



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

INSTITUTO DE BIOLOGÍA

ECOLOGÍA

***Bephratelloides cubensis* ASHMEAD (HYMENOPTERA: EURYTOMIDAE)  
FRETE A ACETOGENINAS DE SEMILLAS DE *Annona diversifolia* SAFFORD**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTORA EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**CLAUDIA AZUCENA DURÁN RUIZ**

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. ALMA ROSA GONZÁLEZ ESQUINCA**

INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS, UNICACH

**COTUTORA DE TESIS: DRA. MARÍA DEL ROCÍO CRUZ ORTEGA**

INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNAM

**COMITÉ TUTOR: DR. ALEJANDRO ZALDÍVAR RIVERÓN**

INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM

**CD . MX.      MAYO, 2019.**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.





**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

INSTITUTO DE BIOLOGÍA

ECOLOGÍA

***Bephratelloides cubensis* ASHMEAD (HYMENOPTERA: EURYTOMIDAE)  
FRETE A ACETOGENINAS DE SEMILLAS DE *Annona diversifolia* SAFFORD**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTORA EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**CLAUDIA AZUCENA DURÁN RUIZ**

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. ALMA ROSA GONZÁLEZ ESQUINCA**

INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS, UNICACH

**COTUTORA DE TESIS: DRA. MARÍA DEL ROCÍO CRUZ ORTEGA**

INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNAM

**COMITÉ TUTOR: DR. ALEJANDRO ZALDÍVAR RIVERÓN**

INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM

**MÉXICO, Cd. Mx.      MAYO, 2019.**





OFICIO CPCB/352/2019

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 Ecología, Manejo Integral de Ecosistemas, Biología Evolutiva y Sistemática del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 28 de enero de 2019, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de DOCTORA EN CIENCIAS de la alumna DURÁN RUIZ CLAUDIA AZUCENA con número de cuenta 514013280 con la tesis titulada: "*BEPHRATELLOIDES CUBENSIS* ASHMEAD (HYMENOPTERA: EURYTOMIDAE) FRENTE A ACETOGENINAS DE SEMILLAS DE *ANNONA DIVERSIFOLIA* SAFFORD", realizada bajo la dirección de la DRA. ALMA ROSA GONZÁLEZ ESQUINCA:

Presidente:	DRA. KARINA BOEGE PARE
Vocal:	DRA. PATRICIA GUEVARA FEFER
Secretario:	DR. ALEJANDRO ZALDÍVAR RIVERÓN
Suplente:	DRA. SONIA VÁZQUEZ SANTANA
Suplente	DR. GUILLERMO DELGADO LAMAS

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

**A T E N T A M E N T E**  
**"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"**  
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 20 de marzo de 2019.

  
**DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA**  
**COORDINADOR DEL PROGRAMA**



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

## **Agradecimientos Institucionales**

Agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México por mi formación académica.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico para realizar los estudios de doctorado en el Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM, otorgándome la beca con número de CVU 537021 y número de becario 302173.

Al Consejo de Ciencia y Tecnología del Estado de Chiapas (COCYTECH) por el apoyo económico para la conclusión de la tesis, proporcionándome la Beca Tesis Posgrados 2017.

A la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas (UNICACH) por mi formación académica, por ser el sitio de realización de los trabajos de investigación y experimentos.

A mi Comité Tutorial: Dra. Alma Rosa González Esquinca, la Dra. Rocío Cruz Ortega y Dr. Alejandro Zaldívar Riverón por la paciencia, las observaciones, los comentarios y la guía infinita que contribuyeron a la mejora de mi nivel académico y a la realización de la tesis.

### **Agradecimientos a título personal**

Agradezco a mis padres y hermano por el apoyo incondicional, sin su guía, esto no hubiera sido posible. Gracias por ayudarme a crecer y a creer en mí. Totalmente agradecida y orgullosa de ustedes. Son mi mayor motivación y los amores de mi vida.

A la Dra. Alma Rosa González Esquinca por abrirme las puertas del laboratorio, por aceptarme como alumna y enseñarme un mundo lleno de cristales. Gracias mi doctorcita preferida por la confianza, la paciencia y el apoyo infinito.

Al Dr. Iván de la Cruz Chacón por apoyarme siempre, es mi asesor de corazón. Gracias por encontrar un lugar para en mí en cada curso impartido en los que, según yo, no tenía cabida.

A la Dra. Rocío Cruz Ortega y al Dr. Alejandro Zaldívar Riverón por las observaciones realizadas al escrito y por los viajes realizados a esta cálida ciudad para aportar sus invaluable comentarios. Siempre bienvenidos.

A la Dra. Karina Boege Pare, Dra. Patricia Guevara Fefer, Dra. Sonia Vázquez Santana y al Dr. Guillermo Delgado Lamas, quienes fungieron como miembros de jurado para el examen de grado. Gracias por los comentarios realizados a esta tesis.

A la Dra. Christian Anabí Riley Saldaña y a la Dra. Marisol Castro Moreno por la convivencia, el apoyo durante los experimentales y el ánimo de siempre que me ayudó a levantarme.

A la Dra. Lorena Luna Cazares por su apoyo y sus palabras de ánimo para seguir adelante.

A la Dra. Hilda Araceli Zavaleta Mancera y al Biol. Simón Morales Rodríguez por el apoyo, sus enseñanzas y su cálido recibimiento en el Laboratorio de Anatomía Vegetal, COLPOS, campus Montecillo.

A mis amigos del Laboratorio de Fisiología y Química Vegetal (UNICACH), que siempre dibujaron sonrisas en mi boca: Alfredo, Alejandro, Cecilia, Úrsula, Karla, Alexander.

A Don Vicente, que en paz descanse, y a su familia por abrirme las puertas de su hogar y por proporcionarme los frutos de papausa.

A Alexis por hacer más cálidas mis salidas de campo, por el apoyo, por estar siempre presente, por el amor y las sonrisas.

A Paty, Juan Carlos, Daniela, Luis Ángel y Erick por su cariño y apoyo incondicional en la gran Ciudad de México.

Al pedacito de vida que iluminó mi mundo durante muchos años. Conmigo siempre.

A mis padres

# ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>ABSTRACT</b> .....	3
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	5
<b>II. REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	7
2.2. <i>Annona diversifolia</i> Safford .....	7
2.2.1 Distribución .....	7
2.2.2 Descripción botánica .....	9
2.2.3 Fenología .....	10
2.3. Acetogeninas de Anonáceas.....	13
2.3.1 Clasificación .....	14
2.3.2 Biosíntesis.....	14
2.3.3 Actividad insecticida.....	15
2.4. El género <i>Bephratelloides</i> Giraul, 1913 .....	27
2.5. <i>Bephratelloides cubensis</i> Ashmead, 1984 .....	30
2.5.1 Descripción .....	30
2.5.2 Ciclo de vida .....	33
<b>III. ANTECEDENTES</b> .....	35
3.1. Estudios sobre <i>Annona diversifolia</i> .....	35
3.1.1 Detección de moléculas orgánicas .....	35
3.1.2 Toxicidad de extractos y acetogeninas.....	36
3.2. Estudios sobre el secuestro de acetogeninas.....	38
3.3. Estudios sobre <i>Bephratelloides cubensis</i> .....	38
3.3.1 Métodos de control.....	38
3.3.2 Interacción planta-insecto.....	39
<b>IV. PLANTEAMIENTO DE LOS OBJETIVOS</b> .....	40
<b>V. DISEÑO EXPERIMENTAL Y MÉTODOS</b> .....	42
5.1. Diseño General .....	42
5.2. Parte experimental.....	43
5.2.1 Material vegetal .....	43
5.2.2 Extracción de acetogeninas.....	44

5.2.3 Aislamiento de acetogeninas de referencia .....	44
5.2.4 Análisis en HPLC .....	45
5.2.5 Análisis histológico .....	46
5.2.6 Análisis estadístico .....	46
5.2.7 Identificación de la avispa .....	46
5.2.8 Caracterización de los estadios larvales .....	47
5.2.9 Determinación de acetogeninas en <i>Bephratelloides cubensis</i> . .....	49
<b>VI. RESULTADOS</b> .....	51
6.1. Determinar el perfil de la herradura y rolliniastatina-2 durante el desarrollo de las semillas. .....	51
6.1.1 Acetogeninas de referencia.....	51
6.1.2 Clasificación de las semillas.....	53
6.1.3 Acetogeninas en diferentes etapas de desarrollo .....	57
6.1.4 Discusión .....	59
6.2. Caracterización morfológica de los estadios larvarios de <i>Bephratelloides cubensis</i> .....	62
6.2.1 Identificación de la avispa .....	62
6.2.2 Estadios larvarios.....	63
6.2.3 Discusión .....	68
6.3. Determinar la probable presencia de acetogeninas en larvas, pupas y adultos de <i>Bephratelloides cubensis</i> .....	70
6.3.1 Discusión .....	75
6.4 Relacionar la actividad de las acetogeninas frente a la presencia de <i>Bephratelloides cubensis</i> . ARTÍCULO DE REQUISITO: Ontogenic synchronization of <i>Bephratelloides cubensis</i> , <i>Annona macrophyllata</i> seeds and acetogenins from Annonaceae.....	78
<b>VII. CONSIDERACIONES</b> .....	90
<b>VIII. CONCLUSIONES</b> .....	91
<b>IX. ARTÍCULO DE REVISIÓN: Polinización, fecundación y desarrollo de semillas de Annonaceae ..</b>	93
9.1. La Familia Annonaceae.....	93
9.2. Flores .....	96
9.3. Polinizadores .....	103
9.4. Fecundación .....	104
9.5. Desarrollo de semillas .....	107
<b>IX. LITERATURA CITADA</b> .....	124

## INDICE DE CUADROS Y FIGURAS

### Cuadros

<b>Cuadro 1.</b> Actividad insecticida de extractos crudos del género <i>Annona</i> .....	16
<b>Cuadro 2.</b> Acetogeninas con actividad insecticida.....	19
<b>Cuadro 3.</b> Concentraciones tóxicas de diversas acetogeninas.....	23
<b>Cuadro 4.</b> Distribución y especies hospederas del género <i>Bephratelloides</i> .....	29
<b>Cuadro 5.</b> Características fisicoquímicas de las acetogeninas aisladas.....	53
<b>Cuadro 6.</b> Concentración de laherradurina y rolliniastatina-2 en las diferentes etapas de desarrollo.....	58
<b>Cuadro 7.</b> Presencia de dientes en los estadios larvarios de <i>B. cubensis</i> y el promedio del largo de las mandíbulas.....	63
<b>Cuadro 8.</b> Géneros y especies de la familia Annonaceae en México.....	94
<b>Cuadro 9.</b> Estructuras del óvulo que originan semillas.....	105

### Figuras

<b>Figura 1.</b> <i>Annona diversifolia</i> .....	8
<b>Figura 2.</b> Distribución de <i>Annona diversifolia</i> en Centroamérica, México y Chiapas.....	9
<b>Figura 3.</b> Algunas fases de desarrollo de <i>Annona diversifolia</i> .....	11
<b>Figura 4.</b> Fenología de <i>Annona diversifolia</i> durante un ciclo anual.....	12
<b>Figura 5.</b> Estructura general de las acetogeninas.....	13
<b>Figura 6.</b> Ejemplos de acetogeninas de acuerdo a los grupos funcionales que presentan.....	14
<b>Figura 7.</b> Algunas especies del género <i>Bephratelloides</i> .....	27
<b>Figura 8.</b> Algunas plantas hospederas de <i>Bephratelloides</i> .....	28
<b>Figura 9.</b> Distribución de las especies del género <i>Bephratelloides</i> .....	29
<b>Figura 10.</b> <i>Bephratelloides cubensis</i> .....	31
<b>Figura 11.</b> Duración del ciclo de vida de <i>Bephratelloides cubensis</i> en diferentes especies de <i>Annona</i> .....	34



<b>Figura 12.</b> Localización de acetogeninas y alcaloides en el endospermo de semillas de <i>A. diversifolia</i> .....	35
<b>Figura 13.</b> Diseño general de esta investigación .....	42
<b>Figura 14.</b> Frutos y semillas de <i>Annona diversifolia</i> .....	43
<b>Figura 26.</b> Sitio de recolecta de frutos y semillas de <i>Annona diversifolia</i> .....	44
<b>Figura 16.</b> Mandíbula de <i>Bephratelloides cubensis</i> .....	47
<b>Figura 17.</b> Posición de marcas y semi-marcas .....	49
<b>Figura 18.</b> Identificación y estructura de rolliniastatina-2 y laherradurina .....	52
<b>Figura 19.</b> Cromatografía en capa fina de las acetogeninas de referencia .....	53
<b>Figura 20.</b> Etapas de desarrollo de las semillas de <i>Annona diversifolia</i> .....	54
<b>Figura 21.</b> Idioblastos de <i>Annona diversifolia</i> durante el desarrollo de las semillas .....	55
<b>Figura 22.</b> Laherradurina y rolliniastatina-2 totales a lo largo del desarrollo de las semillas .....	58
<b>Figura 23.</b> <i>Bephratelloides cubensis</i> .....	62
<b>Figura 24.</b> Estadios de desarrollo de <i>B. cubensis</i> .....	63
<b>Figura 25.</b> Estadios larvarios de <i>Bephratelloides cubensis</i> .....	64
<b>Figura 26.</b> Relación entre los estadios larvarios y el largo de las mandíbulas .....	65
<b>Figura 27.</b> Consenso de la forma de las mandíbulas .....	65
<b>Figura 28.</b> Relative warps (PCA) de las mandíbulas .....	66
<b>Figura 29.</b> Thin-plate spin que muestra la mayor variación en las mandíbulas .....	66
<b>Figura 30.</b> Análisis de Variables Canónicas (CVA) de las mandíbulas de <i>B. cubensis</i> .....	67
<b>Figura 31.</b> Desarrollo de <i>Bephratelloides cubensis</i> en semillas de <i>Annona diversifolia</i> .....	70
<b>Figura 32.</b> Larvas de <i>Bephratelloides cubensis</i> en el interior de semillas de <i>Annona diversifolia</i> .....	71
<b>Figura 33.</b> Presencia de acetogeninas y avispas en las diferentes etapas de desarrollo de <i>A. diversifolia</i> .....	72
<b>Figura 34.</b> Cromatogramas de los extractos hexánicos de los diferentes estadios de desarrollo y excretas de <i>Bephratelloides cubensis</i> .....	73

<b>Figura 35.</b> Cromatogramas de los extractos metanólicos de los diferentes estadios de desarrollo y excretas de <i>Bephratelloides cubensis</i> .....	74
<b>Figura 36.</b> Diversidad floral de Anonáceas.....	99
<b>Figura 37.</b> Estructuras sexuales.....	100
<b>Figura 38.</b> Fenología floral.....	102
<b>Figura 39.</b> Algunos polinizadores de Anonáceas .....	103
<b>Figura 40.</b> Fecundación en <i>A. cherimolia</i> .....	105
<b>Figura 41.</b> Embriones de diferentes Anonáceas.....	108
<b>Figura 42.</b> Nucela en diferentes estados de desarrollo.....	110
<b>Figura 43.</b> Endospermo y materiales de reserva.....	113
<b>Figura 44.</b> Testa .....	116
<b>Figura 45.</b> Tegmen y ruminaciones .....	118
<b>Figura 46.</b> Pericálaza, tejido vascular y tapón micropilar.....	121

## RESUMEN

Las acetogeninas de anonáceas son un grupo de metabolitos secundarios exclusivos de esta familia. Debido a su potente toxicidad presentan diferentes actividades biológicas, entre ellas la citotóxica, antiparasítica, antimicrobiana e insecticida. Las acetogeninas se han aislado principalmente de semillas; en este estudio se reporta por primera vez la biosíntesis de acetogeninas durante el desarrollo de las semillas de una anonácea. También se relaciona esta biosíntesis con la alimentación de *Bephratelloides cubensis*, avispa que cumple casi todo su ciclo de vida en el interior de la semilla y que se alimenta del endospermo acetogénico. Para determinar el perfil de acetogeninas durante la ontogenia de las semillas de *Annona diversifolia*, éstas fueron clasificadas en ocho etapas de desarrollo. Con el análisis realizado con HPLC, las acetogeninas laherradurina y rolliniastatina-2 fueron detectadas a partir de la mitad del desarrollo de las semillas, lo que indica que las acetogeninas son biosintetizadas durante la embriogénesis y no provienen de la planta madre. Las acetogeninas se detectaron simultáneamente, aunque no en la misma concentración. Laherradurina se detectó a una concentración inicial de  $125.67 \mu\text{g}\cdot\text{g semilla}^{-1}$ , mientras que la rolliniastatina-2 fue casi imperceptible, con un valor de  $25.42 \mu\text{g}\cdot\text{g semilla}^{-1}$ ; la concentración final de ambas moléculas fue de  $45,716.33 \mu\text{g}\cdot\text{g semilla}^{-1}$  y  $2,661.61 \mu\text{g}\cdot\text{g semilla}^{-1}$ , respectivamente, siendo laherradurina 16 veces más abundante que rolliniastatina-2. Estos resultados apoyan que laherradurina es la acetogenina más abundante de las semillas de *A. diversifolia*. Se realizó el seguimiento del desarrollo de los idioblastos, células que almacenan a las acetogeninas en el endospermo de las semillas. Se observó que los idioblastos pueden diferenciarse del resto de las células a partir de la etapa IV, coincidiendo con la detección de laherradurina y rolliniastatina-2. El seguimiento del ciclo de vida de la avispa *B. cubensis* en las semillas de *A. diversifolia* reveló que el desarrollo ocurre en etapas específicas del crecimiento de las semillas. Las larvas crecen en el interior de las semillas de la etapa V a la VII, las pupas en las etapas VII y VIII, mientras que las adultas solo están en semillas maduras y nunca en etapas anteriores. Estos resultados mostraron que la alimentación de las larvas coincide con la detección de laherradurina y

rolliniastatina-2, lo que indica que no sólo consumen las sustancias de reserva proporcionadas por la semilla, sino que también ingieren a las acetogeninas tóxicas. Aunque las larvas ingieren a las acetogeninas, éstas no fueron detectadas en ningún estado de desarrollo de la avispa, lo que supone una metabolización de las moléculas, que explicaría la tolerancia a su toxicidad. Debido a que los himenópteros parásitos son incapaces de biosintetizar lípidos, por lo que necesariamente deben adquirirlos de su alimento, las acetogeninas junto con los ácidos grasos podrían funcionar como un reservorio importante de energía debido a la naturaleza lipídica que poseen, además de ser una fuente rica en átomos de carbono que podrían ser reciclados e incorporados a la formación de otras moléculas importantes para su desarrollo. Las semillas representan para *B. cubensis* no solo alimento sino también un refugio durante los estados de desarrollo más vulnerables contra factores bióticos y abióticos, además al ser las semillas una fuente de acetogeninas tóxicas para otros insectos que le brindan a *B. cubensis* protección tanto física como química.

## ABSTRACT

Annonaceous acetogenins are a group of secondary metabolites exclusive of this family. Because of their toxicity, have different biological activities, for example, the cytotoxic, antiparasitic, antimicrobial e insecticide. The acetogenins are principally isolated from seeds, in this work it is reported for the first time the annonaceous acetogenins biosynthesis during the ontogenic development of the seed of one species of Annonaceae, and contrasted with the *Bephratelloides cubensis*'s feeding, wasp that fulfills almost its entire life cycle inside the seed and also feeds on the acetogenic endosperm. To determine the profile of acetogenins during the ontogeny of *Annona diversifolia* seeds, these were classified into eight stages of development. With the analysis performed in HPLC, the laherradurin and rolliniastatin-2 acetogenins are detected in the middle stages of the endospermic development, indicated that the acetogenins are biosynthesized during the embryogenesis and they are not a contribution of the mother plant. The acetogenins were detected simultaneously, although not in the same concentration, laherradurin was detected with an initial concentration of  $125.67 \mu\text{g}\cdot\text{g seed}^{-1}$ , while rolliniastatin-2 was almost imperceptible, with a value of  $25.42 \mu\text{g}\cdot\text{g seed}^{-1}$ ; the final concentration of both acetogenins was  $45\,716.33 \mu\text{g}\cdot\text{g seed}^{-1}$  and  $2\,661.61 \mu\text{g}\cdot\text{g seed}^{-1}$ , respectively, being the laherradurin 16 times more abundant than rolliniastatin-2. These results support that laherradurin is the most abundant acetogenin of the seeds of *A. diversifolia*. The development of idioblasts was monitored, solitary cells in the endosperm that store annonaceous acetogenins inside the seeds. With this research, it was observed that the idioblasts could be differentiated from the rest of the cells from stage IV, coinciding with the detection of the laherradurin and rolliniastatin-2. The monitoring of the life cycle of the wasp *B. cubensis*, in the seeds of *A. diversifolia*, revealed that development occurs at specific stages of seed growth. The larvae grow inside the seeds of stage V to the VII, the pupae in stages VII and VIII, while the adults are specifically found in mature seeds and never in previous stages. These results showed that the feeding of the larvae coincides with the detection of the laherradurine and rolliniastatin-2, which indicates that they not only consume the reserve substances

provided by the seed but also ingest the toxic acetogenins. Although the larvae ingest the acetogenins, they were not detected in any state of development of the wasp, which means a metabolization of the molecules, which would explain the tolerance to its toxicity. The parasitic Hymenoptera are unable to biosynthesize lipids, so they must necessarily acquire them from their food. Their larval phase coincides with the biosynthesis of these molecules, and that is why they are ingested together with the reserve materials of the seeds, which suggests that the molecules can be incorporated into the metabolism of the wasps, and constitute an essential source of energy, due to the lipid nature they possess. In this sense, acetogenins together with fatty acids could function as an important reservoir of energy due to the lipid nature they possess, also being a rich source of carbon atoms that could be recycled and incorporated into the formation of other molecules necessary for its development. The seeds represent for *B. cubensis* not only food but also a refuge during the most vulnerable stages of development against biotic and abiotic factors, besides being the seeds a source of toxic acetogenins for other insects that give to *B. cubensis* protection both physical as chemistry.

## I. INTRODUCCIÓN

Durante más de 400 millones de años se han desarrollado interacciones relacionadas con el consumo de plantas por insectos herbívoros, las cuales una vez atacadas por estos desencadenan diversos mecanismos de defensa química contra ellos, como son los metabolitos secundarios (Fürstenberg-Hägg *et al.* 2013). Al mismo tiempo los insectos herbívoros han desarrollado adaptaciones para seguir aprovechando estos recursos (Mello & Silva-Filho, 2002).

Los metabolitos secundarios son moléculas de bajo peso molecular elaboradas por las plantas y otros organismos que constituyen la comunicación química a través de la cual las plantas se relacionan con su entorno y se cree que forman parte de sus mecanismos de defensa (Fraenkel, 1959; Taiz & Zeiger, 2006; Piñol *et al.* 2008; Wink, 2011; Claramunt, 2013). Los metabolitos secundarios son muchos y muy diversos. En las plantas pueden encontrarse *per se* (ser constitutivos) o pueden incrementarse o biosintetizarse como respuesta al daño producido en los tejidos por algún agente biótico o abiótico (ser inducidos) (Mello & Silva-Filho, 2002; Del Val, 2012).

De las interacciones que se establecen en la naturaleza entre plantas e insectos la herbivoría es una de las más documentadas. La ingestión de metabolitos secundarios puede tener diferentes consecuencias fisiológicas sobre los organismos consumidores, ya que estas moléculas pueden ser tóxicas o disuadir a insectos generalistas. Sin embargo, también hay insectos especialistas que son resistentes a los compuestos tóxicos porque su organismo responde con adaptaciones metabólicas (Langel & Ober, 2011; Abdalsamee & Müller, 2012; Baden *et al.* 2013).

Muchas especies de plantas almacenan metabolitos secundarios en las semillas, lo que significa que durante la embriogénesis la planta dispone de recursos metabólicos no solo para almacenar sustancias de reserva, sino que además provee a las semillas con sustancias de defensa que representarían una clara ventaja para que la plántula en crecimiento se establezca en el ecosistema (De la Cruz, 2012). En esta investigación se realizó la detección de las acetogeninas de anonáceas durante la ontogenia de las semillas de *Annona diversifolia*. Además, la detección de esas moléculas tóxicas se relacionó con la presencia

de la avispa parásita *Bephratelloides cubensis*, cuyo desarrollo ocurre en el interior de las semillas y su dieta depende completamente del endospermo que almacena a las acetogeninas tóxicas.

Los Resultados (VI) están divididos de acuerdo con los objetivos de la investigación, cada uno con su respectiva discusión: 6.1) Determinación del perfil de la herradura y rolliniastatina-2 durante el desarrollo de las semillas, aquí se describen las características de las semillas, el seguimiento de los idioblastos y de las dos acetogeninas en las ocho etapas de desarrollo en que fueron clasificadas; 6.2) Caracterización morfológica de los estadios larvarios de *Bephratelloides cubensis*, en esta sección se señalan las características diagnósticas de la avispa, así como las características de los cinco estadios por los que pasan las larvas; 6.3) Determinación de la probable presencia de acetogeninas en larvas, pupas y adultos de *B. cubensis*, al descubrir que las avispas ingieren a las acetogeninas junto con el material de reserva, en este objetivo se buscó la presencia de la herradura y rolliniastatina-2 en los diferentes estadios de la avispa; 6.4) Relación de la actividad de las acetogeninas frente a la presencia de *B. cubensis*, este objetivo corresponde al artículo de requisito "Ontogenic synchronization of *Bephratelloides cubensis*, *Annona macrophyllata* seeds and acetogenins from Annonaceae", publicado en la revista *Journal of Plant Research*, en el cual se relaciona la detección de las acetogeninas con el desarrollo de los idioblastos durante la ontogenia de las semillas y con la dieta de la avispa, que incluye a estas moléculas tóxicas. Por último, se incluye un artículo de revisión sobre la polinización, fecundación y el desarrollo de las semillas de Annonaceae (VIII).



## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.2. *Annona diversifolia* Safford

De acuerdo al *Trópicos del Missouri Botanical Garden* la clasificación taxonómica de *Annona diversifolia* es la siguiente:

Subclase Magnoliidae Novák ex Takht.

Superorden Magnolianaes Takht.

Orden Magnoliales Bromhead

Familia Annonaceae Juss.

Género *Annona* L.

Especie *Annona diversifolia* Safford

#### 2.2.1 Distribución

*Annona diversifolia* Safford (sin. *Annona macrophyllata* Donn. Sm.) (Figura 1), conocida comúnmente como papauce, anona blanca, ilama o ilamatzapotl (Safford, 1912; Standley & Steyermark, 1946), es un frutal distribuido en México y Centroamérica (Figura 2). Se le encuentra en forma silvestre o como cercas vivas en las viviendas, y ocasionalmente en huertos pequeños. En México se cultiva y comercializa en los mercados regionales principalmente en los estados de Chiapas, Guerrero, Oaxaca y Tabasco (Julián-Loeza, 2009), pero también se localiza en los estados de Campeche, Colima, Estado de México, Michoacán, Nayarit, Sinaloa, Yucatán (Zavala y Ballesteros, 2000), Guanajuato, Hidalgo, Morelos, Querétaro, Quintana Roo, San Luis Potosí y Tamaulipas (De-la-Cruz-Chacón *et al.* 2016) (Figura 2). En Chiapas, *A. diversifolia* se reporta en Acapetahua, Chiapa de Corzo, Chicoasén, Jiquipilas, San Fernando, San Lucas, Tapachula, Tuxtla Chico, Tuxtla Gutiérrez, Villa Corzo, Villaflores (Domínguez-Gutú, 2010), Cintalapa y Las Rosas (Figura 2).

La dehiscencia de los frutos de *A. diversifolia* ocurre en estados avanzados de madurez y con tasas altas de producción de etileno. El exocarpo de los frutos maduros se abre sistemáticamente disminuyendo su valor comercial, se desconoce porque ocurre esta partición, pero se cree que los cambios en la turgencia relacionados con la producción de azúcares neutros durante la maduración provocan movimientos de agua desde el exocarpo y posiblemente del receptáculo hacia la pulpa. El incremento en el diámetro del receptáculo

aumenta el estrés en la pulpa y el exocarpo, lo que produce la ruptura irregular del fruto (Andrés & Andrés, 2011). Es por esta razón que la distribución hacia los mercados de las grandes ciudades se ve limitada, ya que la dehiscencia favorece la contaminación de la pulpa y acorta la vida de anaquel de los mismos (Ballesteros *et al.* 2006).



**Figura 1.** *Annona diversifolia*. A) Árbol, B) Flor, C) Fruto, D) Semilla. Fotografías Claudia Durán.

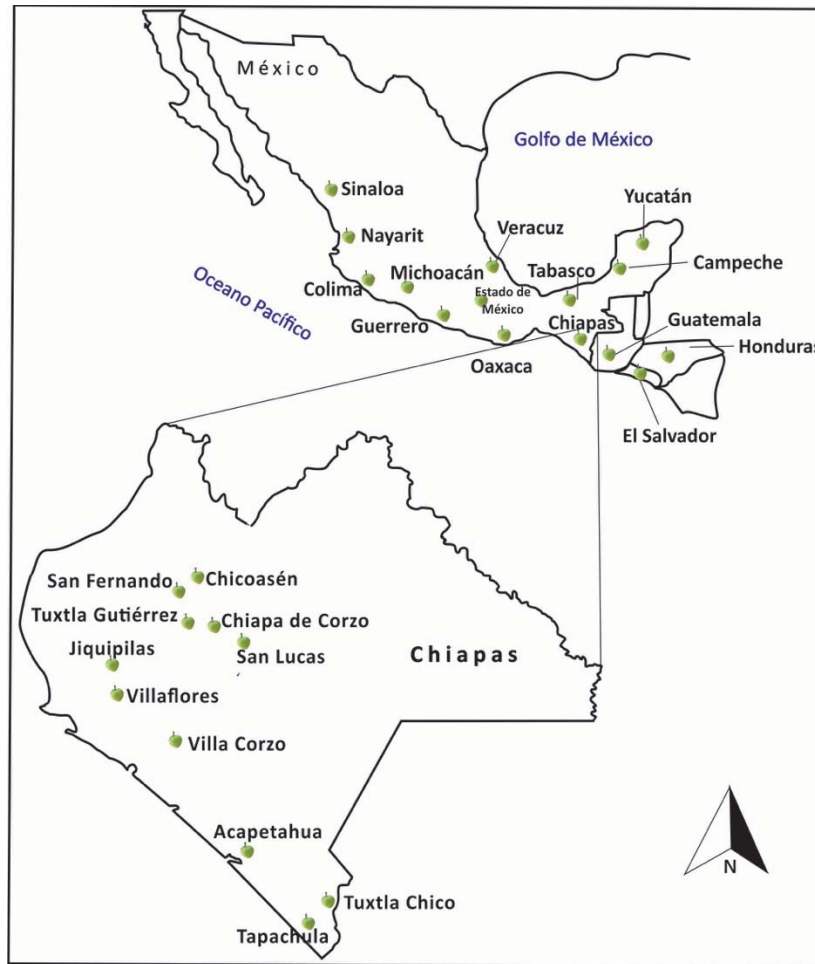


Figura 2. Distribución de *Annona diversifolia* en Centroamérica, México y Chiapas.

### 2.2.2 Descripción botánica

Standley & Steyermark (1946) describen a *A. diversifolia* como un árbol pequeño, de **ramas** glaucas, glabras; **hojas** de 8-14 cm de largo y 4-6 cm de ancho sobre peciolo de 8-18 mm de largo, redondeadas o subacutadas en el ápice, acutadas o redondeadas en la base, glabras, glaucas por abajo; las hojas inferiores a los brotes florales orbiculares y cordado-ceñidas de 2-4 cm de longitud; **flores** solitarias, pedicelos adelgazados, glabros, recurvados o pendulosos, de 3-5 cm de longitud, minuciosamente bracteolada abajo de la mitad, **sépalos** redondeados a triangulares, ferruginoso-pilosos arriba, 2-3 mm de longitud; 3 **pétalos** exteriores linear-oblongos, obtusos, minuciosamente pubescentes por fuera, 2.5 cm de longitud, cerca de 6 mm de ancho en la base, los 3 pétalos internos rudimentarios, frutos ampliamente ovoides, tomentosos, generalmente 13-15 cm de longitud y 12-15 cm

de ancho, cubierto con protuberancias ligeramente redondeadas, **semillas** oblongo-ovoides de 2 cm largo y 1 cm de ancho (Figura 1).

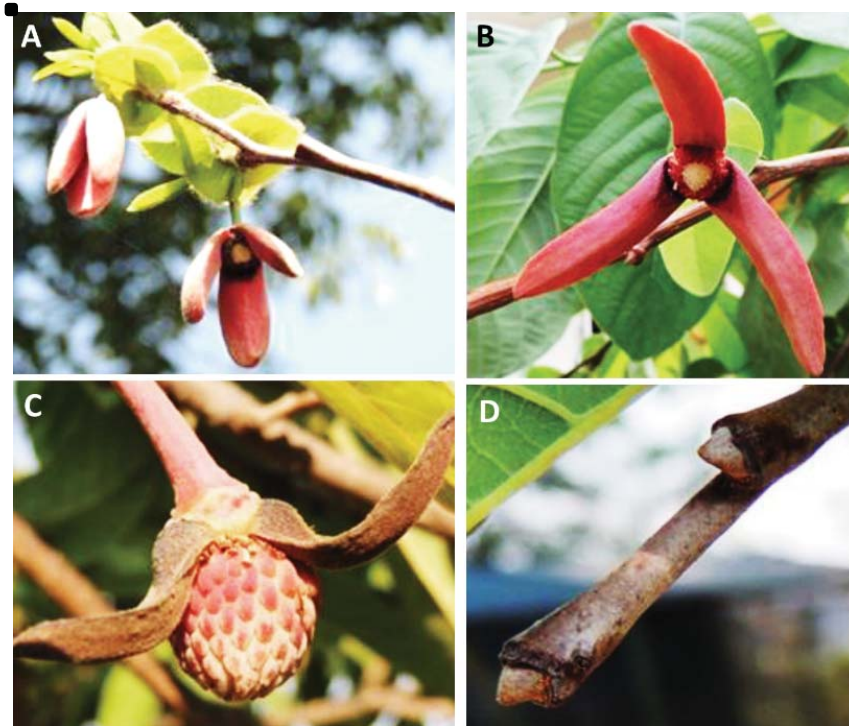
### **2.2.3 Fenología**

Las descripciones fenológicas de las plantas son utilizadas para conocer los ciclos de foliación, floración y fructificación de las plantas cultivadas, y además proveen datos para entender la relación que existe entre ellas y su ambiente. Las características fenológicas distinguen a *A. macrophyllata* en una Selva Baja Caducifolia ya que tiene una estrategia de reproducción (floración y fructificación) sincronizada con la época de lluvias, estrategia que comparte con *A. purpurea*, pero que difiere de *A. reticulata* y *A. lutescens*, cuya estrategia de reproducción está asociada a la época de secas (González-Esquinca *et al.* 2016). A continuación se describe la fenología de *A. diversifolia*, cuyos datos forman parte de la investigación realizada por González-Esquinca *et al.* (2016) sobre la fenología de cuatro especies de anonas:

**Fenología foliar.** Las yemas foliares latentes se observan mejor cuando los árboles han perdido su follaje (BBCH 00) (BBCH= Biologische Bundesanstalt, Bundessortenamt und Chemische Industrie). El desarrollo de las yemas foliares inicia durante la transición de la temporada de seca a la temporada de lluvia (BBCH 03) (Figura 3, 4). Las ramas producen yemas foliares y florales, ambas son terminales o axilares. Los brotes de las hojas frecuentemente están protegidos con catáfilos laminares blancuzcos (BBCH 03) que se rompen cuando las hojas emergen (Figura 3D). Las primeras hojas que emergen de las yemas inicialmente están cubiertas con abundantes tricomas de color marrón dorado.

**Desarrollo de las hojas.** Las yemas foliares, a diferencia de *A. lutescens*, *A. purpurea* y *A. reticulata*, producen un par de hojas sin peciolo, orbiculares con pelos de color marrón sobre las catáfilas y los márgenes. Este tipo de hojas indican el desarrollo de ramas con brotes foliares y florales; sin embargo, otras ramas con yemas foliares carecen de brotes florales. Veinticuatro días después del inicio de las lluvias las ramas presentan varias fases de desarrollo; cuando la lluvia finaliza los árboles presentan abundante follaje y ramas completamente desarrolladas (BBCH 19, BBCH 39).

**Senescencia foliar.** Al inicio de la temporada de seca comienzan los síntomas de la senescencia, las hojas cambian de color de verdes a amarillas y por último a marrón. En febrero los árboles pierden más de 50% de sus hojas (BBCH 95), por lo que a principios de marzo retienen sólo el 10% del follaje de hojas senescentes (BBCH 97). Durante marzo y abril los árboles pierden completamente sus hojas.



**Figura 3.** Algunas fases de desarrollo de *Annona diversifolia*. A) Flor en fase femenina (cerrada) y fase masculina (abierta). B) Flor en fase masculina, los estambres son de color rojo. C) Fruto en desarrollo. D) Yema foliar. Modificado de González-Esquinca *et al.* (2016).

**Fenología reproductiva.** La floración ocurre en mayo y junio produciendo frutos a la mitad de la temporada de lluvia (Figura 4). La fructificación termina al finalizar las lluvias, por lo que las semillas permanecerán latentes al menos seis meses hasta que comience la próxima temporada de lluvias, escapando de las condiciones adversas que representaría germinar durante la sequía (González-Esquinca *et al.* 2015).

**Emergencia de flores y floración.** Las hojas y las flores se desarrollan simultáneamente. Las flores son solitarias y pediceladas. Como otras especies de *Annona*, las flores presentan dicogamia. Las flores tienen pétalos pubescentes de color rojo marrón



que son retenidos por varios días (BBCH 68), con un androceo púrpura que se distingue del color crema del gineceo (Figura 3A-C).

**Crecimiento del fruto y fructificación.** Durante la formación del fruto, los pétalos de *A. diversifolia* pueden persistir durante más tiempo (BBCH 70) (Figura 3C), a diferencia de otras anonas como *A. lutescens*, *A. purpurea* y *A. reticulata*. Un mismo árbol puede tener frutos en diferentes grados de desarrollo. Una vez maduros, se presenta una dehiscencia, por lo que no pueden ser almacenados más de cuatro días. La pulpa puede ser blanca o rosa.

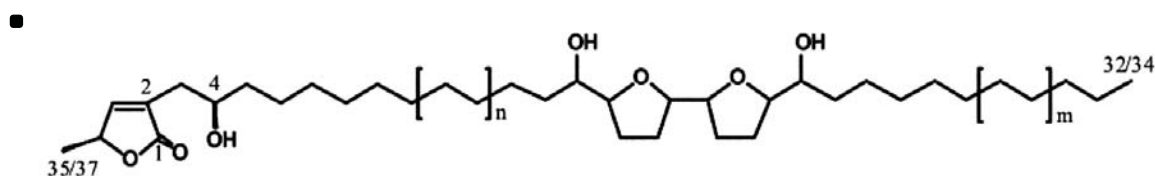
**Factores climáticos y fenología.** Los análisis de correlación entre los factores climáticos y la fenología de las especies de *Annona* muestran que las fases reproductivas están asociadas a los cambios en la precipitación y las temperaturas mínimas. En el caso de *A. diversifolia*, se requiere la presencia de lluvia, por lo tanto la disminución de la temperatura para la fructificación y foliación (Figura 4).

		Temporada de lluvia				Transición	Temporada de seca				Transición		
		JUN	JUL	AGO	SEP	OCT	NOV	DIC	ENE	FEB	MAR	ABR	MAY
Fenología reproductiva		Floración	Fruto inmaduro			Fruto maduro							Floración
Fenología foliar		Yemas foliares	Foliación				Senescencia						
Precipitación mm	Máximo	51.7	20.4	40.4	106	24.7	1.8	1.7	0.1	0	0.1	24.5	48.4
	Mínimo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Mensual	213	71.6	165	265	41.2	9.5	1.8	0.1	0	0.2	45.8	91.4
Temperatura °C	Máximo	26.9	26.3	26.5	26.3	30.3	25.6	23.7	25.6	26.1	29.8	31.5	33.2
	Mínimo	22.5	22.8	23.5	21.7	23.2	18.7	19.6	18.1	20.3	18.8	19.9	21
	Media	24.8	24.3	24.6	24.3	26.9	22.8	22	22.4	24.3	24.8	26.2	26.7

**Figura 4.** Fenología de *Annona diversifolia* durante un ciclo anual (Modificado de González-Esquinca *et al.* (2016).

### 2.3. Acetogeninas de Anonáceas

Las acetogeninas de anonáceas (ACG) son un grupo de policétidos exclusivo de la familia Annonaceae (Cavé *et al.* 1997; Zafra-Polo *et al.* 1996, 1998; Alali *et al.* 1999). Generalmente su estructura está constituida por una larga cadena alquílica de 35 a 37 átomos de carbono (Figura 5), terminando con un anillo lactónico metil sustituido,  $\alpha$ ,  $\beta$  insaturado, saturado, o como cetolactona. Pueden tener dobles o triples enlaces. Los sustituyentes oxigenados en la cadena pueden ser cetonas, hidroxilos, epóxidos, anillos tetrahidrofuránicos (THF) o tetrahidropiránicos (THP) (Alali *et al.* 1999; Li *et al.* 2008; Schlie-Guzmán *et al.* 2009; Spurr & Brown, 2010).



**Figura 5.** Estructura general de las acetogeninas (Bermejo *et al.* 2005).

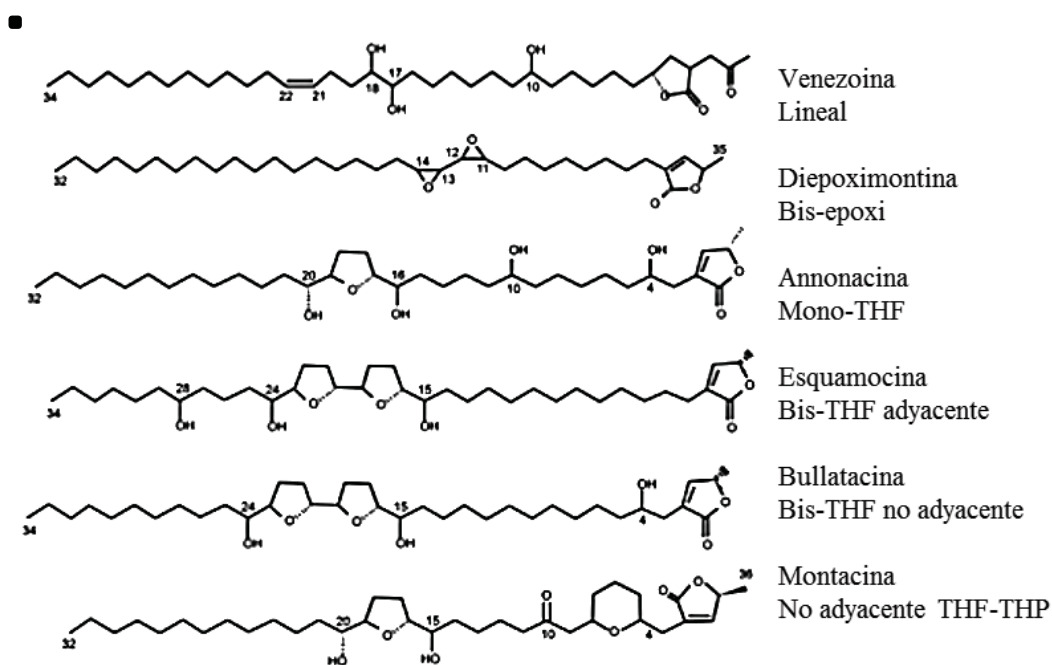
Jolad *et al.* (1982) reportaron a la uvaricina, primera acetogenina aislada de la raíz de *Uvaria acuminate*. Desde su descubrimiento, 445 acetogeninas se han aislado de distintos órganos de las plantas (Liaw *et al.* 2016), aunque tal vez debido a su disponibilidad se han obtenido preferentemente de semillas (Bermejo *et al.* 2005). En la revisión realizada por Bermejo *et al.* (2005) se reportan cerca de 400 acetogeninas en 51 especies y 13 géneros. Liaw *et al.* (2016) reportan 12 especies más, mientras que en el presente estudio se reportan otras 7 especies. Por lo tanto, las acetogeninas que se han reportado en 13 géneros y 70 especies de anonáceas.

Aunque se conoce que las acetogeninas se almacenan en todos los órganos de las plantas (Cavé *et al.* 1997), la ubicación celular de estas moléculas se ha descubierto recientemente en semillas de *A. diversifolia*, donde se almacenan en idioblastos distribuidos exclusivamente en la periferia de las ruminaciones del endospermo (Laguna *et al.* 2015; Brechú-Franco *et al.* 2016). En la familia Annonaceae, los idioblastos se han reportado en semillas de *A. cherimola* (Schroeder, 1951), *A. squamosa* (Corner, 1949; Martínez *et al.* 2013), *Anaxagorea javanica*, *Desmos sp.* *Polyalthia purpurea* (Corner, 1949) y *Anaxagorea*

sp. (Scharaschkin & Doyle, 2006). Dada la distribución de las acetogeninas en las semillas, es probable que también estén almacenadas en los idioblastos oleíferos que se han reportado en las hojas de varias especies de *Annona*, entre ellas las de *A. diversifolia* (Bakker & Gerritsen, 1992).

### 2.3.1 Clasificación

Basados en su naturaleza química y en los grupos funcionales adyacentes, las acetogeninas se clasifican en: a) lineales, b) mono-THF, c) bis-THF adyacentes, d) bis-THF no adyacentes, e) tri-THF, f) THF-THP adyacentes, g) THF-THP no adyacentes, h) mono-THP y i) acetogeninas sólo con  $\gamma$ -lactonas (Figura 6) (Alali *et al.* 1999; Bermejo *et al.* 2005; Schlie-Guzmán *et al.* 2009; Spurr & Brown, 2010).



**Figura 6.** Ejemplos de acetogeninas de acuerdo a los grupos funcionales que presentan (Schlie-Guzmán *et al.* 2009).

### 2.3.2 Biosíntesis

Se desconoce la ruta biosintética de las acetogeninas, pero se sabe que derivan de la ruta de los policétidos, estos datos surgen de la síntesis biomimética (Cavé *et al.* 1997; Alali *et al.* 1999). Se sugiere que el anillo lactónico puede ser formado por la condensación de un aldol teniendo como precursor tres átomos de carbono y un ácido graso, el acilo parece



provenir del ácido palmítico, oleico o linoleico. Parece que los anillos THF se forman después a partir de la oxidación de los dobles enlaces a epóxidos y subsecuentemente expansiones en el anillo hasta formar THF (Cavé *et al.* 1997).

Teniendo una cadena de ácidos grasos, el primer paso parece ser la deshidrogenación, en la cual se introduce un doble enlace en el carbono 15 o 19. Este patrón es prácticamente desconocido en mamíferos, pero se ha observado en organismos marinos, principalmente en esponjas y en anémonas. Estos intermediarios biogénicos comunes en organismos primitivos tal como esos organismos invertebrados tienden a confirmar el arcaísmo de la familia Annonaceae, consideradas también como “organismos pancrónicos”. Argumentos a favor de esta hipótesis son proveídos por la presencia de moléculas en los diferentes niveles de biosíntesis en la misma planta (Cavé *et al.* 1997).

### **2.3.3 Actividad insecticida**

Las acetogeninas son potentes inhibidoras del complejo I mitocondrial (Esposti *et al.* 1994; González *et al.* 1997; Tormo *et al.* 1999), confiriéndoles diversas actividades biológicas, pueden ser inmunosupresoras y herbicidas (Cavé *et al.*, 1997), citotóxicas (Schlie-Guzmán *et al.* 2009), antimicrobianas (Luna-Cazáres & González-Esquince, 2010), antifúngicas, tripanocidas, leishmanicidas (Lima *et al.* 2014) e insecticidas (Bobadilla *et al.* 2002, 2005; Ansante *et al.* 2015; Tolosa *et al.* 2014).

La toxicidad de las acetogeninas se debe a que son potentes inhibidores del complejo I mitocondrial (Esposti *et al.* 1994 González *et al.* 1997; Tormo *et al.* 1999) e incluso actúan sobre la enzima NADH oxidasa de la membrana plasmática (Morré *et al.* 1995; Miyoshi *et al.* 1998; Takada, 2000). Pese a que se han realizado investigaciones desde hace 35 años aún no existe la claridad de cuál es el centro activo de la molécula. Estas actividades biológicas han sido conferidas a los diferentes componentes de la molécula, tal como la distribución de los grupos hidroxilos, la presencia del anillo lactónico, la cantidad y/o distribución de los anillos THF o THP, o a lo largo y flexibilidad que presenta su cadena alquílica (Miyoshi *et al.* 1998; Tormo *et al.* 1999b; He *et al.* 2007; Álvarez *et al.* 2008).

