), 203-205.
- Sarma, B. K., Pandey, V. B., Mishra, G. D., & Singh, U. P. (1999). Antifungal activity of berberine iodide, a constituent of *Fumaria indica*. *Folia microbiologica*, 44(2), 164-166.
- Schmidt, A., Scheel, D., & Strack, D. (1998). Elicitor-stimulated biosynthesis of hydroxycinnamoyltyramines in cell suspension cultures of *Solanum tuberosum*. *Planta*, 205(1), 51-55.
- Seigler, D. S. (1998). Flavonoids. In *Plant secondary metabolism* (pp. 151-192). Springer, Boston, MA.
- Sepúlveda Jiménez, G., Porta Ducoing, H., & Rocha Sosa, M. (2003). La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista mexicana de fitopatología*, 21(3).
- Shoji, T., & Hashimoto, T. (2011). Recruitment of a duplicated primary metabolism gene into the nicotine biosynthesis regulon in tobacco. *The Plant Journal*, 67(6), 949-959.

- Singh, S., Jain, L., Pandey, M. B., Singh, U. P., & Pandey, V. B. (2009). Antifungal activity of the alkaloids from *Eschscholtzia californica*. *Folia microbiologica*, 54(3), 204-206.
- Skadhauge, B., Thomsen, K. K., & Von Wettstein, D. (1997). The role of the barley testa layer and its flavonoid content in resistance to *Fusarium* infections. *Hereditas*, 126(2), 147-160.
- Snyder, B. A., & Nicholson, R. L. (1990). Synthesis of phytoalexins in sorghum as a site-specific response to fungal ingress. *Science*, 48(4963), 1637-1639.
- Soares, E. R., da Silva, F. M., de Almeida, R. A., de Lima, B. R., da Silva Filho, F. A., Barison, A., & de Souza, A. D. (2015). Direct infusion ESI-IT-MSn alkaloid profile and isolation of tetrahydroharman and other alkaloids from *Bocageopsis pleiosperma* maas (Annonaceae). *Phytochemical analysis*, 26(5), 339-345.
- Song, W. Y., Wang, G. L., Chen, L. L., Kim, H. S., Pi, L. Y., Holsten, T., ... & Fauquet, C. (1995). A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, *Xa21*. *science*, 270(5243), 1804-1806
- Soylu, s., Bennett, m. H., & Mansfield, j. W. (2002). Induction of phytoalexin accumulation in broad bean (*Vicia faba* L.) cotyledons following treatments with biotic and abiotic elicitors. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 26(6), 343-348.
- Standley, P. C. and J. A. Steyermark, 1946 Flora of Guatemala. Chicago Museum of Natural History, Botanical Series.
- Sulistyowati, L., Keane, P. J., & Anderson, J. W. (1990). Accumulation of the phytoalexin, 6, 7-dimethoxycoumarin, in roots and stems of citrus seedlings following inoculation with *Phytophthora citrophthora*. *Physiological and molecular plant pathology*, 37(6), 451-461.
- Taiz L., Zeiger E. 2006. Plant Physiology. 4a Edition. SINAUER. pp. 338-342.
- Takken, F. L., & Joosten, M. H. (2000). Plant resistance genes: their structure, function and evolution. *European Journal of Plant Pathology*, 106(8), 699-713.
- Thomas, S.L. , Bonello, P., Lipps, P. E. And Boehm, M.J. (2006). *Avenacin* production in creeping bentgrass (*Agrostis stolonifera*) and influence on the host range of *Gaeumannomyces graminis*. *Plant Disease*. 90(1), 33-38.
- Tolosa, D., Hidalgo, J. R., Sal, P. E., Popich, S., Bardón, A., & Neske, A. (2014). Insecticidal effects of the Annonaceous acetogenin squamocin and the acetogenin fraction of seeds of *Rollinia occidentalis* on soybean and corn pests. *Journal of Agricultural Chemistry and Environment*, 3(04), 156.
- Trojanowska, M. R., & Threlfall, D. R. (1999). Regulation of saponin biosynthesis in primary roots of oat. *Acta botanica gallica*, 146(1), 101-104.
- Tsai, I. L., Liou, Y. F., & Lu, S. T. (1989). Screening of isoquinoline alkaloids and their derivatives for antibacterial and antifungal activities. *Gaoxiong yi xue ke xue za zhi= The Kaohsiung journal of medical sciences*, 5(3), 132-145.
- Umemura, K., Ogawa, N., Shimura, M., Koga, j., Usami, h., & Kono, T. (2003). Possible role of phytocassane, rice phytoalexin, in disease resistance of rice against the blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 67(4), 899-902.
- Van Loon L.C., Rep, M, Pieterse, C.M.J. (2006) Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants. *Annual Review of Phytopathology*. 44: 135-162.
- VanEtten, H. D., Sandrock, R. W., Wasmann, C. C., Soby, S. D., McCluskey, K., & Wang, P. (1995). Detoxification of phytoanticipins and phytoalexins by phytopathogenic fungi. *Canadian Journal of Botany*, 73(S1), 518-525.