Con el descubrimiento de la actividad tóxica de las acetogeninas, se han realizado una variedad de evaluaciones utilizando los extractos crudos aislados de distintos órganos de las plantas de anonáceas, casi siempre enfocadas en insectos vectores de enfermedades o aquellos que constituyen plagas de cultivos como *Atta mexicana*, *Spodoptera frugiperda* (maíz), *Leptinotarsa decemlineata* (papa), *Myzus persicae* (tabaco, pepino, lechuga y jitomate), *Oncopeltus fasciatus* y *Tribolium castaneum* (granos almacenados) y *Blatella germánica* (plagas de hogares) (Cuadro 1).

**Cuadro 1.** Actividad insecticida de extractos crudos del género *Annona*.

Especie	Órgano	Insecto	Daño	Bibliografía
<i>Annona atemoya</i>	Semillas	<i>Trichoplusia ni</i>	Cultivo del tabaco	Seffrin <i>et al.</i> (2010)
<i>A. cacans</i>	Hojas	<i>Tetranychus tumidus</i>	Cultivos del plátano	Alves <i>et al.</i> (2013)
	Semillas	<i>Spodoptera frugiperda</i>	Cogollero del maíz	Ansante <i>et al.</i> (2015)
<i>A. cherimola</i>	Semillas	<i>Anopheles sp.</i>	Vector de malaria	Bobadilla <i>et al.</i> (2002)
	Semillas	<i>Rhodnius neglectus</i>	Vector de Chagas	Pinheiro <i>et al.</i> (2011, 2013)
<i>A. coriacea</i>	Fruto-semilla	<i>Aedes aegypti</i>	Vector del dengue clásico, del dengue hemorrágico y fiebre amarilla	Costa <i>et al.</i> (2012)
	Hojas, semillas	<i>Psodoptera frugiperda</i>	Cultivos de maíz	Freitas & Pereira (2013)
		<i>Tetranychus tumidus</i>	Cultivos del plátano	Alves <i>et al.</i> (2013)
<i>A. crassiflora</i>	Tallos, raíces	<i>Aedes aegypti</i>	Vector del dengue clásico, del dengue hemorrágico y fiebre amarilla	Rodrigues <i>et al.</i> (2006)
	Semillas	<i>Tibraca limbativentris</i>	Cultivos de arroz	Krinski & Massaroli (2014)
	Semillas	<i>Culex quinquefasciatus</i>	Vector del dengue y malaria	Alamilla (2000)
<i>A. diversifolia</i>	Raíces	<i>Atta mexicana</i>	Defoliación de cultivos	Acuña-Castro <i>et al.</i> (2011)
	Semillas	<i>Zabrotes subfasciatus</i>	Semillas almacenadas: frijol	Ascencio (2012)
	Raíces	<i>Anastrepha ludens</i>	Cultivos de frutos tropicales	González-Esquinca <i>et al.</i> (2012)
	Tallos			
<i>A. glabra</i>	Semillas	<i>Callosobruchos chinensis</i>	Semillas almacenadas: frijol, soja, garbanzo y haba	Ohsawa <i>et al.</i> (1990)
		<i>Aedes aegypti</i>	Vector del dengue clásico, del dengue hemorrágico y fiebre amarilla	De Mendonça <i>et al.</i> (2005)
<i>A. lutescens</i>	Hojas Tallos	<i>Anastrepha ludens</i>	Cultivos de frutos tropicales	González-Esquinca <i>et al.</i> (2012)

Especie	Órgano	Insecto	Daño	Bibliografía
<b>A. mucosa</b>	Hojas	<i>Euschistus heros</i>		Bandeira <i>et al.</i> (2011)
	Semillas	<i>Chrysodeixis includens</i>	Cultivos de soja	Massaroli <i>et al.</i> (2013)
		<i>Euschistus heros</i>		Bandeira <i>et al.</i> (2011)
		<i>Tibraca limbativentris</i>	Cultivos de arroz	Krinski & Massaroli (2014)
		<i>Spodoptera frugiperda</i>	Cogollero del maíz	Ansante <i>et al.</i> (2015)
<b>A. montana</b>		<i>Spodoptera frugiperda</i>	Cogollero del maíz	Ansante <i>et al.</i> (2015)
<b>A. muricata</b>	Semillas	<i>Callosobruchus chinensis</i>	Semillas almacenadas: frijol, soja, garbanzo y haba	Ohsawa <i>et al.</i> (1990)
		<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Cultivos de soja	Fontana <i>et al.</i> (1998)
		<i>Pseudaletia sequax</i>	Cultivos de trigo	
	<i>Spodoptera litura</i>	Cultivos de maíz	Leatemala & Isman (2004a)	
		<i>Anopheles albimanus</i>	Vector de malaria	
		<i>Aedes aegypti</i>	Vector del dengue clásico, del dengue hemorrágico y fiebre amarilla	Morales <i>et al.</i> (2004)
<b>A. muricata</b>	Flor-hoja	<i>Culex quinquefasciatus</i>	Vector de malaria y dengue	Pérez-Pacheco <i>et al.</i> (2004)
	Semillas	<i>Aedes aegypti</i>	Vector del dengue clásico, del dengue hemorrágico y fiebre amarilla	Bobadilla <i>et al.</i> (2005)
	Hojas			
	Semillas	<i>Sitophilus zeamais</i>	Cultivos de maíz y granos almacenados	Hincapié <i>et al.</i> (2008)
		<i>Culex quinquefasciatus</i>	Vector de malaria y dengue	Florez & Martínez (2010)
	Hojas	<i>Anastrepha ludens</i>	Cultivos de naranjas	González-Esquínca <i>et al.</i> (2012)
<b>A. reticulata</b>	Semillas	<i>Callosobruchus chinensis</i>	Semillas almacenadas: frijol, soja, garbanzo y haba	Ohsawa <i>et al.</i> (1990)
<i>Callosobruchus chinensis</i>		Semillas almacenadas: frijol, soja, garbanzo y haba.		
<i>Tribolium castaneum</i>		granos	Parvin <i>et al.</i> (2003)	
<i>Spodoptera litura</i>		Cultivos de tabaco, papas, cebolla, col y cacahuete	Leatemala & Isman (2004a)	
<b>A. squamosa</b>	Semillas	<i>Chrysoperla carnea</i>		
		<i>Plutella xylostella</i>	Cultivos de crucíferas: col, coliflor, brócoli	Leatemala & Isman (2004a, b)
		<i>Spodoptera litura</i>	Cultivos de tabaco, papas, cebolla, col y cacahuete	
		<i>Trichoplusia ni</i>	Cultivo del tabaco	
		<i>Culex quinquefasciatus</i>	Vector de malaria y dengue	Pérez-Pacheco <i>et al.</i> (2004)
	Hojas	<i>Corcyra cephalonica</i>	Granos almacenados	Narangoda & Karunaratne (2009)
Semillas	<i>Crociodolomia pavonana</i>	Cultivos de crucíferas: col, coliflor, brócoli	Dadang <i>et al.</i> (2009, 2011)	
	<i>Plutella xylostella</i>	Cultivos de crucíferas: col, coliflor, brócoli		
	<i>Trichoplusia ni</i>	Cultivo del tabaco	Seffrin <i>et al.</i> (2010)	
	<i>Aedes albopictus</i>		Kemprij & Bath (2011)	
<b>A. sylvatica</b>	Hojas	<i>Tetranychus tumidus</i>	Cultivos del plátano	Alves <i>et al.</i> (2013)
	Semillas	<i>Spodoptera frugiperda</i>	Cogollero del maíz	Ansante <i>et al.</i> (2015)

La actividad insecticida de 61 acetogeninas aisladas de 13 especies se ha demostrado principalmente sobre el mosquito vector de la fiebre amarilla, filariasis y malaria *A. aegypti* (He *et al.* 1997), el escarabajo de la papa *Leptinotarsa decemlineata* (González-Coloma, 2002), el cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* (Álvarez *et al.* 2007) y la chinche del algodoncillo *Oncopeltus fasciatus* (Álvarez *et al.* 2008, Tolosa *et al.* 2012) (Cuadros 2 y 3).

Seis años después del descubrimiento de la uvaricina (Jolad *et al.* 1982), Fujimoto *et al.* (1988) realizaron el primer estudio sobre la actividad insecticida de una acetogenina: squamocina, aislada de semillas de *A. squamosa*, la cual fue tóxica contra larvas de la polilla de la col *Plutella xylostella*. Existe evidencia de que las acetogeninas actúan en diferentes concentraciones y en distintas etapas de desarrollo de los organismos. Por ejemplo, Kawazu *et al.* (1989) evaluaron a la annonina y neoannonina aisladas de *A. squamosa* contra huevos, larvas y adultos de la mosca de la fruta *Drosophila* sp. Estos autores demostraron la potente toxicidad de estas dos moléculas, con una mortalidad media de huevos y larvas a concentraciones de 125~140  $\mu\text{g}\cdot 2\text{g}$  de dieta<sup>-1</sup> y de adultos a 62.5  $\mu\text{g}\cdot 2\text{g}$  de dieta<sup>-1</sup>.

Diversos estudios sobre la actividad insecticida de las acetogeninas ayudaron a elucidar el mecanismo de acción de estas moléculas, concluyendo en todos los casos que se debía a la inhibición de la cadena respiratoria, entre ellos se encuentran los siguientes: Lieb *et al.* (1990) demostraron que la annonina I, aislada de semillas de *A. squamosa*, tiene actividad insecticida sobre el escarabajo *Phaedon cochleariae* y la polilla de la col *Plutella xylostella*. Un año después se demostró que la actividad de la annonina en *P. xylostella* se debió a la inhibición respiratoria (Londershansen *et al.* 1991). Lewis *et al.* (1993) publican que la acetogenina asimicina, aislada de *Asimina triloba*, tiene actividad insecticida contra larvas del 5° estadio del taladro del maíz, *Ostrinia nubilalis*, a una concentración de 0.55nmol·mg proteína<sup>-1</sup>, inhibiendo el 50% de la respiración, lo que sugería un bloqueo en la cadena transportadora de electrones en el complejo I mitocondrial, la misma acción de la bullatacina (rolliniastatina-2) sobre células Sf9 de insectos (Ahammadsahib *et al.* 1993).

**Cuadro 2.** Acetogeninas con actividad insecticida.

Especie	Órgano	Acetogeninas	Insecto	Cita		
<i>Annona cherimola</i>	Semillas	Squamocina	<i>Leptinotarsa decemlineata</i> <i>Myzus persicae</i>	Guadaño <i>et al.</i> (2000)		
		Laherradurina	<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	González-Coloma <i>et al.</i> (2002)		
		Rolliastatina-2	<i>Spodoptera littoralis</i>			
		Squamocina	<i>Leptinotarsa decemlineata</i> <i>Spodoptera littoralis</i>			
		Asimicina Itrabina Almuñequina Cherimolina-1 Cherimolina-2 Motrilina Neoannonina Tucumanina	<i>Spodoptera frugiperda</i>		Álvarez <i>et al.</i> (2007)	
		Itrabina Almunequina Molvizarina Squamocina	<i>Oncopeltus fasciatus</i>	Álvarez <i>et al.</i> (2008)		
		<i>Annona diversifolia</i>	Semillas y raíces	Laherradurina	<i>Atta mexicana</i>	Acuña-Castro <i>et al.</i> (2010)
		<i>Annona glabra</i>	Semillas	Annonacina	<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	González-Coloma. (2002)
		<i>Annona montana</i>	Hojas y ramas	Annonacina Annonacina-A cis-annonacina-10-ona Densicomacina-1 Murihexocina-A	<i>Oncopeltus fasciatus</i>	Álvarez <i>et al.</i> (2008)
				Annonacina cis-annonacina-10-ona Densicomacina-1 Gigantetronenina Murihexocina-B Tucupentol	<i>Spodoptera frugiperda</i>	Di-Toto <i>et al.</i> (2010)
<i>Annona mucosa</i>	Semillas	Rolliniastatina-1	<i>Spodoptera frugiperda</i>	Ansante <i>et al.</i> (2015)		
<i>Annona muricata</i>		Annomontacina Bullatalicina (Cherimolina-2) Gigantetrocina A	<i>Blatella germánica</i>	Alali <i>et al.</i> (1998)		
<i>Annona bullata</i> <i>Annona muricata</i> <i>Asimina longifolia</i> <i>Asimina triloba</i> <i>Goniothalamus giganteus</i> <i>Rollinia mucosa</i>	Corteza, hojas, semillas	10-OH asimicina 12-OH bullatacina A 12-OH bullatacina B Annonacina Annonacina 4-Oac Annonacina A Annopentocina A	<i>Aedes aegypti</i>	He <i>et al.</i> (1997)		

Especie	Órgano	Acetogeninas	Insecto	Cita
<b><i>Annona bullata</i></b> <b><i>Annona muricata</i></b> <b><i>Asimina longifolia</i></b> <b><i>Asimina triloba</i></b> <b><i>Goniothalamus giganteus</i></b> <b><i>Rollinia mucosa</i></b>	Corteza, hojas, semillas	Annopentocina B	<i>Aedes aegypti</i>	He <i>et al.</i> (1997)
		Annopentocina C		
		Asimicina		
		Asiminacina		
		Bullatacina		
		(Rolliniastatina-2)		
		Bullatalicina		
		(Cherimolina 1)		
		Bullatetrocina		
		<i>cis</i> -Gigantrionenina		
		<i>cis</i> -Silvaticina		
		Giganenina		
		Gigantetrocina A		
		Gigantetrocinona		
		Gigantetronenina		
		Gigantriocina		
		Gigantrionenina		
		Goniothalamicina B		
		Longicoricina		
		Longifolicina		
Longimicina B				
Longimicina C				
Longimicina D				
Motrilina				
Mucosina				
Muricatetrocina B				
Muricatetrocina C				
Muriehxocina A				
Muriehxocina B				
Rollidecina A				
Rollidecina B				
Rollinecina A				
Rollinecina B				
Rollitacina				
		Silvaticina		
		Trilobacina		
		Trilobacinona		
		Trilobina		
		Xylomaticina 4-Oac		
<b><i>Annona squamosa</i></b>	Semillas	Annonina (Squamocina)	<i>Plutella xylostella</i>	Fujimoto <i>et al.</i> (1988)
			<i>Drosophila</i> sp	Kawazu <i>et al.</i> (1989)
			<i>Phaedon cochleariae</i>	Lieb <i>et al.</i> (1990)
		Neoannonina	<i>Drosophila</i> sp	Kawazu <i>et al.</i> (1989)
		Annotemoyina-1	<i>Tribolium castaneum</i>	Parvin <i>et al.</i> (2003)
			<i>Ostrinia nubilalis</i>	Lewis <i>et al.</i> (1993)
<b><i>Asimina triloba</i></b>		Asimicina	<i>Epilachna varivestis</i>	Gupta <i>et al.</i> (2011)
			<i>Aphis gossypii</i>	
			<i>Aedes aegypti</i>	
			Goniothalamicina	
<b><i>Rollinia membranaceae</i></b>		Rolliniastatina-1	<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	González-Coloma <i>et al.</i> (2002)
			<i>Spodoptera littoralis</i>	
<b><i>Rollinia occidentalis</i></b>	Semillas	Desacetylurvaricina	<i>Spodoptera frugiperda</i>	Tolosa <i>et al.</i> (2012)
	Motrilina			
	Rolliniastatina-1			
	Rolliniastatina-2			
		Silvaticina		

Las distintas investigaciones intentan explicar la relación entre la toxicidad y la estructura de las moléculas, existiendo aún una discusión acerca de los sitios activos de las acetogeninas. Alali *et al.* (1998) demostraron que las acetogeninas annomontacina, gigantetrocina-A y bullatalicina (=cherimolina 1) tienen actividad tóxica sobre la cucaracha alemana *Blattella germanica*. He *et al.* (2007) publican la toxicidad de 44 acetogeninas contra el mosquito de la fiebre amarilla *Aedes aegypti*, teniendo efectividad a concentraciones menores a los  $50\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . Las acetogeninas más tóxicas encontradas en ese trabajo fueron bullatacina (rolliniastatina-2) y muricatetrocina-B a concentraciones de  $1.10\times 10^{-1}\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  y  $6.22\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , respectivamente, suponiendo que su toxicidad se debe al número y posición de los grupos hidroxilos y la posición de los anillos THF.

Guadaño *et al.* (2000) analizaron el efecto tóxico de la annonacina y squamocina contra adultos del escarabajo de la papa *Leptinotarsa decemlineata*, el pulgón verde *Myzus persicae*, la rosquilla negra *Spodoptera littoralis*, siendo la squamocina, aislada de semillas de *A. cherimola*, la que tuvo mayor toxicidad ( $10\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{cm}^2$ ) contra *L. decemlineata* y *M. persicae*, en tanto que la annonina aislada de semillas de *Annona glabra* tuvo una actividad disuasoria contra *L. decemlineata* a la misma concentración. Los autores mencionan que aunque la toxicidad de la squamocina pueda referirse a su estructura bis-THF e inhibir el complejo I mitocondrial, la actividad disuasoria de la annonacina responde a otro mecanismo. Además, estos autores comprobaron que ninguna de estas dos acetogeninas tuvo actividad frente a *S. littoralis*, por lo que sugirieron la posible inactivación de estas acetogeninas por el sistema enzimático de este insecto.

González-Coloma *et al.* (2002) comprobaron que las acetogeninas annonacina, bullatacina (rolliniastatina-2), rolliniastatina-1, laherradurina y squamocina son tóxicas sobre adultos de *L. decemlineata*. Para conocer la eficacia de la toxicidad de la annotemoyina-1, Parvin *et al.* (2003) realizaron ensayos en los diferentes estadios de desarrollo del gorgojo rojo del frijol *Tribolium castaneum*, encontrando que la  $\text{LD}_{50}$  varía entre  $101.68$  y  $920.54\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ , siendo más sensibles los primeros estadios.

Álvarez *et al.* (2007) analizaron nueve acetogeninas contra larvas y pupas del cogollero del maíz *S. frugiperda* a una concentración de  $50\text{ mg}\cdot\text{g dieta}^{-1}$ . La squamocina

resultó la acetogenina más tóxica, aunque también la asimicina, almuñequina, cherimolina-1, cherimolina-2, itrabina, motrilina, neoannonina y tucumanina producen mortalidad y malformaciones que no les permite sobrevivir. Todas las acetogeninas provocaron un 80% de mortalidad de pupas.

Diez acetogeninas fueron evaluadas por Álvarez *et al.* (2008) frente a ninfas del 5° estadio y adultos de *Oncopeltus fasciatus*, de las cuales ocho tuvieron actividad insecticida: almuñequina, annonacina, annonacina-A, *cis*-annonacina-10-ona, cherimolina, densicomasina-1, itrabina, molvizarina y squamocina. Las acetogeninas con estructura bis-THF, itrabina y squamocina fueron las que provocaron el 100% de mortalidad a 0.1 y 0.25  $\mu\text{g}\cdot\text{ninfa}$ . Según estos autores, la propiedad insecticida pareciera estar dada por el número y posición de los grupos hidroxilos y la presencia de anillos THF adyacentes, misma conclusión hecha por He *et al.* (2007).

Tres años después Acuña *et al.* (2010) probaron que laherradurina, aislada de semillas de *A. diversifolia*, es tóxica en una concentración de  $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  contra la hormiga arriera *Atta mexicana*. En este mismo año, Di Toto *et al.* (2010) analizaron la actividad de las acetogeninas annonacina, *cis*-annonacina-10-ona, densicomasina-1, murihexocina-B gigantetronenina y tucupentol contra larvas y pupas de *Spodoptera frugiperda*, las cuales a una concentración de  $100 \mu\text{g}\cdot\text{g}$  de dieta<sup>-1</sup> provocaron hasta el 70% de mortalidad en ambos estadios.

La asimicina, aislada de *Asimina triloba*, fue evaluada contra *Aedes aegypti*, el pulgón algodónero *Aphis gossypii* y el gorgojo del frijol *Epilachna varivestis*, obteniendo una mortalidad del 100% a 500 ppm, 50 ppm y 1 ppm, respetivamente (Gupta *et al.* 2011). Tolosa *et al.* (2012) evaluaron a las acetogeninas desacetiluaricina, bullatacina (rolliastatina-2), motrilina, rolliastatina-1 y silvaticina, aisladas de *Rollinia occidentalis*, sobre larvas de *Spodoptera frugiperda*. Estas acetogeninas causan una mortalidad del 100% en concentraciones entre 50 y 100 ppm. El estudio más reciente fue realizado por Ansante *et al.* (2015), quienes probaron a la rolliniastatina-1, aislada de *Annona mucosa* sobre el cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda*, provocando el 87% de la mortalidad de las larvas.



Desde el punto de vista de la actividad insecticida, las acetogeninas más estudiadas son la annonacina, asimicina y squamocina, esto debido a que, de acuerdo con Lannuzel *et al.* (2003), Champy *et al.* (2005) y Pomper *et al.* (2009) son las más abundantes en algunas anonáceas. Entre las acetogeninas más tóxicas encontramos a la rolliniastatina 1 y la bullatacina (rolliniastatina 2) (Esposti *et al.* 1994). De las moléculas mencionadas, 31 tienen estructura mono-THF y la misma cantidad presentan estructura bis-THF, de estas últimas 25 cuentan con anillos THF adyacentes y seis con anillos THF no adyacentes. He *et al.* (2007) y Álvarez *et al.* (2008) mencionan que la propiedad insecticida parece estar dada por el número y posición de los grupos hidroxilos y la presencia de anillos THF adyacentes. Sin embargo, Álvarez *et al.* (2007) contradicen esta posición debido a que acetogeninas mono-THF también causaron los mismos efectos que las bis-THF. Por lo tanto, aún se desconoce cuál o cuáles son los centros activos que forman parte de la estructura de las acetogeninas.

De acuerdo con la revisión bibliográfica se observó que la toxicidad de las acetogeninas está determinada por el tipo molécula, la concentración a la que se evalúa, así como el insecto que funcionará como modelo de estudio y el estadio larvario en el que se encuentre.

**Cuadro 3.** Concentraciones tóxicas de diversas acetogeninas.

Acetogeninas	Insectos	Estadio	Mortalidad	Concentración	Concentración en moles	Referencia
Almunequina	<i>Oncopeltus fasciatus</i>	Ninfa Adulto	LC <sub>50</sub>	11.3 ng·ninfa	1.76×10 <sup>-5</sup> μmol· ninfa	Álvarez <i>et al.</i> (2007)
	<i>Spodoptera frugiperda</i>	Larva		50 μg·g de dieta	0.08 μmol·g de dieta	
Annomontacina	<i>Blatella germánica</i>	Ninfa		1000 ppm	1085.83 μmol·L <sup>-1</sup>	Alali <i>et al.</i> (1998)
Annonacina	<i>Aedes aegypti</i>	Larva	LC <sub>50</sub>	3.0 mg·L <sup>-1</sup>	4.80 μmol·L <sup>-1</sup>	He <i>et al.</i> (2007)
	<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	Adulto	29%	10 μg·insecto	0.02 μmol·insecto	Guadaño <i>et al.</i> (2000)
	<i>Oncopeltus fasciatus</i>	Ninfa	>50%	10 μg·ninfa	0.07 μmol·ninfa	Álvarez <i>et al.</i> (2007)
	<i>Spodoptera frugiperda</i>	Larva Pupa	LC <sub>50</sub>	94.38 ppm	151.02 μmol·g de dieta	Di-Toto <i>et al.</i> (2010)
4-acetylannonacina	<i>Aedes aegypti</i>	Larva	LC <sub>50</sub>	6.2 mg·L <sup>-1</sup> 10.8 mg·L <sup>-1</sup>	9.70 μmol·L <sup>-1</sup> 4.80 μmol·L <sup>-1</sup>	He <i>et al.</i> (2007)
Annonacina-A	<i>Oncopeltus fasciatus</i>	Ninfa	>50%	10 μg·ninfa	0.07 μmol·ninfa	Álvarez <i>et al.</i> (2007)
Annonina (squamocina)	<i>Drosophila sp.</i>	Huevo Larva	LD <sub>50</sub>	125 ~ 140 μg·2g de dieta	0.20 ~ 0.22 μmol·2g de dieta	Kawazu <i>et al.</i> (1989)

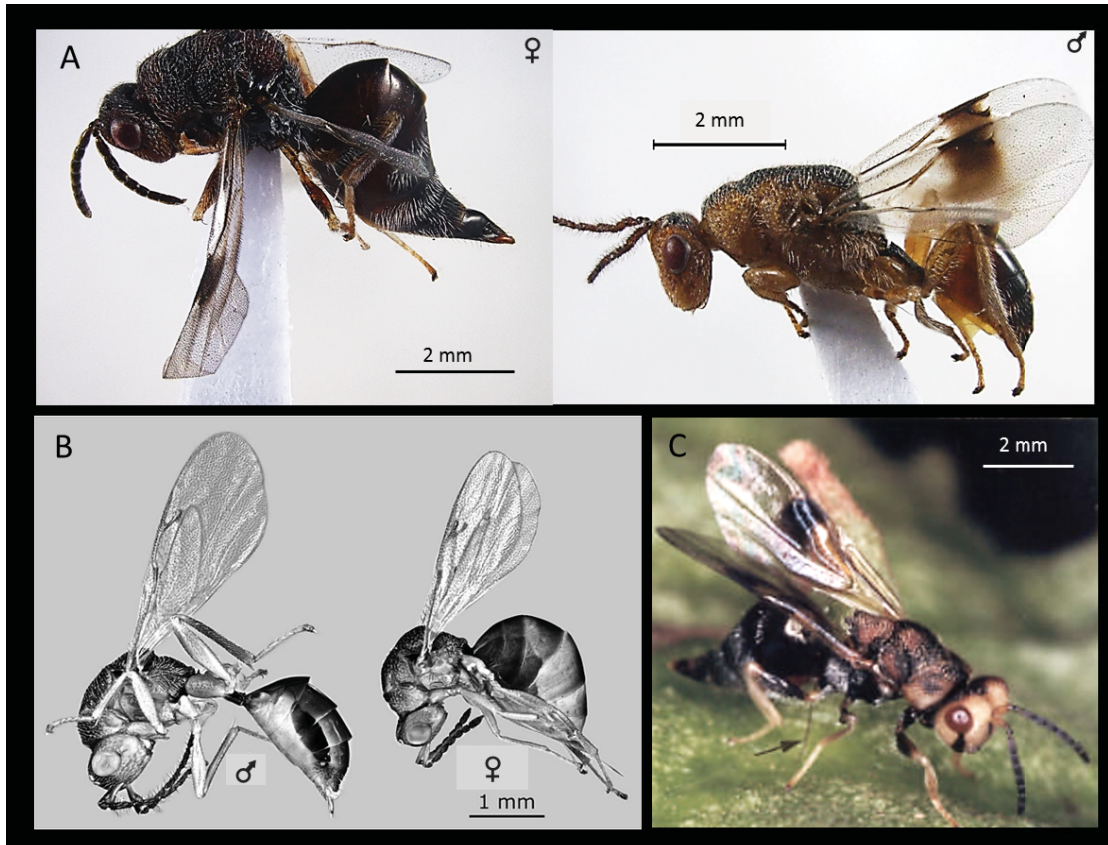
Acetogeninas	Insectos	Estadio	Mortalidad	Concentración	Concentración en moles	Referencia
		Adulto	LD <sub>50</sub>	62.5 µg·2g de dieta	0.10 µmol·2g de dieta	
Annopentocina A	<i>Aedes aegypti</i>	Larva	LC <sub>50</sub>	>50 mg·L <sup>-1</sup>	>8.16 µmol·L <sup>-1</sup>	He <i>et al.</i> (2007)
Annopentocina B		Larva	LC <sub>50</sub>	>50 mg·L <sup>-1</sup>	>8.16 µmol·L <sup>-1</sup>	
Annopentocina C		Larva	LC <sub>50</sub>	>50 mg·L <sup>-1</sup>	>8.16 µmol·L <sup>-1</sup>	
Annotemoyina-1	<i>Tribolium castaneum</i>	Larva 1° estadio	LD <sub>50</sub>	243.10, 394.89, 579.67 µgm·cm <sup>-2</sup>	0.42, 0.69, 1.09 µmol·cm <sup>-2</sup>	Parvin <i>et al.</i> (2003)
		Larva 2° estadio	LD <sub>50</sub>	612.92, 366.95, 315.18 µgm·cm <sup>-2</sup>	1.07, 0.64, 0.55 µmol·cm <sup>-2</sup>	
		Larva 3° estadio	LD <sub>50</sub>	333.67, 243.30, 636.12 µgm·cm <sup>-2</sup>	0.58, 0.43, 1.11 µmol·cm <sup>-2</sup>	
		Larva 4° estadio	LD <sub>50</sub>	684.88, 101.68, 449.28 µgm·cm <sup>-2</sup>	1.19, 0.18, 0.78 µmol·cm <sup>-2</sup>	
		Larva 5° estadio	LD <sub>50</sub>	199.41, 525.93, 742.69 µgm·cm <sup>-2</sup>	0.35, 0.95, 1.29 µmol·cm <sup>-2</sup>	
		Larva 6° estadio	LD <sub>50</sub>	191.70, 609.38 y 792.38 µgm·cm <sup>-2</sup>	0.33, 1.06, 1.38 µmol·cm <sup>-2</sup>	
		Adulto macho	LD <sub>50</sub>	827.43, 615.23 y 221.13 µgm·cm <sup>-2</sup>	1.44, 1.07, 0.28 µmol·cm <sup>-2</sup>	
Adulto hembra	LD <sub>50</sub>	429.42, 693.10 y 920.54 µgm·cm <sup>-2</sup>	0.75, 1.21, 1.60 µmol·cm <sup>-2</sup>			
Asimicina	<i>Spodoptera frugiperda</i>	Larva	LC <sub>50</sub>	50 µg·g de dieta	0.08 µmol·g de dieta	He <i>et al.</i> (2007)
	<i>Aedes aegypti</i>		LC <sub>50</sub>	2.7 mg·L <sup>-1</sup>	4.33 µmol·L <sup>-1</sup>	
	<i>Aphis gossypii</i>		100%	500ppm	802.65 µmol·L <sup>-1</sup>	Gupta <i>et al.</i> (2011)
	<i>Epilachna varivestis</i>		100%	50 ppm	80.26 µmol·L <sup>-1</sup>	
	<i>Aedes aegypti</i>		100%	1 ppm	1.61 µmol·L <sup>-1</sup>	
	<i>Ostrinia nubilalis</i>	Larva 4° estadio	50% de inhibición	0.55 nmol·mg proteína	8.83×10 <sup>-7</sup> µmol·g de dieta	Lewis <i>et al.</i> (1993)
10-OH asimicina				15.2 mg·L <sup>-1</sup>	23.79 µmol·L <sup>-1</sup>	
Asiminacina				1.6 mg·L <sup>-1</sup>	2.57 µmol·L <sup>-1</sup>	
12-OH bullatacina A	<i>Aedes aegypti</i>	Larva	LC <sub>50</sub>	8.0 mg·L <sup>-1</sup>	12.52 µmol·L <sup>-1</sup>	He <i>et al.</i> (2007)
12-OH bullatacina B				8.0 mg·L <sup>-1</sup>		
Bullatalicina				9.0 mg·L <sup>-1</sup>	14.09 µmol·L <sup>-1</sup>	
	<i>Blatella germanica</i>	Ninfa		1000 ppm	1565.10 µmol·L <sup>-1</sup>	Alali <i>et al.</i> (1998)
Bullatetrocina	<i>Aedes aegypti</i>	Larva	LC <sub>50</sub>	6.2 mg·L <sup>-1</sup>	9.70 µmol·L <sup>-1</sup>	He <i>et al.</i> (2007)
Cherimolina-1	<i>Spodoptera frugiperda</i>			50 µg·g de dieta	0.08 µmol·g de dieta	Álvarez <i>et al.</i> (2007)
Cherimolina-2				50 µg·g de dieta	0.08 µmol·g de dieta	
<i>cis</i> -annonacina-10-uno	<i>Oncopeltus fasciatus</i>	Ninfa	>50%	10 µg·ninfa	0.07 µmol·ninfa	
	<i>Spodoptera frugiperda</i>	Larva Pupa	LC <sub>50</sub>	83.4 ppm	139.72 µmol·g de dieta	Di-Toto <i>et al.</i> (2010)

Acetogeninas	Insectos	Estadio	Mortalidad	Concentración	Concentración en moles	Referencia
<i>cis</i> -Gigantrionenina	<i>Aedes aegypti</i>	Larva	LC <sub>50</sub>	8.6 mg·L <sup>-1</sup>	14.17 μmol·L <sup>-1</sup>	He <i>et al.</i> (2007)
<i>cis</i> -silvaticina		Larva		6.0 mg·L <sup>-1</sup>	9.39 μmol·L <sup>-1</sup>	
Densicomasina-1	<i>Oncopeltus fasciatus</i>	Adulto	28%	10 μg·ninfa	0.02 μmol·ninfa	Álvarez <i>et al.</i> (2007)
		Larva Pupa	40% 60%	100 μg·g de dieta	0.17 μmol·g de dieta	Di-Toto <i>et al.</i> (2010)
Desacetylurvaricina	<i>Spodoptera frugiperda</i>	Larva	100%	50 ppm	83.38 μmol·L <sup>-1</sup>	
			100%	100 ppm	164.76 μmol·L <sup>-1</sup>	
Giganenina	<i>Aedes aegypti</i>	Larva	LC <sub>50</sub>	7.8 mg·L <sup>-1</sup>	12.85 μmol·L <sup>-1</sup>	He <i>et al.</i> (2007)
Gigantetrocina-A					10.4 mg·L <sup>-1</sup>	
	<i>Blatella germanica</i>	Ninfa		1000 ppm	1675.33 μmol·L <sup>-1</sup>	Alali <i>et al.</i> (1998)
Gigantetrocinona	<i>Aedes aegypti</i>	Larva	LC <sub>50</sub>	2.2 mg·L <sup>-1</sup>	3.69 μmol·L <sup>-1</sup>	He <i>et al.</i> (2007)
Gigantetronenina	<i>Spodoptera frugiperda</i>	Larva Pupa	LC <sub>50</sub>	83.1 ppm	133.40 μmol·g de dieta	Di-Toto <i>et al.</i> (2010)
Gigantetroneninona	<i>Aedes aegypti</i>	Larva	LC <sub>50</sub>	8.3 mg·L <sup>-1</sup>	13.32 μmol·L <sup>-1</sup>	He <i>et al.</i> (2007)
Gigantriciocina				18.5 mg·L <sup>-1</sup>	31.85 μmol·L <sup>-1</sup>	
Gigantrionenina				4.0 mg·L <sup>-1</sup>	6.89 μmol·L <sup>-1</sup>	
Goniothalamicina-B				13.3 mg·L <sup>-1</sup>	22.28 μmol·L <sup>-1</sup>	
Itrabina	<i>Oncopeltus fasciatus</i>	Ninfa Adulto	LC <sub>50</sub>	14.91 ng·ninfa	2.49×10 <sup>-5</sup> μmol·ninfa	Álvarez <i>et al.</i> (2007)
	<i>Spodoptera frugiperda</i>	Pupa Adulto		50 μg·g de dieta	0.08 μmol·g de dieta	
Laherradurina	<i>Atta mexicana</i>	Adulto		100 μg·ml <sup>-1</sup>	190 μmol·L <sup>-1</sup>	Acuña <i>et al.</i> (2010)
	<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	Adulto				
Longicoricina	<i>Aedes aegypti</i>	Larva	LC <sub>50</sub>	58.0 mg·L <sup>-1</sup>	99.85 μmol·L <sup>-1</sup>	He <i>et al.</i> (2007)
Longifolicina				249 mg·L <sup>-1</sup>	408.90 μmol·L <sup>-1</sup>	
Longimicina B				27.3 mg·L <sup>-1</sup>	45.89 μmol·L <sup>-1</sup>	
Longimicina C				65.7 mg·L <sup>-1</sup>	110.44 μmol·L <sup>-1</sup>	
Longimicina D				11.5 mg·L <sup>-1</sup>	18.46 μmol·L <sup>-1</sup>	
Molvizarina	<i>Oncopeltus fasciatus</i>	Ninfa	LC <sub>50</sub>	0.34 ng·ninfa	5.97×10 <sup>-7</sup> μmol·ninfa	Álvarez <i>et al.</i> (2007)
Motrilina	<i>Aedes aegypti</i>	Larva	LC <sub>50</sub>	4.7 mg·L <sup>-1</sup>	7.54 μmol·L <sup>-1</sup>	He <i>et al.</i> (2007)
				50 μg·g de dieta	0.08 μmol·g de dieta	Álvarez <i>et al.</i> (2007)
	<i>Spodoptera frugiperda</i>	Larva	100%	50 ppm	80.26 μmol·L <sup>-1</sup>	Tolosa <i>et al.</i> (2012)
				100 ppm	160.53 μmol·L <sup>-1</sup>	Tolosa <i>et al.</i> (2012)
Mucocina	<i>Aedes aegypti</i>	Larva	LC <sub>50</sub>	2.1 mg·L <sup>-1</sup>	3.29 μmol·L <sup>-1</sup>	He <i>et al.</i> (2007)
Muricatetrocina B				2.2 mg·L <sup>-1</sup>	3.69 μmol·L <sup>-1</sup>	
Muricatetrocina C				>50 mg·L <sup>-1</sup>	>83.77 μmol·L <sup>-1</sup>	
				>50 mg·L <sup>-1</sup>	>94.54 μmol·L <sup>-1</sup>	
Murihexocina-A				<i>Oncopeltus fasciatus</i>	Ninfas Adultos	
Murihexocina-B	<i>Aedes aegypti</i>	Larva	LC <sub>50</sub>	>50 mg·L <sup>-1</sup>	>94.54 μmol·L <sup>-1</sup>	He <i>et al.</i> (2007)

Acetogeninas	Insectos	Estadio	Mortalidad	Concentración	Concentración en moles	Referencia
	<i>Spodoptera frugiperda</i>	Larva Pupa	30% 70%	100 µg·g de dieta	0.19 µmol·L <sup>-1</sup>	Di-Toto <i>et al.</i> (2010)
Neoannonina	<i>Drosophila sp.</i>	Huevo		125~140 µg·2g de dieta <sup>-1</sup>	0.22~0.24 µmol·2g de dieta <sup>-1</sup>	Kawazu <i>et al.</i> (1989)
		Larva		62.5 µg·2g de dieta <sup>-1</sup>	0.18 µmol·2g de dieta <sup>-1</sup>	Kawazu <i>et al.</i> (1989)
	<i>Spodoptera frugiperda</i>	Adulto	LD <sub>50</sub>	50 µg·g de dieta <sup>-1</sup>	0.09 µmol·g de dieta <sup>-1</sup>	Álvarez <i>et al.</i> (2007)
Rolliastatina-1	<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	Adulto	EC <sub>50</sub>			
	<i>Spodoptera frugiperda</i>	Larva	100% LC <sub>50</sub>	100 ppm 84.3 mg·kg <sup>-1</sup>	160.53 µmol·L <sup>-1</sup> 135530.54 µmol·kg <sup>-1</sup>	Tolosa <i>et al.</i> (2012)
Rollinistatina-2 (bullatacina)	<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	Adulto	97-100%	2.3 µg·cm <sup>2</sup>	3.69×10 <sup>-3</sup> µmol·cm <sup>2</sup>	
	<i>Spodoptera frugiperda</i>	Larva	100%	50 ppm	80.26 µmol·L <sup>-1</sup>	Tolosa <i>et al.</i> (2012)
	<i>Spodoptera littoralis</i>					
Rollidecina A				1.0 × 10 <sup>-1</sup> mg·L <sup>-1</sup>	0.16 µmol·L <sup>-1</sup>	
Rollidecina B				11.2 mg·L <sup>-1</sup>	17.53 µmol·L <sup>-1</sup>	
Rollinecina A	<i>Aedes aegypti</i>	Larva	LC <sub>50</sub>	>50 mg·L <sup>-1</sup>	78.25 µmol·L <sup>-1</sup>	He <i>et al.</i> (2007)
Rollinecina B				>50 mg·L <sup>-1</sup>	>80 µmol·L <sup>-1</sup>	
Rollitacina				>50 mg·L <sup>-1</sup>	>80 µmol·L <sup>-1</sup>	
				4.7 mg·L <sup>-1</sup>	7.36 µmol·L <sup>-1</sup>	
	<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	Adulto	92%	10 µg·insecto		Guadaño <i>et al.</i> (2000)
Squamocina	<i>Myzus persicae</i>			10 µg·cm <sup>-2</sup>	0.07 µmol·cm <sup>-2</sup>	Guadaño <i>et al.</i> (2000)
	<i>Oncopeltus fasciatus</i>	Ninfa	LC <sub>50</sub>	0.16 µg·ninfa	2.56 ×10 <sup>-4</sup> µmol·ninfa	Álvarez <i>et al.</i> (2007)
	<i>Spodoptera frugiperda</i>			50 mg·g dieta <sup>-1</sup>		
Silvaticina	<i>Aedes aegypti</i>		LC <sub>50</sub>	1.6 mg·L <sup>-1</sup>	2.50 µmol·L <sup>-1</sup>	He <i>et al.</i> (2007)
	<i>Spodoptera frugiperda</i>	Larva	70%	100 ppm	156.51 µmol·L <sup>-1</sup>	Tolosa <i>et al.</i> (2012)
Trilobacina			LC <sub>50</sub>	1.6 mg·L <sup>-1</sup>	2.57 µmol·L <sup>-1</sup>	
Trilobacinone	<i>Aedes aegypti</i>		LC <sub>50</sub>	10.4 mg·L <sup>-1</sup>	16.70 µmol·L <sup>-1</sup>	He <i>et al.</i> (2007)
Trilobina			LC <sub>50</sub>	6.7×10 <sup>-1</sup> mg·L <sup>-1</sup>	1.08 µmol·L <sup>-1</sup>	
Tucupentol	<i>Spodoptera frugiperda</i>	Larva-pupa	30%-70%	100 µg·g de dieta	0.16 µmol·g de dieta	Di-Toto <i>et al.</i> (2010)
4-acetilxylomaticina	<i>Aedes aegypti</i>	Larva	LC <sub>50</sub>	6.2 mg·L <sup>-1</sup>	9.30 µmol·L <sup>-1</sup>	He <i>et al.</i> (2007)

#### 2.4. El género *Bephratelloides* Giraul

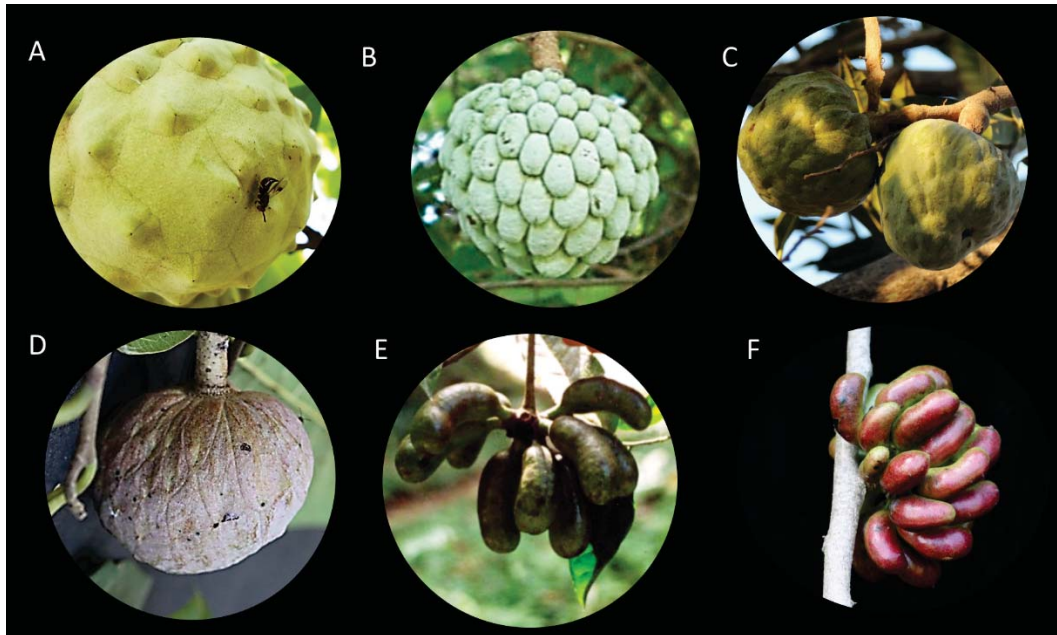
El género *Bephratelloides* (Chalcidoidea: Eurytomidae) está constituido por avispas barrenadoras de semillas. De acuerdo a Noyes (2014), este género incluye ocho especies: *B. ablusus* Grissell & Foster, *B. cubensis* Ashmead, *B. duguetiphagus* Chang, *B. limai* Bondar, *B. melleus* Westwood, *B. paraguayensis* Crawford, *B. petiolatus* Grissell & Schauff y *B. pomorum* (sin. *B. maculicollis* Cameron) Fabricius (Figura 7).



**Figura 7.** Algunas especies del género *Bephratelloides*. A) *B. cubensis*. B) *B. ablusus*. C) *B. pomorum*. Imágenes A) Claudia Durán, B) Castañeda-Vildózola *et al.* (2011), C) Pereira *et al.* (2003).

Las especies de *Bephratelloides* atacan especialmente a especies de la familia Annonaceae (Castañeda-Vildózola *et al.* 2010). La presencia de *B. cubensis* se ha documentado especialmente en el género *Annona*, probablemente porque son las que tienen mayor interés comercial. Otras anonáceas hospederas son *Cymbopetalum mayanum* (Grissell & Foster, 1996), *Xylopiya aromatica* (Perioto, 1997) y *Duguetia panamensis* (Chang, 1998) (Figura 8, cuadro 7). Aunque se conoce bien la afinidad de *Bephratelloides* a las

anonáceas, se tiene un registro de *B. ablusus* en semillas de *Diospyros digyna*, una especie que pertenece a la familia Ebenaceae (Castañeda-Vildózola *et al.* 2010).



**Figura 8.** Algunas plantas hospederas de *Bephratelloides*. A) *Annona diversifolia*. B) *A. squamosa*. C) *A. lutescens*. D) *A. reticulata*. E) *Cymbopetalum mayanum*. F) *Xylopia aromatica*. Fotografías A,C) Colección del Laboratorio de Fisiología y Química Vegetal; D) Missouri Botanical Garden MBG© B, E) Cirilo Nelson (TEFH) ©; F) O.M. Montiel ©. B, D-F) Adquiridas de Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. 30 Sep 2016.

Las especies de *Bephratelloides* están distribuidas únicamente en el continente Americano, de las cuales *B. cubensis* tiene una distribución más amplia, seguida por *B. pomorum*. (Figura 9, cuadro 4). En México se ha reportado la presencia de *B. ablusus* y *B. cubensis*, ambas en Chiapas (Grissell & Foster, 1996; González-Sánchez, 2014), mientras que *B. cubensis* se localiza también en Nayarit (Rodríguez *et al.* 1980; Hernández-Fuentes, 2008), Guerrero, Morelos, Puebla, Veracruz y Yucatán (Castañeda-Vildózola, 2010) (Figura 9).



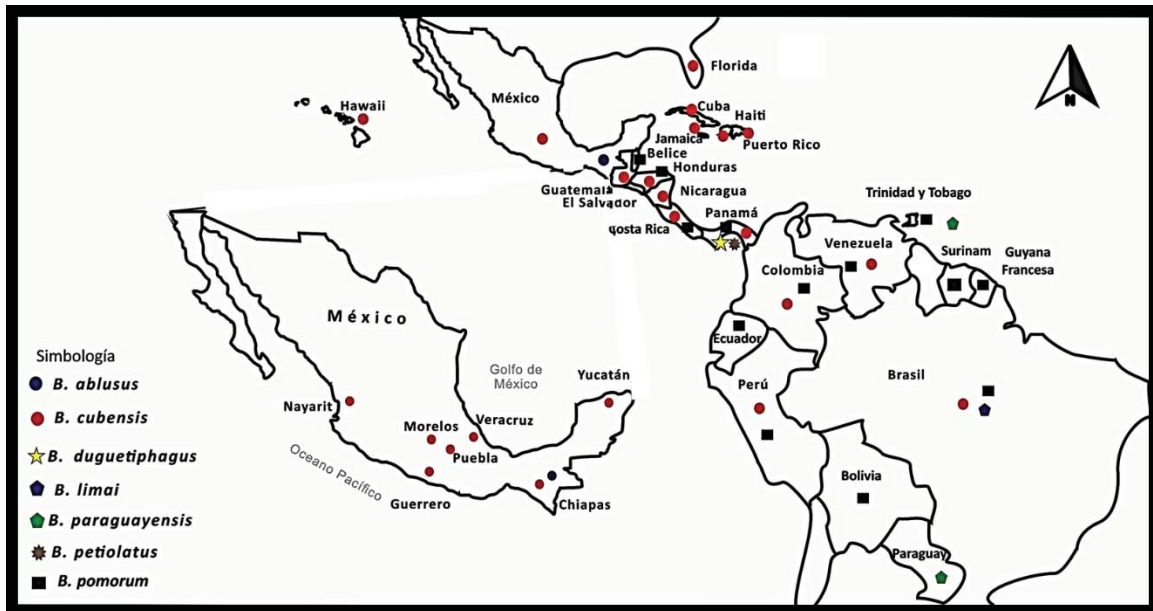


Figura 9. Distribución de las especies del género *Bephratelloides*.

Cuadro 4. Distribución y especies hospederas del género *Bephratelloides*.

Especie	Distribución	Especie hospedera	Referencias
<i>Bephratelloides</i> sp.		<i>Xylopia aromatica</i>	Perioto (1997)
<i>B. ablusus</i>	México	<i>Cymbopetalum mayanum</i>	Grissell & Foster (1996)
<i>B. cubensis</i>	Brasil	<i>Annona bullata</i> <i>A. cherimola</i> <i>A. glabra</i> <i>A. lutescens</i> <i>A. diversifolia</i> <i>A. montana</i> <i>A. muricata</i> <i>A. reticulata</i> <i>A. squamosa</i> <i>A. squamosa</i> × <i>cherimola</i>	Korytkowski & Ojeda (1966) Heu (1988) Grissell & Schauff (1990) Nadel & Peña (1991) Peña & Bennet (1995) González-Sanchez (2014)
	Colombia		
	Costa Rica		
	Cuba		
	Guatemala		
	Haiti		
	Hawaii		
	Honduras		
	Florida		
	Jamaica		
	México		
	Panamá		
<i>B. duguetiphagus</i>	Panamá	<i>Duguetia panamensis</i>	Chang (1998)
<i>B. limai</i>	Brasil	<i>Annona</i> sp.	Grissell & Schauff (1990b) Noyes (2014)
		<i>A. muricata</i>	
<i>B. melleus</i>	Desconocido	Desconocido	Grissell & Schauff (1990)

Especie	Distribución	Especie hospedera	Referencias
<i>B. paraguayensis</i>	Paraguay Trinidad & Tobago	<i>Annona</i> sp.	Grissell & Schauff (1990)
<i>B. petiolatus</i>	Panamá	<i>Annona</i> sp.	Peña & Bennet (1995) Noyes (2014)
<i>B. pomorum</i>	Bolivia Belice Brasil Colombia Costa Rica Ecuador Guyana Francesa Honduras Panamá Perú Surinam Trinidad & Tobago Venezuela	<i>Annona</i> sp. <i>A. cherimola</i> <i>A. montana</i> <i>A. muricata</i> <i>A. squamosa</i>	Grissell & Schauff (1990b) Peña & Bennet (1995) Barbosa <i>et al.</i> (1997)

## 2.5. *Bephratelloides cubensis* Ashmead, 1984

La clasificación taxonómica del género *Bephratelloides* es la siguiente (Noyes, 2014):

Orden Hymenoptera

Superfamilia Chalcidoidea

Familia Eurytomidae

Subfamilia Eurytominae

Género *Bephratelloides*

Especie ***Bephratelloides cubensis*** Ashmead

### 2.5.1 Descripción

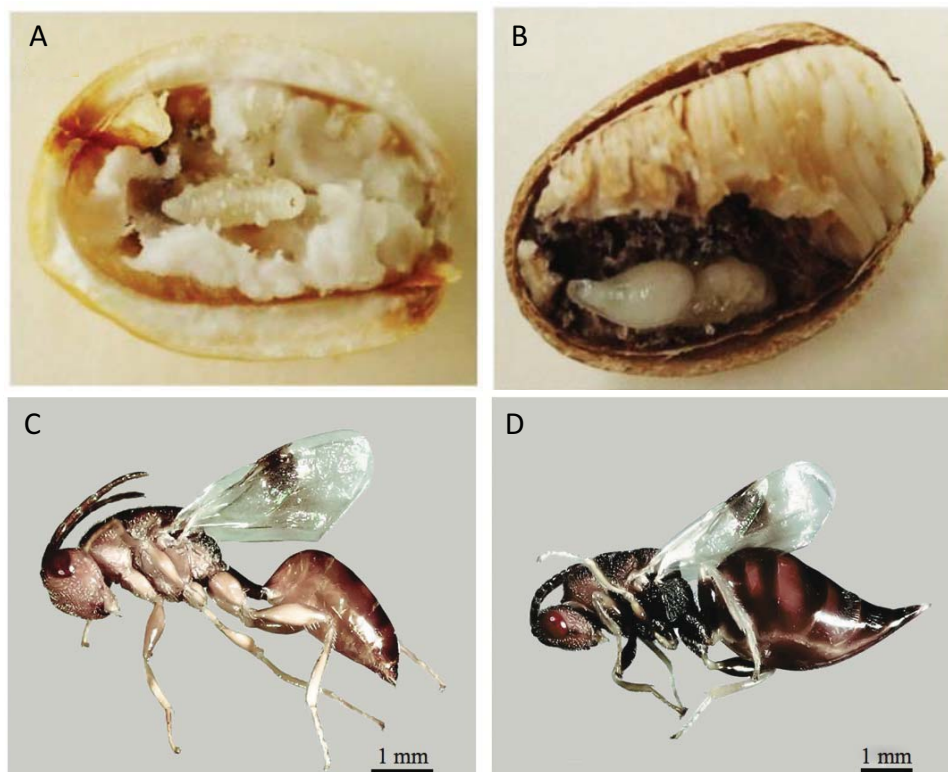
*Bephratelloides cubensis* es un insecto olífago, conocido como la avispa de las anonáceas (Hernández-Fuentes, 2010) (Figura 21). Hasta el momento, se ha reportado que esta especie parasita a 10 de las 18 especies del género *Annona* que se distribuyen en México (Korytkowski & Ojeda, 1966; Heu, 1988; Grissell & Schauff, 1990; Nadel & Peña, 1991; Peña & Bennet, 1995; González-Sánchez, 2014; De-la-Cruz-Chacón *et al.* 2016) (Cuadro 7).

*Bephratelloides cubensis* está ampliamente distribuida en América. En México se distribuye en Nayarit (Rodríguez *et al.* 1980; Hernández-Fuentes, 2008), Guerrero, Morelos,



Puebla, Veracruz, Yucatán (Castañeda-Vildózola, 2010) y Chiapas (González-Sánchez, 2014) (Figura 9).

La **diagnosis** de *B. cubensis* es la siguiente (Grissell & Schauff, 1990 y Grissell & Foster, 1996): parte media superior del propodeo ligeramente lisa, sin carinas y sin setas; área sombreada debajo de la venación de las alas; el tamaño de los insectos varía de 4.0 a 9.5 mm de largo. Escutelo redondeado apicalmente, arqueado en vista de perfil, no proyectando más allá del dorsellum. Línea calva del ala anterior ausente. Flagelómeros cilíndricos en machos.



**Figura 10.** *Bephratelloides cubensis*. A) Larvas. B) Pupas. C) Macho. D) Hembra (González-Sánchez, 2014).

La descripción morfológica de los huevos, larvas y pupas (Figura 10) fue obtenida de Evangelista *et al.* (1999b):

**Huevos.** Son blancos y muy pequeños, miden por lo regular 0.2 mm de largo y 0.1 mm de ancho, en el córium se observa con pequeñas ornamentaciones en forma de espinas cortas.

**Larvas.** Larvas de color blanco (Figura 10A), llegan a alcanzar 7 mm de largo en su último estadio. La región cefálica está diferenciada del cuerpo; la cabeza es distinta, las antenas y los ocelos son vestigiales, presenta dos piezas mandibulares esclerotizadas de color café.

**Pupas.** Las pupas son de tipo exarata (Figura 10B). Las pupas hembras tienen el abdomen grande y el ápice constreñido, mientras que los machos presentan el abdomen corto y redondeado, su longitud es de 8 mm. Las pupas que dan origen a las hembras son de mayor tamaño. En la cabeza es posible encontrar a las antenas en formación.

**Adultos** (Korytkowski & Ojeda, 1966):

**Cabeza.** Cabeza de tipo Hypognatha, la cual es de forma casi cuadrangular, de color amarillo ocre con el vértex negro brillante. La frente es fuertemente reticulada, más o menos cubierta con pelos plateados y erectos. **Ojos compuestos** de un color café oscuro, insertos lateralmente en la cabeza; **ocelos** bruno negruzcos, brillantes. **Antenas** compuestas de 10 segmentos; escapo pequeño de color amarillo claro; pedicelo de forma triangular, ensanchándose de la base hacia el ápice; funículo compuesto de 6 segmentos de color pardo amarillento. **Mandíbulas** de forma cuadrangular, presentando 2 dientes bien definidos y uno aplanado no bien diferenciado; existen 2 apófisis alargadas que nacen en los dientes prominentes y terminan en la base de la mandíbula. **Palpos maxilares** compuestos de 4 segmentos, siendo el último más alargado y de forma típica. Palpos labiales de 3 segmentos, siendo el segundo más pequeño.

**Tórax.** Tórax mucho más largo que ancho, muy toscamente punteado y cubierto de pubescencia plateada y erecta, de color predominantemente bruno rojizo, intercalado con manchas negras, poco brillantes debido a su superficie rugosa. **Alas** anteriores con una longitud de 4.9 mm cada una, con la vena submarginal ligeramente curvada hacia el margen anterior, presentando pocos pelos en su porción basal y abundantes en su porción apical que es curvada; la vena marginal es muy corta y fuertemente pilosa; vena post-marginal con una longitud igual a la mitad de la vena marginal; vena estigmal recurvada presentando una porción apical ensanchada; existe una mancha ubicada entre la vena sub-marginal y el ápice de la vena estigmal, que es de un color bruno amarillento; además hay una pequeña

mancha en la región posterior del ala, algo más difusa que la anterior. El **hamulli** está constituido básicamente por tres dientes grandes y curvados, presenta 8 espínulas de igual longitud y disposición típica. **Propodeum** negro muy tosco y rugosamente punteado. Espiráculo oval colocado en la porción dorsoanterior. **Patás** largas y de un color amarillento, pero con las coxas y parte basal de los fémures de un color bruno a bruno oscuro.

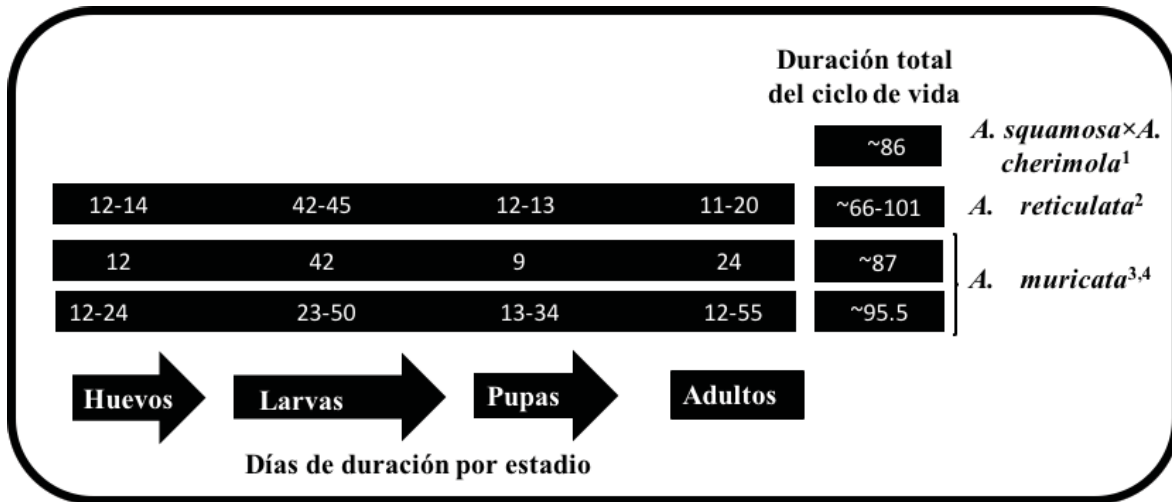
**Abdomen** casi totalmente negro excepto la porción ventral de cada segmento que es amarillo rojizo, superficie lisa y brillante con pocos pelos dispersos y erectos a partir del quinto segmento.

### 2.5.2 Ciclo de vida

El ciclo de vida comienza con la oviposición de las hembras sobre frutos pequeños. De acuerdo con los estudios realizados con *B. cubensis* en diferentes especies de anonas, se conoce que las hembras prefieren ovipositar en frutos inmaduros que tengan un diámetro de 3 a 4 cm en *A. reticulata* (Bruner & Acuña, 1967), de 3.1 a 7.6 cm en *A. squamosa* (Hernández-Fuentes, 2010) y <8 cm en *A. diversifolia* (González-Sánchez, 2014).

Los huevos, larvas, pupas y adultos se desarrollan en el interior de semillas de frutos en crecimiento (Nadel & Peña, 1991) (Figura 10). Las larvas se alimentan del endospermo de las semillas, afectando la viabilidad de éstas. Los individuos adultos al salir de los frutos forman galerías a través de la pulpa que permiten la entrada de insectos necrófagos y hongos fitopatógenos, dañando totalmente a los frutos (Nadel & Peña, 1991; Castañeda-Vildózola *et al.* 2010; Hernández-Fuentes *et al.* 2010).

Hay reportes que señalan que el ciclo de vida de *B. cubensis* oscila entre ~86 y 100 días (Bruner & Acuña, 1967; Nadel & Peña, 1991; Veloza, 1991 en Murcia, 2006; Evangelista *et al.* 1999a) (Figura 11). Tomando en cuenta el tiempo de duración de los diferentes estados de desarrollo, los huevos eclosionan ~12-24 días después de la puesta, el periodo larvario tiene una duración de ~23-55 días, las pupas de ~9-34 días, mientras que los adultos, en vida libre, viven ~11-24 días (Figura 11), siendo siempre el estadio de larva el que mayor duración tiene. Esta variación parece depender de la planta hospedera y de las condiciones ambientales (temperatura y humedad) (Bruner & Acuña, 1967; Korytkowski & Ojeda, 1966; Nadel & Peña, 1991; Veloza, 1991 en Murcia, 2006; Evangelista *et al.* 1999a).



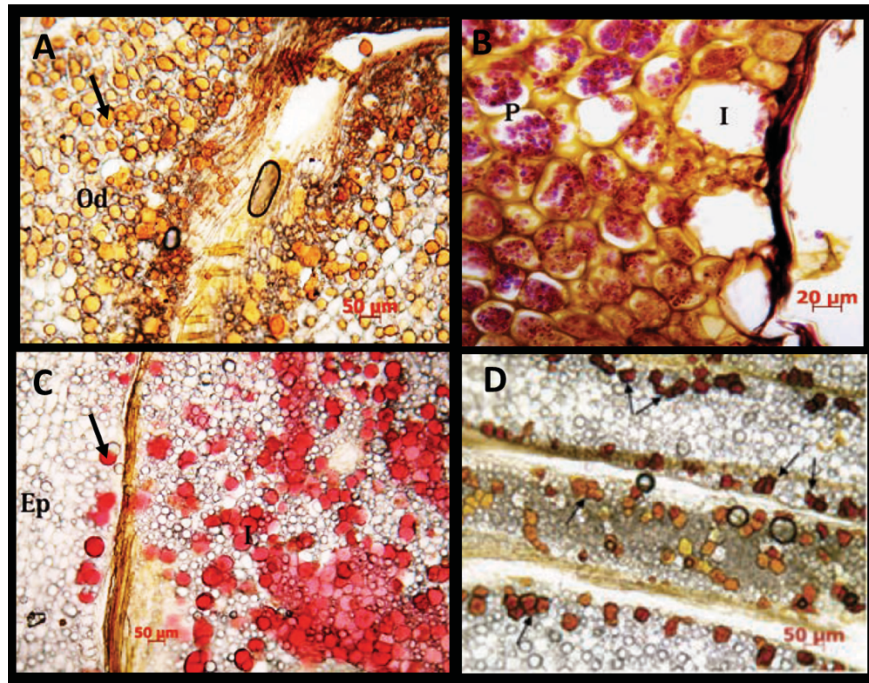
**Figura 11.** Duración del ciclo de vida de *Bephratelloides cubensis* en diferentes especies de *Annona*.  
<sup>1</sup>Korytkowski & Ojeda (1966); Nadel & Peña (1991a); <sup>2</sup>Bruner & Acuña (1967); <sup>3</sup>Evangelista *et al.* (1999b); <sup>4</sup>Hernández-Fuentes *et al.* (2010).

### III. ANTECEDENTES

#### 3.1. Estudios sobre *Annona diversifolia*

##### 3.1.1 Detección de moléculas orgánicas

Las semillas de *Annona diversifolia* han sido objeto de diversos estudios químicos, y gracias a éstos se conocen algunos de los compuestos que constituyen su endospermo. Pérez-Amador *et al.* (1997) realizaron un análisis con cromatografía de gases del aceite extraído de las semillas de la papaya, con el que determinaron los ácidos grasos palmítico, esteárico, linoleico y oleico, siendo este último el más abundante además de los triglicéridos C50, C52 y C54. Recientemente Laguna *et al.* (2015) y Brechú-Franco *et al.* (2016) realizaron análisis histoquímicos al endospermo de las semillas, detectaron lípidos y proteínas, una de las aportaciones más importantes en su estudio fue la detección histológica en semillas de las acetogeninas y alcaloides, los cuales se almacenan específicamente en idioblastos, células distribuidas en periferia de las ruminaciones (Figura 12).



**Figura 12.** Localización de acetogeninas y alcaloides en el endospermo de semillas de *A. diversifolia*. A) Detección de lípidos con Sudan III. B) Detección de proteínas con azul negro de naftol. C) Detección de ACG con el reactivo de Kedde. D) Localización de alcaloides con Lugol. Las flechas señalan idioblastos. Abreviaciones: Ep, endospermo; I, idioblastos; Od, gotas de aceites; P: proteoplastos. Imágenes modificadas de A-C) Laguna *et al.* (2015), D) Brechú-Franco *et al.* (2016).

### 3.1.2 Toxicidad de extractos y acetogeninas

Ante el conocimiento de la presencia de moléculas tóxicas en la familia Annonaceae se han realizado diversas evaluaciones con los extractos crudos obtenidos de diferentes órganos de *A. diversifolia*. De la Cruz (2001) realizó evaluaciones de toxicidad sobre el crustáceo *Artemia salina* utilizando extractos hexánicos y etanólicos de raíces, tallos y semillas, obteniendo 100% de mortalidad a concentraciones de 100 y 1000  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  a las 6 y 24 h de exposición.

Acuña-Castro *et al.* (2011) evaluaron extractos de raíces, tallos, hojas y semillas a 0, 1, 10, 100 y 1000  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  sobre la hormiga arriera *Atta mexicana*. Los mejores porcentajes de mortalidad se tuvieron con los extractos de raíces y semillas, siendo éstos tiempo y dosis-dependientes. Los resultados señalaron el potencial de los extractos de *A. diversifolia* sobre la hormiga arriera.

González-Esquinca *et al.* (2012) probaron los extractos acuosos y etanólicos de tallos y hojas sobre larvas de la mosca de la fruta *Anastrepha ludens*. Los extractos de hojas en concentraciones de 2000  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  provocaron el 75.8% y 75.3% de mortalidad, mientras que los extractos acuosos de tallos a la misma concentración causaron el 90% de mortalidad, encontrando que la toxicidad es dependiente de la concentración. Todos los extractos también fueron probados sobre *Artemia salina*, resultando tóxicos después de 24 h de exposición.

En la búsqueda de moléculas con propiedades antifúngicas De-la-Cruz-Chacón *et al.* (2013) probaron la actividad inhibitoria de los extractos de cuatro especies de *Annona*, entre ellas *A. diversifolia*. Las propiedades antifúngicas de los extractos hexánicos y metanólicos de tallos y hojas de *A. diversifolia* fueron probadas contra los hongos *Aspergillus glaucus*, *Rhizopus stolonifer* y *Colletrotichum gloesporoides*. El potencial antifúngico se evaluó a concentraciones de 250 y 500  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  con el método de inhibición del crecimiento micelial. Los extractos metanólicos de tallo fueron los más activos, inhibiendo a los dos primeros hongos. En este trabajo se concluyó que la actividad inhibitoria depende de las especies evaluadas, los órganos utilizados y los hongos que sirven de modelo de estudio.



La evaluación más reciente de extractos obtenidos de semillas de *A. diversifolia* la realizaron Reyes-Trejo *et al.* (2014) frente a larvas de *Aedes aegypti*, importante vector del dengue, chikungunya, zika y fiebre amarilla. En este estudio el extracto metanólico presentó la mayor actividad larvicida con una CL<sub>50</sub> de 5.23 µg·mL<sup>-1</sup>. Además, estos autores realizaron una partición del extracto con cloruro de metileno (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) mediante una columna cromatográfica y obtuvieron una fracción con la mayor actividad larvicida a 48 horas, con una CL<sub>50</sub> de 3.1 µg·mL<sup>-1</sup>. Después del aislamiento e identificación de los compuestos, los autores detectaron a laherradurina y dos acetogeninas desconocidas.

De las semillas maduras de *Annona diversifolia* se han aislado las acetogeninas cherimolina-2 (Schlie-Guzmán *et al.* 2009b), rolliniastatina-2 (Luna-Cazáres & González-Esquinca, 2010) y laherradurina (De la Cruz, 2001; Schlie-Guzmán *et al.* 2009; Reyes-Trejo *et al.* 1997, 2014). Laherradurina y cherimolina-2 fueron evaluadas *in vitro* e *in vivo* sobre células **HeLa** (derivadas del cáncer cérvico humano) y células **SW-480** (derivadas del cáncer colorectal), donde estas moléculas fueron más tóxicas que la doxorubicina, un fármaco ampliamente utilizado en las quimioterapias contra el cáncer. Laherradurina inhibió a concentraciones de 20 y 0.01 µg·mL<sup>-1</sup> el crecimiento celular de HeLa y SW-480 en un 80% y 48%, respectivamente. Por otro lado, la cherimolina-2 inhibió a las mismas concentraciones entre el 76-78% y el 38-43%, respectivamente. En esta misma investigación, el análisis realizado con ratones atímicos demostró que ambas acetogeninas reducen el tamaño y desarrollo de los tumores causados por las dos líneas celulares (Schlie-Guzmán *et al.* 2011).

Luna-Cazáres & González-Esquinca (2010) probaron la actividad antibacteriana de la rolliniastatina-2, aislada de semillas de *A. diversifolia* a una concentración de 2 mg·mL<sup>-1</sup> sobre esferoplastos de bacterias que provocan enfermedades gastrointestinales y respiratorias, tales como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella typhi*. Previamente, los autores realizaron un análisis donde las bacterias tenían paredes celulares y la rolliniastatina provocó hasta el 40% de inhibición; sin embargo, al trabajar con los esferoplastos el porcentaje de inhibición aumentó al 58, 55 y 57%, respectivamente.

Laherradurina, además de su actividad insecticida y citotóxica, es candidata para ser utilizada en la biorremediación mediada por biofilms, que degradan hidrocarburos

aromáticos policíclico porque aumentan la producción de señales autoinductoras y la comunicación celular en la bacteria *Pseudomonas plecoglossicida*, que se traduce en la producción de biofilms (Parellada *et al.* 2011).

### **3.2. Estudios sobre el secuestro de acetogeninas**

A pesar de la toxicidad de las acetogeninas se tiene el registro de un insecto que desafía una de las actividades biológicas más reconocida de esas moléculas. El único caso documentado hasta ahora sobre el secuestro de las acetogeninas es el realizado por Martin *et al.* (1999). Estos autores reportaron que las larvas y adultos de la mariposa cebrá, *Protographium marcellus* (sin. *Eurytides marcellus*) (Papilionidae), almacenan en sus tejidos (cuerpo graso y alas) las acetogeninas asimicina, rolliniastatina-2 (bullatacina), bullatalicina y trilobacina, adquiridas durante la alimentación de las larvas a base de las hojas de *Asimina triloba*. Se cree que la presencia de estos metabolitos en el organismo de las mariposas es utilizada para evitar la depredación. Se desconoce si las plagas principales de anonáceas, el barrenador de semillas y de los frutos, *Bephratelloides cubensis* y *Cerconota annonella*, respectivamente (Coto & Saunders, 2001; Castañeda-Vildózola *et al.* 2010) están adaptadas para el secuestro de las acetogeninas.

### **3.3. Estudios sobre *Bephratelloides cubensis***

Setenta y tres años después de la identificación de *B. cubensis* por Ashmead (1894), Bruner & Acuña (1967) la catalogaron como una de las principales plagas del género *Annona* sp. en el Caribe y Florida. Las investigaciones se han centrado principalmente en la descripción morfológica, en la de su ciclo de vida y al registro de sus plantas hospederas (Korytkowski & Ojeda, 1966; Peña *et al.* 1984; Grissell & Schauff, 1990b; Nadel & Peña, 1991a, b; Evangelista *et al.* 1999a, b).

#### **3.3.1 Métodos de control**

Debido al daño que las avispas provocan en las semillas de *Annona*, especialmente en las especies de interés comercial, como la guanábana (*Annona muricata*) y la chirimoya



(*Annona cherimola*), se han realizado una variedad de pruebas químicas, físicas y biológicas para el control de *Bephratelloides cubensis*. En 1988, Peña y Nagel probaron para *B. cubensis* dos insecticidas químicos comerciales a diferentes concentraciones: malation y permetrina. En condiciones de laboratorio estos compuestos provocaron después de 24 horas del tratamiento tópico el 100% y 95% de mortalidad a  $0.57\text{g ia}\cdot\text{L}^{-1}$  y  $0.256\text{g ia}\cdot\text{L}^{-1}$ , respectivamente. En condiciones de campo la menor infestación se produjo después de la aspersión de  $0.36\text{ lb ai}\cdot 100\text{ gal}$  de una mezcla de malatión, metil tiofanato y mancozeb. Hernández-Fuentes *et al.* (2008) también evaluaron diferentes insecticidas, de los cuales el dimetoato fue el mejor tratamiento.

Con la finalidad de buscar métodos de control amigables con el ambiente, Murcia y Salamanca (2006) realizaron un método de control biológico, utilizando al hongo *Paecilomyces lilacinus*, cuyo ensayo provocó el 100% de mortalidad en *B. pomorum* a una concentración de  $6.4\times 10^7$  conidios $\cdot\text{mL}^{-1}$ . Esta prueba podría realizarse también sobre individuos de *B. cubensis*.

De acuerdo con las investigaciones en las que se han utilizado barreras físicas, los autores apuntan que la siguiente propuesta es la más rentable, económica y funcional. Se sugiere que para bloquear la oviposición de la avispa es necesario envolver a los frutos pequeños de  $\sim 3\text{cm}$  de diámetro con bolsas hechas de tela de organza con 372 perforaciones por pulgada (1.6% de infestación) (Hernández-Fuentes *et al.* 2008), con bolsas de plástico perforadas (49cm x 28cm) (15% de infestación) (Micheletti *et al.* 2001) o utilizando bolsas de plástico rojas con orificios de 5-10 mm (20 cm x 15 cm) con TNT (12.5% de infestación) (Silva *et al.* 2013).

### **3.3.2 Interacción planta-insecto**

El estudio más reciente acerca de la interacción de *A. diversifolia* con *B. cubensis* fue el realizado por González-Sánchez (2014), quien reporta la presencia de esta avispa en Chiapas, además de explicar la incidencia e interacción ecológica de *B. cubensis* en *A. diversifolia*. Este es un trabajo que le da un giro ecológico a la presencia de esta avispa en una especie de *Annona*, alejándolo de la parte económica y agronómica como lo tienen los trabajos anteriores.

## IV. PLANTEAMIENTO DE LOS OBJETIVOS

Con el descubrimiento de la actividad tóxica de las acetogeninas, las investigaciones han seguido el camino agroquímico, orientadas al uso en el combate de vectores de enfermedades y el control de plagas agrícolas. Casi ninguno de estos trabajos aborda el aspecto ecológico y evolutivo de la presencia de estas moléculas en el desarrollo de las plantas y su relación con los insectos herbívoros o parásitos.

La actividad insecticida de *A. diversifolia* ha sido demostrada frente a insectos como *Culex pipiens quinquefasciatus* (Alamilla *et al.* 2000), *Atta mexicana* (Acuña-Castro *et al.* 2011), *Anastrepha ludens* (Rueda-Pérez, 2007; González-Esquinca *et al.* 2012) y *Aedes aegypti* (Reyes-Trejo *et al.* 2014). No obstante, la toxicidad de las acetogeninas, éstas no actúan contra la avispa *Bephratelloides cubensis*, plaga principal de las anonáceas, entre ellas *Annona diversifolia*, *A. muricata*, *A. reticulata*, *A. squamosa* y *A. cherimola* (Castañeda-Vildózola *et al.* 2010), sugiriendo un fenómeno de coevolución como el documentado para algunas mariposas (Brower *et al.* 1984), o bien, un desfase entre la biosíntesis de las acetogeninas y el desarrollo larvario. Hasta ahora, no se encuentran antecedentes en la literatura científica que documenten este fenómeno.

Con excepción de la cópula, casi todo el ciclo de vida de *B. cubensis* se cumple en el interior de las semillas de *A. diversifolia*, de tal manera que su desarrollo está sincronizado con el crecimiento y diferenciación de las semillas (Nadel & Peña, 1991). Incluso las larvas se alimentan del endospermo de las semillas, que almacena, además de sustancias de reserva, acetogeninas (Laguna *et al.* 2015; Brechú-Franco *et al.* 2016). Por lo tanto, la pregunta que se plantea en esta investigación es **¿Por qué si las acetogeninas son tóxicas no le causan daño a *B. cubensis*?**

Con la finalidad de conocer si estas moléculas coinciden en espacio y tiempo con el estadio larvario de *B. cubensis*, determinamos el perfil de acetogeninas durante el desarrollo de semillas de *A. diversifolia*, además de reportar la etapa de la diferenciación de los idioblastos. También se caracterizó morfológicamente los estadios larvarios de *B. cubensis*. Para conocer si las avispas almacenan en su organismo las acetogeninas se

realizaron análisis de las larvas, pupas, adultas y excretas de *B. cubensis*. Al final se relacionó la actividad de las acetogeninas frente a la presencia de la avispa. Esta investigación aporta información novedosa y relevante acerca de la expresión del metabolismo de estas moléculas durante la ontogenia de las semillas, así como la interacción que existe entre las avispas y las anonas.

### **Hipótesis**

Debido a la actividad tóxica que presentan las acetogeninas contra algunos insectos, pero no contra *Bephratelloides cubensis* se espera que:

1. Las acetogeninas no se biosinteticen en el inicio del desarrollo de las semillas de *Annona diversifolia*, por lo que las larvas de *B. cubensis* pueden alimentarse del endospermo durante su desarrollo.
2. Las larvas tengan la capacidad de detoxificar las acetogeninas o almacenarlas en su organismo.
3. Las larvas excreten las acetogeninas antes de que sean absorbidas por su cuerpo.

## V. DISEÑO EXPERIMENTAL Y MÉTODOS

### 5.1. Diseño General

Para probar la hipótesis de que la biosíntesis de acetogeninas puede ocurrir desfasada de la etapa larvaria de *Bephratelloides cubensis*, se realizó el análisis del perfil de acetogeninas durante todo el desarrollo de las semillas (Figura 13), el cual fue dividido en ocho etapas, desde etapas iniciales hasta la madurez de las semillas. Las acetogeninas de referencia fueron aisladas de las semillas maduras.

Para la caracterización de los estadios larvarios de la avispa *B. cubensis*, se realizó la recolecta de sus diferentes estadios de desarrollo, se obtuvieron del interior de semillas infectadas de *A. diversifolia*, mientras que algunos adultos se recolectaron cuando posaban sobre los frutos.

Al tener los resultados de que la detección de las acetogeninas coincide con la alimentación de las larvas se realizó el análisis de las larvas, pupas y adultas. Las excretas de *B. cubensis* también fueron examinadas, ya que para evitar su intoxicación algunos insectos pueden excretar las sustancias tóxicas después de ser consumidas (Després *et al.* 2007), por lo tanto, las excretas de *B. cubensis* también fueron examinadas. Al final, se realizó la correlación existente entre los resultados obtenidos del perfil de acetogeninas y la presencia de *B. cubensis* durante el desarrollo de las semillas.

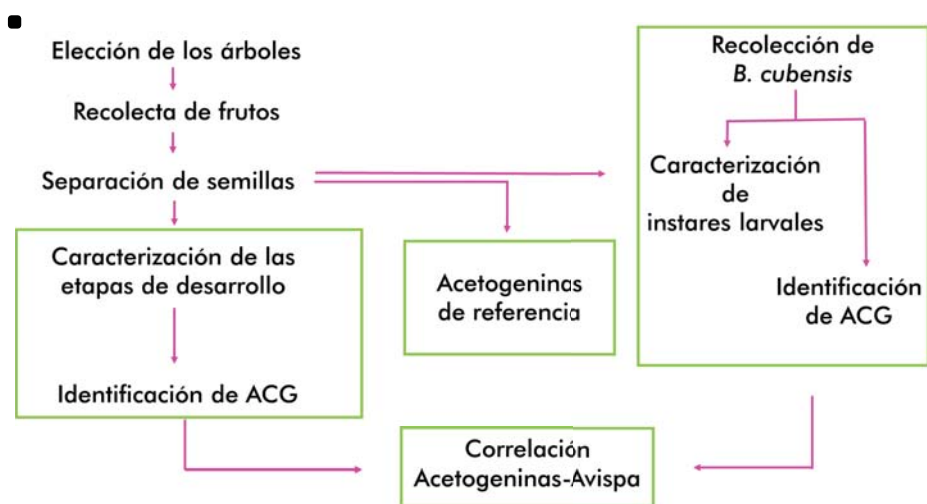


Figura 13. Diseño general de la investigación.

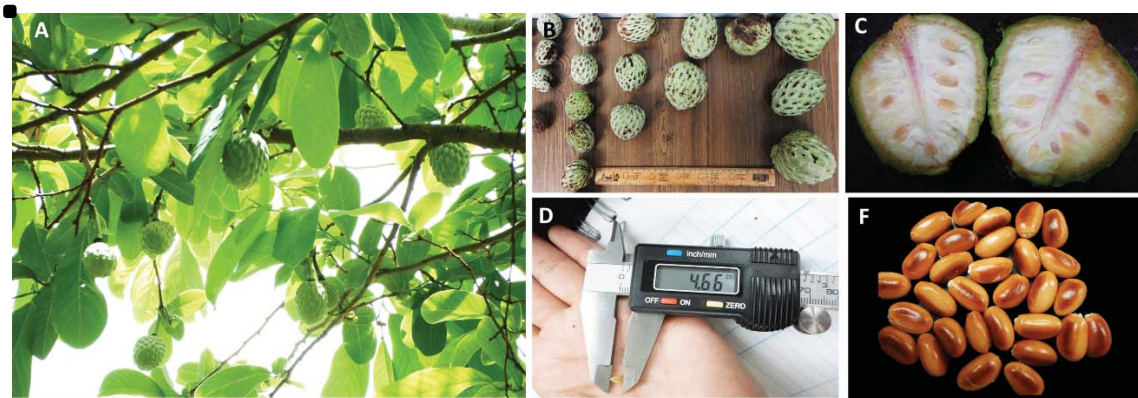
## 5.2. Parte experimental

### 5.2.1 Material vegetal

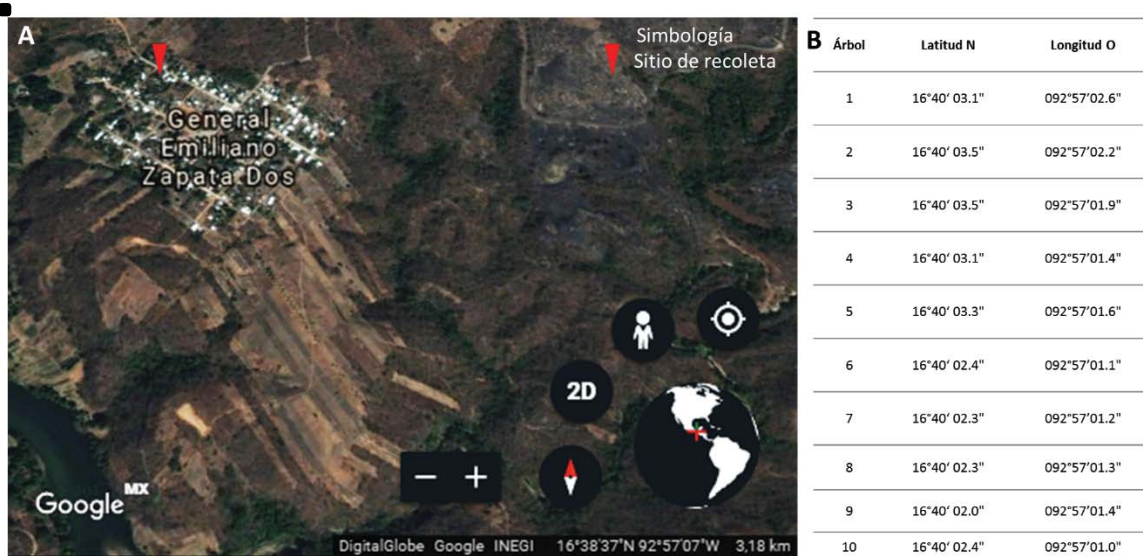
Durante tres años consecutivos (mayo a septiembre de los años 2013 a 2015) se recolectaron frutos de 10 árboles de *Annona diversifolia*, los cuales se cortaron de acuerdo a su tamaño y grado de desarrollo, desde inmaduros de 12 mm de diámetro hasta maduros de 125 mm de diámetro, de las cuales se obtuvieron las semillas analizadas (Figura 14). La recolecta se realizó en la localidad General Emiliano Zapata Dos perteneciente al municipio de Chiapa de Corzo, Chiapas, México ( $16^{\circ}40'03.1''N$ ,  $92^{\circ}57'02.6''W$ ) (Figura 15).

Las semillas fueron clasificadas de acuerdo con su longitud y grado de madurez. Para realizar el perfil de acetogeninas se recolectaron 3 g de semillas para cada etapa de desarrollo, aunque para las tres primeras etapas el peso fue variable.

Todos los frutos y semillas fueron medidos del largo y ancho utilizando un calibrador digital Truper®. La caracterización de las diferentes etapas de desarrollo de las semillas se realizó con un análisis de clases utilizando el largo de las semillas. Para preservar a las semillas y evitar su contaminación estas se almacenaron en un congelador a  $-2^{\circ}C$ .



**Figura 14.** Frutos y semillas de *Annona diversifolia*. A) Frutos inmaduros. B) Algunos frutos recolectados en diferentes grados de desarrollo. C) Semillas inmaduras dentro de su fruto. D) Medición del largo de una semilla inmadura (4.6 mm). F) Semillas cerca de la madurez (22 mm).



**Figura 15.** Sitio de recolecta de frutos y semillas de *Annona diversifolia*. A) Ubicación de la localidad General Emiliano Zapata Dos. B) Coordenadas geográficas de los árboles elegidos para la recolecta. A) Imagen adquirida de Google Earth, 12 de septiembre de 2017.

### 5.2.2 Extracción de acetogeninas

La extracción de acetogeninas se realizó siguiendo el método reportado por De la Cruz (2001). Las semillas de cada etapa de desarrollo (8 etapas × 10 árboles) fueron maceradas y extraídas a baño maría, durante 8 h en tres ocasiones (cambiando solvente nuevo en cada ciclo), primero con hexano (Hex) (para acetogeninas poco polares) y después con metanol (MeOH) (para acetogeninas polares), utilizando por cada gramo de semilla 10 mL de solvente (1:10). La concentración de los extractos se realizó con un rotaevaporador Caframo® WB 2000, a 150 rpm, con una temperatura de 65 °C para los extractos hexánicos y 70 °C para los metanólicos.

### 5.2.3 Aislamiento de acetogeninas de referencia

Las acetogeninas de referencia se aislaron del extracto metanólico de 1 Kg de semillas maduras sin testa. A este extracto se le realizaron tres extracciones por agitación, durante 30 min, cambiando el solvente en tres ocasiones, primero con Hex, luego con acetato de etilo (AcOEt) y después con cloroformo (CHCl<sub>3</sub>). Posteriormente, se le agregó MeOH absoluto al extracto metanólico previamente desengrasado y se indujo a la precipitación mediante refrigeración durante tres días, del cual se obtuvo un precipitado de color blanco

(3.8 g) que se fraccionó en una columna cromatográfica, utilizando sílica gel 60 Merck® como adsorbente y solventes orgánicos Baker® como eluyentes, en un gradiente de polaridad creciente Hex: AcOEt (7:3, 5:5, 3:7), AcOEt, AcOEt: MeOH (5:5) y MeOH. Se obtuvieron 250 fracciones de 150 mL. El seguimiento de los compuestos se realizó mediante cromatografía en capa fina (TLC) con placas de sílica gel Sigma-Aldrich® (indicador de fluorescencia de 254 nm, poro de 60 Å) y una mezcla de Hex: AcOEt (2:8). Se unieron las fracciones 36-75 y 101-165. De la unión de las fracciones 36-75 se obtuvieron cristales traslúcidos en forma de agujas, mientras que de las fracciones 101-165 se obtuvo una cera de color blanca que se cristalizó con MeOH consiguiendo cristales traslúcidos. Estas acetogeninas fueron identificadas como laherradurina y rolliniastatina, respectivamente, por el Dr. Diego Cortés del Departamento de Farmacología de la Universidad de Valencia, España.

**Laherradurina** (C<sub>37</sub>H<sub>68</sub>O<sub>7</sub>). M= 598. Melting point 60–62 °C; [α]<sub>D</sub> + 21° (MeOH; c 0.09); IR v<sub>max</sub> cm<sup>-1</sup> (film) 3590, 1765, 1450; CIMS (CH<sub>4</sub>), m/z: 625 [MH]<sup>+</sup>, 670 [MH-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>, 586 [MH-2H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>, 571 [MH-3H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>), <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz).

**Rolliniastatina-2** (C<sub>37</sub>H<sub>68</sub>O<sub>7</sub>). M= 622. Melting point 90.5-90.7 °C; [α]<sub>589</sub> = + 12°, [α]<sub>578</sub> = + 12.5°, [α]<sub>546</sub> = +14.5 °C, [α]<sub>436</sub> = + 29.75°, [α]<sub>365</sub> = +51.25° (c=0.4; CHCl<sub>3</sub>); H NMR (C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>, 470 MHz). Melting point 73 – 76 OC; R<sub>f</sub> 0.22 (diclorometano – metanol 19:1); [α]<sub>D</sub>27 + 5.3° (c 0.23, CHCl<sub>3</sub>); uv λ (CH<sub>3</sub>OH) (log ε) 210 (3.85).

#### 5.2.4 Análisis en HPLC

El análisis de los extractos y de las acetogeninas aisladas se realizó en un equipo de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) Perkin Elmer® Series 200. Los extractos se prepararon a 1mg·mL<sup>-1</sup> y se inyectaron 20 µL de muestra. La separación se realizó en una columna Spheri-5 RP-18 (100 × 4.6 mm, 5 µm) a 30 °C. La fase móvil consistió en metanol/acetronitrilo/agua grado HPLC Baker® (10:80:10, isocrático) a un flujo de 1mL/min durante 10 min. El espectro de absorción UV se registró a 254 nm.

La identificación de las acetogeninas presentes en las semillas de diferentes etapas de desarrollo se hizo por comparación con los tiempos de retención de las acetogeninas de referencia, siendo 3.3 y 4.2 min para la rolliniastatina-2 y laherradurina, respectivamente.



Para la cuantificación se realizaron curvas de calibración con las acetogeninas aisladas en las siguientes concentraciones: 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 y 1 mg·mL<sup>-1</sup>. Las curvas fueron lineales con una r<sup>2</sup> de 0.93 para la herradura y una r<sup>2</sup> de 0.99 para rolliniastatina-2. Las condiciones analíticas se determinaron usando el programa Turbochrom de Perkin Elmer®.

### **5.2.5 Análisis histológico**

El seguimiento del desarrollo de los idioblastos en las semillas de *Annona diversifolia* se realizó mediante microscopía electrónica de barrido. El procesamiento de las muestras se llevó a cabo en el Laboratorio de Anatomía e Histoquímica Vegetal del Colegio de Postgraduados (COLPOS), Campus Montecillo. Las semillas se cortaron longitudinalmente con navajas de doble filo Gillette® y se fijaron en glutaraldehído durante 12 h. Posteriormente, se deshidrataron gradualmente en etanol al 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% y 100% durante 40 min en cada uno. Después, las muestras se secaron a punto crítico con un equipo Tousimis® Samdri-780<sup>a</sup> y se colocaron en porta muestras de platón para ser recubiertas con oro en una ionizadora de metales Ion Sputter JFC-1100, Jeol, Fine Coat durante 15 min. Las muestras se fotografiaron en un microscopio electrónico de barrido JEOL® JSM-6390, utilizando el programa SEM control user interface versión 8.23 de la Unidad de Microscopía Electrónica del COLPOS, Campus Montecillo. La medición de los idioblastos se realizó con el programa ImageJ (Image Processing and Analysis in Java).

### **5.2.6 Análisis estadístico**

La variación en la concentración de acetogeninas en las diferentes etapas de desarrollo de las semillas se determinó mediante una prueba de varianzas simple no paramétrica de Kruskal-Wallis y separación de grupos de Mann-Whitney con una probabilidad de 0.05 utilizando el paquete estadístico Past versión 3.13 (Hammer *et al.* 2001).

### **5.2.7 Identificación de la avispa**

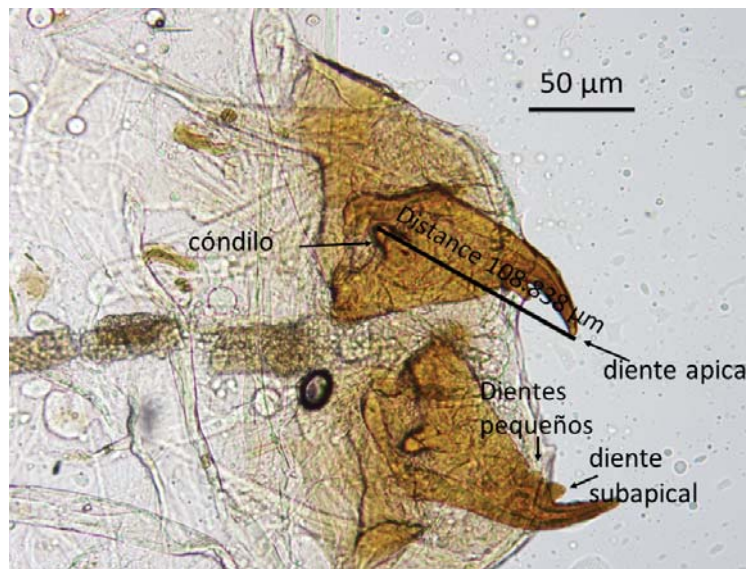
Las larvas, pupas, adultos y excretas de *Bephratelloides cubensis* fueron recolectados del interior de las semillas de *A. diversifolia*, aunque algunos adultos se capturaron en vida libre.



Los individuos fueron preservados en etanol al 70%. La identificación se llevó a cabo en la Colección Nacional de Insectos del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México, utilizando las claves taxonómicas de Grissell & Schauff (1990) y Grissell & Foster (1996). Las microfotografías se obtuvieron con un microscopio confocal, con una cámara Leica® modelo DCF290 HD. Ejemplares machos y hembras fueron depositados en la Colección Nacional de Insectos de la UNAM.

### 5.2.8 Caracterización de los estadios larvales

Para la identificación de los estadios larvares de *B. cubensis* dentro de las semillas de *A. diversifolia* se emplearon 120 mandíbulas, las cuales fueron aisladas al desintegrar el cuerpo blando de las larvas con hidróxido de potasio (KOH) al 10% durante 24 h. Las mandíbulas fueron preservadas en glicerina. Las microfotografías se obtuvieron con una cámara acoplada a un microscopio Zeiss® Primo Star. Se midió el largo de cada mandíbula utilizando el programa ZEN 2 de Zeiss®, partiendo del cóndilo mandibular hasta el ápice del diente apical (Figura 16).