- Velázquez-del Valle, M. G., Bautista-Baños, S., Hernández-Lauzardo, A. N., Guerra-Sánchez, M. G., & Amora-Lazcano, E. (2008). Estrategias de control de *Rhizopus stolonifer* Ehrenb.(Ex Fr.) Lind, agente causal de pudriciones postcosecha en productos agrícolas. *Revista mexicana de fitopatología*, 26(1), 49-55.
- Vijayan, P., Shockey, J., Lévesque, C. A., & Cook, R. J. (1998). A role for jasmonate in pathogen defense of *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(12), 7209-7214.
- Villanueva, C. B. (2004). Determinación de la actividad enzimática de PG en el proceso de maceración causado por *Rhizopus stolonifer* en jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Universidad Veracruzana. Veracruz, México. *Universidad Veracruzana, Veracruz, México*.
- Villanueva-Arce, R., Yáñez-Morales, M. D. J., & Hernández-Anguiano, A. M. (2008). Especies de *Colletotrichum* en chirimoya (*Annona cherimola* Mill.). *Agrociencia*, 42(6), 689-701.
- Vivanco, J. M., Cosío, E., Loyola-Vargas, V. M., & Flores, H. E. (2005). Mecanismos químicos de defensa en las plantas. *Investigación y ciencia*, 34(2), 68-75.
- Walker, J. C., & Stahmann, M. A. (1955). Chemical nature of disease resistance in plants. *Annual Review of Plant Physiology*, 6(1), 351-366.
- Waller, J. M. (1992). *Colletotrichum* diseases of perennial and other cash crops. *Colletotrichum diseases of perennial and other cash crops.*, 167-185.
- Watanabe, M., Sumida, N., Yanai, K., & Murakami, T. (2004). A novel saponin hydrolase from *Neocosmospora vasinfecta* var. *vasinfecta*. *Applied and environmental microbiology*, 70(2), 865-872.
- Weltring, K. M., Wessels, J., & Geyer, R. (1997). Metabolism of the potato saponins α -chaconine and α -solanine by *Gibberella pilicaris*. *Phytochemistry*, 46(6), 1005-1009.
- Wharton, P. S., & Nicholson, R. L. (2000). Temporal synthesis and radiolabelling of the sorghum 3-deoxyanthocyanidin phytoalexins and the anthocyanin, cyanidin 3-dimalonyl glucoside. *The New Phytologist*, 145(3), 457-469.
- Whenham, R. J., Fraser, R. S. S., Brown, L. P., & Payne, J. A. (1986). Tobacco-mosaic-virus-induced increase in abscisic-acid concentration in tobacco leaves. *Planta*, 168(4), 592-598.
- White, R. F. (1979). Acetylsalicylic acid (aspirin) induces resistance to tobacco mosaic virus in tobacco. *Virology*, 99(2), 410-412.
- Wildermuth, M. C., Dewdney, J., Wu, G., & Ausubel, F. M. (2001). Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature*, 414(6863), 562.
- Wink, M., and Shimmer, O. 1999. Modes of action of defensive secondary metabolites. Pp.17-134. In M. Wink M. (ed). *Functions of Plant Secondary Metabolites and their Exploration in Biotechnology*. Shiffeld Academic Press. Shiffeld, England. 304 p.
- Wu, C. C., Wu, C. L., Huang, S. L., & Chang, H. T. (2012). Antifungal activity of liriodenine from *Michelia formosana* heartwood against wood-rotting fungi. *Wood science and technology*, 46(4), 737-747.
- Wu, F. E., Zeng, L., Gu, Z. M., Zhao, G. X., Zhang, Y., Schwedler, J. T., & Sastrodihardjo, S. (1995). Muricatocins A and B, two new bioactive monotetrahydrofuran Annonaceous acetogenins from the leaves of *Annona muricata*. *Journal of natural products*, 58(6), 902-908.

- Wu, F. E., Zhao, G. X., Zeng, L., Zhang, Y., Schwedler, J. T., McLaughlin, J. L., & Sastrodihardjo, S. (1995). Additional bioactive acetogenins, annomutacin and (2, 4-trans and cis)-10R-annonacin-A-ones, from the leaves of *Annona muricata*. *Journal of natural products*, 58(9), 1430-1437.
- Yu J-G, Gui H-Q, Luo X-Z, Sun L. (1998) Murihexol, a linear acetogenin from *Annona muricata*. *Phytochemistry*; 49: 1689–1692.
- Zafra-Polo, M. C., González, M. C., Estornell, E., Sahpaz, S., & Cortes, D. (1996). Acetogenins from Annonaceae, inhibitors of mitochondrial complex I. *phytochemistry*, 42(2), 253-271.
- Zeng, L., Wu, F. E., Oberlies, N. H., McLaughlin, J. L., & Sastrodihardjo, S. (1996). Five new monotetrahydrofuran ring acetogenins from the leaves of *Annona muricata*. *Journal of Natural Products*, 59(11), 1035-1042.
- Zepeda, R. E., Estrada, M., Ocaña, A., Villegas, I., Brunner, I., & Bustos, E. (2009). Secondary metabolites induction in *Mammillaria huitzilopochtli* (Cactaceae) and evaluation of the fungicidal activity. *African Journal of Biotechnology*, 8(16).
- Zhang, H., Fu, C., Zheng, X., Xi, Y., Jiang, W., & Wang, Y. (2004). Control of postharvest *Rhizopus* rot of peach by microwave treatment and yeast antagonist. *European Food Research and Technology*, 218(6), 568-572.
- Zipfel, C., Robatzek, S., Navarro, L., Oakeley, E. J., Jones, J. D., Felix, G., & Boller, T. (2004). Bacterial disease resistance in *Arabidopsis* through flagellin perception. *Nature*, 428(6984), 764.