**Figura 16.** Mandíbula de *Bephratelloides cubensis*. Fotografía de Claudia Durán.

Para determinar los estadios larvares se utilizó el largo de las mandíbulas (Hernández-Fuentes *et al.* 2010) y el número de dientes de cada individuo, el análisis para esta última característica se realizó a través de un análisis cluster. Además, la variación

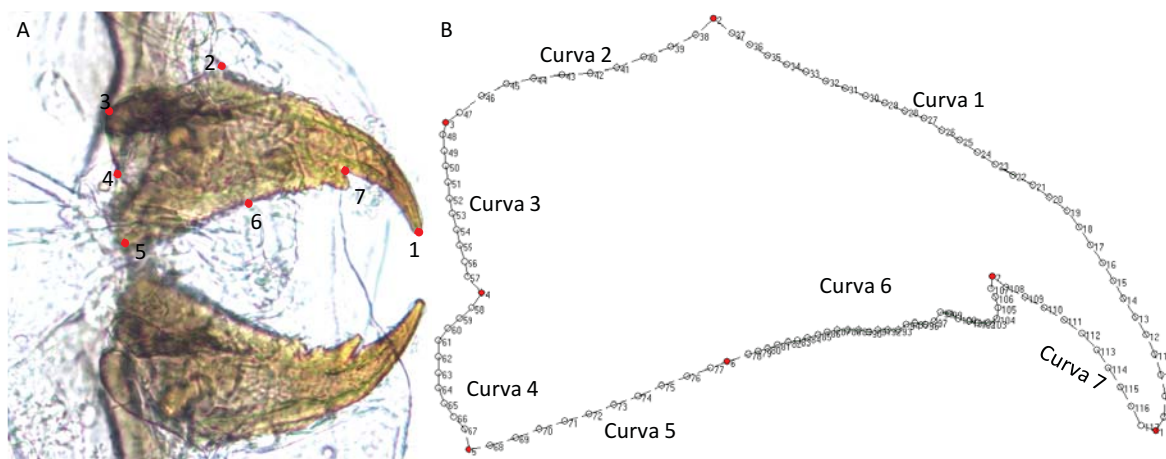
entre los estadios larvarios y el tamaño de las mandíbulas se determinó mediante una prueba de varianzas simple no paramétrica de Kruskal-Wallis y separación de grupos de Mann-Whitney con una probabilidad de 0.05, utilizando el programa PAST versión 3.13 (Hammer *et al.* 2001).

Para tener una mejor apreciación de los cambios de forma a través de los estadios y lograr una mejor diferenciación de éstos, se realizó el análisis de morfometría geométrica siguiendo el método sugerido por Zelditch *et al.* (2004, 2012) y Wrozyña *et al.* (2016). Se utilizaron 120 imágenes, cada una corresponde a la mandíbula de cada ejemplar. A lo largo del contorno de la mandíbula izquierda se colocaron 117 puntos utilizando el programa tpsDig2 versión 2.26 (Rohlf, 2016a), 7 de ellos fueron elegidos como marcas (LMs) y 100 como semi-marcas (SLMs) (Figura 17). Los puntos 1, 2 y 7 corresponden a LMs de tipo I; los puntos 3, 4 y 5 son LMs de tipo III; y el LM 6 fue colocado entre los puntos 5 y 6. El contorno de la mandíbula se obtuvo a partir de la definición de 7 curvas con semi-marcas equidistantes cada uno: las curvas 1 (entre LMs 1-2) y 6 (entre LMs 6-7) se definieron con 30 puntos; las curvas 2 (entre LMs 2-3), 3 (entre LMs 3-4), 4 (entre LMs 4-5), 5 (entre LMs 5-6) y 7 (entre LMs 7-8) fueron establecidos con 10 puntos cada uno. La conversión de las curvas a landmarks, la determinación de semi-marcas y la dirección de su desplazamiento se realizó con el programa tpsUtil versión 1.70 (Rohlf, 2016b).

Para remover la variación en el tamaño, orientación y posición de las marcas y semi-marcas de cada individuo se realizó el análisis de superimposición de Procrustes (Zelditch *et al.* 2012; Plagge *et al.* 2016) utilizando el programa tpsRwl 1.69 (Rohlf, 2017); con este mismo programa se obtuvieron los datos del *consensus*, Análisis de Deformaciones Relativas (relative warps) (Análisis de Componentes Principales (PCA)) y el tamaño centroide (centroid size). La visualización de los cambios en la forma se observó con un análisis de Thin-Plate Spin (TPS) (placa delgada), realizado con el programa estadístico PAST versión 3.13 (Hammer *et al.* 2001).

Para explorar las diferencias entre los individuos se realizó un Análisis de Deformaciones Relativas (*relative warps*) (PCA), un Análisis de Variables Canónicas (CVA) y un Análisis Multivariante de la Varianza (MANOVA), éstos dos últimos se realizaron con el

paquete estadístico PAST versión 2.17c (Hammer *et al.* 2001). Debido a que el número de variables excede el número de individuos por grupo, para el CVA y MANOVA se utilizaron los primeros 15 *relative warps* que explican el 95% de la varianza, además el valor de p fue rectificado con la corrección de Bonferroni (Wrozyña *et al.* 2016).



**Figura 17.** Posición de marcas y semi-marcas. A) Marcas 1-7 (puntos rojos). B) Semi-marcas (puntos blancos) que constituyen las 7 curvas que definen el contorno de la mandíbula. Curva 1: 8-37; curva 2: 38-47; curva 3: 48-57; curva 4: 58-67; curva 5: 68-77; curva 6: 78-107; curva 7: 108-117.

### 5.2.9 Determinación de acetogeninas en *Bephratelloides cubensis*

#### *Extracción*

Para determinar la presencia de acetogeninas en los diferentes estados de desarrollo de *B. cubensis* se realizaron extractos hexánicos y metanólicos a partir de 1.5 g de larvas, pupas, adultos y excretas. Las extracciones se realizaron igual que las semillas: a reflujo durante 8 h en tres ocasiones, primero con hexano (Hex) y después con metanol (MeOH) Baker®, utilizando por cada gramo de insecto 10 mL de solvente (1:10). La concentración de los extractos se realizó con un rotaevaporador Caframo® WB 2000, a 150 r.p.m., con una temperatura de 65 °C para los extractos hexánicos y 70 °C para los metanólicos.

#### *Análisis en HPLC*

El análisis de los extractos de los insectos se realizó siguiendo el mismo procedimiento de las semillas en un HPLC Perkin Elmer® Series 200. Los extractos se prepararon a 1mg·mL<sup>-1</sup> y se inyectaron 20 µL de muestra. La separación se realizó en una columna Spheri-5 RP-18 (100 × 4.6 mm, 5µm) a 30 °C. La fase móvil consistió en metanol/acetoneitrilo/agua grado

HPLC Baker® (10:80:10, isocrático) a un flujo de  $1\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$  durante 10 min. El espectro de absorción UV se registró a 220 nm.

## **VI. RESULTADOS**

**6.1. Determinar el perfil de laherradurina y rolliniastatina-2 durante el desarrollo de las semillas.**

### **6.1.1 Acetogeninas de referencia**

Las acetogeninas laherradurina y rolliniastatina-2 fueron aisladas del extracto metanólico de semillas maduras (Figuras 18 y 19), las cuales se obtuvieron de la unión y cristalización de las fracciones 36-75 y 101-165, respectivamente. Las características fisicoquímicas se especifican en el cuadro 5. Ambas moléculas fueron utilizadas como referencia para conocer su presencia durante la ontogenia de las semillas. La detección de acetogeninas en HPLC fue de 3.3 y 4.2 min para la rolliniastatina-2 y laherradurina, respectivamente (Figura 18).

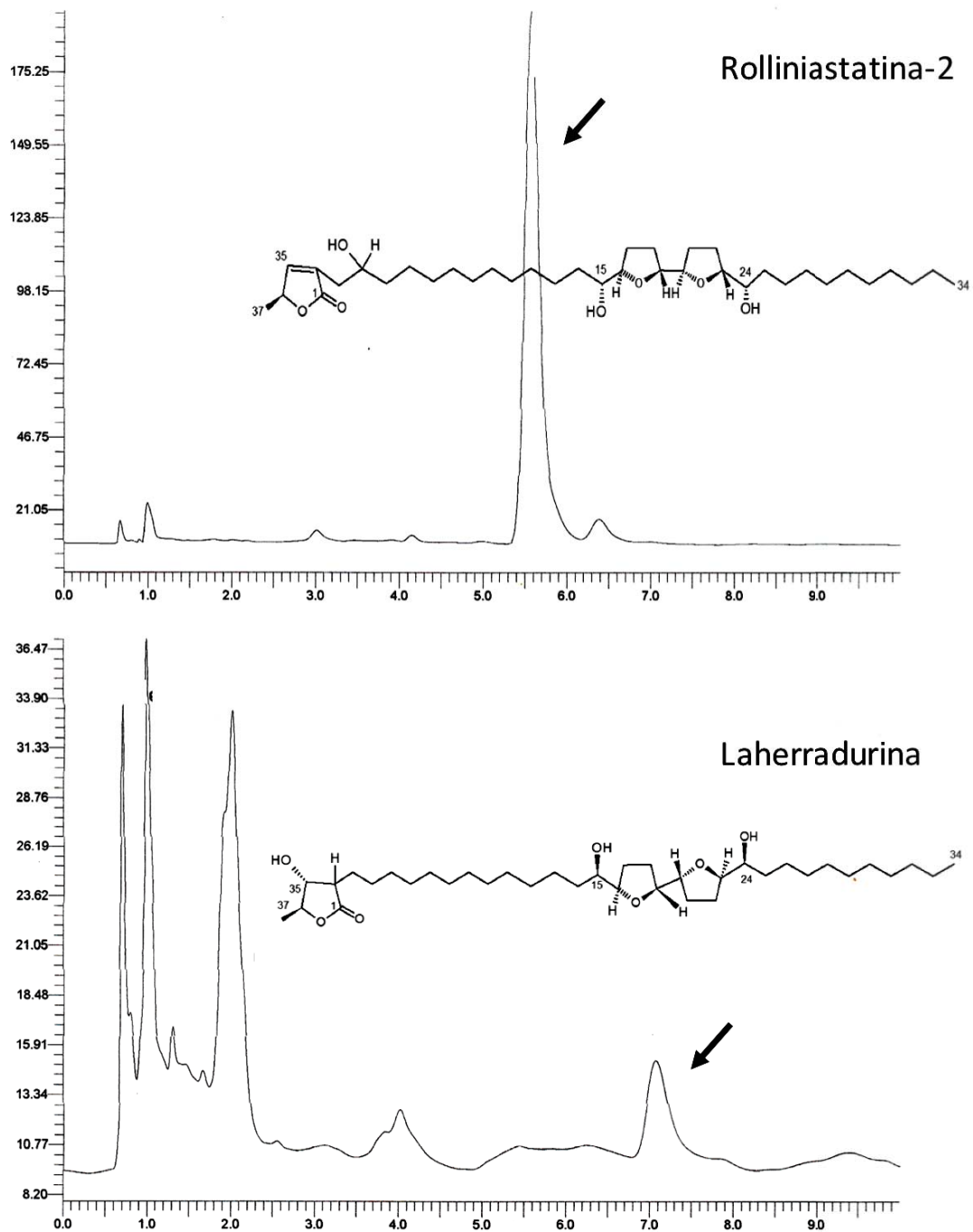
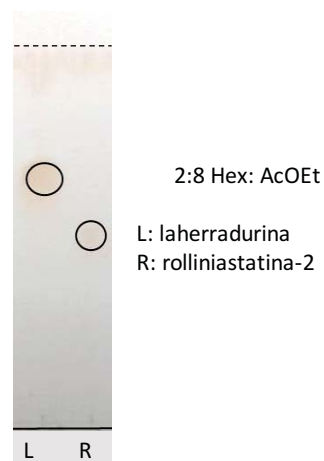


Figura 18. Identificación y estructura de rolliniastatina-2 y laherradurina.



**Figura 19.** Cromatografía en capa fina de las acetogeninas de referencia.

**Cuadro 5.** Características fisicoquímicas de las acetogeninas aisladas. Rf: Constante cromatográfica.

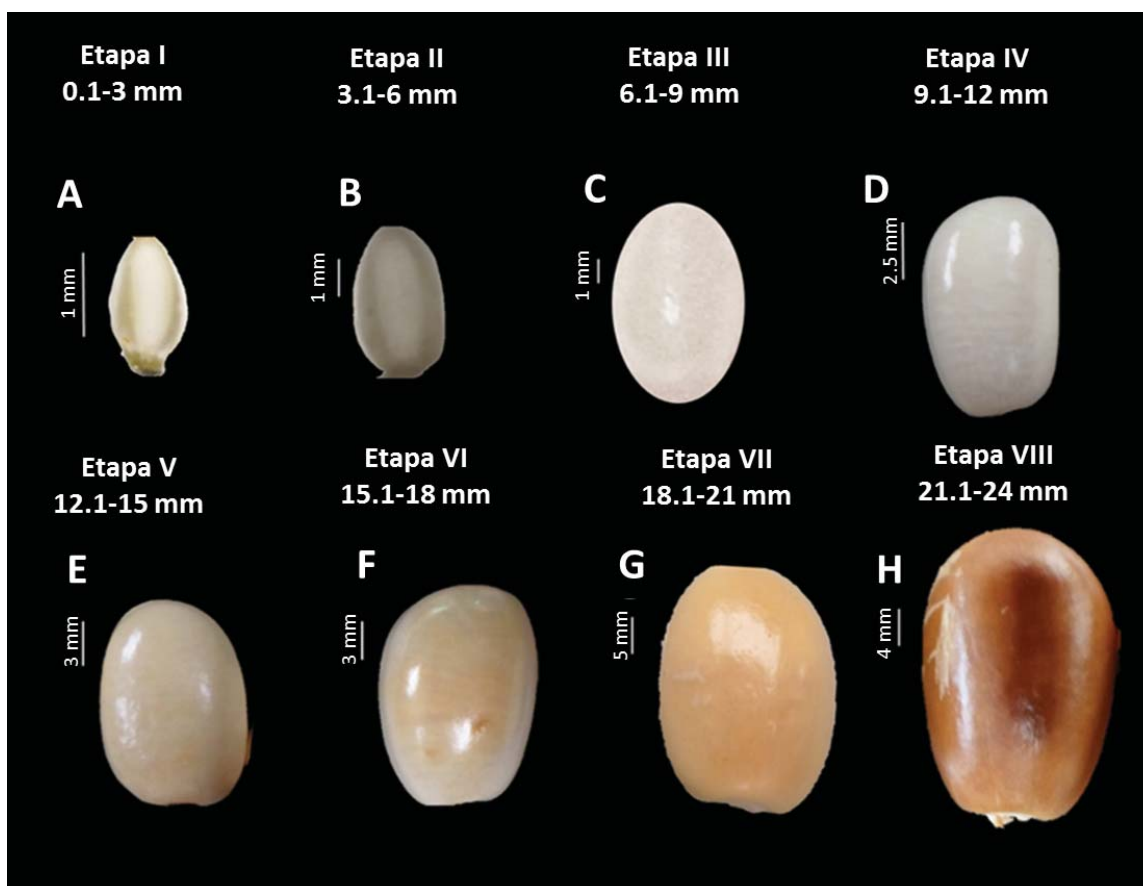
Compuesto	Rendimiento (mg)	Apariencia-color	Solubilidad	Rf	Punto de fusión (°C)
Laherradurina	1258.7	Cristales blancos en forma de aguja	AcOEt/CHCl <sub>3</sub> /EtOH/MeOH	0.63	66- 67
Rolliniastatina-2	13.6	Cristales blancos	AcOEt/CHCl <sub>3</sub> /EtOH/MeOH	0.48	62-65

### 6.1.2 Clasificación de las semillas

Para abarcar el perfil de acetogeninas durante el desarrollo de las semillas, éstas se clasificaron en ocho etapas: etapa I (0.01-3 mm), etapa II (3.1-6 mm), etapa III (6.1-9 mm), etapa IV (9.1-12 mm), etapa V (12.1-15 mm), etapa VI (15.1-18 mm), etapa VII (18.1-21 mm) y etapa VIII (21.1-24 mm) (Figura 20). Además del tamaño de las semillas, otra característica que caracteriza a las distintas etapas es la coloración y dureza de la cubierta seminal, relacionada con su madurez y lignificación.

Las semillas de las cuatro primeras etapas se caracterizan por tener la cubierta seminal blanca, muy delgada, suave y frágil (Figura 20A–D), que en contacto con el aire se oxida con rapidez y el endospermo es acuoso. En las etapas V y VI (Figura 20E–F), la cubierta de la semilla presenta cambios de coloración, de blanco a ligeramente amarillo y es

levemente dura; el endospermo deja de ser líquido y tiene una consistencia blanda. En las semillas de la etapa VII, se distingue la testa y el tegmen de color amarillo tenue (Figura 20G), más intenso que las dos etapas anteriores, y presenta mayor dureza por lo que se dificulta cortarlas, el endospermo es enteramente sólido. En la etapa VIII, la testa es café oscuro (Figura 20H), característica de las semillas maduras por la lignificación de los tegumentos, por lo que la cubierta de la semilla es dura y muy resistente a cualquier daño mecánico, y el endospermo es sólido.

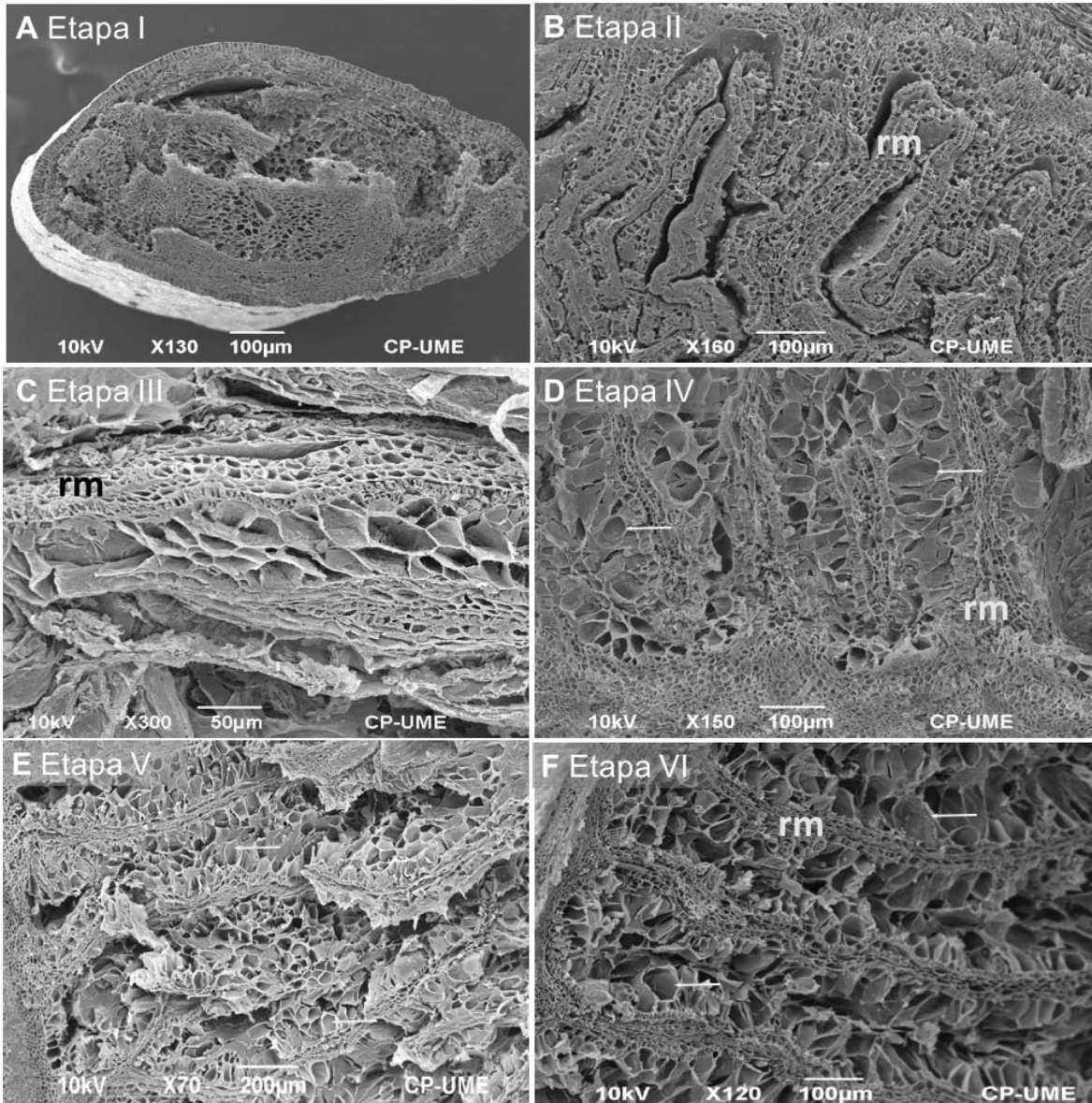


**Figura 20.** Cambios morfológicos relacionados con la etapa de desarrollo de las semillas de *Annona diversifolia*.

La ubicación celular de las acetogeninas se ha descubierto recientemente en semillas de *Annona diversifolia*, las cuales son almacenadas en idioblastos (Laguna *et al.* 2015; Brechú-Franco *et al.* 2016), razón por la cual se realizó el seguimiento de éstos para relacionar la sincronización de su formación y la presencia de acetogeninas.

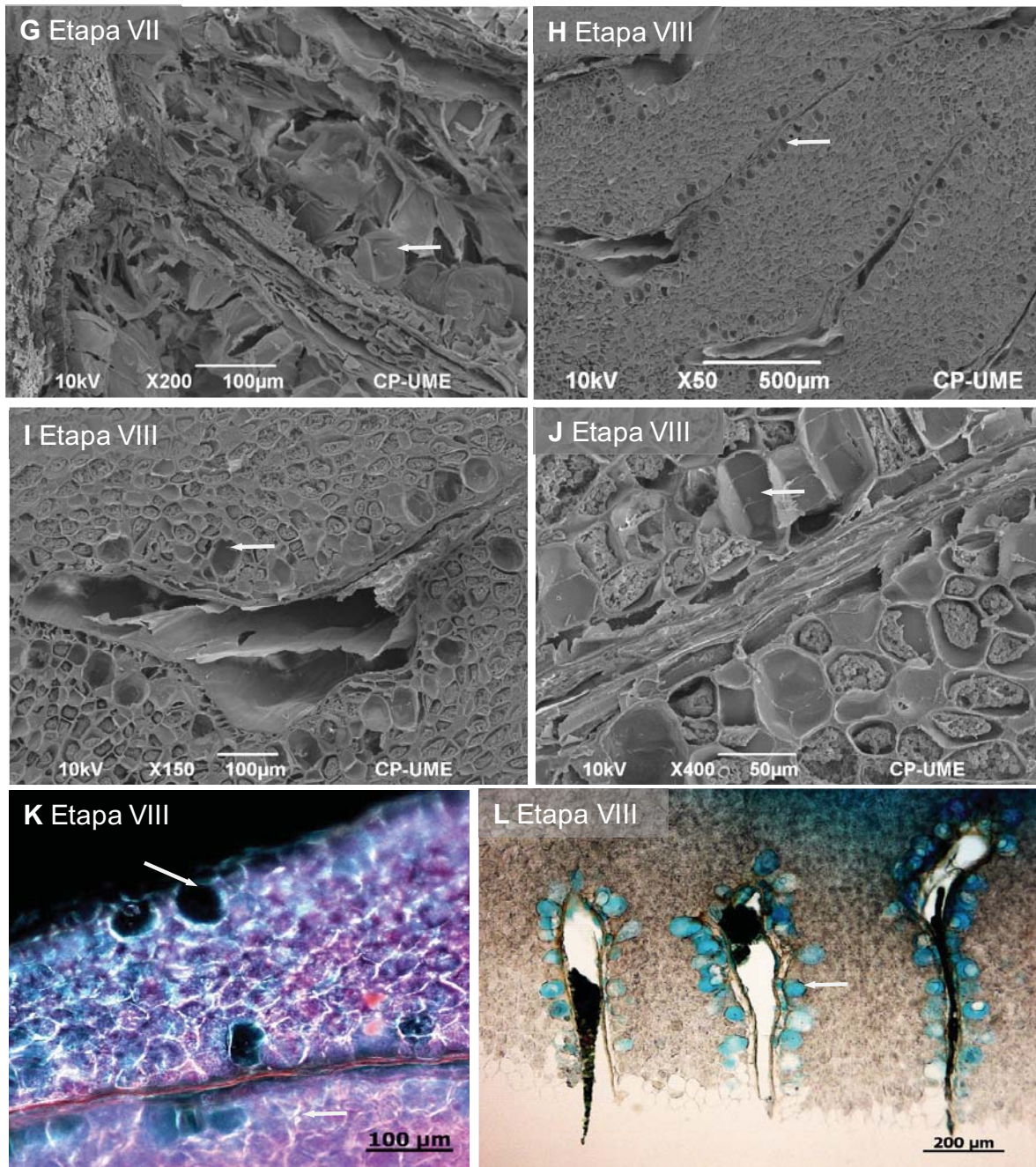


Durante las primeras tres etapas de desarrollo de las semillas, no es posible diferenciar a los idioblastos del resto de las células (Figura 21A), algunos son visibles a partir de la etapa IV (Figura 21B-C) e inconfundibles en semillas que han alcanzado la madurez (Figura 21D-F). Los idioblastos se observaron siempre distribuidos a los márgenes de las ruminaciones. En promedio, los idioblastos miden  $68 \times 45 \mu\text{m}$ .



**Figura 21.** Idioblastos de *Annona diversifolia* durante el desarrollo de las semillas. A) Etapa I (0.01-3 mm). B) Etapa II (3.1-6 mm). C) Etapa III (6.1-9 mm). D) Etapa IV (9.1-12 mm). E) Etapa V (12.1-15) Etapa VI (15.1-18). Cortes longitudinales de las semillas a diferentes etapas. Las flechas señalan a los idioblastos. Abreviación: rm, ruminación. Observadas con un microscopio de barrido.





**Figura 21 continuación.** Idioblastos de *Annona diversifolia* durante el desarrollo de las semillas. G) Etapa VII (18.1-21). H-L) Etapa VIII (21.1-24). K) Corte histológico teñido con rojo "O" de aceite. Y observado con microscopía de campo oscuro. L) Microscopía de luz, tinción con azul de metileno. Cortes longitudinales. Las flechas señalan a los idioblastos. Abreviación: rm, ruminación.

### 6.1.3 Acetogeninas en diferentes etapas de desarrollo

Las acetogeninas laherradurina y rolliniastatina-2 se detectaron en los extractos hexánicos y metanólicos (cuadro 6), aunque en mayor proporción en estos últimos. En los extractos hexánicos ambas moléculas tienen un coeficiente de variación alto, con un valor de 210.50 para la rolliniastatina-2 y 107.09 para laherradurina. Para el análisis de las acetogeninas a lo largo del desarrollo de las semillas se tomó en cuenta la suma de ambos compuestos contenidos en los dos extractos, equivalente a las acetogeninas totales.

Ambas acetogeninas se detectaron a partir de la etapa V, que corresponde a la etapa intermedia del desarrollo de las semillas (Figura 22), justo en esta etapa la concentración de ambas moléculas es mínima comparada con el aumento que presentan en las etapas consecuentes (cuadro 6).

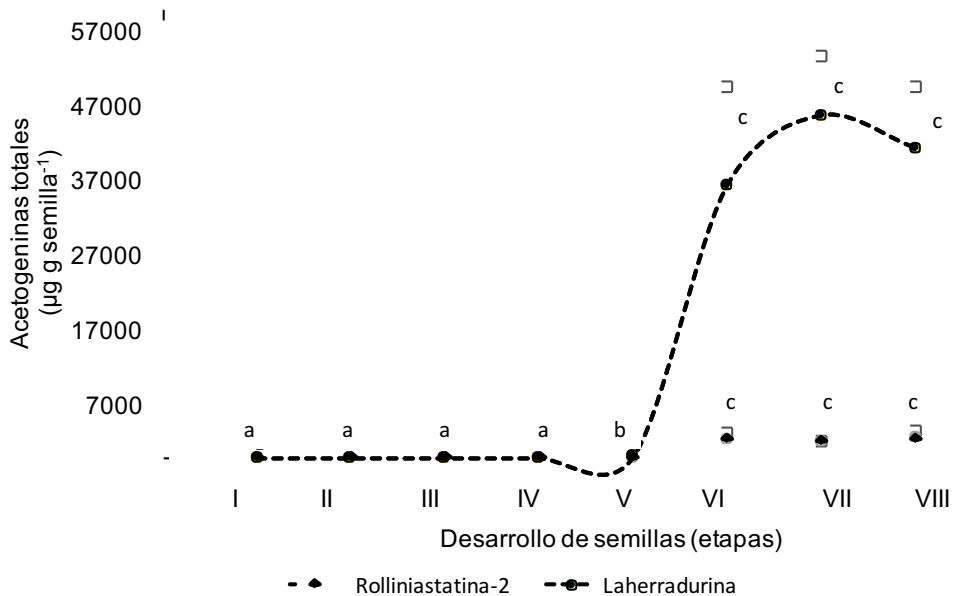
Laherradurina se encuentra a una concentración inicial de  $125.67 \mu\text{g}\cdot\text{g semilla}^{-1}$ , cuya concentración aumenta 100 veces hasta alcanzar una concentración máxima de  $45,716.33 \mu\text{g}\cdot\text{g semilla}^{-1}$ , manteniéndose sin variación desde la etapa VI hasta la VIII.

La detección inicial de rolliniastatina-2 fue casi imperceptible, con un valor de  $25.42 \mu\text{g}\cdot\text{g semilla}^{-1}$ ; sin embargo, su concentración aumentó 300 veces hasta alcanzar los  $2,661.61 \mu\text{g}\cdot\text{g semilla}^{-1}$  en las etapas siguientes, permaneciendo sin diferencias significativas (cuadro 6). Los resultados indican que la concentración de laherradurina es 16 veces mayor que la de rolliniastatina-2.

**Cuadro 6.** Concentración de laherradurina y rolliniastatina-2 en las diferentes etapas de desarrollo.

Etapa	Laherradurina $\mu\text{g}\cdot\text{g semilla}^{-1}$			Rolliniastatina-2 $\mu\text{g}\cdot\text{g semilla}^{-1}$		
	Extractos hexánicos	Extractos metanólicos	Total	Extractos hexánicos	Extractos metanólicos	Total
I	ND	ND	ND	ND	ND	ND
II	ND	ND	ND	ND	ND	ND
III	ND	ND	ND	ND	ND	ND
IV	ND	ND	ND	ND	ND	ND
V	125.67 $\pm$ 48	ND	125.67 $\pm$ 48 <b>b</b>	25.47 $\pm$ 8	ND	25.47 $\pm$ 8 <b>b</b>
VI	470.70 $\pm$ 404	35912.46 $\pm$ 13843	36383.16 $\pm$ 13937 <b>a</b>	87.90 $\pm$ 93	2465.58 $\pm$ 1420	2553.16 $\pm$ 1412 <b>a</b>
VII	439.87 $\pm$ 455	45364.43 $\pm$ 8984	45716.33 $\pm$ 8793 <b>a</b>	250.07 $\pm$ 441	2031.35 $\pm$ 917	2281.43 $\pm$ 833 <b>a</b>
VIII	594.91 $\pm$ 726	40787.83 $\pm$ 9051	41382.74 $\pm$ 8979 <b>a</b>	44.41 $\pm$ 30	2617.19 $\pm$ 1604	2661.61 $\pm$ 1617 <b>a</b>

Test de Kruskal-Wallis para acetogeninas totales: laherradurina  $P = 7.449 \times 10^{-13}$ ,  $\chi^2 = 61.84$ , rolliniastatina-2  $P = 7.455 \times 10^{-12}$ ,  $\chi^2 = 55.11$ . Las letras indican diferencias significativas.



**Figura 22.** Laherradurina y rolliniastatina-2 totales a lo largo del desarrollo de las semillas. Las letras señalan diferencias significativas.

#### 6.1.4 Discusión

Las acetogeninas de anonáceas están almacenadas en idioblastos, células especializadas en la compartimentalización de sustancias o compuestos, estos idioblastos se han reportado en el endospermo de las semillas y en la radícula e hipocótilo de plántulas de *A. macrophyllata* (Laguna *et al.* 2015; Brechú-Franco *et al.* 2016). Debido a las características lipídicas de las acetogeninas y al supuesto de que los precursores son largas cadenas de ácidos grasos, entre ellos el ácido palmítico, oleico o linoleico (Cavé *et al.* 1997), reportados también en semillas de *A. diversifolia* (Pérez-Amador *et al.* 1997; Marroquin-Andrade *et al.* 2011), las acetogeninas podrían localizarse en la *oil cavity*, un compartimento subcelular que almacena lípidos y ocupa cerca del 75% del volumen de los idioblastos (Bakker & Gerritsen, 1990, 1992). Siguiendo el desarrollo de los idioblastos, se notó que pueden diferenciarse del resto de las células a partir de la etapa IV (9.1-12 mm) (Figura 20), coincidiendo con la presencia de laherradurina y rolliniastatina-2.

En la familia Annonaceae, se han reportado idioblastos oleíferos, mucilaginosos y con cristales de oxalato de calcio, los dos primeros en hojas de 37 especies del género *Annona* (Bakker & Gerritsen, 1990, 1992); mientras que los dos últimos se han observado en tallos y hojas de *Rollinia mucosa* y *R. rugulosa* (Duarte *et al.* 2016). En las semillas, antes de conocer el sitio de almacenamiento de las acetogeninas, solo se habían reportado idioblastos oleíferos en *A. squamosa* (Corner, 1949; Martínez *et al.* 2013; Silva *et al.* 2016), *A. cherimola* (Schroeder, 1951), *Anaxagorea* sp. (Scharaschkin & Doyle 2006), *Anaxagorea javanica*, *Desmos* sp. y *Polyalthia purpurea* (Corner, 1949).

Los idioblastos del género *Annona* están formados por una pared celular suberizada que tiene entre otras características evitar la salida de las sustancias tóxicas almacenadas, como las acetogeninas y alcaloides. La presencia de la pared suberizada es un carácter ancestral de dicotiledóneas primitivas como Annonaceae y Lauraceae, ausente en familias recientes (Bakker & Baas, 1993). Esto sugiere no solo en la antigüedad de las anonáceas, sino también de estos metabolitos secundarios que han acompañado a las plantas durante el curso de su evolución, conociendo también que la biosíntesis de las acetogeninas parece

tener intermediarios biogénicos presentes en primitivos organismos marinos como las esponjas y anémonas (Cavé *et al.* 1997).

El análisis realizado por Bakker & Gerritsen (1992) demostró que, en promedio, los idioblastos oleíferos de hojas del género *Annona*, miden alrededor de 33  $\mu\text{m}$ , los de menor tamaño fueron encontrados en *A. cacans* con 24  $\mu\text{m}$ , mientras que los más grandes alcanzan hasta los 50  $\mu\text{m}$ , como en el caso de *A. nutans*. También notaron que los idioblastos mucilaginosos en las hojas son más grandes que los oleíferos. Sin embargo, los idioblastos de las semillas maduras de *A. diversifolia* (~65  $\mu\text{m}$ ) superan en tamaño a los encontrados en sus hojas que miden 27  $\mu\text{m}$ , más bien están cercanos a los idioblastos mucilaginosos de *A. glauca* que miden 62  $\mu\text{m}$ .

En la familia Annonaceae, los idioblastos tienen una distribución específica de acuerdo con el órgano en el que se encuentran. En las semillas, los idioblastos se localizan en la periferia de las ruminaciones (Figura 21) (Laguna *et al.* 2015; Brechú-Franco *et al.* 2016), mientras que en las hojas se limitan al parénquima esponjoso, aunque en algunos casos pueden encontrarse en el parénquima empalizada, e incluso en ambos tejidos simultáneamente (Bakker & Gerritsen, 1992; Van Setten & Koek-Noorman, 1986).

Las acetogeninas laherradurina y rolliniastatina-2 fueron identificadas por primera vez en semillas de *Annona cherimola* (Ríos *et al.* 1989) y *Rollinia mucosa* (Pettit *et al.* 1989), respectivamente. Ambas moléculas fueron detectadas durante el desarrollo de las semillas de *A. diversifolia*, que también se han reportado en semillas maduras de la misma especie (De la Cruz, 2001; Schlie-Guzmán *et al.* 2009; Luna-Cazáres & González-Esquinca, 2010; Reyes-Trejo *et al.* 1997, 2014;). Ambas acetogeninas también se reportaron en hojas de *A. lutescens* y en todos los órganos de plántulas de *A. muricata* (González-Esquinca *et al.* 2014).

La ruta de biosíntesis de acetogeninas parece privilegiar la formación de algunos compuestos sobre otros, ya que durante el desarrollo de las semillas de *A. diversifolia*, la concentración de laherradurina es mayor que la de rolliniastatina-2 (Figura 22, cuadro 6), patrón observado también en semillas maduras: laherradurin (1000  $\mu\text{g g seed}^{-1}$ ), rolliniastatina-2 (30  $\mu\text{g g seed}^{-1}$ ) y la cherimolina-2 (20  $\mu\text{g g seed}^{-1}$ ) (De la Cruz, 2001; Schlie-

Guzmán *et al.* 2009). Por lo tanto, laherradurina es la ACG mayoritaria de las semillas maduras de *A. macrophyllata*, seguida por rolliniastatina-2 y cherimolina-2.

La localización de ambas moléculas está relacionada con el grado de desarrollo de las semillas, ya que su concentración aumenta en las etapas cercanas a la madurez (Figura 22). Además, su distribución también varía de acuerdo con el órgano en el que se almacena, y a la etapa de desarrollo. En plántulas de *A. muricata*, laherradurina es más abundante en hojas, mientras que rolliniastatina-2 lo es en tallos y raíces. Dentro de este mismo esquema laherradurina está 40 veces más en plántulas de 2 hojas, mientras que la rolliniastatina-2 está 26 veces más concentrada en raíces de plántulas de 6 hojas (González-Esquinca *et al.* 2014). Además, la presencia de acetogeninas en radículas recién emergidas de *A. muricata*, como laherradurina (González-Esquinca *et al.* 2014) y *cis*-uvarimicin IV (Riley-Saldaña *et al.* 2017) sugiere que las acetogeninas de las semillas son movilizadas a los órganos de las plántulas durante la germinación, mientras que la presencia de muricin B y *cis*-annonacin-10-one, a partir de las primeras hojas, sugiere que su biosíntesis es dependiente de la fotosíntesis (Riley-Saldaña *et al.* 2017) e independiente de su probable presencia en semillas.

Las raíces y hojas producen y almacenan grandes cantidades de alcaloides y acetogeninas, probablemente para proteger a dos de sus órganos imprescindibles, el primero necesario para la toma y transporte de agua y nutrientes, mientras que las hojas son indispensables para la realización de la fotosíntesis (Riley-Saldaña *et al.* 2017). Por lo tanto, los resultados de esta investigación estarían dentro de este contexto, considerando que las plantas asignan recursos para biosintetizar acetogeninas durante su desarrollo, para proteger a su órgano de dispersión y por lo tanto asegurar la perpetuación de la especie. La toxicidad frente a diferentes grupos biológicos permite vislumbrar el papel defensivo que podrían tener estos compuestos frente a las distintas presiones bióticas y/o abióticas a las que las plantas están sometidas durante su ciclo de vida (Fraenkel, 1959; Vivanco *et al.* 2005; Wink, 2010) aunque en este último caso también se desconoce su participación.

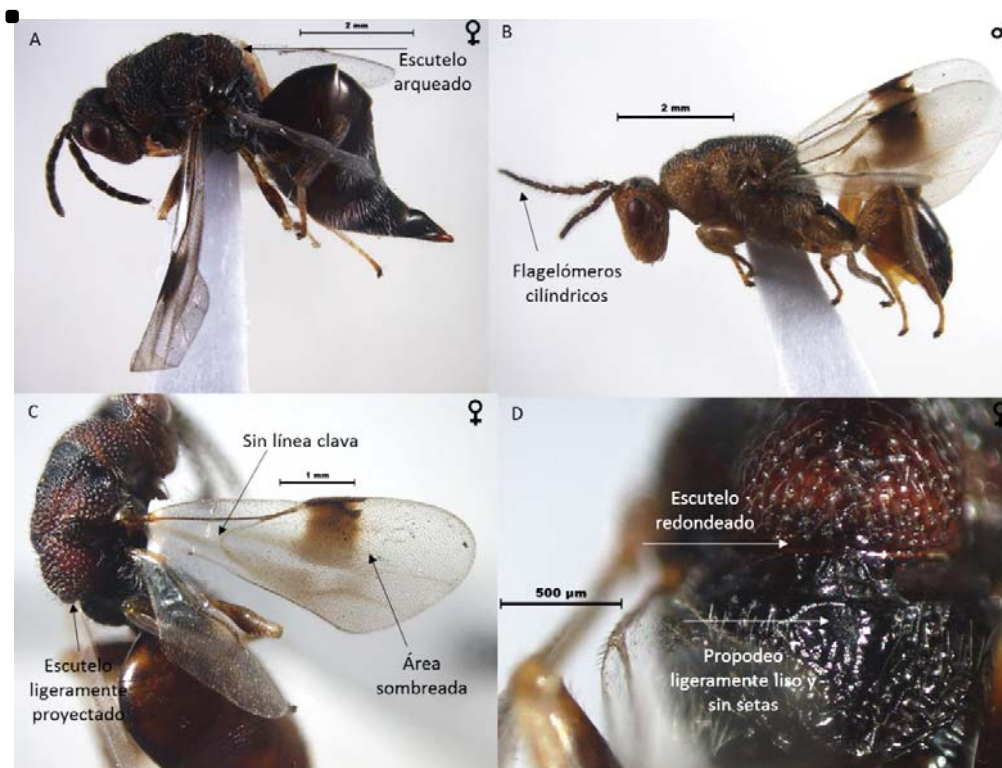


## 6.2. Caracterización morfológica de los estadios larvarios de *Bephratelloides cubensis*

### 6.2.1 Identificación de la avispa

Antes de realizar los análisis con la avispa parásita de *A. diversifolia* se confirmó su identidad taxonómica. Las características del adulto coinciden con las características diagnósticas de *Bephratelloides cubensis*: la parte media superior del propodeo es ligeramente lisa, sin carinas y sin setas (Figura 23D); área sombreada debajo de la venación de las alas (Figura 23B y C); el tamaño de los insectos varía de 4.0 a 9.5 mm de largo. Otras de sus características son: escutelo redondeado apicalmente, arqueado en vista de perfil, no proyectando más allá del dorsellum (Figura 23A y C). La línea calva del ala anterior ausente (Figura 23C). Los flagelómeros en los machos son cilíndricos (Figura 23B).

El desarrollo de esta especie es holometábolo, es decir, que pasa por los estados de huevo, larva, pupa y adulto, estos estados fueron encontrados dentro de las semillas, con excepción de los huevos (Figura 24). Por otra parte, se encontró que las avispas afectaron a 645 semillas de 310 frutos.



**Figura 23.** *Bephratelloides cubensis*. A) Hembra. B) Macho. C) Características del ala y escutelo. D) Características del escutelo y propodeo.



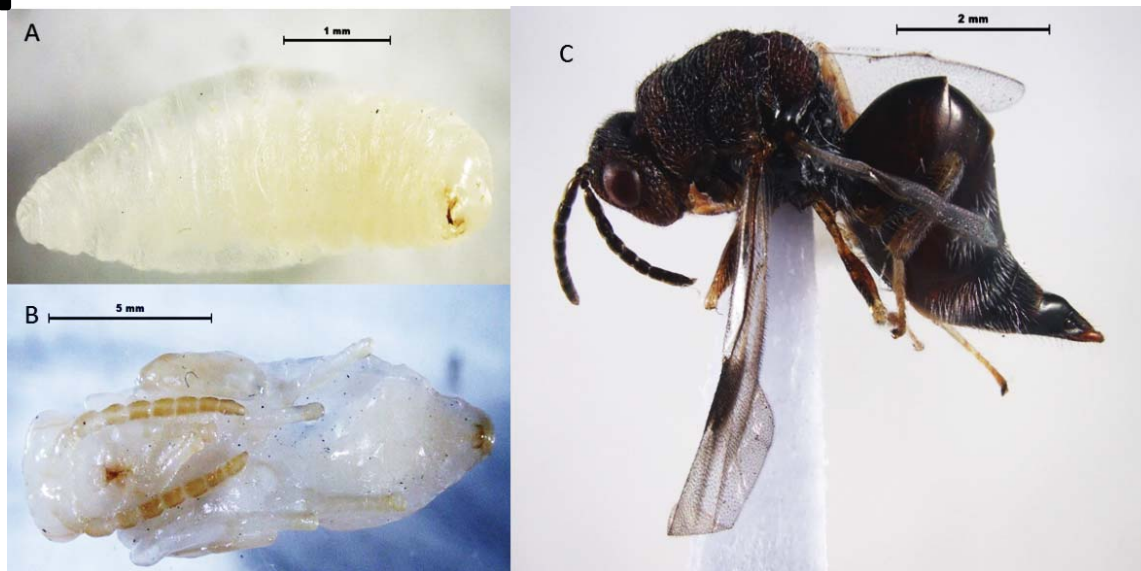


Figura 24. Estadios de desarrollo de *B. cubensis*. A) Larva. B) Pupa. C) Adulto.

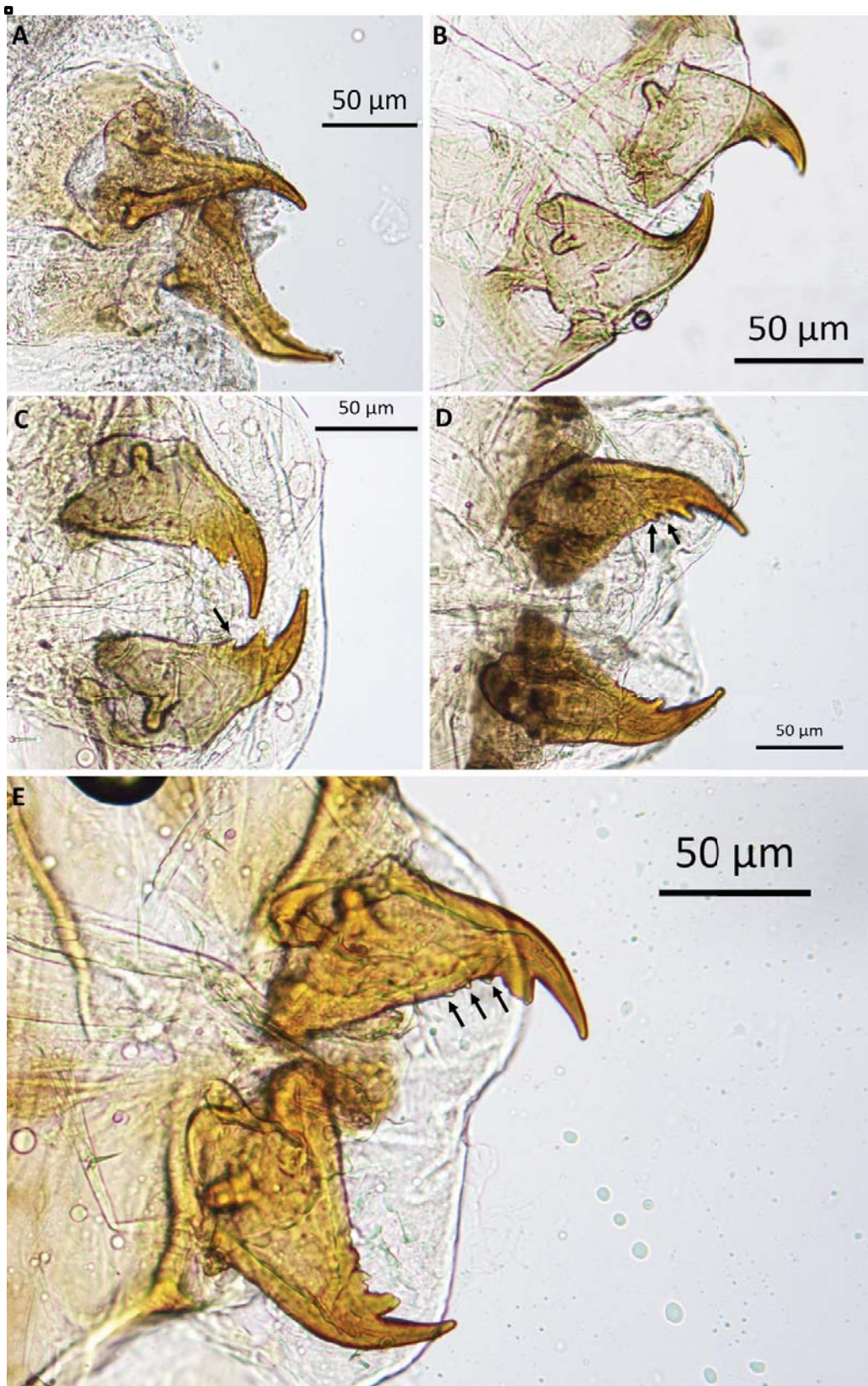
### 6.2.2 Estadios larvarios

Para tener mayor conocimiento acerca del ciclo de vida de *B. cubensis* en las semillas de *A. diversifolia*, los estadios larvarios fueron caracterizados. Visualmente, las mandíbulas de las larvas presentan algunas diferencias, entre ellas el número de dientes (cuadro 7), característica que sirvió para definir cinco agrupaciones, interpretados como estadios larvarios (Figura 25). Las larvas de cualquier estado ontogénico presentan el diente apical, mientras que el diente subapical se desarrolla a partir del segundo estadio y permanece hasta el quinto. Los últimos tres estadios se diferencian porque tienen dientes pequeños: 1 (estadio 3), 2 (estadio 4) y 3 (estadio 5).

**Cuadro 7.** Presencia de dientes en los estadios larvarios de *B. cubensis* y el promedio del largo de las mandíbulas.

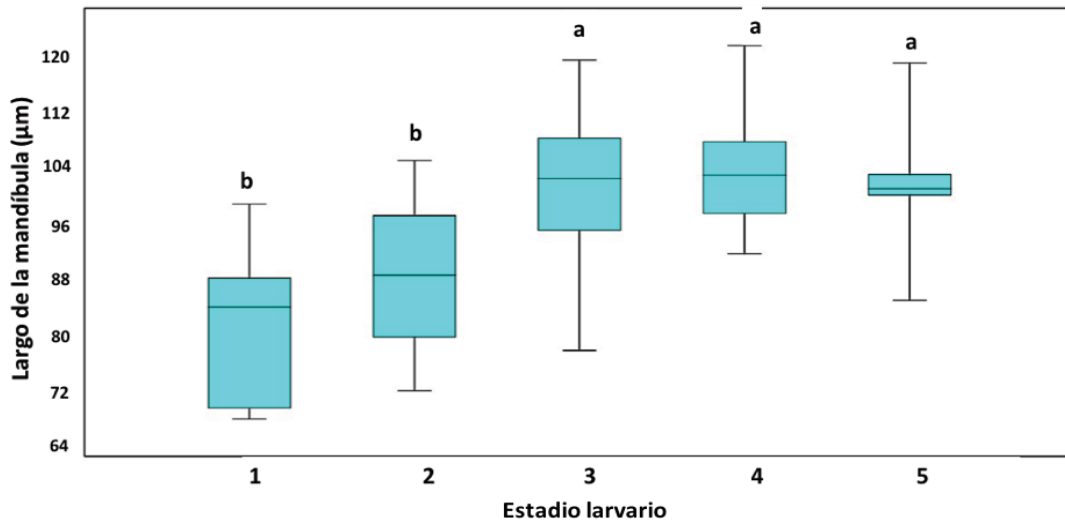
Estadio larvario	Diente apical	Diente subapical	Dientes pequeños	Número total de dientes	Largo ( $\mu\text{m}$ )
1	1	0	0	1	85.93 $\pm$ 13.87 b
2	1	1	0	2	89.59 $\pm$ 9.81 b
3	1	1	1	3	102.30 $\pm$ 9.65 a
4	1	1	2	4	102.37 $\pm$ 7.37 a
5	1	1	3	5	102.60 $\pm$ 7.89 a

Test de Kruskal-Wallis:  $p = 1.318 \times 10^{-6}$ ,  $\chi^2 = 32.79$ . Las letras señalan diferencias significativas.



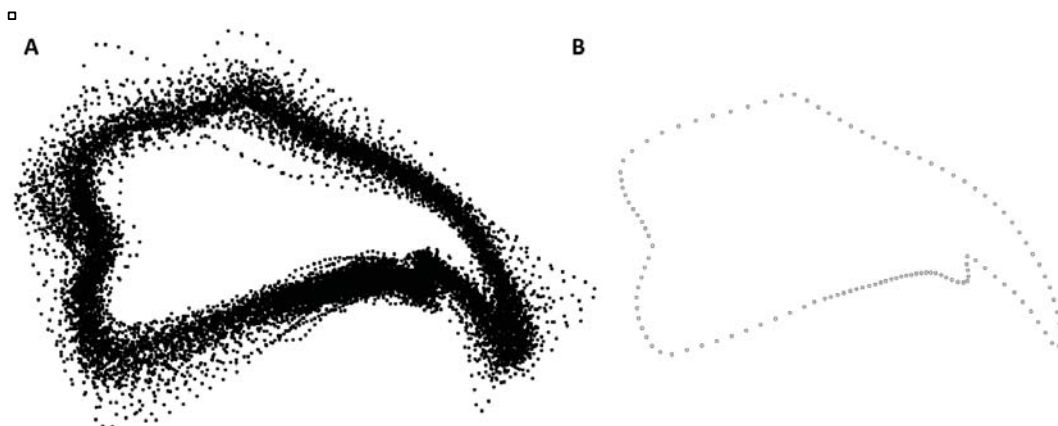
**Figura 25.** Estadios larvarios de *Bephratelloides cubensis*. A) Estadio 1. B) Estadio 2. C) Estadio 3. D) Estadio 4. E) Estadio 5. Las flechas señalan los dientes pequeños.

Tomando en cuenta el largo de las mandíbulas, el análisis de Kruskal-Wallis arrojó diferencias significativas entre estadios larvarios ( $p= 1.318 \times 10^{-6}$ ,  $\chi^2= 32.79$ ). Sin embargo, los individuos quedaron agrupados en dos estadios y no en cinco como se esperaba. El primer grupo está conformado por los dos primeros estadios y el siguiente grupo conformado por los estadios 3, 4 y 5 (cuadro 7, Figura 26).



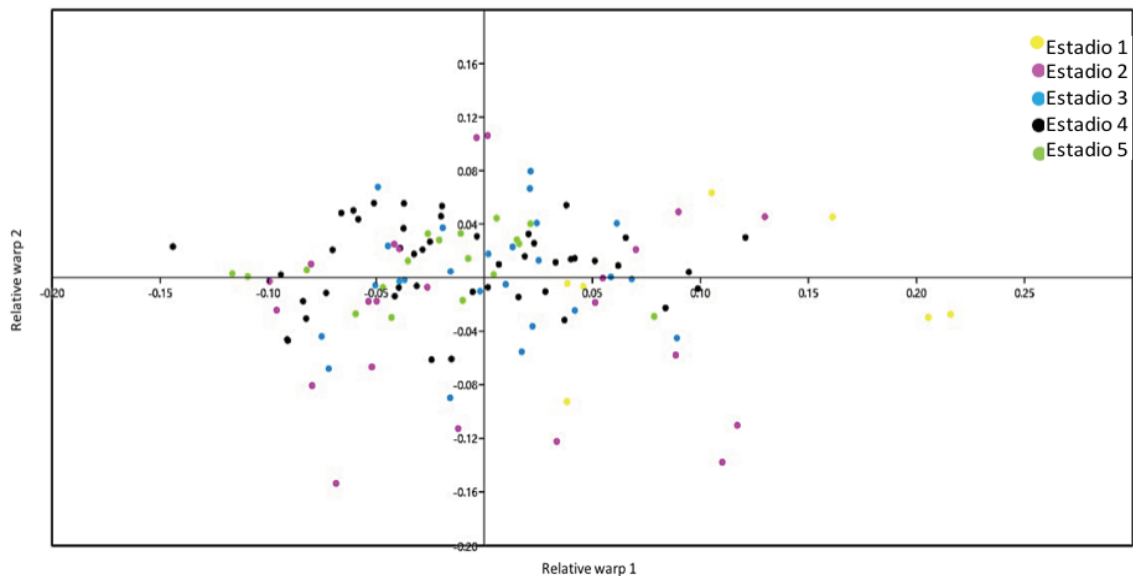
**Figura 26.** Relación entre los estadios larvarios y el largo de las mandíbulas.

Para realizar una mejor separación de los estadios larvarios se llevó a cabo el análisis de forma de las mandíbulas, tomando en cuenta todo el contorno. El consenso de las mandíbulas de los 120 ejemplares arrojó una forma promedio caracterizada por la presencia de los dientes apical y subapical, además se observó que el patrón de forma es la misma en los diferentes estados ontogénicos (Figura 27).



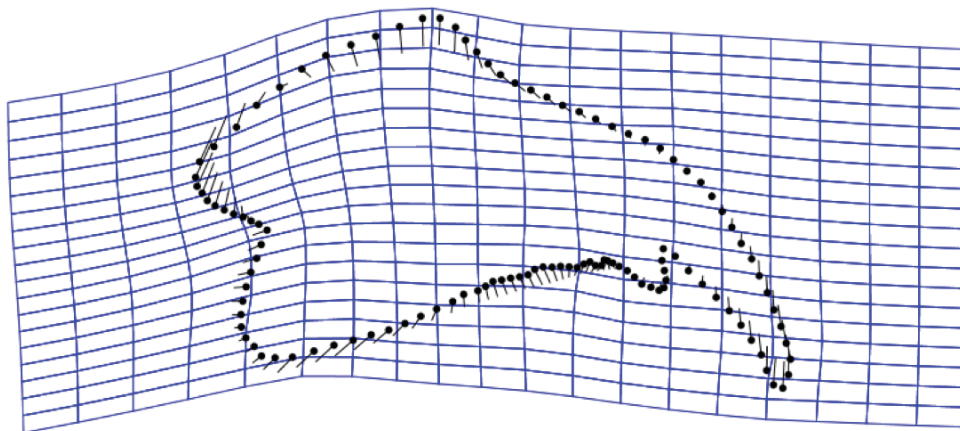
**Figura 27.** Consenso de la forma de las mandíbulas. A) Puntos que definen el contorno de las mandíbulas de 120 individuos, B) Forma promedio.

El análisis de deformaciones relativas (PCA) (Figura 28) no muestra una separación clara de grupos entre los individuos en diferentes estados ontogénicos, al contrario, todos los individuos se sobreponen. Las variaciones de la forma están explicadas por los primeros dos componentes: 34.96% y 16.93%, que en su conjunto representan el 51.89% de la varianza, todas relacionadas con el contorno de las mandíbulas.



**Figura 28.** Análisis de deformaciones relativas (PCA) de las mandíbulas.

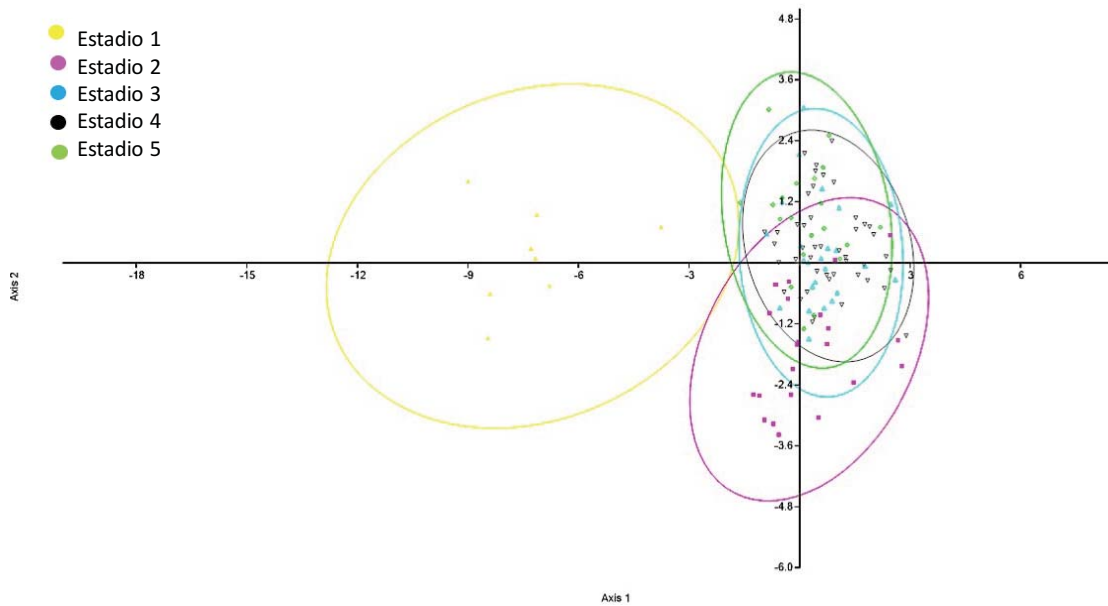
El *thin-plate spin* (placas delgadas) muestra que las partes con mayor deformación, que significa variación, son el lado izquierdo de la mandíbula (cerca del cóndilo mandibular), en la parte basal y en la zona donde se encuentran los dientes pequeños (Figura 29).



**Figura 29.** Thin-plate spin que muestra la mayor variación en las mandíbulas.



El CVA delimitó a un grupo de individuos que corresponden a las larvas más jóvenes (estadio 1), además separó a otro grupo, que corresponden al estadio 2, que se sobrepone un poco con los otros tres grupos que están completamente juntos (Figura 30). El análisis estadístico MANOVA indicó que los grupos fueron significativamente diferentes (Wilk's lambda: 0.08858,  $f= 5.6$ ,  $p=7.993 \times 10^{-27}$ , Pillai's trace=1.464,  $f= 3.964$ ,  $p= 5.241 \times 10^{-17}$ ), aunque prácticamente están separados en tres y no en cinco grupos.



**Figura 30.** Análisis de Variables Canónicas (CVA) de las mandíbulas de *B. cubensis*.

### 6.2.3 Discusión

En México, y especialmente en Chiapas, se han reportado dos especies del género *Bephratelloides*: *B. ablusus* y *B. cubensis* (Grissell & Foster, 1996; González-Sánchez, 2014), por lo que para esta investigación se realizó la identificación de la especie, confirmando la identidad de *Bephratelloides cubensis*, reportada por otros autores en *Annona diversifolia* (Castañeda-Vildózola *et al.* 2010; González-Sánchez, 2014).

En este trabajo se reporta el 31.5% de semillas parasitadas y el 16.46% de los frutos, un tanto diferentes a los resultados de González-Sánchez (2014) quién encontró el 9 y el 26%, respectivamente. Los resultados indican una tasa de infestación relativamente baja, comparado con los 60 o hasta 100% de infestación de los frutos de *Annona muricata* (Hernández-Fuentes *et al.* 2010), esta diferencia posiblemente se debe a que los árboles que se utilizaron para el trabajo son de traspatio y no forman parte de cultivos extensivos, como ocurre con los árboles de guanábana.

Determinar el número de los estadios larvarios en las especies de avispas parásitas (ej. Braconidae e Ichneumonidae) suele ser difícil, incluso existen diferencias entre los resultados de los investigadores que estudian a las mismas especies (Quicke, 2015). En este estudio, la mejor clasificación de los estadios larvarios de *Bephratelloides cubensis* fue el número de dientes, los cuales pueden estar presentes o no durante los estados ontogénicos (cuadro 7), en los últimos estadios la presencia de los dientes pequeños son los que marcan la diferencia. La clasificación final fue en cinco estadios larvarios, que se caracterizan por tener uno, dos, tres, cuatro o cinco dientes (Cuadro 7, Figura 25). Las mandíbulas multidentadas y esclerotizadas son características de insectos fitófagos, especialmente de aquellos que se alimentan de tejidos duros como el de las semillas (Quicke, 2015). Además, estas características también les permiten a las avispas adultas realizar los orificos de salida a través de la testa lignificada de las semillas y abrirse camino a través de la pulpa de los frutos.

Hernández-Fuentes *et al.* (2010) clasificaron a las larvas de la misma especie, en semillas de *Annona muricata*, en cinco estadios larvarios tomando en cuenta las medidas de las mandíbulas, sin embargo en nuestro estudio no fue posible realizar este mismo

procedimiento, ya que con el largo de las mandíbulas, solo se separan en dos grupos y no en cinco (Figura 26), uniendo los dos primeros intares en un grupo y los últimos tres estadios en otro; en este análisis las medidas se sobreponen entre estadios larvarios lo que no permite utilizarla como un método de separación. Con estos resultados se nota que el tamaño de las mandíbulas permanece constante a partir del tercer estadio (102.30  $\mu\text{m}$ ).

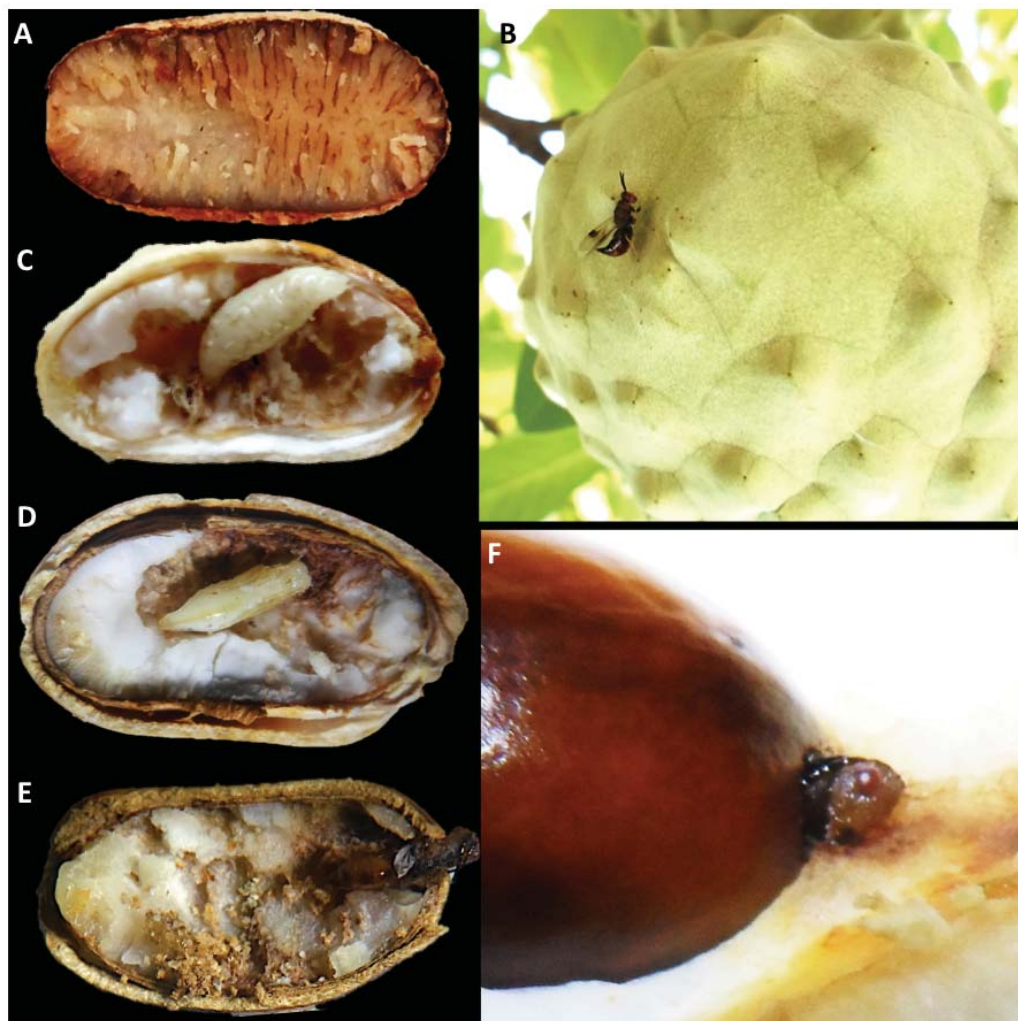
Con la finalidad de tener una mejor caracterización de las mandíbulas se realizó el análisis de la forma tomando en cuenta el contorno absoluto de la estructura. El análisis de la morfometría geométrica empleado por primera vez en esta especie se muestra que la forma de las mandíbulas es muy similar en todos los estadios larvarios (Figura 27), aunque sí con diferencias en algunas zonas, como la parte basal y la zona donde se encuentran los dientes pequeños. Sin embargo, estas deformaciones, que representan cambios en la forma, tampoco son tan prominentes (Figura 29), por lo que la curvatura formada por la presencia de los dientes pequeños no fue significativa y no fueron considerados en la forma promedio de las mandíbulas, caso contrario a la presencia del diente apical y subapical.

El CVA puede ser utilizado, por ejemplo, para describir las diferencias en las formas de las mandíbulas de las hormigas (Zelditch *et al.* 2012). Este análisis permitió la separación de los individuos del primer y segundo estadio, aunque estos últimos se superponen con los individuos del tercero, cuarto y quinto estadio (Figura 30). Esta separación parece estar relacionada con la ausencia de las curvaturas provocadas por los dientes pequeños, mientras que la sobreposición del segundo estadio con los estados ontogénicos más avanzados pudiera estar determinado por la presencia del diente subapical.

En general, las avispas parásitas presentan cinco estadios larvarios, en ocasiones este número puede reducirse en los insectos endoparásitos (Quicke, 2015). En este trabajo se clasificaron cinco estadios, tomando en cuenta el número de dientes, aunque si se utilizara el análisis morfométrico serían solo dos o tres estadios. Sin embargo, aunque los dientes pequeños no hayan sido lo suficientemente definidos para la morfometría, está claro que existen, y que visualmente señalan diferencias, lo que sugiere que para análisis posteriores de la determinación de los estadios, es necesario la observación directa de las mandíbulas y el conteo de los dientes.

### 6.3. Determinar la probable presencia de acetogeninas en larvas, pupas y adultos de *Bephratelloides cubensis*

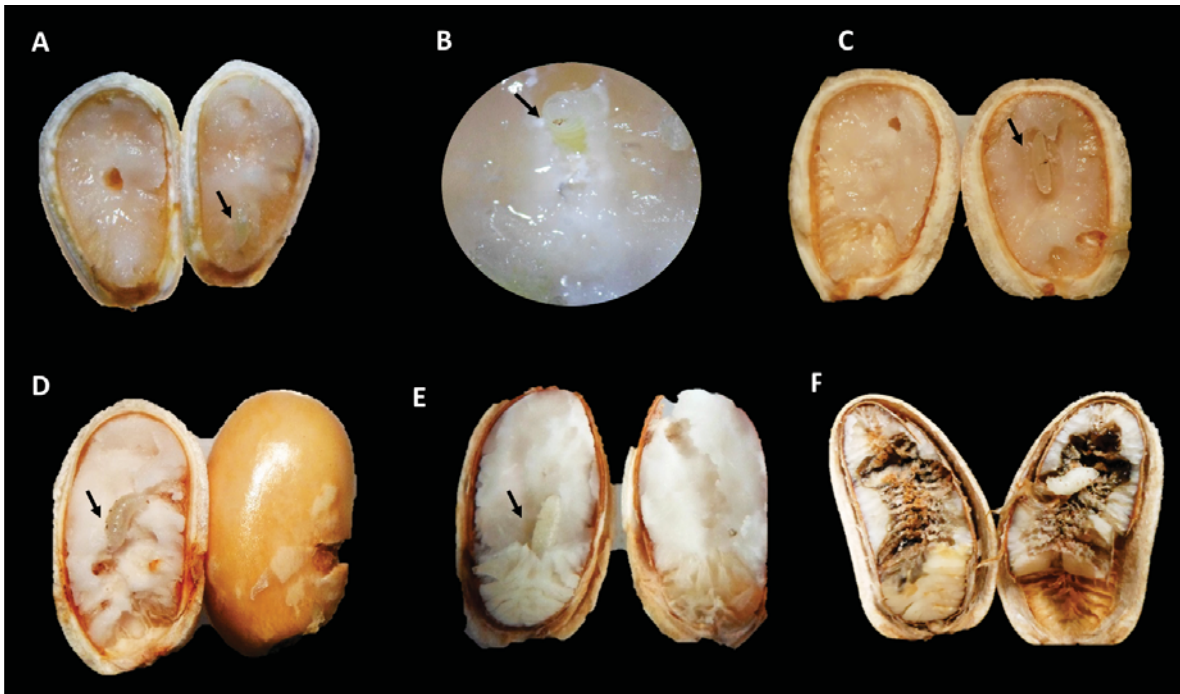
El seguimiento del ciclo de vida de *B. cubensis* en semillas de *A. diversifolia* reveló que los estados de desarrollo de la avispa ocurren en etapas determinadas del crecimiento de las semillas. Las larvas se desarrollan dentro de semillas de la etapa V a la VII, las pupas en las etapas VII y VIII, mientras que las adultas se encuentran específicamente en semillas maduras y nunca en etapas anteriores (Figura 31, 32).



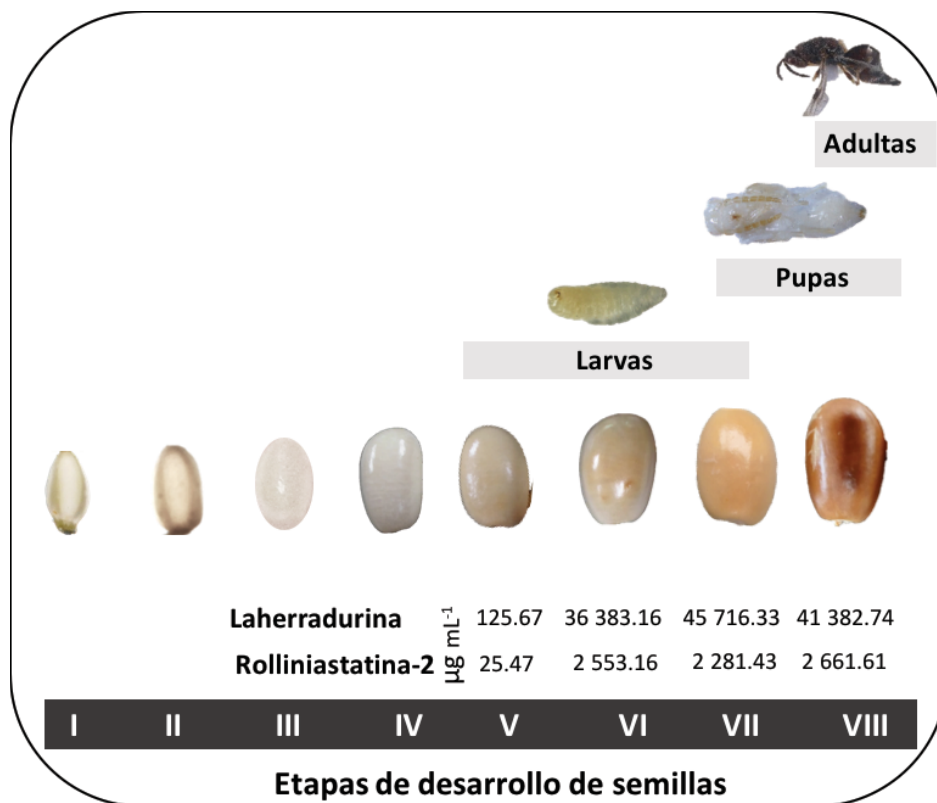
**Figura 31.** Desarrollo de *Bephratelloides cubensis* en semillas de *Annona diversifolia*. A) Semilla sana, sin daño provocado por la avispa, B) Hembra posando sobre fruto, C) Larva. D) Pupa. E-F) Adulto emergiendo de la semilla madura.



La detección de laherradurina y rolliniastatina-2 coincide con la alimentación de las larvas de *B. cubensis*, especialmente cuando ambos compuestos están en altas concentraciones (Figura 32, 33). Esto significa que durante el consumo del endospermo las larvas ingieren a las acetogeninas tóxicas, además de las sustancias de reserva, entre ellas las proteínas y lípidos (Laguna *et al.* 2015; Brechú-Franco *et al.* 2016). De estos últimos se ha detectado en *A. diversifolia* los ácidos palmítico, esteárico, oleico y linoleico (Pérez-Amador *et al.* 1997).

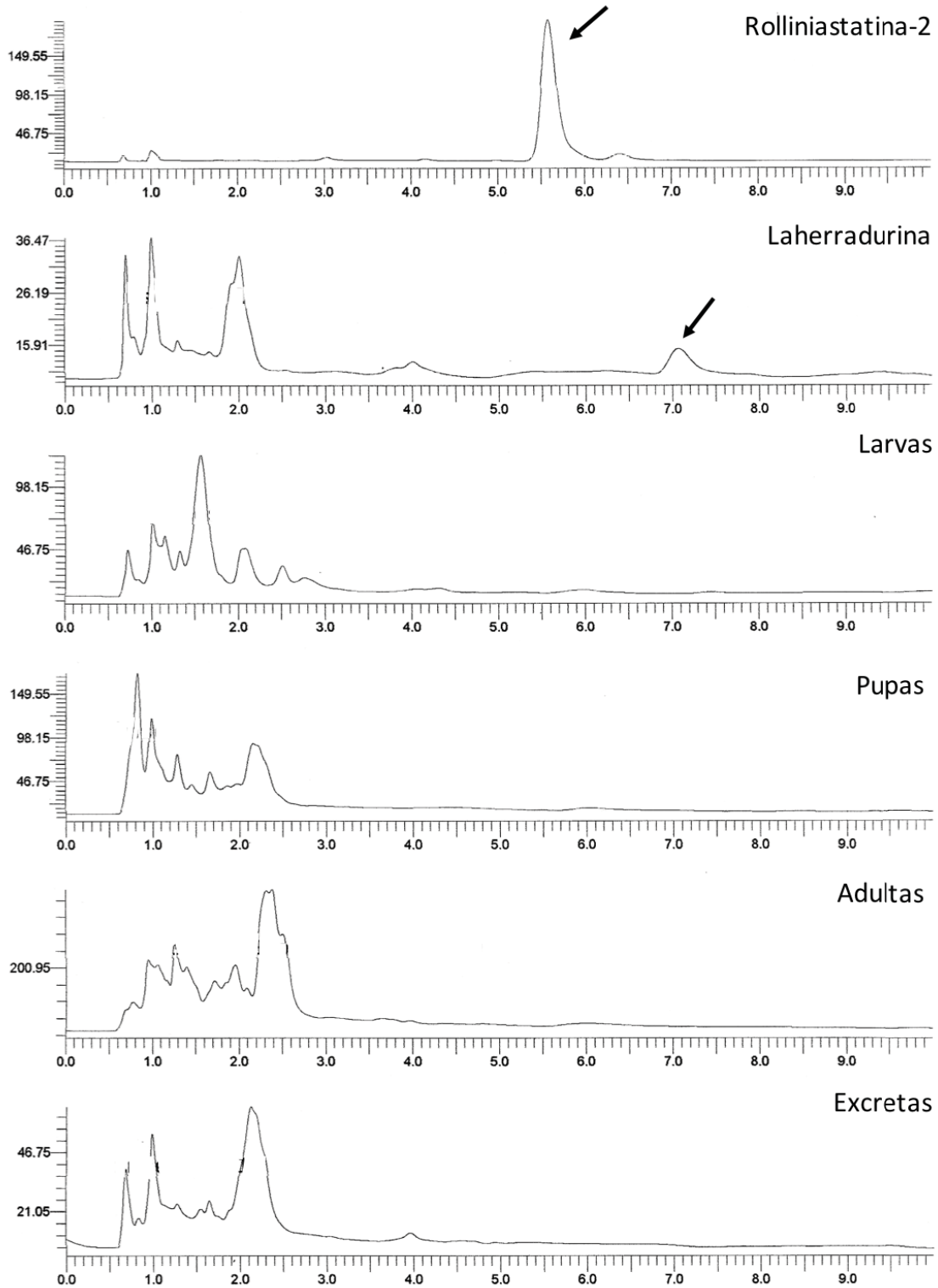


**Figura 32.** Larvas de *Bephratelloides cubensis* en el interior de semillas de *Annona diversifolia*. A-B) Semilla de la etapa V. C) Semilla en la etapa VI. D-F) Larva en semilla de la etapa VII. Las flechas señalan a las larvas.

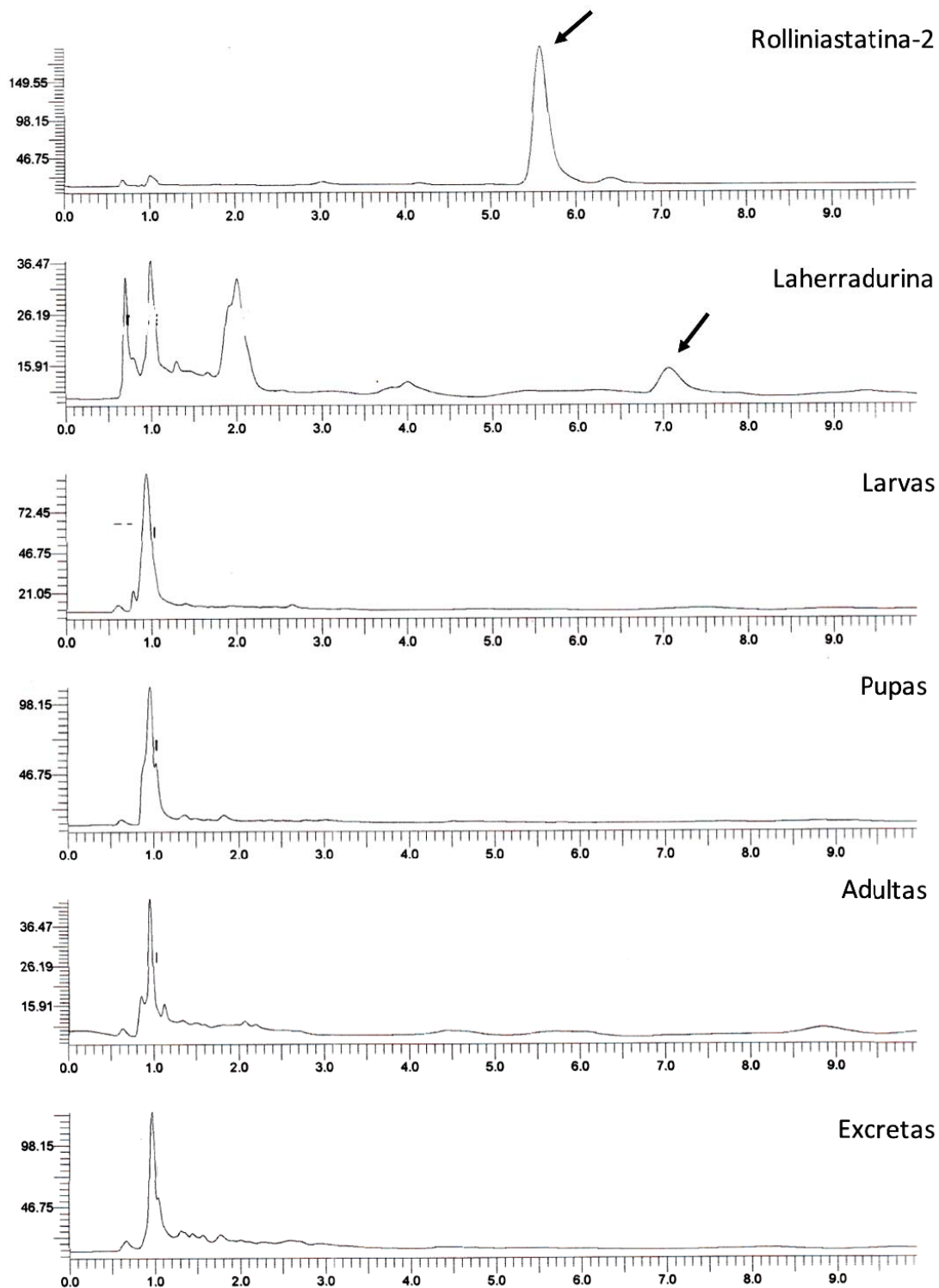


**Figura 33.** Presencia de acetogeninas y avispas en las diferentes etapas de desarrollo de *A. diversifolia*.

Al tener el conocimiento que las avispas ingieren acetogeninas, se realizó el análisis de las larvas, las pupas, las adultas e incluso las excretas de la avispa para evaluar si estas moléculas eran almacenadas en su cuerpo o eliminadas en la excreción. El análisis en el HPLC no detectó a laherradurina y rolliniastatina-2 en ninguno de los extractos de los insectos (Figura 34, 35).



**Figura 34.** Cromatogramas de los extractos hexánicos de los diferentes estadios de desarrollo y excretas de *Bephratelloides cubensis*. Nótese la ausencia de rolliniastatina-2 y laherradurina en todos los extractos de los insectos.



**Figura 35.** Cromatogramas de los extractos metanólicos de los diferentes estadios de desarrollo y excretas de *Bephratelloides cubensis*. Nótese la ausencia de rolliniastatina-2 y laherradurina en todos los extractos de los insectos.

### 6.3.1 Discusión

*Bephratelloides cubensis* cumple casi todo su ciclo de vida en el interior de las semillas de *A. diversifolia* durante las etapas más vulnerables de su desarrollo: larvas, pupas y su transformación en adultas. La metamorfosis holometábola de la avispa se realiza en etapas específicas del desarrollo de las semillas. Esto se observó claramente al encontrar larvas en las etapas V a VII, a las pupas en las etapas VII y VIII y a las adultas en semillas completamente maduras y nunca en etapas inmaduras (Figura 31-33).

El desarrollo de la avispa está sincronizado con el crecimiento y diferenciación de las semillas (Nadel & Peña, 1991). Esta sincronía es muy especial porque la acumulación del material de reserva en las semillas no se detiene aún cuando la larva se alimenta constantemente del endospermo, permitiéndole a la avispa la obtención de los nutrientes necesarios para su desarrollo (González-Sánchez, 2014). Una característica de las larvas es que son el único estadio de las avispas que se alimenta del endospermo (Figura 32), por lo que al igual que la del resto de los himenópteros endoparásitos las larvas defecan antes de pupar para evitar contaminar su alimento (Ornosa & Ortiz-Sánchez, 2004; Sharkey & Fernández, 2006).

Las pruebas de toxicidad de las semillas de *A. diversifolia*, de la herradura y rolliniastatina-2 han demostrado que son tóxicas a bajas concentraciones frente a diversos artrópodos. A pesar de la actividad tóxica de las semillas, las avispas tienen una alta tolerancia al consumo de las semillas tóxicas ( $0.00031$  hasta  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), y aunque las acetogeninas se encuentran en concentraciones mayores que las medias inhibitorias o letales para otros organismos, como *Artemia salina* ( $0.002$ - $5.2 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), *Spodoptera frugiperda* ( $3.1 \times 10^{-4}$  a  $50$ ,  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) (Ahammadsahib, 1993; Tolosa *et al.* 2012), *Manduca sexta* ( $11 \text{ nM}$ ) (Ahammadsahib, 1993) y *Leptinotarsa decemlineata* ( $2.3 \mu\text{g cm}^2$ ) (González-Coloma *et al.* 2002), las larvas toleran el consumo de estas moléculas.

Muchos insectos tienen metabolitos secundarios que sirven como defensa química frente a los depredadores. Algunos compuestos son ingeridos y almacenados durante la alimentación con tejidos vegetales. Este secuestro puede ser metabólicamente menos costoso que la biosíntesis *de novo*, especialmente si se presentan estructuras en donde

puedan almacenarse a altas concentraciones (Pasteels, 1992; Després *et al.* 2007). El único caso documentado sobre el secuestro de acetogeninas es en la mariposa *Eurytides marcellus* (Lepidoptera), cuyas larvas almacenan en sus tejidos a la asimicina, bullatalicina, trilobacina y rolliniastatina-2 a partir del consumo de las hojas de *Asimina triloba* (Annonaceae), acetogeninas que son retenidas hasta el estado adulto (tejidos y alas) (Martin *et al.* 1999). Aunque exista un caso de secuestro de acetogeninas, no ocurre el mismo proceso en *B. cubensis* ya que los análisis de los extractos resultaron negativos.

Los himenópteros parásitos son incapaces de sintetizar sus propios lípidos *de novo*, por lo que son adquiridos de su alimento. Los lípidos son almacenados en el cuerpo graso de los insectos y proveen a los adultos una alta reserva de energía, que se traduce en un tiempo de vida más largo, también se ha detectado que alrededor del 80% de la energía disponible del hospedero es tomado por el parásito (Quike, 2015). En este sentido, las acetogeninas, además de los ácidos grasos, podrían funcionar como un reservorio importante de energía debido a la naturaleza lipídica que poseen, considerando además que las larvas son el único estadio que se alimenta, y que todos los procesos fisiológicos del desarrollo consecuentes requieren energía, entre ellas la vida libre de las adultas, la cópula y la oviposición. Incluso, las acetogeninas podrían ser una fuente rica en átomos de carbono ya que presentan 35 o 37 átomos que podrían ser reciclados e incorporados a la formación de otras moléculas importantes para su desarrollo. Un ejemplo de la incorporación de elementos a partir del consumo de metabolitos secundarios se reporta en el escarabajo *Caryedes brasiliensis*, el cual consume semillas de *Dioclea megacarpa* (Leguminosae) que almacena altos niveles del aminoácido no proteico L-canavanina (capaz de bloquear la síntesis de proteínas) e incorpora el nitrógeno a la síntesis de aminoácidos proteicos (Rosenthal, 1983).

Algunas avispas forman capullos durante su desarrollo, lo cual le confiere protección frente a la desecación, daños físicos, depredadores, hiperparasitoides y la penetración de microorganismos (Quicke, 2015). Sin embargo, *B. cubensis* no forma capullos, debido a que utiliza a las semillas como una barrera que la protege frente al ambiente externo. La avispas de las anonáceas parecen sacarle la máxima ventaja a las semillas ya que es el lugar donde

cumple casi todo su ciclo de vida, obteniendo alimento y además confiriendo protección. Hasta ahora, *B. cubensis* es el único insecto conocido que puede penetrar las semillas de las anonáceas, y en ese sentido parece no tener ningún depredador, al menos no mientras se encuentra en el interior de las semillas, considerando también que las semillas representan una fuente rica en metabolitos secundarios tóxicos para otros insectos, estando protegida física y químicamente.

**6.4 Relacionar la actividad de las acetogeninas frente a la presencia de *Bephratelloides cubensis*. ARTÍCULO DE REQUISITO: Ontogenic synchronization of *Bephratelloides cubensis*, *Annona macrophyllata* seeds and acetogenins from Annonaceae.**





# Ontogenic synchronization of *Bephratelloides cubensis*, *Annona macroprophyllata* seeds and acetogenins from Annonaceae

Claudia Azucena Durán-Ruiz<sup>1</sup> · Rocío Cruz-Ortega<sup>2</sup> · Alejandro Zaldívar-Riverón<sup>3</sup> · Hilda Araceli Zavaleta-Mancera<sup>4</sup> · Iván De-la-Cruz-Chacón<sup>1</sup> · Alma Rosa González-Esquinca<sup>1</sup>

Received: 13 April 2018 / Accepted: 7 December 2018  
© The Botanical Society of Japan and Springer Japan KK, part of Springer Nature 2019

## Abstract

The seeds of *Annona macroprophyllata* Donn. Sm. contain idioblasts with toxic acetogenins, including laherradurin and rolliniastatin-2, in relatively high proportions. Both metabolites are cataloged as potent insecticides for several species, even so, the wasp *Bephratelloides cubensis* Ashmead fulfills almost its entire life cycle inside the seeds of this and other annonaceous species, to such a degree, that they constitute a strong selection pressure. In order to document the chemical relationship between the two species, it is reported for the first time in this paper the presence of idioblasts and acetogenins during the ontogenic development of the seeds of *A. macroprophyllata*, and contrasted with the development of *B. cubensis*. The results indicate that idioblasts with laherradurin and rolliniastatin-2 acetogenins are formed in the middle stages of the endospermic development, also that both acetogenins are biosynthesized simultaneously, and that their proportion is dependent on the degree of development. The acetogenins are present in high amounts that suppose a sufficient toxic barrier and, in this case, laherradurin is the most abundant ( $> 1000 \mu\text{g g dry weight}^{-1}$ ). The wasp *B. cubensis* only emerges from the seeds to copulate and returns for oviposition; its larval phase coincides with the appearance of acetogenins, so it feeds on the acetogenic endosperm. The absence of acetogenins in the tissues and excreta of the insect supposes a metabolization of the molecules, which would explain the tolerance to its toxicity.

**Keywords** Seed borer wasp · Endosperm · Idioblasts · Laherradurin · Rolliniastatin-2

## Introduction

The seeds constitute a form of propagation and survival of the species, thus, their number, time of formation within the fruit, and their defense system, are associated with the ecological conditions that allow its survival. In species of *Annona* L., fruits contain many seeds (34–65) (González-Esquinca et al. 2015), which develop over a period of about 4 months (González-Esquinca et al. 2016). During its formation, the mother plant provides resources for the differentiation of external teguments, endosperm and embryo, as well as the biosynthesis of a series of secondary metabolites of attraction or defense, a capacity that has evolved as a facet of the survival strategy of the plants, or as their interaction against the herbivores that coexist in time and space (Stamp 2003).

Annonaceae seeds are characterized by high amounts of lipids and toxic metabolites, such as acetogenins. The acetogenins from Anonaceae at very low doses are cytotoxic, insecticidal and antifeedant molecules, as well as potent

✉ Alma Rosa González-Esquinca  
aesquinca@unicach.mx

<sup>1</sup> Laboratorio de Fisiología y Química Vegetal, Instituto de Ciencias Biológicas, Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas, Libramiento Norte Poniente 1150, Col. Lajas Maciel, CP 29039 Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, Mexico

<sup>2</sup> Laboratorio de Alelopatía, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Delegación Coyoacán, CP 04360 Mexico City, Mexico

<sup>3</sup> Colección Nacional de Insectos, Departamento de Zoología, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Delegación Coyoacán, CP 04510 Mexico City, Mexico

<sup>4</sup> Laboratorio de Anatomía e Histoquímica Vegetal, Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas, Campus Montecillo, CP 56230 Texcoco, Estado De México, Mexico

inhibitors of the mitochondrial complex I of the respiratory chain (Degli-Esposti et al. 1994; González et al. 1997; Schlie-Guzmán et al. 2009; Tormo et al. 1999, 2001). Its activity is associated with the molecular arrangements of the polyketide structure and the formation of the chelating complex with  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  that interrupts the intracellular and mitochondrial calcium homeostasis (Liaw et al. 2011), and its biosynthesis seems to be associated with the metabolism of long-chain fatty acids (Alali et al. 1999). They are constituted by 35–37 C, and include an alkyl chain with a terminal methyl-substituted-lactone ring,  $\alpha$ ,  $\beta$  unsaturated, saturated or rearranged as ketolactone; they can have tetrahydrofuran rings (THF) or tetrahydropyronic rings (THP), as well as double or triple bonds and oxygenated substituents, mainly hydroxyl and epoxides (Cavé et al. 1997).

The importance or role of acetogenins for the plant remains unknown, although its antifeedant activity and toxicity against arthropods or insect cells suggest that they constitute forms of chemical defense that depend on the concentration, exposure time to them, and the sensitivity of the organism.

Our working team isolated from mature seeds of *Annona macrophyllata* Donn. Sm. the acetogenins laherradurin (De la Cruz 2001; Schlie-Guzmán et al. 2009), rolliniastatin-2 (bullatacin) (Luna-Cazáres and González-Esquinca 2010), and cherimolin-2 (De la Cruz 2001; Schlie-Guzmán et al. 2009), three acetogenins with high insecticidal activity and significant structural differences as chain long, type of lactone ring and THF rings position (Álvarez Colom et al. 2007, 2008, 2010; Cortés et al. 2014; Liaw et al. 2016). This activity has been demonstrated with seed extracts of this species in insects such as the mosquito *Culex pipiens quinquefasciatus* Say (Alamilla et al. 2000), the leafcutter ant *Atta mexicana* Smith (Acuña-Castro et al. 2011), the Mexican bean weevil *Zabrotes subfasciatus* Boheman (Ascencio-Alvarado 2012), the Mexican fruit fly *Anastrepha ludens* Loew (González-Li et al. 2012) and with *Aedes aegypti* L. larvae (Reyes-Trejo et al. 2014), vector mosquito of dengue, zika and chikungunya. Additionally, the activity of laherradurin acetogenins has been evaluated with the brine shrimp *Artemia salina* L. (De la Cruz 2001) and with the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* Smith and Abbot (Ruiz Hidalgo et al. 2018); also, rolliniastatin-2 acetogenins have been tested with *S. frugiperda* (Ahammadsahib et al. 1993; Tolosa et al. 2012), the tobacco hornworm *Manduca sexta* L. (Ahammadsahib et al. 1993), and the Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata* Say (González-Coloma et al. 2002).

Despite the high toxicity of these acetogenins, the wasp *Bephratelloides cubensis* Ashmead, also known as the “Annona seed borer”, spends most of its life cycle within the seeds of *A. macrophyllata* (Hernández-Fuentes et al. 2010; Peña et al. 1984); these are characterized, during

maturity, for its high content of laherradurin and rolliniastatin-2 (De la Cruz 2001), such that the development of *B. cubensis* is synchronized with the growth and differentiation of the seed (Nadel and Peña 1991). The larvae of this wasp feed on the endosperm of the growing seeds, and they even grow and transform into pupae and adults inside it (Castañeda-Vildózola et al. 2010; Hernández-Fuentes et al. 2010; Nadel and Peña 1991; Peña et al. 1984). Until now, there is no scientific literature that explains the chemical relationship established between *A. macrophyllata* and *B. cubensis* during the ontogeny of both; for that reason, in this work, is evidenced the presence of idioblasts and acetogenins during the ontogenetic development of the seeds of *A. macrophyllata* and is contrasted with the development of *B. cubensis*.

## Materials and method

### Collection of *Annona macrophyllata* fruits and classification of the seeds

Fruits of *A. macrophyllata* were collected from May to September for two consecutive years (2013 and 2014), in General Emiliano Zapata Dos, Chiapa de Corzo, Chiapas, Mexico (60°40'03.1" N, 92°57'02.6" W). The collection of the seeds in different stages of development was corroborated directly, not only considering the degree of development of the fruits. To establish a possible correlation between the degree of development of the seeds, and that of the fruits, the length and width of 70 fruits as well as the length of the 1935 seeds found were measured with a digital vernier. Then, 251 fruits of 10 trees were gathered, with different degrees of development (from 19 to 100 mm width and 20 to 133 mm length); 2500 seeds were extracted and classified according to their length in eight stages: stage I (0.01–3 mm), stage II (3.1–6 mm), stage III (6.1–9 mm), stage IV (9.1–12 mm), stage V (12.1–15 mm), stage VI (15.1–18 mm), stage VII (18.1–21 mm) and stage VIII (21.1–24 mm).

During the procedure, in order to avoid contamination of the plant material, seeds were stored in brown paper bags, in a refrigerator at 2 °C.

### Presence of acetogenins and idioblasts during the development of the seeds

#### Acetogenins

Acetogenins extracts were obtained following the method reported by De la Cruz (2001). For each stage of development (8 stages  $\times$  10 trees), 3 g of fresh non infected seeds were separated, except for the first two stages, in which due

to the size of the seeds the weight was lower (6.5 mg–2.4 g). Seeds without external teguments were macerated and extracted in a water bath for 8 h, three times; first with *n*-hexane (*n*-Hex) J.T.Baker® (to obtain less polar acetogenins) and then with methanol (MeOH) J.T.Baker® (for polar acetogenins), using 10 mL of solvent per gram of seeds. The solvents were removed in a Caframo® WB 2000 rotary evaporator (Canada), at 150 rpm and a temperature of 65 °C for hexanic extracts, and 70 °C for methanolic extracts. The identification of acetogenins was performed by HPLC, as described in section c.

### Idioblasts

The evaluation of the presence of idioblasts was carried out on four seeds of each stage of development. They were obtained from freshly collected fruits, which were cut longitudinally (0.5 cm<sup>3</sup>) and fixed in 2.5% glutaraldehyde with Sorensen's phosphate buffer at pH 7.2 for 12 h (Ruzin 1999). They were dehydrated in ethanol solutions (30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 and 100%) for 40 min on each change. Afterward, they were dried to critical point with a Tousimis® Samdri-780A (Maryland, USA) equipment, and placed, with double-sided adhesive carbon tape, in platinum sample holders to be coated with gold/palladium in a metal ionizer Ion Sputter JFC-1100, Jeol, Fine Coat (USA) for 15 min. The sections were photographed in a JEOL® JSM-6390 Scanning Electron Microscope to 10 keV, using the SEM control user interface version 8.23, of the Unidad de Microscopía Electrónica, at Colegio de Postgraduados (COLPOS), Montecillo Campus, Texcoco, Estado de México, México.

### Isolation, identification and quantification of reference acetogenins

The acetogenins laherradurin and rolliniastatin-2 used as the reference in the HPLC were isolated from 1 kg of mature seeds, dry and without external teguments. They were extracted at continuous reflux, first with 2 L of *n*-hexane (8 h/3 times), and then with 2 L of methanol (8 h/3 times); in each cycle, clean solvent was set. From this procedure, 322 g of hexanic extract and 107 g of methanolic extract were obtained, the latter was used for the isolation of acetogenins.

The methanolic extract was induced to precipitation, by cooling at 2 °C for three days, obtaining a white precipitate (3.8 g), which was fractionated in a chromatographic column, using silica gel Merck® as adsorbent, and Baker® organic solvents as eluents, in a gradient of increasing polarity *n*-Hex:AcOEt (7:3, 5:5, 3:7); AcOEt; AcOEt: MeOH (5:5) and MeOH. Two hundred and fifty fractions of 150 mL were obtained. From the combination of fractions 36–75 laherradurin was obtained in the form of a white powder (1258.7 mg), with a melting point of 66–67 °C. The fractions 101–165

collected were separated by TLC, using a *n*-Hex:AcOEt (2:8), from which rolliniastatin-2 was obtained as white needle-shaped crystals (13.6 mg), with a melting point of 63–64 °C. Laherradurin and rolliniastatin-2 were identified in seeds of this species by Dr. Diego Cortés, from the Department of Pharmacology, at the Universidad de Valencia, Spain.

The quantification of the acetogenins in the hexanic and methanolic extracts was performed on a Perkin Elmer® Series 200 HPLC chromatograph (Norwalk, CT, USA); 20 µL of extract was injected at 1 mg mL<sup>-1</sup>. Separation was performed with a Spheri-5 RP-18 column (100×4.6 mm, 5 µm), at 30 °C. The mobile phase consisted of methanol/acetonitrile/water J.T.Baker® (10:80:10, isocratic), at a flow of 1 mL min<sup>-1</sup> for 10 min. The detection was recorded at 220 nm, and compared with retention times of the reference acetogenins (3.3 and 4.2 min for rolliniastatin-2 and laherradurin, respectively).

For the quantification, calibration curves were made for each acetogenin with concentrations of: 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 and 1 mg mL<sup>-1</sup>. The curves were linear with an *r*<sup>2</sup> of 0.93 for laherradurin and an *r*<sup>2</sup> of 0.99 for rolliniastatin-2. The analytical conditions were determined using the Perkin Elmer® Turbochrom program.

### Identification or characterization of the larval stages of *Bephratelloides cubensis*

In order to know the life cycle of *B. cubensis* in seeds of *A. macroprophyllata*, seeds of the 450 collected fruits were separated and grouped in the corresponding stage of development (I–VIII). Each seed was opened in half to search for larvae, pupae, adults and excreta. The data was handled as a combination composed of the individuals obtained throughout the collection.

Larvae, pupae, adults and excreta (1.5 mg of each) were extracted with *n*-Hex and then with MeOH, following the same method of extraction and analysis by HPLC of acetogenins in seeds (section c).

### Statistical analysis

The variation in the concentration of acetogenins in the different stages of the development of the seeds was determined by a simple non-parametric variance test of Kruskal–Wallis, and a separation of Mann–Whitney groups with a probability of 0.05, using the statistical package Past, version 3.13 (Hammer et al. 2001).

## Results

### Characterization of the seeds

It was determined that there is a positive correlation between the length and width of the fruits and the length of the seeds ( $r=0.85-0.88$ ). Due to the variability of the size of the seeds, its degree of development cannot be clearly predicted from the fruit size (Fig. 1). According to the length of the seeds, these were classified in eight stages of development (Fig. 2). The seeds of the first four stages are characterized for having a white, very thin, soft and fragile seminal cover (Fig. 2a–d), which on contact with the air oxidizes rapidly; also, its endosperm is aqueous. In stages V and VI (Fig. 2e, f), the seed coat shows changes in coloration, from white to lightly yellow, and is slightly hard; the endosperm ceases to be liquid and has a soft consistency. In stage VII seeds, the external tegument and the tegmen are of a faint yellow color (Fig. 2g), more intense than the two previous stages, and have a higher hardness, so it is difficult to cut; in this stage, the endosperm is entirely solid. In stage VIII, the external tegument is dark brown (Fig. 2h), characteristic of mature seeds because of the lignification of the teguments (Corner

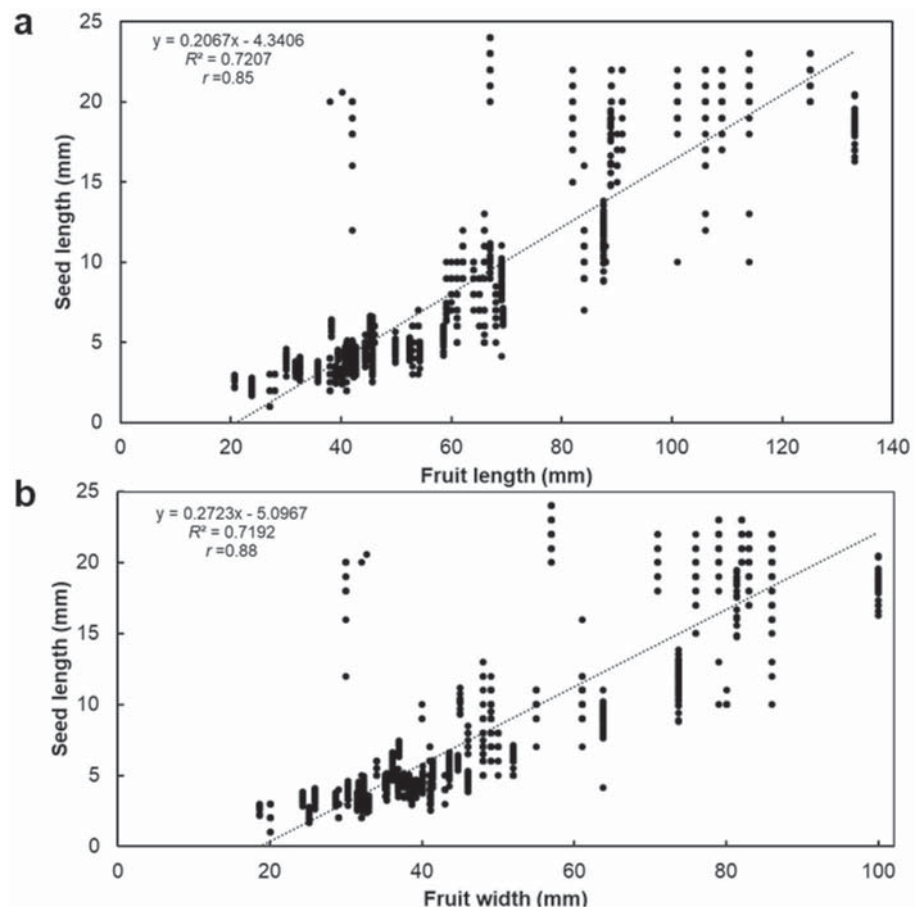
1949), so the seed coat is woody and very resistant to any mechanical damage; the endosperm is solid.

### Presence of acetogenins and idioblasts during the development of the seeds

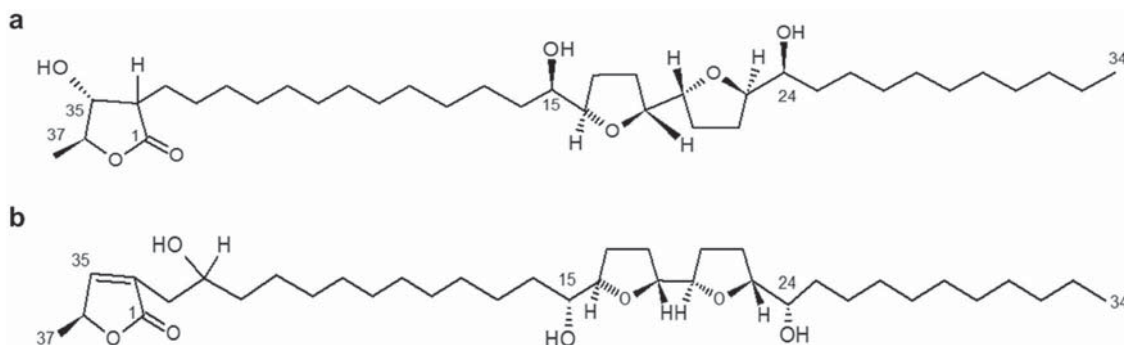
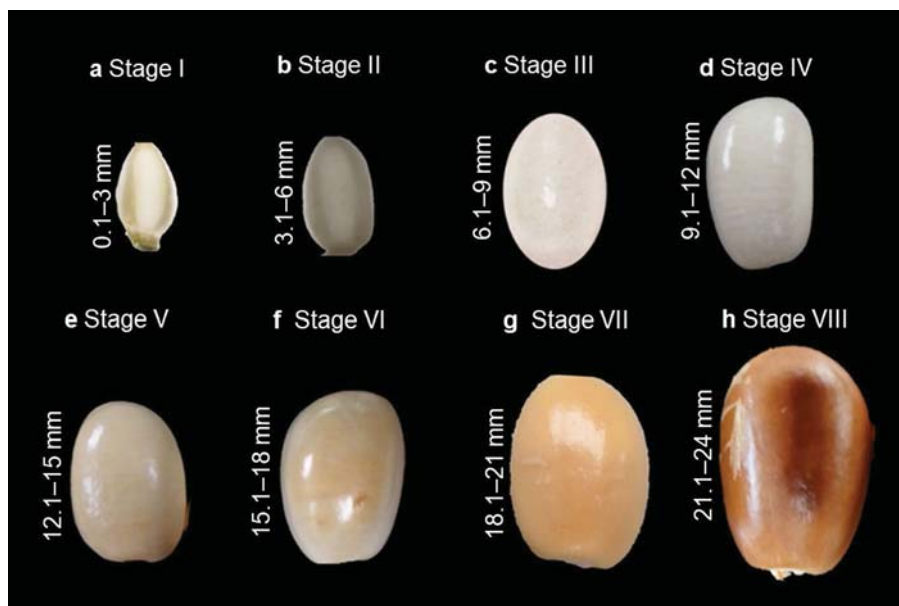
The acetogenins laherradurin and rolliniastatin-2 (Fig. 3) were detected from stage V (12.1–15 mm), which corresponds to half the development of the seeds (Fig. 6). Seeds contain a higher proportion of laherradurin than of rolliniastatin-2 (5 times more in stage V), and up to 15 times in the mature stage (VIII). Both acetogenins increase proportionally during its development, laherradurin more than 300 times (from 125.67 to 45716.33  $\mu\text{g g seed}^{-1}$ ), and rolliniastatin-2 almost 100 times (from 25.47  $\mu\text{g g seed}^{-1}$  to 2661.61  $\mu\text{g g seed}^{-1}$ ), remaining without significant differences until the last stage (VIII). Molecules are present in a higher proportion in methanolic extracts than in hexanic ones (Table 1).

During the first three stages of development of the seeds, it was not possible to differentiate the idioblasts from the rest of the cells (Fig. 4a–c); some were visible from stage IV (Fig. 4d–g), and very evident in seeds that

**Fig. 1** Correlation between the size of fruits and seeds of *Annona macrophyllata*. **a** Fruits length and seeds length, **b** Fruits width and seeds length



**Fig. 2** Stages of the development of *Annona macrophyllata* seeds



**Fig. 3** Structure of the acetogenins. **a** Laherradurin, **b** Rolliniastatin-2. Modified, from Cavé et al. (1997)

**Table 1** Laherradurin and rolliniastatin-2 during the development of *Annona macrophyllata* seeds and the wasp *Bephratelloides cubensis*

Stage	Laherradurin ( $\mu\text{g g seed}^{-1}$ )	Rolliniastatin-2 ( $\mu\text{g g seed}^{-1}$ )	<i>Bephratelloides cubensis</i> ( $\mu\text{g g insect}^{-1}$ )		
I	ND	ND			
II	ND	ND			
III	ND	ND			
IV	ND	ND			
V	125.67 $\pm$ 48.31b	25.47 $\pm$ 8.14b	Larvae		ND
VI	36383.16 $\pm$ 13937a	2553.16 $\pm$ 1412a	Larvae/Pupae		ND
VII	45716.33 $\pm$ 8793a	2281.43 $\pm$ 833a	Larvae/Pupae		ND
VIII	41382.74 $\pm$ 8979a	2661.61 $\pm$ 1617a	Adults		ND

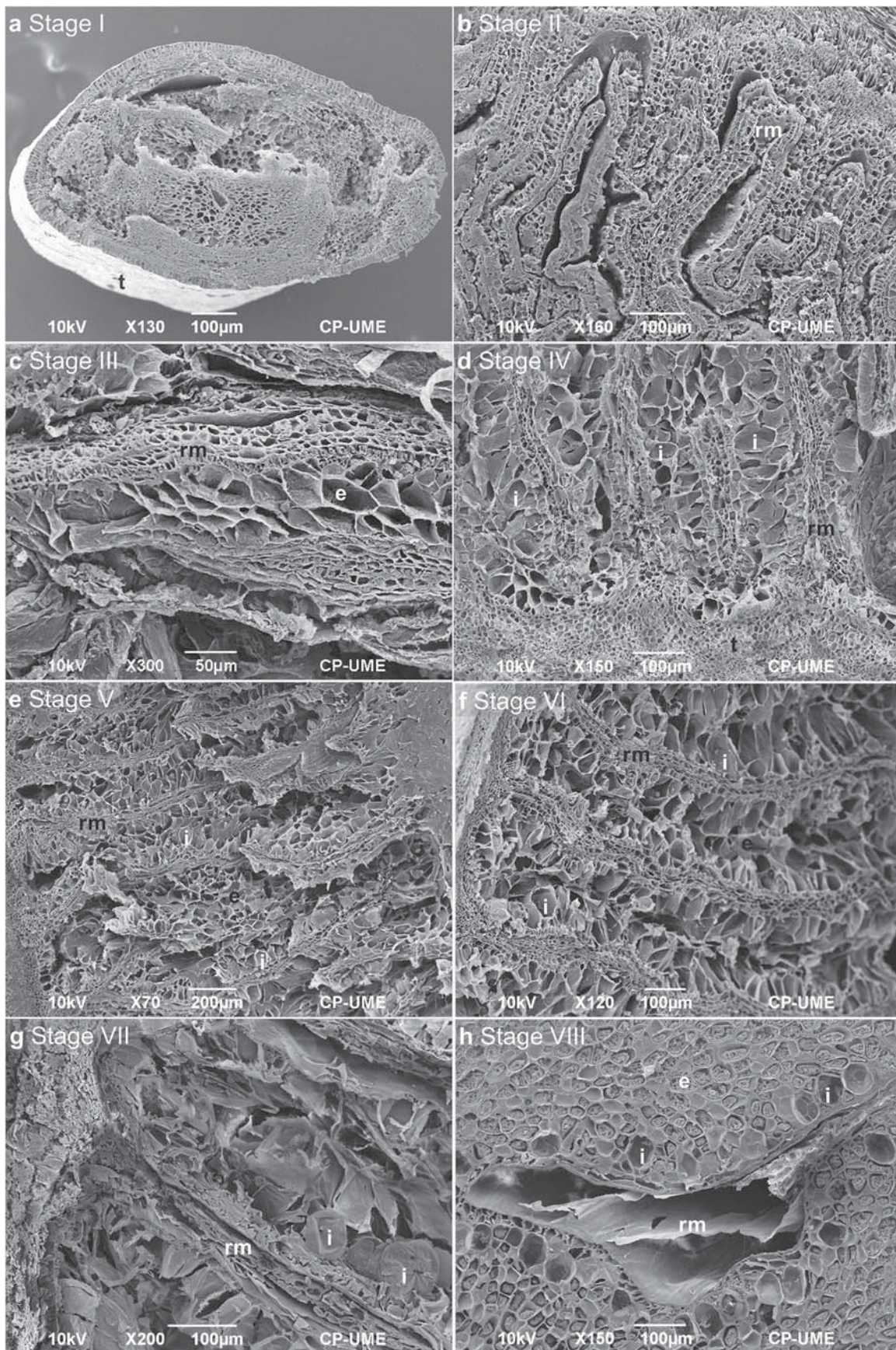
Kruskal–Wallis's Test: laherradurin  $P=7.449 \times 10^{-13}$ ,  $\chi^2=61.84$ , rolliniastatin-2  $P=7.455 \times 10^{-12}$ ,  $\chi^2=55.11$ . It is shown the sum of the acetogenins contained in the two extracts. ND=no detected. The letters indicate significant differences among the stages in each acetogenin

have reached maturity (stage VII and VIII) (Fig. 4h). The idioblasts were only detected in the periphery of the ruminations.

### Larval stages of *Bephratelloides cubensis* and presence of acetogenins during seed development

Larvae of *B. cubensis* were found in seeds of stages V–VII, pupae in stages VII and VIII, while adults only in mature seeds (Fig. 5). There is a coincidence in time and space between the larval phase of the wasp and the presence of acetogenins (Fig. 6). During feeding, the larvae ingest these toxic molecules, but when analyzing the extracts of the excreta and the stages of development of *B. cubensis*, acetogenins were not detected.







◀**Fig. 4** Seed cuts in different degrees of development: testa (*t*), endosperm (*e*), idioblasts (*i*); rumination (*rm*). The increases are indicated in each photograph

## Discussion

*Annona macrophyllata* is a tree of edible fruits, which grows in the Tropical Deciduous Forest and produces dormant seeds that are dispersed during the dry season (González-Esquinca et al. 2016). It has been reported that mature seeds contain Annonaceae acetogenins, such as laherradurin (1000  $\mu\text{g g seed}^{-1}$ ), rolliniastatin-2 (30  $\mu\text{g g seed}^{-1}$ ), and cherimolin-2 (20  $\mu\text{g g seed}^{-1}$ ) (De la Cruz 2001; Schlie-Guzmán et al. 2009). In this study, laherradurin (1258.7  $\mu\text{g g seed}^{-1}$ ) was 90 times more abundant than rolliniastatin-2 (13.6  $\mu\text{g g seed}^{-1}$ ), indicating it as the major acetogenin throughout the development of *A. macrophyllata* seeds.

The ontogeny of the seed involves the development of the embryo, the production of reserve tissues and the formation of the seminal covers. Only in very few cases has the presence of secondary metabolites been documented, as is the case of alkaloids in seeds of *Ipomoea violacea* L. (Genest 1966), and flavonoids in *Brassica napus* L. (Auger et al. 2010). This is the first report for acetogenins during the development of Annonaceae seeds.

The biosynthesis of both acetogenins is expressed simultaneously, and is associated with specific stages of the ontogeny of the seeds of *A. macrophyllata* (Fig. 6), since both compounds are detected in the middle of the development (stage V, 12.1–15 mm), although in unequal proportions (Table 1; Fig. 6). The final result is that the mature seed is endowed, from the middle of its formation, with a package of acetogenins that can be mobilized during germination to the forming organs (Brechú-Franco et al. 2016). Something similar was demonstrated with the *cis*-uvarimicin IV acetogenin in freshly emerged radicles of *A. muricata* L. (Riley-Saldaña et al. 2017), so that the fructifying mother plant forms toxic acetogenins during embryogenesis, which ensures, ultimately, the defense of the seeds against different predators and the survival of the species.

We recently reported that the acetogenins of Annonaceae are stored in idioblasts, specialized cells in the compartmentalization of molecules. These idioblasts were located in the endosperm of mature seeds, as well as in the radicle and hypocotyl of seedlings of *A. macrophyllata* (Brechú-Franco et al. 2016; Laguna et al. 2015). In this work, it is demonstrated that the differentiation of idioblasts occurs long before the seed is fully formed (from stage IV) (Fig. 4), coinciding, in stage V, with the detection of laherradurin and rolliniastatin-2.

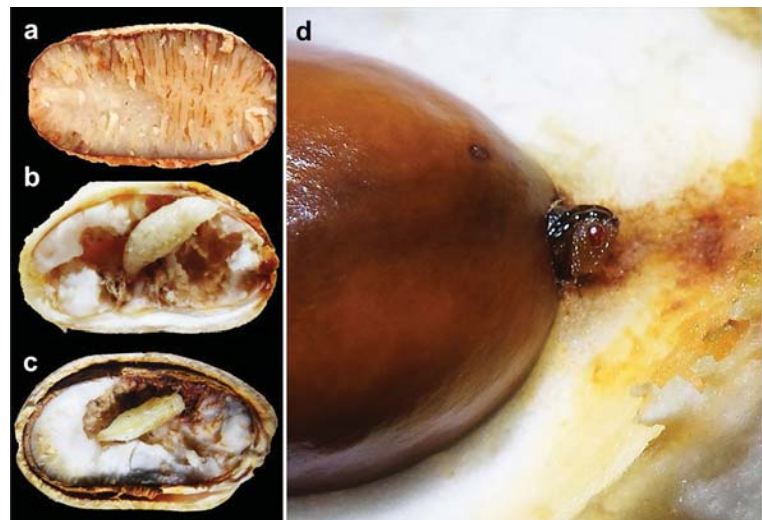
The seed borer *B. cubensis* can fulfill, with the exception of copulation, its entire life cycle within the seeds, in such

a way that its development is synchronized with the growth and differentiation of these (Nadel and Peña 1991). This can be clearly observed when finding larvae in intermediate stages and approaching maturity (stages V–VII), while adults are only seen in mature seeds (stage VIII), and never in earlier stages (Fig. 6).

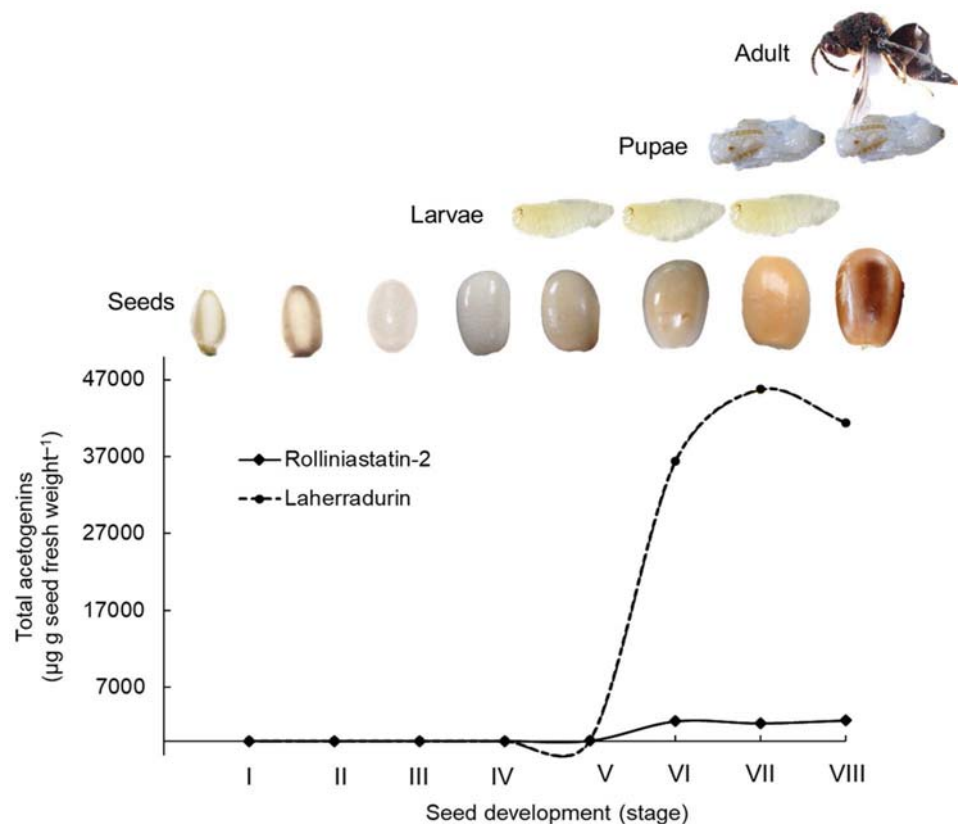
The larvae are the only stage of the wasps that feed on the endosperm (Castañeda-Vildózola et al. 2010; Hernández-Fuentes et al. 2010), and as part of the physiology of this species, as well as the rest of the species of hymenoptera endoparasites, the larvae defecate before pupating, to avoid contaminating their food (Ornosa and Ortiz-Sánchez 2004; Sharkey and Fernández 2006). In this way, the feeding coincides with the biosynthesis, and the increase in the concentration of the acetogenins laherradurin and rolliniastatin-2 (V–VII) (Fig. 6), so the larvae ingest, in addition to the reserve tissues, the acetogenins. However, the wasps have a high tolerance to the consumption of acetogenins. The toxicity values of laherradurin and rolliniastatin-2 are of 0.0005–160.77  $\text{nmol mL}^{-1}$  (Ahammadsahib et al. 1993; De la Cruz 2001; González-Coloma et al. 2002; Li et al. 1990; Ruiz Hidalgo et al. 2018; Tolosa et al. 2012). During the feeding of larvae, acetogenins are found in concentrations higher than the inhibitory or lethal means for other organisms (in a range of 26 to 108 times more); the highest concentration of laherradurin and rolliniastatin-2 during the feeding stage is of 73263.34  $\text{nmol g}^{-1}$  (45716.33  $\mu\text{g g seed}^{-1}$ ) and 4104.75  $\text{nmol g}^{-1}$  (2553.16  $\mu\text{g g seed}^{-1}$ ) (Table 1), respectively, concentrations that although high are not harmful to *B. cubensis*.

The presence and toxicity of the acetogenins during the ontogeny of the seeds of *A. macrophyllata* suggests their participation in the defense mechanisms of both the seeds and the wasps that develop within them, since, for example, the crude extracts of these seeds are toxic for *Zabrotes subfasciatus* (300  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) (Ascencio-Alvarado 2012), *Atta mexicana* ( $1 \times 10^5 \text{ mg mL}^{-1}$ ) (Acuña-Castro et al. 2011), *Anastrepha ludens* ( $1 \times 10^5 \text{ mg mL}^{-1}$ ) (González-Esquinca et al. 2012), *Culex pipiens quinquefasciatus* (0.01, 100 and 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) (Alamilla 2000; Reyes-Trejo et al. 1997) and *Aedes aegypti* ( $3.1 \times 10^3$  to  $63.1 \times 10^4 \text{ mg mL}^{-1}$ ) (Reyes-Trejo et al. 2014). However, insects resistant to chemical defense are known, since some secondary metabolites can be food deterrents to avoid herbivory (Anaya-Lang 2003); others when ingested and stored or sequestered during the feeding of plant tissues constitute a strategy of defense against predators, as in the case of the monarch butterfly *Danaus plexippus* L. (Brower 1969), and the beetles of the genera *Chrysochus* Gebler (Labeyrie and Dobler 2004), *Platyphora* Verral, and *Oreina* Heer (Hartmann et al. 2001); some others can be used for growth and development by being transformed or detoxified during digestion (Konno et al. 2006; Zhang et al. 2012).

**Fig. 5** *Bephratelloides cubensis* in seeds of *Annona macroprophyllata*. **a** Mature seed, without damage by the wasp, **b** Larvae, **c** Pupae, **d** Adult coming out of the seed. **b**, **c** Note the lack of endosperm



**Fig. 6** Relation between the presence of acetogenins during seed development of *A. macroprophyllata* and larval stages of *B. cubensis*



In Annonaceae there is only one documented case on the role of defense of the metabolites, namely, the sequestration of acetogenins by the zebra swallowtail butterfly *Protographium marcellus* Cramer (sin. *Eurytides marcellus* Cramer), whose larvae store asimicin, bullatalicin, trilobacin and bullatacin (rolliniastatin-2), from its feeding with the leaves of *Asimina triloba* (L.) Dunal; these acetogenins are consumed in the larval stage and stored

in the wings and body of the butterflies, constituting a cluster of toxic acetogenins, which confer a possible resistance to predation by birds (Martin et al. 1999). Our data demonstrate that both biosynthesis and compartmentalization in idioblasts of laherradurin and rolliniastatin-2 in the seeds of *A. macroprophyllata*, occur simultaneously with the larval stage of *B. cubensis*, and that the lipid-rich endosperm is consumed completely by the wasps (Figs. 5,



6), even though it contains acetogenins in large quantities, which are very toxic to several species. Thus, unlike *P. marcellus*, these lipid molecules seem to be transformed, or used early in the development of the wasp, since they are not detected in the tissues of the larvae, pupae or the adult insect, nor are they detectable in larval excreta. So it is possible that the hydrocarbon chains of the acetogenins, as well as the fatty acids they contain (Marroquin-Andrade et al. 2011; Pérez Amador et al. 1997), could be used in the fatty body of insects to provide them with reserves, energy and carbon atoms for the biosynthesis of other molecules, such as the *Caryedes brasiliensis* Thunberg beetle, which consumes seeds of *Dioclea megacarpa* Rolfe (Leguminosae), which stores high levels of the non-protein amino acid L-canavanine (capable of blocking the protein synthesis), and incorporates nitrogen into the biosynthesis of protein amino acids (Rosenthal 1983).

The diet of *B. cubensis* consists of seeds of several Annonaceae and thus, of the acetogenins reported here, but also the presence of the wasp has been documented in other Annonaceae (Castañeda-Vildózola et al. 2010; Grisell and Schauff 1990; Nadel and Peña 1991), which also biosynthesize many other acetogenins (Cavé et al. 1997). Therefore, *B. cubensis* has probably adapted during evolution to the toxicity of acetogenins. The acetogenins, fatty acids and other molecules present in the seeds, would sustain several physiological processes of the life cycle, including the transformation to adulthood, copulation, and oviposition. It is unknown what happens with acetogenins during their incorporation into insect metabolism.

## Conclusion

This article documents the presence of the acetogenins laherradurin and rolliniastatin-2 during the ontogeny of the seeds of *A. macrophyllata*. The results also show that wasp *B. cubensis* challenges the toxicity of acetogenins. Further research is necessary for the understanding of this plant–insect interaction as organisms adapt their living environment in various ways, but we hypothesize that the molecules can be incorporated and transformed into the metabolism of the wasps, and in a timely manner protect itself by passing the most vulnerable stages of its cycle life inside these toxic seeds.

**Acknowledgements** The authors are thankful to the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), and to the “Posgrado en Ciencias Biológicas”, at Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), and to Simón Morales Rodríguez for the technical assistance at the Scanning Electron Microscopy at Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas, México. This research is part of a Ph.D. Thesis lead in the “Posgrado en Ciencias Biológicas”, UNAM.

## Compliance with ethical standards

**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

## References

- Acuña-Castro W, De la Cruz-Chacón I, González-Esquinca AR (2011) Actividad insecticida de *Annona diversifolia* frente a *Atta mexicana*. In: González-Esquinca AR, Luna-Cazás LM, Gutiérrez-Jiménez J, Schlie-Guzmán A, Vidal-López DG (eds) Anonáceas plantas antiguas, estudios recientes. UNICACH, México, pp 259–273
- Ahmadshah K, Hollingworth R, McGovern J, Hui YH, McLaughlin JL (1993) Mode of action of bullatacin: a potent antitumor and pesticidal Annonaceous acetogenin. *Life Sci* 53:1113–1120
- Alali F, Liu X, McLaughlin J (1999) Annonaceous acetogenins: recent progress. *J Nat Prod* 62:504–540
- Alamilla Rojas D, Reyes Trejo B, Sixtos Alonso C (2000) Evaluación de la actividad larvicida de cuatro especies del género *Annona* mediante el bioensayo de *Culex quinquefasciatus* Say. In: Memorias del Primer Congreso Nacional de Anonáceas. Universidad Autónoma de Chapingo, pp 75–80
- Álvarez Colom O, Neske A, Popich S, Bardón A (2007) Toxic Effects of Annonaceous Acetogenins from *Annona cherimolia* (Magnoliales: Annonaceae) on *Spodoptera frugiperda*. *J Pest Sci* 80:63–67
- Álvarez Colom O, Barrachina I, Ayala I, González M, Moya P, Neske A, Bardón A (2008) Toxic effects of annonaceous acetogenins on *Oncopeltus fasciatus*. *J Pest Sci* 81:85–89
- Alvarez Colom O, Salvatore A, Willink E, Ordóñez R, Isla MI, Neske A, Bardón A (2010) Insecticidal, mutagenic and genotoxic evaluation of annonaceous acetogenins. *Nat Prod Commun* 5:391–394
- Anaya-Lang A (2003) Ecología Química. Plaza Valdés, México
- Ascencio-Alvarado JI (2012) Evaluación de la actividad insecticida y repelente del extracto obtenido a partir de la semilla de *Annona diversifolia* (anona) sobre el *Zabrotes subfasciatus* (gorgojo común del frijol). Dissertation, Universidad de El Salvador
- Auger B, Marnet N, Gautier V, Maia-Grondard A, Leprince F, Renard M, Guyot S, Nesi N, Routaboul JM (2010) A detailed survey of seed coat flavonoids in developing seeds of *Brassica napus* L. *J Agric Food Chem* 58:6246–6256
- Brechú-Franco AE, Laguna-Hernández G, De-la-Cruz-Chacón I, González-Esquinca AR (2016) 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* 60:2568. <https://doi.org/10.4081/ejh.2016.2568>
- Brower L (1969) Ecological chemistry. *Sci Am* 220:22–29
- Castañeda-Vildózola AC, Nava-Díaz J, Valdez-Carrasco C, Ruiz-Montiel L, Vidal-Hernández, Barrios-Matías S (2010) Distribution and host range of *Bephratelloides cubensis* Ashmead (Hymenoptera: Eurytomidae) in Mexico. *Neotrop Entomol* 39:1053–1055
- Cavé A, Figadère B, Laurens A, Cortes D (1997) Acetogenins from Annonaceae. *Fortschr Chem Org Naturst* 70:81–288
- Corner E (1949) The annonaceous seed and its four integuments. *New Phytol* 48:332–364
- Cortés D, Moreno L, Párraga J, Galán A, Cabedo N (2014) Nuevos fármacos inspirados en Anonáceas. *Rev Bras de Frutic* 36(spe1):22–31. <https://doi.org/10.1590/S0100-29452014000500003>

- De la Cruz Chacón I (2001) Acetogeninas bioactivas de *Annona diversifolia* Safford. Dissertation, Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez
- Degli-Esposti M, Ghelli A, Ratta M, Cortes D, Estornell E (1994) Natural substances (acetogenins) from the family Annonaceae are powerful inhibitors of mitochondrial NADH dehydrogenase (Complex I). *Biochem J* 301:161–167
- Genest K (1966) Changes in ergoline alkaloids in seeds during ontogeny of *Ipomoea violacea*. *J Pharm Sci* 55:1284–1288
- González M, Tormo J, Bermejo A, Zafra-Polo M, Estorell E, Cortés D (1997) Rollimembrina, a novel acetogenin inhibitor of mammalian mitochondrial complex I. *Bioorg Med Chem Lett* 7:11131118
- González-Coloma A, Guadano A, Inés C, Martínez-Díaz R, Cortes D (2002) Selective action of acetogenin mitochondrial complex I inhibitors. *Z Naturforsch* 57C:1028–1034
- González-Esquinca AR, Luna-Cazás LM, Schlie-Guzmán MA, Chacón I, Laguna Hernández G, Flores Breceda S, Montoya Gerardo P (2012) In vitro larvicidal evaluation of *Annona muricata* L., *A. diversifolia* Saff. and *A. lutescens* Saff. extracts against *Anastrepha ludens* Larvae (Diptera, Tephritidae). *Interciencia* 4:284–289
- González-Esquinca AR, De-La-Cruz-Chacón I, Domínguez-Gutiérrez LM (2015) Dormancy and germination of *Annona macrophyllata* (Annonaceae): the importance of the micropylar plug and seed position in the fruits. *Bot Sci* 93:509–515
- González-Esquinca AR, De-La-Cruz-Chacón I, Castro-Moreno M, Riley-Saldaña CA (2016) Phenological strategies of *Annona* species from the tropical deciduous forest of Chiapas, Mexico. *Bot Sci* 94:531–541
- Grissell EE, Schauff ME (1990) A synopsis of the seed-feeding genus *Bephratelloides* (Chalcidoidea: Eurytomidae). *Proc Entomol Soc Wash* 92:177–187
- Hammer O, Harper DAT, Ryan PD (2001) PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analysis. *Paleontol Electrón* 4:1–9
- Hartmann T, Theuring C, Witte L, Pasteels J (2001) Sequestration, metabolism and partial synthesis of tertiary pyrrolizidine alkaloids by the neotropical leaf-beetle *Platyphora boucardi*. *Insect Biochem Mol Biol* 31:1041–1056
- Hernández-Fuentes LM, Urias-López MA, Bautista-Martínez N (2010) Biología y hábitos del barrenador de la semilla *Bephratelloides cubensis* Ashmead (Hymenoptera: Eurytomidae). *Neotrop Entomol* 39:527–534
- Konno K, Ono H, Nakamura M, Tateishi K, Hirayama C, Tamura Y, Hattori M, Koyama A, Kohno K (2006) Mulberry latex rich in antidiabetic sugar-mimic alkaloids forces dieting on caterpillars. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:1337–1341
- Labeyrie E, Dobler S (2004) Molecular adaptation of *Chrysochus* leaf beetles to toxic compounds in their food plants. *Mol Biol Evol* 21:218–221
- Laguna G, Brechú AE, De-la-Cruz-Chacón I, González-Esquinca AR (2015) Histochemical detection of acetogenins and storage molecules in the endosperm of *Annona macrophyllata* Donn Sm. seeds. *Eur J Histochem* 59:2502. <https://doi.org/10.4081/ejh.2015.2502>
- Li XH, Hui YH, Rupprecht JK, Liu YM, Wood KV, Smith DL, Chang CJ, McLaughlin JL (1990) Bullatacin, bullatacinone, and squamone, a new bioactive acetogenin, from the bark of *Annona squamosa*. *J Nat Prod* 53:81–86
- Liaw C-C, Liao W-Y, Chen C-S J, S-C Wu, Y-C S, C-N, Wu S-H (2011) The Calcium-Chelating Capability of Tetrahydrofuranic Moieties Modulates the Cytotoxicity of Annonaceous Acetogenins. *Angew Chem Int* 50:7885–7891
- Liaw C-C, Liou J-R, Wu T-Y, Chang F-R, Wu Y-C (2016) Acetogenins from Annonaceae. *Prog Chem Org Nat Prod* 101:113–230. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-22692-7\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-319-22692-7_2)
- Luna-Cazás LM, González-Esquinca AR (2010) Susceptibility of bacteria and complete spheroplasts of *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella typhi* to rolliniastatin-2. *Nat Prod Res* 24:1139–1145
- Marroquín-Andrade L, Cuevas-Sánchez JA, Guerra Ramírez D, Reyes L, Reyes-Chumacero A, Reyes-Trejo B (2011) Proximate composition, mineral nutrient and fatty acids of the seed of ilama, *Annona diversifolia* Saff. *Sci Res Essays* 6:3089–3093
- Martin J, Madigosky S, Gu Z-M, Zhou D, Wu J, McLaughlin J (1999) Chemical defense in the zebra swallowtail butterfly, *Eurytides marcellus*, involving annonaceous acetogenins. *J Nat Prod* 62:2–4
- Nadel H, Peña J (1991) Hosts of *Bephratelloides cubensis* (Hymenoptera: Eurytomidae) in Florida. *Florida Entomol* 74:476–479
- Ornosa C, Ortíz-Sánchez FJ (2004) Hymenoptera, Apoidea I. In: Ramos MA et al (eds) Fauna Ibérica. Museo Nacional de Ciencias Naturales, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, p 556
- Peña JE, Glenn H, Baranowski RM (1984) Important insect pests of *Annona* spp. in Florida. *Proc Fla State Hort Soc* 97:337–340
- Pérez-Amador MC, González Esquinca A, García Argáez A, Bratoeff E, Labastida C (1997) Oil composition and flavonoid profiles of the seeds of three *Annona* species. *Phyton* 61:77–80
- Reyes-Trejo B, Marroquín L, Peralta M, Navarrete A, Joseph-Nathan P (1997) Laherradurina: Acetogenina activa de *Annona diversifolia* Safford. In: Memorias del I Congreso Internacional de Anonáceas. Universidad Autónoma Chapingo. Estado de México, Chapingo, p 24
- Reyes-Trejo B, Vázquez V, Guerra D, Zuleta H, Reyes L, Sánchez H (2014) Estudio fitoquímico biodirigido de la actividad insecticida de semillas de *Annona diversifolia* Saff. en larvas de *Aedes aegypti* L. In: Memorias del VII Congreso Nacional de Anonáceas 2014. Universidad Veracruzana, Xalapa, pp 56–57
- Riley-Saldaña CA, Cruz-Ortega MDR, Martínez Vázquez M, De-la-Cruz-Chacón I, Castro-Moreno M, González-Esquinca AR (2017) Acetogenins and alkaloids during the initial development of *Annona muricata* L. (Annonaceae). *Z Naturforsch C*. <https://doi.org/10.1515/znc-2017-0060>
- Rosenthal G (1983) Biochemical adaptations of the bruchid beetle, *Caryedes brasiliensis* to L-canavanine, a higher plant allelochemical. *J Chem Ecol* 9:803–815
- Ruiz Hidalgo J, Parellada EA, Bardón A, Vera N, Neske A (2018) Insecticidal activity of Annonaceous acetogenins and their derivatives on *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae). *J Agric Chem Environ* 7:105–116
- Ruzin SE (1999) Plant microtechnique and microscopy. Oxford University Press, Oxford
- Schlie-Guzmán MA, García-Carrancá A, González-Esquinca AR (2009) In Vitro and In Vivo antiproliferative activity of laheradurina and cherimolin-2 of *Annona diversifolia* Saff. *Phytother Res* 23:1128–1133
- Sharkey MJ, Fernández F (2006) Biología y diversidad de Hymenoptera. In: Fernández F, Sharkey MJ (eds) Introducción a los Hymenoptera de la Región Neotropical, 1st edn. Sociedad Colombiana de Entomología y Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, pp 93–108
- Stamp N (2003) Out of the quagmire of plant defense hypotheses. *Q Rev Biol* 78:23–55
- Tolosa D, Álvarez O, Bardón A, Neske A (2012) Insecticidal Effects of Acetogenins from *Rollinia occidentalis* Seed Extract. *Nat Prod Commun* 7:1645–1646

Tormo JR, González MC, Cortés D, Stornell E (1999) Kinetic Characterization of mitochondrial complex I inhibitors using annonaceous acetogenins. *Arch Biochem Biophys* 369:119–126

Tormo JR, Estornell E, Gallardo T, González MC, Cavé A, Granell S, Cortes D, Zafra-Polo MC (2001) Gamma-lactone-Functionalized antitumoral acetogenins are the most potent inhibitors of mitochondrial complex I. *Bioorg Med Chem Lett* 11:681–684

Zhang Y, Ma H, Feng D, Lai X, Chen Z, Xu M, Zhang Z (2012) Induction of detoxification enzymes by quercetin in the silkworm. *J Econ Entomol* 105:1034–1042

## VII. CONSIDERACIONES

La avispa *Bephratelloides cubensis* es la plaga principal del género *Annona* y que causa miles de pérdidas económicas, ya que afecta hasta el 100% de la cosecha de los frutos (Hernández-Fuentes *et al.* 2010), la relación que existe entre ambas especies es extraordinaria. La avispa *B. cubensis* tiene una afinidad específica hacia las especies del género *Annona*. Las larvas consumen el endospermo de las semillas, durante su alimentación no sólo ingieren el material de reserva sino también a las acetogeninas laherradurina y rolliniastatina-2.

La presencia de *B. cubensis* se ha documentado además de *A. diversifolia* en otras anonáceas (Castañeda-Vildózola *et al.* 2010; Grissell & Schauff, 1990; Nadel & Peña, 1991) que también biosintetizan muchas otras acetogeninas, como la cherimolina-1, cherimolina-2 y esquamocina (Cavé *et al.* 1997; Bermejo *et al.* 2005). Por lo tanto, *B. cubensis* probablemente se ha adaptado durante la evolución a la toxicidad de las acetogeninas. Aunque las larvas ingieren acetogeninas, éstas no son almacenadas o secuestradas en su cuerpo, por lo que podrían ser incorporadas a su metabolismo como reservas energéticas y de átomos de carbono para la biosíntesis de otras moléculas, explicando así la tolerancia a lo toxicidad. De esta manera, las acetogeninas, los ácidos grasos y otras moléculas presentes en las semillas, sustentarían varios procesos fisiológicos del ciclo de vida incluyendo la transformación al estado adulto, la cópula y la oviposición.

## VIII. CONCLUSIONES

- La biosíntesis de las acetogeninas laherradurina y rolliniastatina-2 ocurre de manera simultánea durante la mitad del desarrollo de las semillas, aunque la concentración en la que se encuentran no es la misma. Laherradurina es 16 veces más abundante que la rolliniastatina 2.
- La histodiferenciación de los idioblastos en las semillas, células que almacenan a las acetogeninas, se observa a partir de la etapa IV (9-12 mm), coincidiendo una etapa después con la detección de las acetogeninas.
- Considerando el número de dientes, las larvas pasan a través de cinco estadios larvarios. Todos los estados ontogénicos presentan el diente apical, el diente subapical se desarrolla a partir del segundo estadio, mientras que la formación de dientes pequeños (1-3) determina a los últimos tres estadios. La forma de las mandíbulas está definida desde el primer estadio.
- La alimentación de las larvas coincide con la detección de laherradurina y rolliniastatina-2, por lo que estos insectos las ingieren junto con los materiales de reserva del endospermo.
- Aunque las larvas ingieren acetogeninas, éstas no son almacenadas o secuestradas en su cuerpo, por lo que podrían ser incorporadas a su metabolismo como reservas energéticas y de átomos de carbono para la biosíntesis de otras moléculas, explicando así la tolerancia a lo toxicidad.
- Las avispas no solo obtienen alimento de las semillas sino también constituyen un sitio de protección física y química donde puede cumplir casi todo su ciclo de vida, resguardándose durante sus etapas más vulnerables de factores bióticos y abióticos, tales como la depredación, hiperparasitoidismo y desecación.

- La presencia de acetogeninas durante el desarrollo de las semillas aseguraría la protección de las semillas frente a algunos depredadores, aunque claramente no frente a las avispas *B. cubensis*.
- La relación que existe entre *A. diversifolia* y *B. cubensis* es muy atractiva, por lo que investigaciones posteriores ayudarían a entender mejor la interacción entre ambas especies, especialmente en el interés tan peculiar que tiene la avispa hacia las anonáceas.

## IX. ARTÍCULO DE REVISIÓN: Polinización, fecundación y desarrollo de semillas de Annonaceae

### 9.1. La Familia Annonaceae

La Familia Annonaceae pertenece al Orden Magnoliales, y se encuentran entre las plantas más primitivas de las angiospermas (Cronquist, 1968). Los fósiles más antiguos de Anonáceas datan del Cretácico Superior, hace alrededor de 89 millones de años (Pirie & Doyle, 2012). Esta familia está formada por árboles, arbustos y lianas, distribuidos en su mayoría en selvas tropicales en las regiones Neotropical, África y Asia-Australasia (Couvreur *et al.* 2012).

La familia Annonaceae está representada por cuatro subfamilias, 14 tribus y 108 géneros que contienen alrededor de 2400 especies (Chatrou *et al.* 2012; Chatrou, 2013; Couvreur *et al.* 2012), distribuidas generalmente en regiones tropicales y subtropicales (Lebouf *et al.* 1982). En México se distribuyen 60 especies ubicadas en 12 géneros, la mayoría en el centro y sureste del país (cuadro 8). El estado de Chiapas alberga 37 especies y 9 géneros, lo que significa que sostiene el 62% de las especies y el 75% de los géneros de México (De-la-Cruz-Chacón *et al.* 2016).

La importancia económica de las anonáceas está dada principalmente porque los frutos de algunas especies son comestibles, principalmente las del género *Annona*, teniendo un importante lugar en la agricultura, como es el caso de *Annona muricata* (guanábana), *A. reticulata* (saramuyo) y *A. cherimola* (chirimoya). Otras Anonáceas son utilizadas en la industria de las esencias en perfumes como *Cananga odorata* (ylang-ylang), elaboración de aceites comestibles, alcoholes y jabones (Leboeuf *et al.* 1982, Martínez, 1999; Martínez-Vázquez & Estrada-Reyes, 2013).

En los últimos años se ha destacado su potencial biotecnológico dado que poseen compuestos con actividad antitumoral, antihelmíntica, antimalaria, antiprotozoaria, insecticida, antimicrobiana, antifúngica e inmunodepresiva, asociadas a metabolitos secundarios de interés entre los que destacan los alcaloides benzilisoquinolínicos y las acetogeninas de anonáceas (González-Esquínca *et al.* 2011). Debido a su actividad biológica, algunos compuestos pueden dar lugar a nuevos agentes terapéuticos o biológicos, en el

campo de la terapéutica anticancerosa, aplicables en enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson o incluso como plaguicidas gracias a las propiedades insecticidas de algunos de sus componentes. Además, poseen la originalidad química y la actividad biológica adecuada para considerarse especialmente como una fuente de inspiración para la obtención de nuevos medicamentos de síntesis (Cortés *et al.* 2014).

**Cuadro 8.** Géneros y especies de la familia Annonaceae en México (De-la-Cruz-Chacón *et al.* 2017).

Género	Especie	Origen	Distribución
<i>Anaxagorea</i> A. St Hill.	<i>Anaxagorea guatemalensis</i> Schltdl.	Nativa	OAX., VER.
<i>Annona</i> L.	<i>Annona cherimola</i> Mill	Nativa	CHIS., GRO., GTO., HGO., JAL., MEX., MICH., MOR., OAX., PUE., QRO, TAB, VER
	<i>Annona contrerasii</i> J. Jiménez Ram. & J.C. Soto	Endémica	GRO., MICH.
<i>Annona</i> L.	<i>Annona glabra</i> L.	Nativa	CAM., CHIS., COL., GRO., GTO., HGO., JAL., NAY., MICH., OAX., PUE., QROO., TAB., TAMS., VER., YUC.
	<i>Annona globiflora</i> Schltdl.	Endémica	CHIS., GTO., HGO., MEX., MICH., QRO., QROO., SLP., TAMS., VER
	<i>Annona holosericea</i> Saff.	Nativa	CHIS.
	<i>Annona liebmanniana</i> Baill.	Nativa	CHIS., OAX., VER.
	<i>Annona longiflora</i> S. Watson	Endémica	COL., GRO., JAL., MEX., MICH., MOR., NAY., OAX., PUE., VER.
	<i>Annona longipes</i> Saff.	Endémica	VER.
	<i>Annona macrophyllata</i> Donn. Sm	Nativa	CHIS., GRO., GTO., HGO., MEX., MICH., MOR., QRO., QROO., SLP., TAMS., VER., YUC.
	<i>Annona mucosa</i> (Jacq.) Baill.	Nativa	CHIS., OAX., PUE., TAB., VER.
	<i>Annona muricata</i> L.	Nativa	CHIS., COL., GRO., MICH., QROO., TAB., VER., YUC.
	<i>Annona palmeri</i> Saff.	Nativa	COL., GRO., JAL., MICH., OAX., VER.
	<i>Annona purpurea</i> Moc. & Sessé ex Dunal	Nativa	CHIS., COL., JAL., MICH., OAX., PUE., QROO., TAB., VER., YUC.
	<i>Annona rensoniana</i> Standl.	Nativa	CHIS., OAX., PUE., TAB., VER.
	<i>Annona reticulata</i> L.	Nativa	CAM., CHIS., COL., DGO., GRO., HGO., JAL., MEX., MICH., MOR., NAY., OAX., PUE., QRO., QROO., SLP., SIN., TAB., TAMS., VER., YUC.
	<i>Annona scleroderma</i> Saff.	Nativa	CHIS.
	<i>Annona spraguei</i> Saff.	Nativa	CHIS.
<i>Annona squamosa</i> L.	Nativa	CAM., CHIS., COL., GRO., JAL., MEX., MICH., MOR., OAX., PUE.,	



Género	Especie	Origen	Distribución
			QRO., QROO., SLP., SIN., SON., TAB., VER., YUC.
<i>Cymbopetalum</i> Bent.	<i>Cymbopetalum baillonii</i> R.F.Fr.	Endémica	CHIS., JAL., MEX., OAX., PUE., TAB., VER.
	<i>Cymbopetalum gracile</i> R.E. Fr.	Endémica	GRO., OAX., VER.
	<i>Cymbopetalum hintonii</i> Lundell	Endémica	JAL., MICH., NAY.
	<i>Cymbopetalum mayanum</i> Lundell	Nativa	CAM., CHIS., QROO.
	<i>Cymbopetalum mirabile</i> R.E. Fr.	Nativa	CHIS., VER.
	<i>Cymbopetalum parviflorum</i> N.A. Murray	Nativa	OAX.
	<i>Cymbopetalum penduliflorum</i> (Dunal) Baill.	Nativa	CAM., CHIS., GRO., JAL., MICH., NAY., OAX., PUE., TAB., VER.
	<i>Cymbopetalum stenophyllum</i> Donn. Sm	Nativa	CHIS., GRO., OAX.
<i>Desmopsis</i> Saff.	<i>Desmopsis guerrerensis</i> J. Jiménez Ram. & Gonz.-Martínez	Endémica	GRO.
	<i>Desmopsis lanceolata</i> Lundell	Endémica	CHIS., OAX.
	<i>Desmopsis mexicana</i> R.F.Fr.	Endémica	MICH.
	<i>Desmopsis schippii</i> Standl.	Nativa	CHIS.
<i>Desmopsis</i> Saff.	<i>Desmopsis trunciflora</i> (Schltdl. Cham) G.E. Sachtz ex Maas, E.A.mennega&Westra	Endémica	CHIS., COL., JAL., NAY., OAX., TAB., VER.
	<i>Desmopsis uxpanapensis</i> G.E.Sachtz & N.Zamora	Endémica	OAX., VER.
<i>Gutteria</i> Ruiz-& Pav.	<i>Gutteria amplifolia</i> Triana & Planch	Nativa	CHIS., GRO., OAX., PUE., TAB., VER.
	<i>Gutteria anomala</i> .F.Fr.	Nativa	CHIS., GRO., OAX., TAB., VER.
	<i>Gutteria diospyroides</i> Baill.	Nativa	CHIS., OAX., VER.
	<i>Gutteria dolichopoda</i> Donn. Sm	Nativa	CHIS., VER.
	<i>Gutteria galeottiana</i> Baill.	Endémica	CAM., OAX., VER.
	<i>Gutteria grandiflora</i> Donn. Sm	Nativa	CHIS., TAB., MEX., VER.
	<i>Gutteria jurgensenii</i> Hemsl.	Nativa	OAX., TAB., VER.
	<i>Gutteria oliviformis</i> Donn. Sm	Nativa	CHIS., TAB., MEX., VER.
<i>Mosannonna</i> Chatrou	<i>Mosannonna depressa</i> (Baill.) Chatrou	Nativa	CAMP., CHIS., GRO., JAL., MICH., OAX., PUE., QROO., TAB., VER., YUC.
<i>Oxandra</i> A. Rich.	<i>Oxandra lanceolata</i> (Sw.) Baill	Nativa	CHIS., COL., GRO., JAL., MICH., QROO., YUC.
	<i>Oxandra maya</i> Miranda	Nativa	CHIS., TAB.
<i>Sapranthus</i> Seem	<i>Sapranthus campechianus</i> (Kunth) Standl.	Nativa	CAMP., CHIS., GRO., QROO., TAB., VER., YUC.
	<i>Sapranthus chiapensis</i> G.E. Schatz	Endémica	CHIS., OAX.

Género	Especie	Origen	Distribución
	<i>Sapranthus microcarpus</i> (Donn. SM.) R.Re.Fr.	Nativa	
	<i>Sapranthus violaceus</i> (Dunal) Saff.	Nativa	
	<i>Stenanona cauliflora</i> (J.W. Walker) G.E. Schatz	Endémica	
	<i>Stenanona flagelliflora</i> T. Wendt & G.E. Schatz	Endémica	
	<i>Stenanona humilis</i> (Miranda) G.E. Schatz ex Maas, E.A.Mennega & Westra	Endémica	OAX., VER.
<i>Stenanona</i> Standl.	<i>Stenanona migueliana</i> Ortiz- Rodr. & G.E. Schatz	Endémica	CHIS.
	<i>Stenanona monticola</i> Maas & G.E. Schatz	Endémica	CHIS., TAB., MEX., VER.
	<i>Stenanona stenopetala</i> (Donn. Sm.) G.E. Schatz	Nativa	CHIS., TAB.
	<i>Stenanona wendtii</i> G.E. Schatz & Maas	Endémica	OAX., VER.
	<i>Tridimeris hahniana</i> Baill.	Endémica	OAX., QRO., SLP., VER.
<i>Tridimeris</i> Baill.	<i>Tridimeris tuxtliensis</i> G.E.Sachtz	Endémica	TAB., MEX., VER.
<i>Unonopsis</i> R.E.Fr	<i>Unonopsis mexicana</i> Maas & Westra	Endémica	OAX.
	<i>Xylopia frutescens</i> Aubl.	Nativa	CAMP., CHIS., COL., OAX., QROO., TAB., VER.
<i>Xylopia</i> L.	<i>Xylopia sericophylla</i> Standl. & L.O. Williams	Nativa	CHIS., TAB., MEX., VER.

Abreviaciones. **CAMP.**, Campeche; **CHIS.**, Chiapas; **COL.**, Colima; **DGO.**, Durango; **GRO.**, Guerrero; **GTO.**, Guanajuato; **JAL.**, Jalisco; **HGO.**, Hidalgo; **MEX.**, Ciudad de México; **MOR.**, Morelos; **OAX.**, Oaxaca; **MICH.**, Michoacán; **PUE.**, Puebla; **QRO.**, Querétaro; **QROO.**, Quintana Roo; **SLP.**, San Luis Potosí; **SIN.**, Sinaloa; **TAB.**, Tabasco; **TAMS.**, Tamaulipas; **VER.**, Veracruz; **NAY.**, Nayarit; **YUC.**, Yucatán.

## 9.2. Flores

Las flores de las especies de la familia Annonaceae se originan opuestas a las hojas, pueden ser terminales, axilares y rara vez crecen en brotes subterráneos (Kessler, 1993; Endress, 1996). Las flores son solitarias o en inflorescencias determinadas, a veces reducidas a una sola flor, axilares o terminales, pueden estar escondidas por las hojas o expuestas, algunas veces sostenidas de un largo pedicelo (Figura 36) (Van Heusden, 1992).

La mayoría de los géneros de Annonaceae tienen flores hermafroditas, en las cuales ocurre una separación temporal en la madurez de los carpelos y los estambres. Las flores unisexuales son poco frecuentes pero pueden encontrarse en algunas especies de *Annona* y *Anodium* (Saunders, 2010).

El **cáliz** está conformado generalmente por tres sépalos, aunque algunas especies pueden tener dos o cuatro. La estivación valvada es la más frecuente y la imbrincada es la menos ocurrente. Los sépalos varían de 0.5 mm a 45 mm de largo, la mayoría de los géneros presentan sépalos pequeños. Usualmente son más o menos carnosos, algunas veces delgados (Figura 36). En algunos géneros con sépalos delgados, los pétalos son gruesos y viceversa. Los géneros *Asimina*, *Monodora* y *Sapranthus* son algunos de los géneros que tienen los sépalos y pétalos delgados. En general, los sépalos persisten durante la antesis y hasta un tiempo después (Van Heusden, 1992).

Los **pétalos** constituyen a la corola. Las flores presentan de 2 a 12 pétalos, pero la mayoría están constituidas por 6, suelen ser libres pero también pueden estar fusionados. Los colores que predominan en los pétalos son el blanco, amarillo y verde, pero también se pueden observar flores de color rojo, rosa, café, púrpura, naranja, gris y negro. Usualmente hay una variación de colores entre las flores juveniles y maduras. En algunos casos, los pétalos también están teñidos en su parte interna, generalmente de color rojizo, como en las flores de *Annona* y *Cymbopetalum*. El largo de los pétalos es variable, los más grandes son los de *Dasymaschalon* y *Goniothalamus* con un tamaño de hasta 145 y 165 mm, respectivamente; los más pequeños miden entre 1 y 5 mm (Van Heusden, 1992).

El **androceo** está compuesto por muchos estambres, de 3 hasta más de 12, y estaminodios en un arreglo irregular, característicos de cada género. Los estambres están constituidos por un filamento corto y una antera con dos tecas lineares con dehiscencia longitudinal. Miden desde 0.4 hasta 7 mm de largo, aunque en la mayoría de los géneros miden menos de 2 mm (Figura 37A y B). Suelen ser carnosos en etapas muy jóvenes, algunas flores pueden tener estambres de color blanco, crema, amarillos, anaranjados, rojos, cafés y púrpura (Van Heusden, 1992).

Los estaminodios son estambres estériles que se han reportado en pocos géneros (Figura 37B) (Van Heusden, 1992). Existen dos tipos basados en la posición dentro de las flores: internos y externos. Los estaminodios internos son transicionales con los carpelos, mientras que los externos son transicionales con los pétalos, éstos últimos son los más

comunes en la familia. Es raro encontrar ambos tipos de estaminodios en una misma flor (Saunders, 2010).

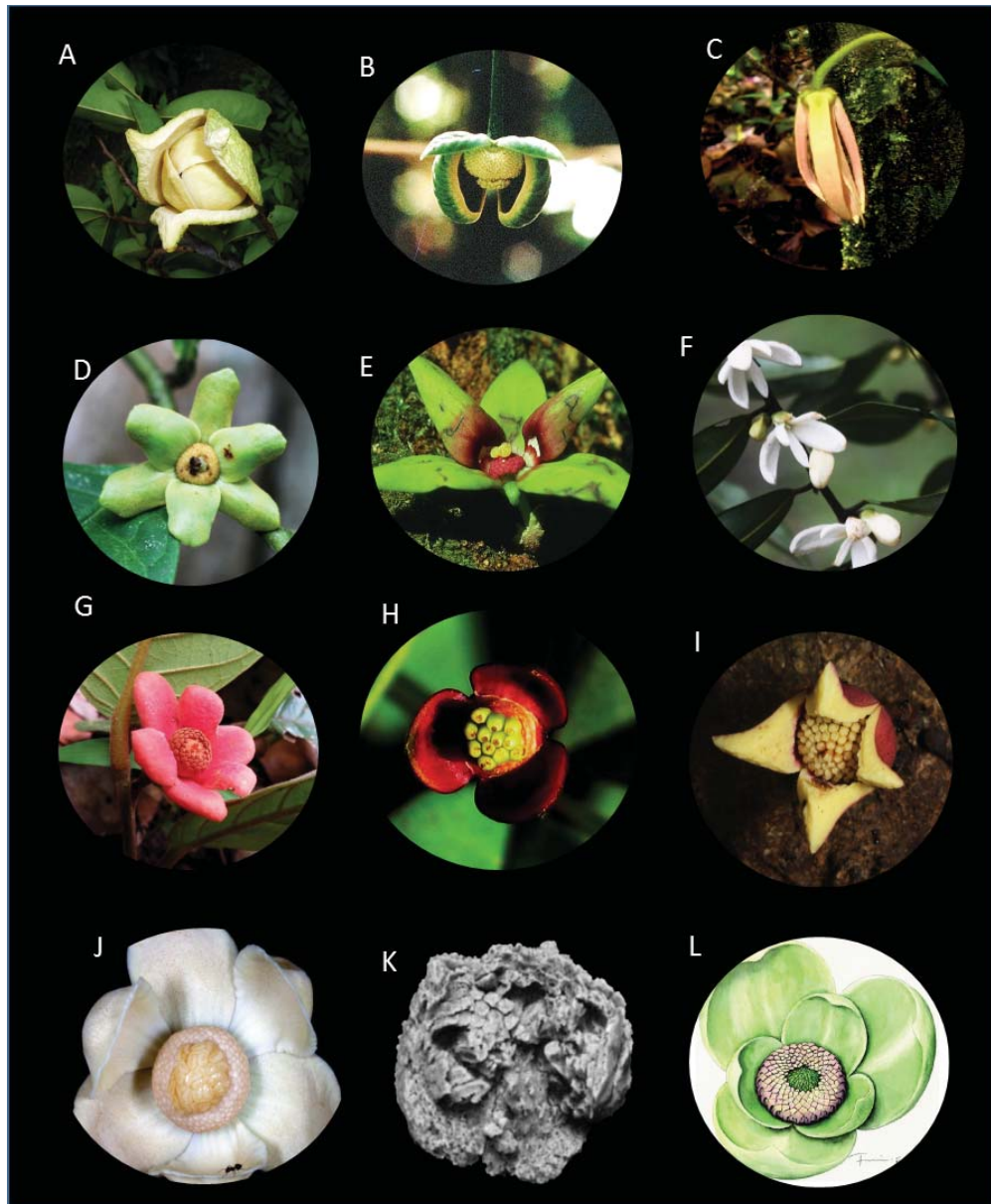
Los granos de polen tienen una variedad de formas, tamaños y configuraciones de apertura (Figura 37C) (Kessler, 1993; Endress, 1996; Xu & Runsen, 2013), pueden ser simples (mónada) o compuestos (tétradas, políade). Si presentan una apertura, ésta puede ser sulcada o sulculada. El tamaño del polen es variado, algunos miden menos de 45  $\mu\text{m}$  mientras que otros más de 90  $\mu\text{m}$ . La forma es elongada como bote o globosa (González-Esquinca, 2001).

El **gineceo** está constituido por muchos ovarios, estilos y estigmas, y puede estar formado por 6 o más de 20 carpelos. Los carpelos presentan una variedad de formas. La forma del ovario depende del número de carpelos en la flor y del número de óvulos por carpelo, pero suelen ser cilíndricos u ovoides (Figura 37I). Los carpelos miden  $\sim 0.5$  a 10 mm de largo, pero en algunas especies llegan a alcanzar hasta 20 mm. La forma del estigma varía entre géneros, pueden ser elipsoides, ovoides, cilíndricos y bilobados. El estilo puede o no estar presente, pero en general son cortos (Van Heusden, 1992).

La mayoría de los géneros presentan 10 óvulos por carpelo, pero también se han registrado uno o dos óvulos (*Disepalum*, *Goniothalamus*, *Polyalthia*, *Popowia*, y *Xylopia*) y hasta 30 (*Fissitigma* y *Uvaria*) (Van Heusden, 1992). Cada óvulo fecundado da origen a una semilla (Lora *et al.* 2010). La placentación marginal del óvulo es la más común, pero puede ser basal y raramente apical. Dependiendo del número de óvulos presentes, éstos pueden estar distribuidos en una o dos filas (Figura 37I) (Van Heusden, 1992).

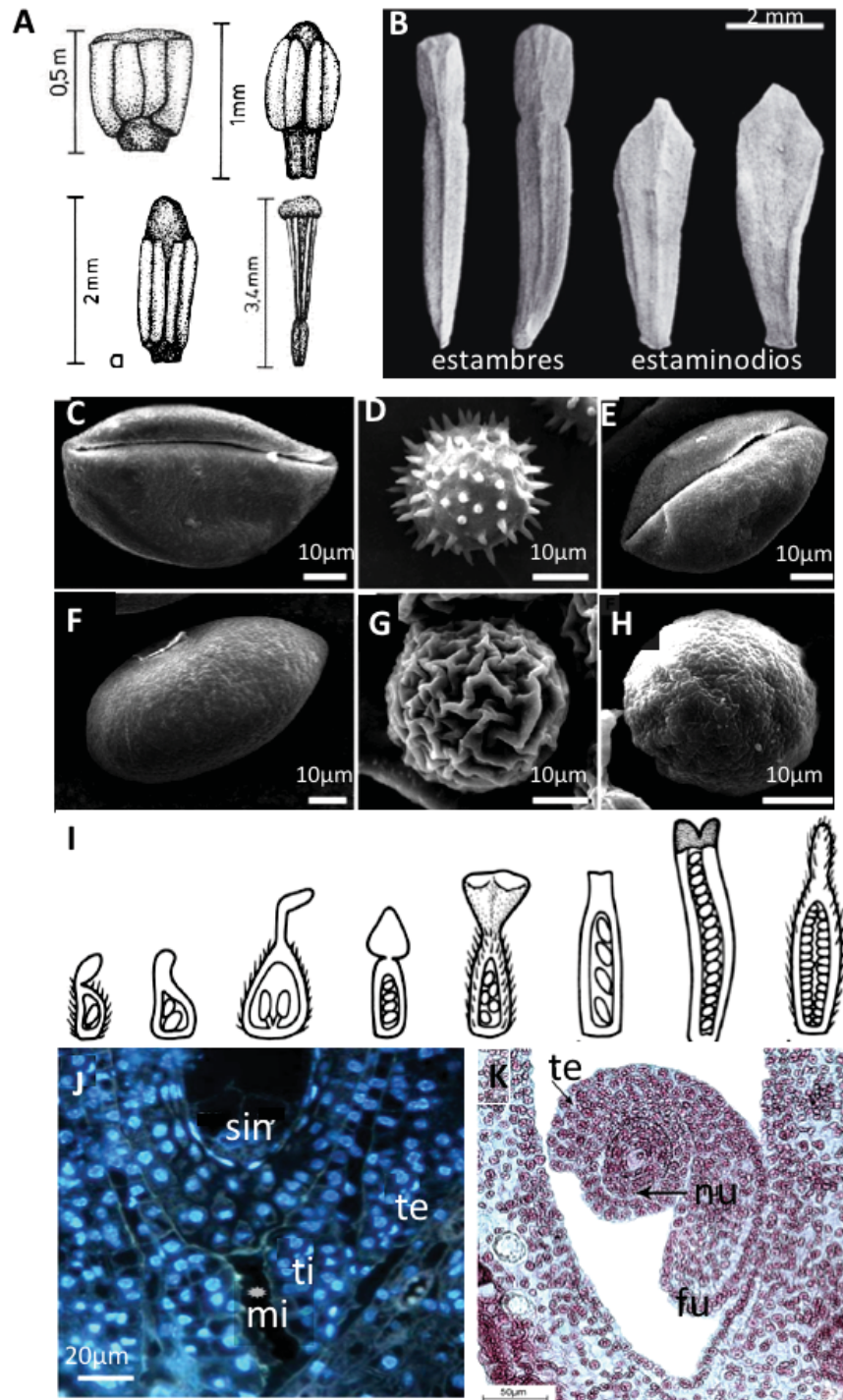
Los óvulos son anátropos, bitégmicos y crasinucelados (Figura 37J y K). El desarrollo del saco embrionario es de tipo *Polygonum*, con siete células (dos sinérgidas, una ovocélula, tres antípodas y una célula central) y ocho núcleos (Corner, 1949; Svoma, 1997, 1998; Lora *et al.* 2010).

El único registro fósil de una flor de Annonaceae corresponde a *Futabanthus asamigawaensis* (Figura 37K,L), con una datación de  $\sim 89$  m.a. (Cretácico Tardío), el cual comparte características diagnósticas con las anonáceas actuales (Takahashi *et al.* 2008).



**Figura 36.** Diversidad floral de las Anonáceas. A) *Annona muricata*, B) *Cymbopetalum* sp., C) *Stenanona migueliana*, D) *Guatteria amplifolia*, E) *Sapranthus viridiflorus*, F) *Xylopia frutescens*, G) *Uvaria* sp., H) *Artabotrys* sp., I) *Uvariopsis dioica*, J) *Uvaria bipindensis*, K) Fósil de *Futabanthus asamigawaensis*, L) Reconstrucción de la flor de *Futabanthus asamigawaensis*. A-J) Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. Marzo 2017, A) © Charles Rakotovao, B) © A. Gentry, C) Ortíz-Rodríguez et al. (2014), D Y F) © Indiana Coronado, E) © George E. Schatz, G) © Iska Gushilman, H) © Fidy Ratovoson, I) © Bidault Ehoarn, J) © Dietrich Ian Lafferty. K-L) Takahashi et al. (2008).





**Figura 37.** Estructuras sexuales. A) Diversidad de estambres, B) Estambres y estaminodios externos de *Uvaria cordata*. Polen de C) *Alphonsea monogyna*, D) *Desmos chinensis*, E-F) *Artabotrys hexapetalus*, G) *Fissistigma oldhamii*, H) *F. retusum*. I) Diversidad de carpelos y placentación. Óvulos de J) *Annona cherimola*, K) *Anaxagorea javanica*. mi, micrópilo; nu, nucela; sin, sinérgidas; te, testa; ti, tegmen. A, I) Van Heusden (1992), B) Saunders (2010), C-H) Xu & Ronsen (2013), J) Lora *et al.* (2010), K) Corona *et al.* (2016).

Las flores de anonáceas presentan dicogamia, son protóginas, primero con una fase pistilada y después una fase estaminada (Figura 38). En general la floración tiene una duración de dos días y está dividida en varias etapas. En la **fase pre-receptiva**, los pétalos exteriores se abren para dejar expuesta la abertura que forman los pétalos interiores, constituyéndose la cámara de polinización (Lau *et al.* 2016), en especies del género *Annona* esta fase puede durar de 24 a 48 h (González-Esquinca *et al.* 2016).

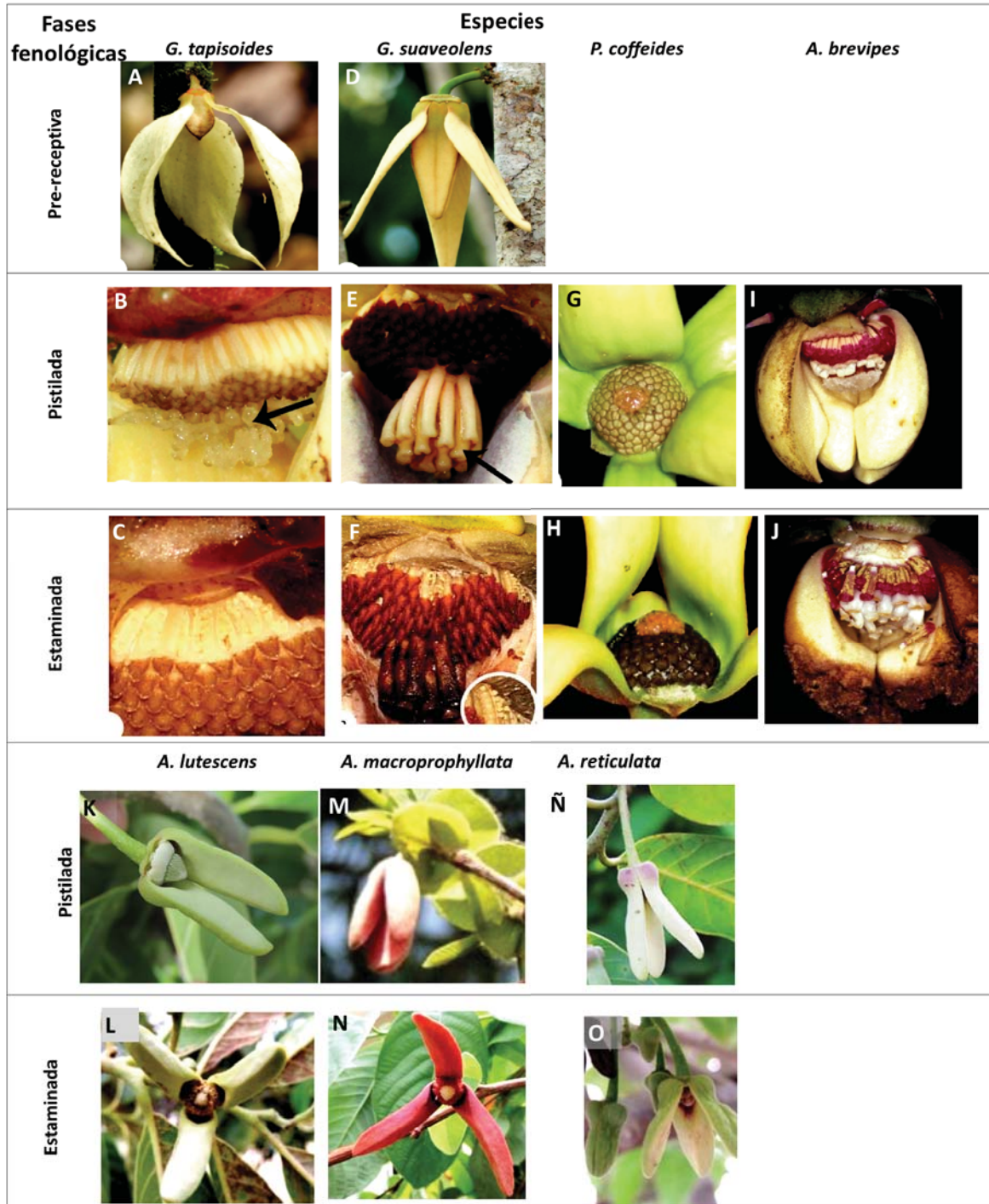
La **fase pistilada** inicia cuando los pétalos internos se abren y los estigmas de color crema exudan una sustancia pegajosa para que se adhiera el polen y que está asociada con el aroma dulce a frutas que atrae a los polinizadores, los cuales quedan atrapados dentro de la cámara de polinización (Lau *et al.* 2016). La fase pistilada tiene una duración de alrededor de 12 h en *Polyalthia coffeoides* (Thwaites) Hook.f. & Thomson y *P. korinti* (Dunal) Thwaites (Ratnayake *et al.* 2006). En *Goniothalamus tapisoides* Mat-Salleh y *G. suaveolens* Becc. es de 23 a 25 h (Lau *et al.* 2016) y en *Anaxagorea prinooides* (Dunal) A.St.-Hil. ex A.DC. 21 h (Gottsberger, 2016). La fase pistilada finaliza cuando la sustancia viscosa se seca y los estigmas tornan a una coloración café (Lau *et al.* 2016).

Según Ratnayake *et al.* (2006) y Lau *et al.* (2016) hay una **fase intermedia**, en ésta las flores no son sexualmente activas, en *Goniothalamus tapisoides* dura ~3 h, 9 h en *G. suaveolens* (Lau *et al.* 2016), parecido al tiempo de *Polyalthia korinti* que es de 8 a 10 h y en *P. coffeoides* tiene una duración de 6 a 12 h (Ratnayake *et al.* 2006).

La **fase estaminada** comienza con la dehiscencia de las anteras y un descenso en la esencia floral, en *Polyalthia coffeoides* y *P. korinti* dura de 12 a 18 h (Ratnayake *et al.* 2006). Esta fase finaliza con la apertura de las flores y la caída de los pétalos que permiten la salida de los polinizadores (Lau *et al.* 2016; González-Esquinca *et al.* 2016), los cuales cargados de polen y atraídos por las esencias florales, pueden visitar otras flores en fase pistilada, del mismo o de diferentes árboles, contribuyendo al proceso de polinización (Gottsberger, 2012).

En el género *Annona* la polinización puede durar hasta tres días (González-Esquinca *et al.* 2016).

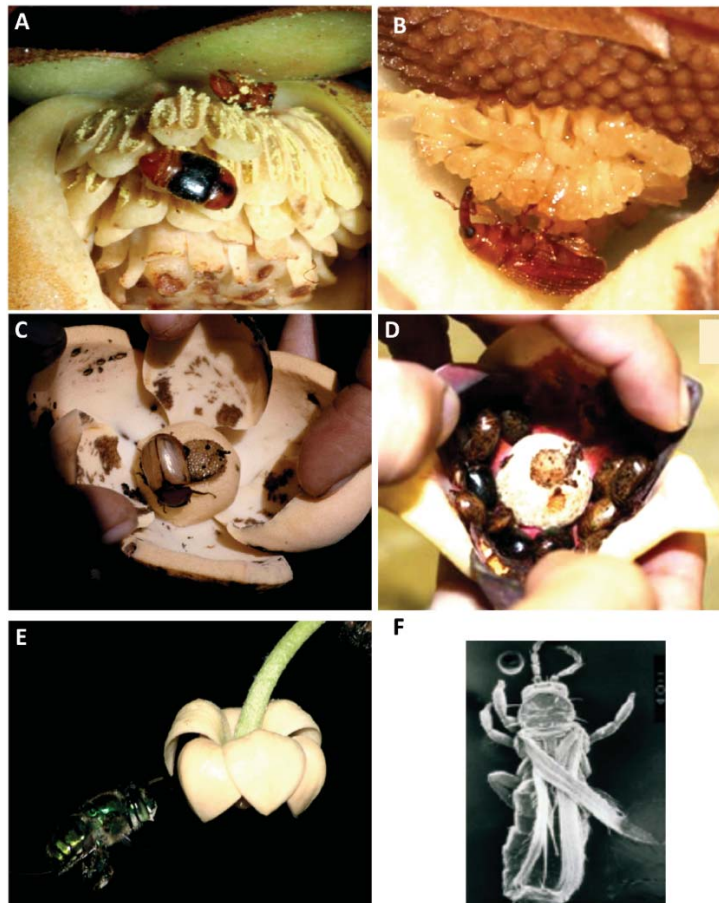




**Figura 38.** Fenología floral. A-C) *Goniothalamus tapisoides*, D-F) *G. suaveolens*, G-H) *Polyalthia coffeoides*, I-J) *Anaxagorea brevipes*, K-L) *Annona lutescens*, M-N) *A. macrophyllata*, Ñ-O) *A. reticulata*. A-C) Lau *et al.* (2016), D-F) Ratnayake *et al.* (2006), I-J) Gottsberger (2016), K) Iván De la Cruz, L-Ñ) González-Esquinca *et al.* (2016).

### 9.3. Polinizadores

La cantarofilia es el tipo de polinización que predomina en la familia Annonaceae, cerca del 90% de las especies son polinizadas por escarabajos (Figura 39). Dentro de este grupo de insectos, los más pequeños no miden más de 7 mm de largo y pertenecen las familias Nitidulidae (Figura 39A), Curculionidae (Figura 4B), Staphylinidae y Chrysomelidae. Las flores de otras especies pueden ser polinizadas por individuos de las subfamilias Dynastinae (Figura 39C), Rutelinae, Cetoniinae y Trichiinae, que tienen una longitud entre 14 y 20 mm. Aunque los escarabajos son los visitantes preferidos de las flores, la polinización también puede ocurrir con ayuda de cucarachas, moscas, abejas y trips (Figura 39E,F) (Gottsberger, 2012, 2014, 2016).



**Figura 39.** Algunos polinizadores de Anonáceas. A) *Coleopterus* sp. sobre flor de *Anaxagorea dolichocarpa*. B) *Endaeus* sp. en *Goniotalamus tapisoides*, C) *Cyclocephala atricapilla* en *Annona coriaceae*, D) Coleópteros en *A. purpurea*, E) *Euglossa imperialis* polinizador de *Unonopsis stipitata*, F) Trip polinizador de *Bocageopsis multiflora*. A, C, E-F) Gottsberger (2012), B) Lau et al. (2016), D) González-Esquínca et al. (2016).

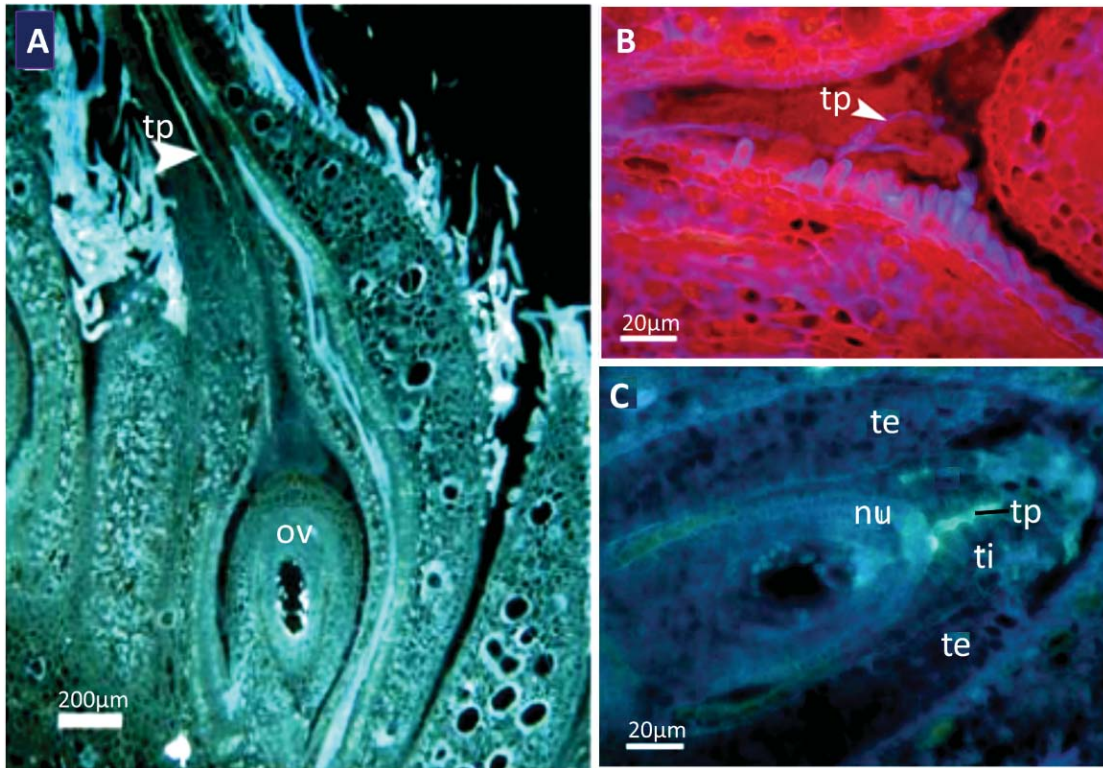
#### 9.4. Fecundación

En la familia Annonaceae el proceso de fecundación ha sido escasamente documentado, a continuación se explicará este proceso utilizando como modelo a *Annona cherimola* Mill. y *A. squamosa*. L.

En *A. cherimola*, los granos de polen germinan una hora después de la polinización. A partir de este momento el tubo polínico crece sobre la superficie estigmática a través de la línea de sutura para penetrar al estilo (Figura 40A), este recorrido ocurre 2 a 3 h después de la fecundación. Posteriormente el tubo polínico crece en una distancia aproximada de 836.3  $\mu\text{m}$  para llegar al lóculo del ovario de 4 a 6 h después de la polinización (Figura 40B). Una vez aquí, el tubo polínico crece sobre el obturador y luego penetra al óvulo (Figura 40C). Cada óvulo es penetrado por un solo tubo polínico (Lora *et al.* 2010). Tanto en *A. cherimola* como en *A. squamosa* la fecundación se observa 24 h después de la polinización (Lora *et al.* 2010; Dos Santos *et al.* 2014).

En *A. squamosa*, el inicio de la formación del fruto ocurre 48 h después de la polinización y está marcado por el desarrollo del pericarpio. También ocurre la degeneración del estigma y el estilo, así como la formación de la zona de abscisión que promueve la separación de estas estructuras del resto del fruto (Dos Santos *et al.* 2014).





**Figura 40.** Fecundación en *A. cherimola*. A) Crecimiento del tubo polínico a través del canal estilar, B) Tubo polínico cerca del lóculo del ovario, C) Tubo polínicos penetrando al óvulo. nu, nucela; ov, óvulo; te, testa; ti, tegmen; tp, tubo polínico. Imágenes modificadas de Lora *et al.* (2010).

El óvulo es el megasporangio rodeado de sus tegumentos protectores, que después de la fecundación da origen a la semilla, por lo que puede ser considerado como el rudimento de la semilla. Después de la fecundación, se considera que se trata de una semilla en desarrollo debido a que ya contiene el cigoto o embrión. Los tejidos presentes en el óvulo son los que originan a los tejidos de la semilla (Cuadro 9) (Espinosa-Osornio & Engleman, 1998).

**Cuadro 9.** Estructuras del óvulo que originan semillas (Espinosa-Osornio & Engleman, 1998).

Partes del óvulo	Pueden originar en la semilla
<b>Saco embrionario:</b>	
<b>Ovocélula</b>	Embrión
<b>Célula central</b>	Endospermo
<b>Nucela</b>	Perispermo
<b>Tegumento interno</b>	Tegumento interno (tegmen)
<b>Tegumento externo</b>	Tegumento externo (testa)
<b>Tegumento medio</b>	Tegumento medio

<b>Hilo</b>	Hilo
<b>Rafe</b>	Rafe
<b>Calaza</b>	Calaza
<b>Micrópilo</b>	Micrópilo

Es escaso el conocimiento sobre el desarrollo de semillas de las Anonáceas, hace 68 años Corner (1949) publicó uno de los trabajos más importantes, aún vigente, sobre la descripción morfológica y del desarrollo de semillas de 15 especies de Anonáceas, señalando los caracteres de estas semillas:

- a) El óvulo es anátropo.
- b) Comúnmente, el tegumento interno sobrepasa al tegumento externo formando al prominente endostoma.
- c) La pericalaza es única en esta familia, es causada por el crecimiento basipetalo del óvulo y el desarrollo de la semilla en el lado opuesto del micrópilo.
- d) La nucela se desarrolla justo después de la fertilización, hasta llenar a la semilla inmadura.
- e) La nucela se vuelve ruminada por la invaginación de los integumentos a los lados de las semillas.
- f) El endospermo se desarrolla longitudinalmente, en el centro de la semilla, extendiéndose desde el micrópilo hasta el final de la calaza, eventualmente se expande hacia la nucela y entre las ruminaciones.
- g) El funículo es muy corto por lo que las semillas son prácticamente sésiles.
- h) El hilo está mal definido porque el endostoma está más o menos perdido entre el funículo y el endostoma. El hilo está usualmente cerrado internamente por un tapón de tejido fibroso alrededor del endostoma.
- i) La testa es fibrosa, consiste en fibras oblicuas y longitudinales.
- j) El embrión es pequeño y se desarrolla cuando la semilla está casi madura.

## 9.5. Desarrollo de semilla

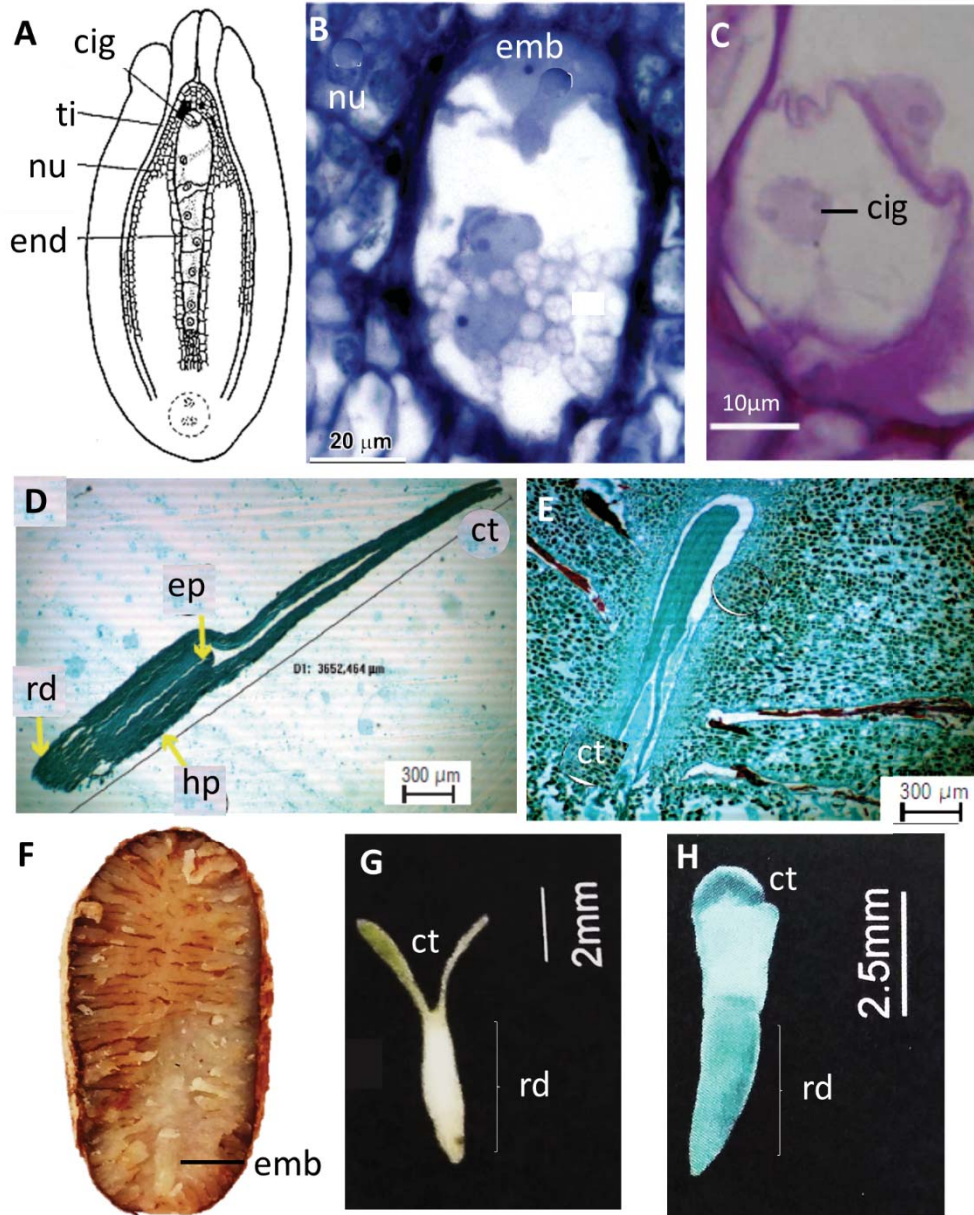
### *Embrión*

El embrión comienza a desarrollarse después de que el endospermo ha sustituido a la nucela (Corner, 1949; Svoma, 1997, 1998; Corona *et al.* 2016). El cigoto de *Artabotrys hexapetalus* sigue sin dividirse cuando el endospermo es una hilera de células (Svoma, 1997) (Figura 41A). Ocho días después de la fecundación, el cigoto de *A. cherimola* sufre su primera división celular, cuando el endospermo presenta cuatro células (Figura 41C) (Lora *et al.* 2010).

El embrión maduro de las Anonáceas es rudimentario y pequeño, recto, lineal, con un eje embrionario moderadamente desarrollado, una plúmula rudimentaria y dos cotiledones planos y delgados (Hayat, 1963; Villamil *et al.* 1999; Martínez *et al.* 2013). El embrión se encuentra embebido en el endospermo y está colocado en la parte basal central muy cerca del hilo, protegido por el tapón micropilar (Figura 41).

En promedio, los embriones de las anonas miden 3mm de largo. En particular, los embriones de *Annona crassiflora* Mart. miden aproximadamente 2 mm (Pimenta *et al.* 2013); los de *A. muricata* L. 3 mm (Villamil *et al.* 1999), los de *A. macrophyllata* Donn.Sm. 3.37 mm (Domínguez-Gutú, 2010) y los de *A. squamosa* alrededor de 3.6 mm (Martínez *et al.* 2013).

En *A. squamosa* el embrión presenta células meristemáticas con paredes delgadas en el hipocótilo, los cotiledones y la radícula. El procambium y el meristemo apical es fácilmente observable (Martínez *et al.* 2013). Las células de embrión pueden contener cristales y/o sustancias de reserva. Se han reportado lípidos en los embriones de *Anaxagorea javanica* Blumme (Corner, 1949) y *Annona muricata*, en esta última especie los lípidos representan el 33% del peso seco del embrión (Villamil *et al.* 1999). El embrión de *A. hexapetalus* almacena además de lípidos, algunos cristales. En el caso de *Bocageopsis canescens* (Benth.) R.E.Fr. los embriones contienen pequeñas cantidades de aceites y granos de almidón, mientras que en *Unonopsis* sp. y *Bocagea* sp. las células del embrión parecen ser amiláceas (Svoma 1997).



**Figura 41.** Embriones de diferentes anonáceas. A) Cigoto en semilla muy joven de *Artabotrys hexapetalus*, después de la fecundación, B) Saco embrionario de *Annona squamosa* 24 h después de la fecundación, C) Primera división celular del cigoto de *A. cherimola* 8 días después de la fecundación, D-E) Embrión maduro de *A. cherimola*, F) Semilla madura de *A. macrophyllata*, G-H) Embrión maduro de *A. macrophyllata* en diferentes vistas. cig, cigoto; ct, cotiledones; emb, embrión; end, endospermo; ep, epicótilo; hp, hipocótilo; nu, nucela; ti, tegmen; rd, radícula. Imágenes modificadas de A) Corner (1949), B) Dos Santos *et al.* (2014), C) Lora *et al.* (2010). D-E) Martínez *et al.* (2013), F) Durán-Ruiz *et al.* (2016), G-H) Somoza Gómez (2015).



## Nucela

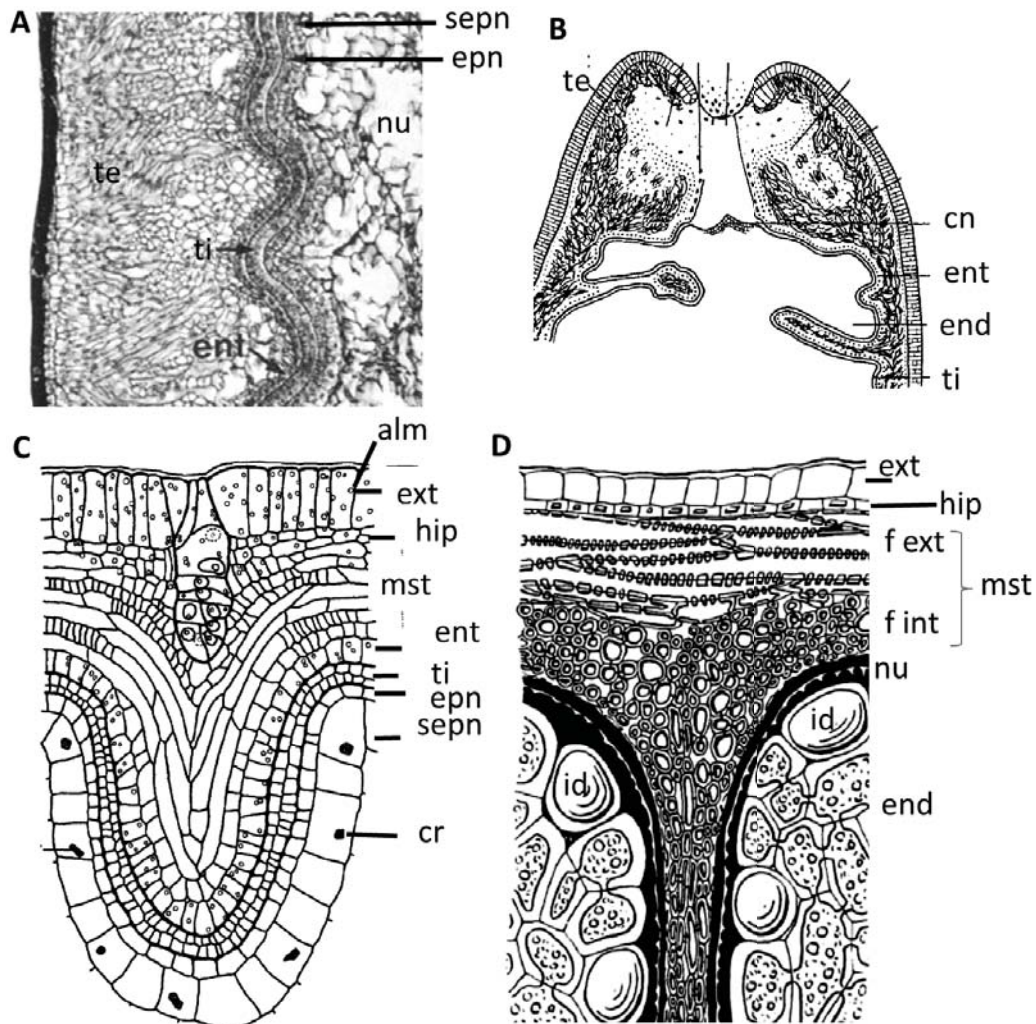
La nucela está formada por una pequeña capa de células epidermales que se desarrolla rápidamente después de la fecundación y que llena completamente a la semilla inmadura (Figura 42A,B). El crecimiento de la nucela es principalmente producido por la división periclinal de la subdermis; el incremento de su volumen se lleva a cabo simultáneamente con el aumento del tamaño de la semilla (Corner, 1949; Svoma 1997, 1998). En *Anaxagorea javanica* la nucela se reporta como un tejido blanco y firme (Corner, 1949).

La nucela se puede dividir en tres capas: la **epidermis**, **subepidermis** o **hipodermis** y la **capa nucelar**, esta última compuesta por ambas epidermis (Figura 42A-C) (Svoma, 1998). En *Bocagea* sp. y *Ancana* sp., la subepidermis nucelar está compuesta de pequeñas células isodiamétricas, pero llegan a alcanzar gran tamaño en *Xylopia aromatica* (Lam.) Mart., *X. emarginata* Mart. y *Unonopsis* sp. (Svoma, 1998). En semillas jóvenes de *Artabotrys hexapetalus* esta capa, junto con la epidermis nucelar, forma parte de las ruminaciones, antes de que el endospermo ocupe el lugar de la nucela (Figura 42A) (Svoma, 1997). La capa nucelar se ha reportado en *Ancana* sp., *Bocagea* sp., *Bocageopsis canescens*, *Unonopsis* sp., *X. aromatica* y *X. emarginata* (Figura 42B) (Svoma, 1998).

En algunas especies, las células nucleares pueden almacenar cristales, moléculas de protección o sustancias de reservas. Por ejemplo, las células que conforman la capa nucelar de las semillas de *Bocageopsis canescens* contienen taninos; las células hipodermiales de *Annona squamosa* y *Desmos dasymaschala* pueden contener gotas de lípidos que, más adelante en el desarrollo, se incorporan a las capas más externas del endospermo cuando éste sustituye a toda la nucela. En los tejidos frescos, estas células oleíferas son llamativas por el color naranja del aceite. Algunas de las células de la subepidermis de *Xylopia aromatica* y *X. emarginata* contienen muchos cristales (Figura 42C) (Corner, 1949).

Cuando el endospermo comienza a reemplazar a la nucela, sus células se van desintegrando hasta desaparecer. Por lo tanto, cuando el endospermo está completamente formado y las semillas han alcanzado la madurez ya no existe rastro de ella. Sin embargo, en las especies *Polyalthia purpurea* Ridl., *Cananga odorata* (sin. *Canangium odoratum* (Lam.) Baill. ex King, *D. dasymaschala*, *Desmos chinensis* Lour. y *D. dumosa* (Roxb.) Saff. la

nucela queda representada solo por una cutícula color café (Figura 42D); en *A. squamosa* permanecen únicamente las células hipodermales con gotas de aceites (Corner, 1949).



**Figura 42.** Nucela en diferentes estados de desarrollo. A) Epidermis y subepidermis de la nucela en semillas muy jóvenes de *Artabotrys hexapetalus*. B) Capa nucelar en semillas jóvenes de *Xylopia aromatica*, C) Epidermis, subepidermis y cristales presentes en la nucela de semillas jóvenes de *X. aromatica*. D) Nucela como cutícula de una ruminación en semillas maduras de *Desmos dasymaschala*; endospermo con idioblastos. cn, capa nucelar; cr, cristales; epn, epidermis nucelar; end, endospermo; ent, endotesta; ext, exotesta; f ext, fibras externas; f int, fibras internas; hip, hipodermis; id, idioblasto; mst, mesotesta; nu, nucela; sepn, subepidermis nucelar; ti, tegmen; te, testa. Imágenes modificadas de A) Svoma (1997), B-C) Svoma (1998), D) Corner, (1949).

### Endospermo

El endospermo es celular e inicia su desarrollo en semillas muy jóvenes (Figura 41A), en *Annona cherimola* se observó que comienza tres días después de la fecundación (Figura 43A) (Lora *et al.* 2010). Al principio y por tiempo prolongado, el endospermo está formado

por una sola fila de células isodiamétricas que se desarrolla al centro y a lo largo de la semilla (Figura 41A; 43B), es hasta etapas posteriores que incrementa su tamaño para remplazar a la nucela y desarrollarse entre las ruminaciones (42D) (Corner, 1949; Svoma, 1997, 1998). En las etapas más cercanas a la maduración las células engrosan sus paredes y el endospermo se vuelve duro (Figura 41F; 42D) (Corner, 1949; Schroeder, 1951; Svoma, 1997, 1998; Domínguez-Gutú, 2010).

El almacenamiento de las sustancias de reserva en el endospermo varía de acuerdo con la especie, algunas de ellas almacenan mayor cantidad de lípidos, almidón y/o proteínas. **Endospermo con lípidos.** Las especies en las que se ha reportado la presencia de lípidos son: *Anaxagorea javanica*, *Alphonsea elliptica* Hook.f. & Thomson, *Cananga odorata*, *Mezzettia leptopoda* (Hook.f. & Thomson) King, *Xylopiia fusca* Maingay ex Hook.f. & Thomson, *X. caudata* Hook.f. & Thomson (Corner, 1949) y *X. aromatica* (Svoma, 1998). Las células del endospermo de *A. hexapetalus* además de almacenar lípidos también acumulan algunos cristales. Otra especie cuyo endospermo está lleno de cristales es *Unonopsis* sp. (Svoma, 1997).

La presencia de idioblastos oleíferos a lo largo de los márgenes de las ruminaciones se han reportado en semillas maduras de *Anaxagorea javanica*, *Desmos dasymaschala* (Figura 8D), *Annona cherimola* (Schroeder, 1951), *A. squamosa* (Martínez *et al.* 2013) (Figura 43C) y *A. muricata* (Villamil *et al.* 1999). En *A. macrophyllata* se reportó la presencia de acetogeninas y alcaloides en estos idioblastos (Laguna *et al.* 2015; Brechú-Franco *et al.* 2016) (Figura 43D,E).

**Endospermo con lípidos y proteínas.** El aceite de las semillas maduras de *Annona diversifolia* (= *A. macrophyllata*), *A. purpurea* y *A. lutescens*, está constituido por los siguientes ácidos grasos: palmítico, esteárico, linoleico y oleico, siendo este último el más abundante. Además identificaron cuatro tipos de triglicéridos: C<sub>48</sub>, C<sub>50</sub>, C<sub>52</sub> y C<sub>54</sub>; el primer triglicérido ausente en *A. diversifolia* (Pérez-Amador *et al.* 1997). El análisis histoquímico de *A. macrophyllata* reveló la presencia de, además de lípidos, proteínas (Laguna *et al.* 2015) (Figura 43F-G). En *A. muricata* también fueron reportados lípidos y proteínas, con la

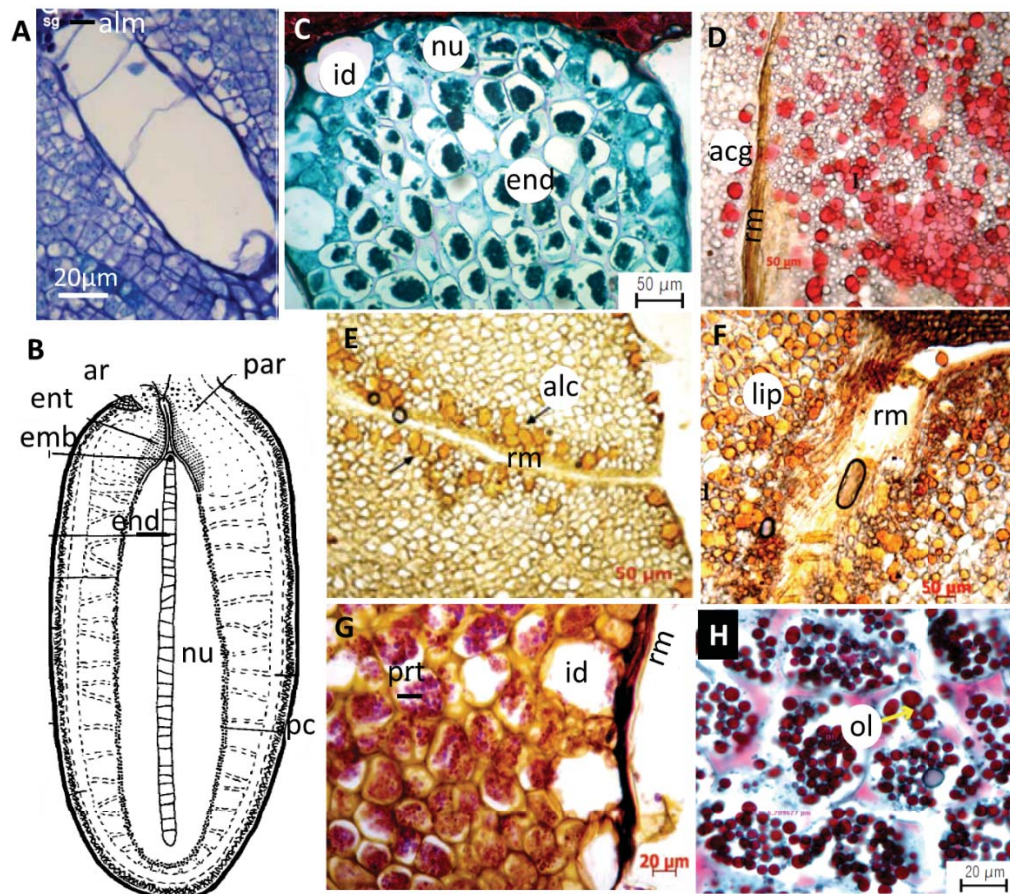


diferencia de que en esta especie también se encontraron cristales de calcio (Villamil *et al.* 1999).

**Endospermo con lípidos y almidones.** Las especies que se reportan con almacenamiento tanto de lípidos como almidones son *Annona cherimola* (Schroeder, 1951), *Bocageopsis canescens*, *Unonopsis* sp. (Svoma, 1998), *Desmos dasymaschala*, *D. chinensis*, *D. dumosa*, *Annona dioica* A.St.-Hil. (Galastri, 2008) y *A. squamosa* (Figura 8H) (Corner, 1949; Martínez *et al.* 2013); sin embargo, las células oleíferas de estas especies provienen de las células hipodermales de la nucela que se embebieron cuando ésta fue sustituida por el endospermo (Corner, 1949).

**Endospermo con almidones.** Hasta el momento, se ha documentado que el endospermo de *Polyalthia purpurea*, *Popowia nervosa* Ridl., *Xylopia malayana* (Corner, 1949) y *X. emarginata* (Svoma 1998) son amiláceos.

Las especies con endospermos que contienen acetogeninas se describen en la sección que trata de las acetogeninas de anonáceas.



**Figura 43.** Endospermo y materiales de reserva. A) Endospermo en desarrollo de *Annona cherimola*, 8 días después de la fecundación, B) Semilla de *Artabotrys hexapetalus* en estado avanzado de desarrollo, con células del endospermo en el centro de la semilla, C) Idioblastos en semilla madura de *Annona squamosa*, D-G) Semilla madura de *A. macrophyllata*, D) Idioblastos con acetogeninas, E) Idioblastos con alcaloides, F) Lípidos, G) Proteosomas, H) Oleoplastos de *A. squamosa*. acg, acetogeninas; alc, alcaloides; alm, almidón; ar, arilo; emb, embrión; end, endospermo; ent, endotesta; id, idioblasto; lip, lípidos; nu, nucela; ol, oleosomas; pc, pericalaza; prt, proteosomas; rm, ruminación. Imágenes modificadas de A) Lora *et al.* (2010), B) Svoma (1997), C, H) Martínez *et al.* 2013, D, F-G) Laguna *et al.* (2015), E) Brechú-Franco *et al.* (2016).

### *Rafe y antirafe*

En los óvulos anátropos, donde parte del funículo está fusionado con los tegumentos, la semilla conserva parte del funículo pegada y forman una costilla característica llamada rafe (Bonfil, 2010). El antirafe es un término también propuesto por Corner (1949) que refiere al lado opuesto de la rafe. Ambas estructuras se elevan como un nervio a lo largo del plano medio (Svoma, 1998).

### *Tegumentos*

Las semillas de anonáceas están formadas por dos tegumentos: el tegumento externo (testa) y el tegumento interno (tegmen), ambos se originan directamente de los tegumentos del óvulo (Figura 44, 45; cuadro 9), están formados por una o múltiples capas que se describirán a continuación (Svoma, 1997; Espinosa-Osornio & Engleman, 1998).

#### *Testa*

El tegumento externo conforma la cubierta externa de las semillas, denominada testa. Este tegumento está dividido en exotesta, mesotesta y endotesta (Figura 42; 44) (Corner, 1949; Svoma 1997, 1998; Martínez *et al.* 2013).

**Exotesta.** La exotesta constituye a la epidermis de la testa y corresponde a la capa más externa de la semilla. Consiste en una sola capa de células pequeñas, isodiamétricas o elongadas, bien definidas y con paredes delgadas (Figura 42C-D; 44E). Durante todo el desarrollo esta capa solo experimenta divisiones celulares anticlinales (Corner, 1949; Svoma, 1997, 1998; Martínez *et al.* 2013).

Dependiendo de la especie esta capa puede o no tener diferentes compuestos. En *Artabotrys hexapetalus*, *Ancana* sp., *Bocageopsis canescens*, *Unonopsis* sp. y *Xylopia*

*aromatica* estas células se van llenando de taninos gradualmente (Figura 44D), en esta última especie también almacena granos de almidón (Figura 42C) (Svoma, 1997, 1998). En *A. javanica* las células contienen una sustancia de color café muy oscuro, mientras que en *Desmos dasymaschala* es de color negro y azul en *Xylopi caudata* y *X. malayana* (Corner, 1949).

**Mesotesta.** En general la mesotesta está constituida de cuatro capas: la hipodermis, dos capas de tejido fibroso y el parénquima (Figura 44) (Corner, 1949; Svoma, 1997, 1998).

La **hipodermis** corresponde a la epidermis externa de la mesotesta y está compuesta de una o dos capas de células isodiamétricas pequeñas sin color que se encuentra justamente debajo de la exotesta (Figura 42C-D; 44D, F) (Corner, 1949; Svoma, 1997, 1998).

Algunas células de la hipodermis pueden contener sustancias o materiales, en *Annona squamosa* esta capa se observa cristalina, quizás por la presencia de oxalato de calcio (Figura 44F) (Corner, 1949; Martínez *et al.* 2013). También la hipodermis de *Xylopi caudata*, *X. malayana* y *Desmos dasymaschala* presentan cristales cortos y oblongos (Corner, 1949). Las semillas jóvenes de *X. aromatica* además de almacenar cristales, almacenan granos de almidón (Svoma, 1998). En *Artabotrys hexapetalus* también hay granos de almidón pero no cristales.

Las células que se localizan debajo de la hipodermis constituyen al **tejido fibroso**, que durante el desarrollo de la semilla se elongan en fibras formando dos capas distintas (Svoma, 1999). Las fibras de la capa más externa son longitudinales y las de la capa interna son transversales, ambas crecen por divisiones periclinales o anticlinales (Figura 42D; 44E-F). En *Alphonsea elliptica*, *D. chinensis* y en *D. dumosa* las capas fibrosas de la testa son mucho más delgadas que las del resto de las especies ya que cada capa fibrosa solo tiene una, dos o tres células de espesor (Corner, 1949).

En etapas maduras las paredes de las células internas y radiales se convierten en gruesas y lignificadas proporcionándole dureza y protección a las semillas (Svoma, 1997, 1998).

La última capa de la mesotesta es el **parénquima**, éste tiene células incoloras con paredes delgadas. El parénquima se desarrolla, en el plano medio, a lo largo de toda la



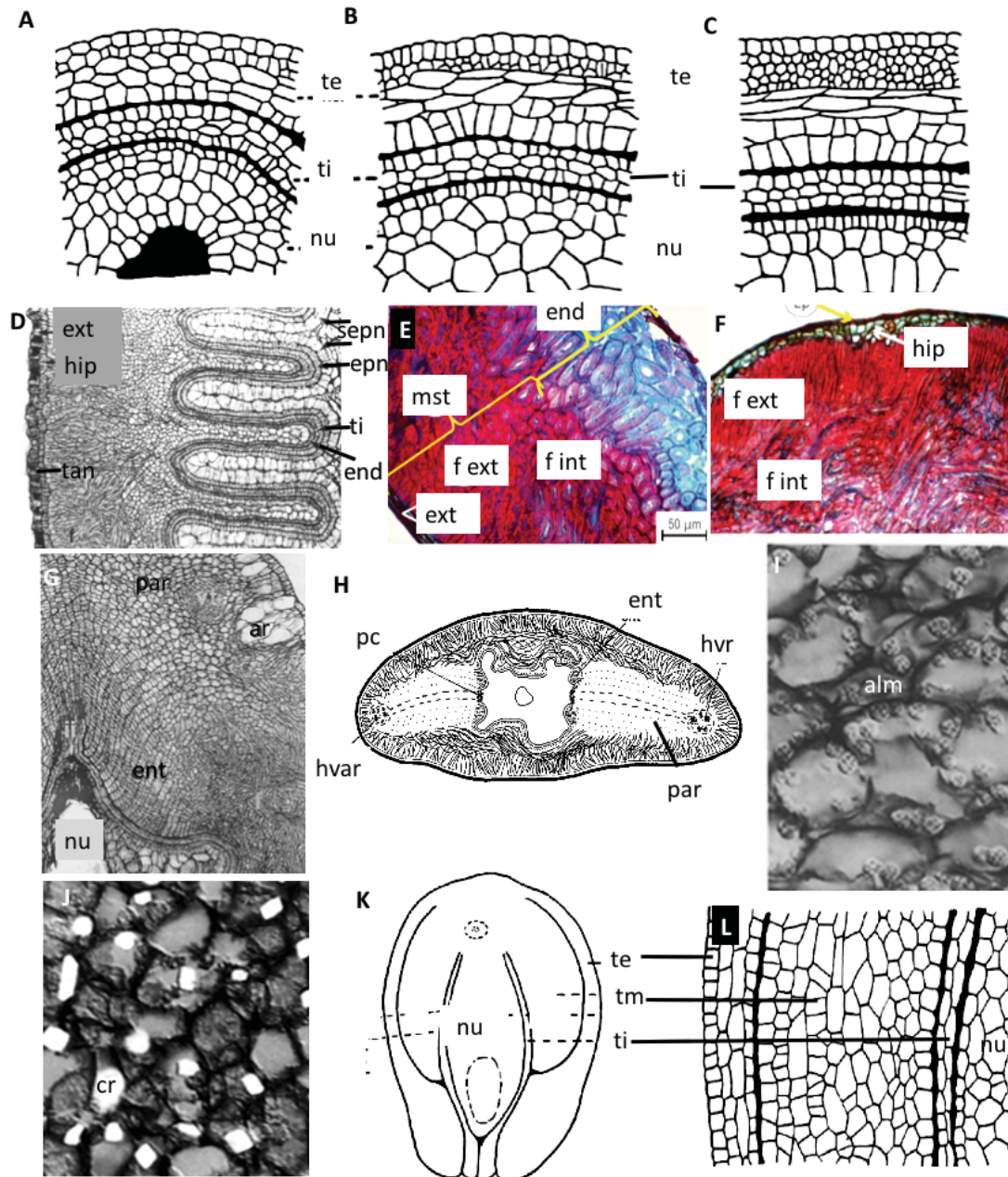
semilla e incluye al sistema vascular, a nivel de la pericalaza está bien desarrollado (Figura 44H), en la región micropilar se hace estrecho y se amplía de nuevo sobre el nivel del arilo rudimentario (Figura 44G). El parénquima colapsa en la madurez (Svoma, 1997, 1998).

Algunas células parenquimatosas almacenan sustancias de reservas. Durante el desarrollo de las semillas de *Artabotrys hexapetalus* algunas de las células del parénquima contienen taninos y son llenadas con numerosos granos de almidón (Figura 44I) (Svoma, 1997).

**Endotesta.** Corresponde a la epidermis interna de la testa, las células son pequeñas e isodiamétricas, en partes permanece de una sola capa y en otras se convierte en multicapa por divisiones celulares periclinales (Figuras 42-44) (Svoma, 1997; Martínez *et al.* 2013). Los derivados de la múltiple endotesta son arreglados compactamente en filas de células radiales sin espacios de aire que se observa fácilmente en semillas jóvenes (Figura 45G). Al final de los estados de desarrollo las células de la endotesta engrosan sus paredes y se lignifican (Svoma, 1997).

En semillas jóvenes de *Artabotrys hexapetalus* y *Xylopia aromatica* las células de la endotesta están llenas con granos de almidón, especialmente en la región micropilar. También la formación de idioblastos con cristales comienza en etapas tempranas, gradualmente un cristal de oxalato de calcio es depositado en cada célula de la endotesta y sus derivados. La mayoría de los cristales son solitarios y mayormente de tipo prismático (Figura 45J). Los cristales están embebidos en un protoplasma oleoso.

En algunas especies se presenta otro tegumento, denominado tegumento medio, el cual forma parte principal de la testa de las semillas de *Cananga odorata*, *Mezzettia leptopoda* y *Xylopia curtisii*, éste término se refiere al tejido que se desarrolla a los lados del óvulo entre la testa y el tegmen (Figura 44K-H) (Corner, 1949).



**Figura 44.** Testa. A-C) *Anaxagorea javanica*, A) Sección transversal del óvulo maduro, B) Óvulo después de la fecundación, C) Semilla muy joven, D) *Artabotrys hexapetalus*, E) Testa y tegmen de la semilla madura de *Annona squamosa*, F) Testa de *A. squamosa*, G) Parénquima en semillas jóvenes de *A. hexapetalus*, H) Sección transversal de la semilla casi madura de *A. hexapetalus*, I) Granos de almidón en parénquima de *A. hexapetalus*, J) Cristales en endotesta de *A. hexapetalus*, K) Óvulo maduro de *C. odoratum*, L) Acercamiento de los tegumentos de óvulo en *C. odoratum*. alm, almidón; ar, arilo; cr, cristales; epn, epidermis nucelar; end, endospermo; ent, endotesta; ext, exotesta; f ext, fibras externas; f int, fibras internas; hvar; haz vascular del antirafe; hvr, haz vascular del rafe; r hip, hipodermis; mst, mesotesta; nu, nucela; par, parénquima; sepn, subepidermis nucelar; ti, tegmen; te, testa; tm, tegmen medio. Imágenes modificadas de A-C, K-J) Corner (1949), D, G-J) Svoma (1997), E-F) Martínez *et al.* 2013.

### *Tegmen*

El tegmen puede estar formado por diferentes capas de células isodiamétricas (Figura 43; 45A-E). Por ejemplo, el tegmen de *Annona squamosa* y *Polyalthia purpurea* está formada por una sola capa (Corner, 1949; Martínez *et al.* 2013), dos capas en *Desmos dasymaschala* y *Cananga odorata* (Corner, 1949), tres en *Annona muricata* (Villamil *et al.* 1999) y cuatro capas en *Anaxagorea javanica* (Corner, 1949). Este tegumento forma al **micrópilo** (Svoma, 1997).

El tegmen se extiende en las partes laterales a lo largo de toda la semilla (Figura 41A). En los cortes transversales y en todos los estados de desarrollo de las semillas, el tegmen es en forma de anillo en la región micropilar (Figura 45A) (Svoma, 1998).

Durante el desarrollo de la semilla algunas células del tegmen pueden contener sustancias de protección o de reserva, las células en *Annona muricata* están constituidas por taninos (Villamil *et al.* 1999); en *Anaxagorea javanica*, *Polyalthia purpurea*, *P. nervosa* (Corner, 1949) y *Annona macrophyllata* algunas células son oleoginosas (Durán-Ruiz *et al.* 2016).

En la semilla madura el tegmen queda como una cutícula cubriendo al endospermo, formando parte de las ruminaciones (Corner 1949; Svoma, 1997, 1998; Villamil *et al.* 1999).

### *Ruminaciones*

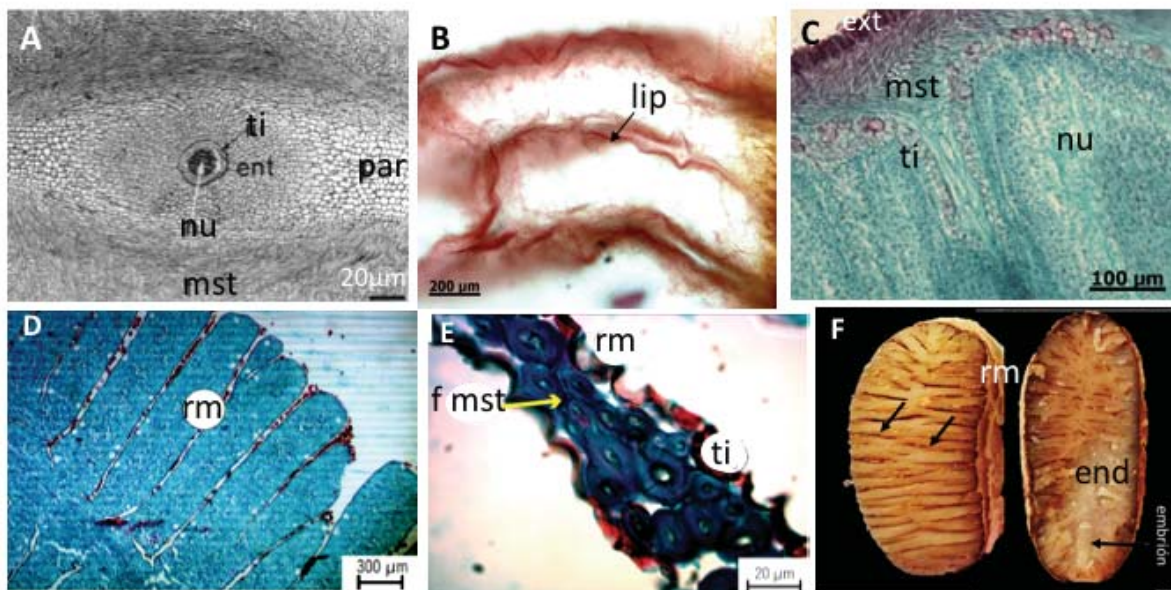
Los pliegues del endospermo (ruminaciones) son causados por una intensa división celular anticlinal de las capas que los constituyen y se forman desde etapas muy tempranas del desarrollo de las semillas (Figura 43; 46C). Las ruminaciones se invaginan en el perispermo por lo que inicialmente son una característica de ésta (Figura 46C) y posteriormente del endospermo (Figura 42E-F).

En casi todas las especies las ruminaciones están formadas por el tegmen, la endotesta y las fibras de la capa interna de la mesotesta (Figura 43; 45D-E) (Corner, 1949, Schroeder, 1951; Svoma, 1997, 1998, Villamil *et al.* 1999; Martínez *et al.* 2013; Durán-Ruiz *et al.* 2016). En las etapas tempranas de *Artabotrys hexapetalus*, *Xylopia aromatica* y *X. emarginata* también las ruminaciones están formadas por la epidermis y subdermis de la

nucela (Figura 42). Las ruminaciones en las semillas de *Anaxagorea* y *Polyalthia* están constituidas únicamente por el tegmen.

Las ruminaciones se desarrollan como pliegues transversales de los flancos de la semilla sobre su longitud total, pero están ausentes en el plano medio (Figura 45D) (Corner, 1949; Svoma 1997, 1998). En semillas maduras los pliegues de las ruminaciones son largas láminas transversas y lignificadas (Figura 46E) (Corner 1949; Svoma, 1997, 1998).

Los principales tipos de ruminaciones en Annonaceae son lameliformes y espiniformes. Las ruminaciones lameliformes presentan dos o cuatro láminas transversales delgadas, mientras que las espiniformes penetran al endospermo como espigas. La ruminación irregular es menos frecuente, este término se refiere a las ruminaciones constituidas por láminas más gruesas y más irregulares (Pirie & Doyle, 2012). Los tres tipos de ruminaciones están presentes en el género *Anaxagorea* (Gottsberger, 2016).



**Figura 45.** Tegmen y ruminaciones. A) Sección transversal de semillas jóvenes de *Artabotrys hexapetalus*, B) Tegmen con lípidos en semillas jóvenes de *Annona macrophyllata*, C) Ruminación en semilla muy joven de *A. macrophyllata*, D) Ruminaciones en semilla madura de *A. squamosa*, E) Acercamiento de la ruminación en *A. squamosa*, F) semilla madura de *A. macrophyllata*. ext, exotesta; f mst, fibras de la mesotesta; lip, lípidos; mst, mesotesta; nu, nucela; par, parénquima; rm, ruminación; ti, tegmen. Imágenes modificadas de A) Svoma (1997), B-C,F) Durán-Ruiz *et al.* (2016), D-E) Martínez *et al.* (2016).



### *Pericálaza*

El término pericálaza fue acuñado por Corner (1949) para describir una de las características de los óvulos y las semillas de anonáceas. Este autor menciona que en un óvulo anátropo normal la cálaza es el punto de inflexión de éste, en el que los tegumentos y la nucela se unen con el funículo, y donde, comúnmente, el haz vascular del rafe termina por transfusión a la nucela. Sin embargo eso no ocurre en las semillas de las anonáceas, en este caso el haz vascular se extiende como un aro en el plano medio longitudinal desde el funículo hasta el micrópilo (Figura 44B), en este caso, ambos tegumentos y la nucela se unen al tejido del haz vascular a lo largo de todo su recorrido, siendo libres solo en los lados del óvulo o la semilla, es decir en las partes que flanquean el aro vascular (Corner, 1949).

Paralelo al crecimiento horizontal del parénquima también los meristemas pericalazales se multiplican y envuelven a las ramas vasculares que se comunican con los haces de la rafe y de la antirafe (Figura 46A,B). Posteriormente algunas células de la pericalaza se llenan de taninos formando un tejido de células taníferas (Figura 46C), este tejido se ha reconocido en *Artabotrys hexapetalus*, *Bocageopsis canescens*, *Unonopsis* sp. y *Ancana* sp. (Svoma, 1998).

### *Sistema vascular*

El haz vascular está conectado con la pericálaza y se extiende alrededor de toda la semilla en el plano medio hasta la punta del tegmen (Figura 46A). En la región micropilar el haz del antirafe se divide en dos ramas las cuales forman un anillo en la testa y se reúne con el haz de la rafe debajo del hilo (Figura 46H). En las semillas maduras el haz vascular se extiende alrededor de la rafe y la antirafe, se encuentra rodeado por el parénquima y está comunicado con la pericálaza, la cual está estrechamente conectada con el endospermo (Figura 46B-C). Además, los elementos del xilema y floema diferencian completamente (Figura 46C) (Svoma, 1997, 1998).

### *Arilostoma*

Es un término también propuesto por Corner (1949) que hace referencia a un arilo rudimentario que rodea al hilo y al micrópilo (Figura 45G). El arilo rudimentario se desarrolla solo por el alargamiento de las células de la hipodermis de la testa y del rafe adyacente

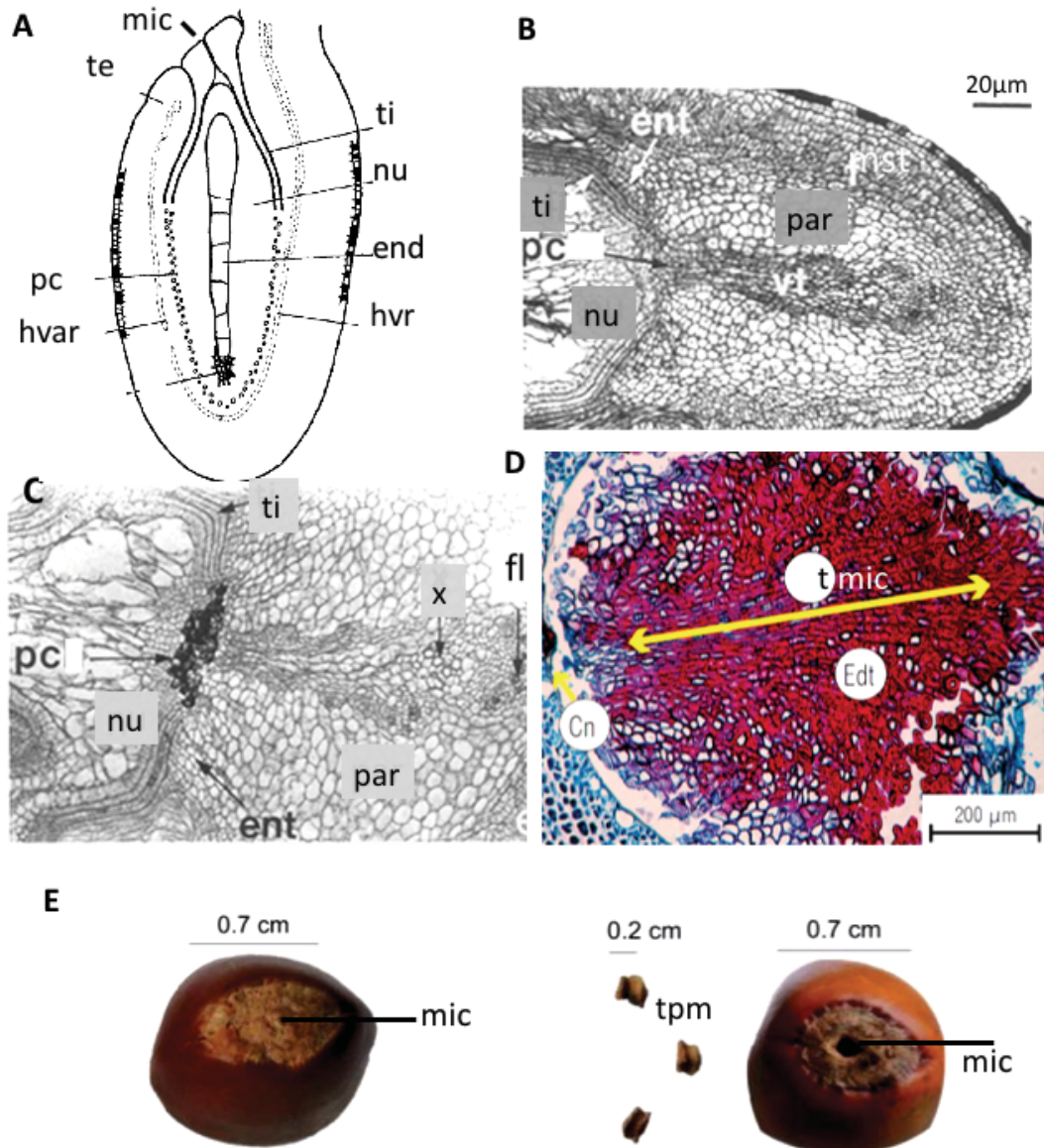
alrededor del micrópilo. En *Artabotrys hexapetalus* comienza a crecer rápidamente después de la fecundación (Figura 44B) (Svoma, 1997), mientras que en *A. squamosa* se forma cuando las semillas tienen de 3 a 4 mm de largo (Corner, 1949). Existen especies en donde no hay presencia de arilo, como es el caso de *Polyalthia purpurea*, *Alphonsea elliptica* y *Bocagea sp.* (Corner, 1949).

Conforme el desarrollo de la semilla avanza, las paredes de las células del arilo se van lignificando (Svoma, 1997; 1998). Además las células que lo constituyen pueden contener sustancias de reserva, por ejemplo los lóbulos del arilo de *Cananga odorata*, *Xylopia aromatica* y *Bocageopsis canescens* presentan lípidos y en ocasiones sustancias amarillentas (Svoma, 1999; Corner, 1949).

#### *Tapón micropilar*

El tapón micropilar está formado por la múltiple endotesta (Figura 46D) (Svoma, 1997; Martínez *et al.* 2013). Este tejido está bien desarrollado, frecuentemente como un tapón leñoso y cónico en muchas semillas de anonáceas. (Figura 46E) El tapón cierra la abertura que queda en la testa por el desprendimiento de la semilla (Corner, 1949).





**Figura 46.** Pericalaza, tejido vascular y tapón micopilar. A-B) Haz vascular en semilla muy joven de *Artabotrys hexapetalus*, C) Taninos en la pericalaza y diferenciación del xilema y floema en semillas jóvenes de *A. hexapetalus*, D) Tejido micopilar en semilla madura de *Annona squamosa*, E) Micrópilo y tapón micopilar en semilla madura de *A. macrophyllata*. cn, cutícula nucelar; end, endospermo; ent, endotesta; fl, floema; hvr, haz vascular del rafe; hvar, haz vascular del antirafe; mic, micrópilo; nu, nucela; par, parénquima; pc, pericalaza; ti, tegmen; te, testa; t mic, tejido micopilar; tpm, tapón micopilar; vt; tejido vascular; x, xilema. Imágenes modificadas de A-C) Svoma (1997), D) Martínez *et al.* (2016), E) González-Esquínca *et al.* (2015).

## Discusión

La literatura especializada en el desarrollo de las semillas de Annonaceae y sus familias relacionadas es escasa. En general, las investigaciones están enfocadas en caracterizar a las semillas maduras.

El embrión de las anonáceas es pequeño y se caracteriza por desarrollarse después de que el endospermo ha sustituido a la nucela (Corner, 1949; Svoma, 1997, 1998; Corona *et al.* 2016). Algunos autores señalan que las especies de anonas que tienen latencia presentan una latencia morfofisiológica, con un embrión escasamente desarrollado (Baskin & Baskin, 2001), sin embargo, en *Annona macrophyllata* está totalmente desarrollado al momento de la dispersión (González-Esquinca *et al.* 1997 en González-Esquinca *et al.* 2015).

En cuanto al perispermo, en la mayoría de las semillas de Anonáceas es reemplazada por el endospermo, sin embargo en el género *Desmos*, en *Polyalthia purpurea* y *Canangium odoratum* permanece como una cutícula de color café. Además, Corner (1949) encontró otra peculiaridad en las semillas de *Annona squamosa* y *Desmos dasymaschala*: la presencia, en el endospermo, de células oleíferas hipodermales de la nucela. El autor menciona que es necesario conocer la ontogenia de las semillas para saber si esas células oleíferas provienen del tejido del endospermo o de la nucela, ya que no es fácil determinarlo. Por la falta de estudios se desconoce si esta característica es igual en el resto de las especies, especialmente en aquellas que tienen alto contenido de aceites.

También es importante señalar que el metabolismo secundario de las Annonaceae está caracterizado por la presencia de las llamadas acetogeninas y que estas moléculas invariablemente se encuentran en el endospermo de todas las semillas (Cavé *et al.* 1997; Zafra-Polo *et al.* 1996, 1998), específicamente en los idioblastos (Laguna *et al.* 2015; Brechú-Franco *et al.* 2016).

La cubierta de las semillas puede ser dura o suave en función de las especies, por ejemplo *Annona lutescens* y *A. muricata* presentan una cubierta suave y papilosa en tanto que las semillas de *A. macrophyllata* y *A. purpurea* son duras y fibrosas (González-Esquinca, observación personal). Aunque la cubierta de algunas especies está formada por

la testa y el tegmen, Corner (1949) aclara que no es un patrón extendido para todas las anonáceas, ya que las semillas de *Canangium odoratum*, *Mezzettia leptopoda* y *Xylopia curtisii* presentan, además, un tegumento medio.

La composición de la testa por capas de células fibrosas y lignificadas, y algunas con cristales, proporcionándoles dureza y protección a las semillas (Corner, 1949; Svoma, 1997, 1998). Además la presencia de taninos (Corner, 1949; Svoma, 1997, 1998), sugiere una protección extra frente a la depredación, ya que estos metabolitos secundarios provocan estrés oxidativo en los herbívoros (Salminen & Karonen, 2011).

Aún se desconoce la función de las ruminaciones, algunos autores sugieren que éstas pueden facilitar el suministro de oxígeno, agua y nutrientes al endospermo y embrión en desarrollo, además de mejorar el intercambio gaseoso (Svoma, 1997, 1998; Martínez *et al.* 2013). Después de la germinación, el endospermo ruminado también puede ser importante para el establecimiento y supervivencia de la plántula, ya que tiene la capacidad de proteger al embrión, estirar sus pliegues, nutrir y proteger a las plántulas durante sus primeras etapas de desarrollo (Gottsberger, 2016).

## **Conclusiones**

Las especies de la familia Annonaceae se caracterizan por la pericalaza, que junto con el endospermo ruminado, permite separar a las semillas de esta familia del resto de las Magnoliales. La presencia de las acetogeninas de anonáceas parece ser también una característica única de la familia ya que no se han encontrado en ninguna otra, al igual que la distribución de los idioblastos en las orillas de las ruminaciones.

Este estudio permite vislumbrar el estado del arte sobre el desarrollo de las estructuras de las semillas de anonáceas, y en menor proporción de otras especies filogenéticamente relacionadas. También orienta hacia la realización de investigaciones sobre la anatomía de las semillas de las Magnoliales y la necesidad de incluir estudios ontogénicos para esclarecer las relaciones evolutivas que rodean a este grupo primitivo de plantas.

## IX. LITERATURA CITADA

- Abdalsamee M. & C. Müller. 2012. Effects of indole glucosinolates on performance and sequestration by the sawfly *Athalia rosae* and consequences of feeding on the plant defense system. *Journal of Chemical Ecology*, 38, 1366-1375
- Acuña Castro W. 2010. Actividad insecticida de *Annona diversifolia* frente a *Atta mexicana*. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas, México.
- Ahammadsahib K, Hollingworth R, McGovren J, Hui Y-H. McLaughlin. 1993. Mode of action of bullatacin: A potent antitumor and pesticidal Annonaceous acetogenin. *Life Sciences*, 53(149): 1113-1120.
- Alali F, Liu X, McLaughlin J. 1999. Annonaceous Acetogenins: Recent Progress. *Journal of Natural Products*, 62: 504-540.
- Alamilla B. 2000. Evaluación de la actividad larvicida de cuatro especies del género *Annona*, mediante el bioensayo de *Culex quinquefasciatus* Say. En: Memorias del Primer Congreso Nacional de Anonáceas. Universidad Autónoma de Chapingo, Estado de México, México. Pp. 75-80.
- Álvarez O, Neske A, Popich S, Bardón A. 2007. Toxic Effects of Annonaceous Acetogenins from *Annona cherimolia* (Magnoliales: Annonaceae) on *Spodoptera frugiperda*. *Journal of Pest Science*, 80: 63-67.
- Álvarez O, Barrachina I, Ayala I, González M, Moya P, Neske A, Bardon A. 2008. Toxic effects of annonaceous acetogenins on *Oncopeltus fasciatus*. *Journal of Pest Science*, 81:85-89.
- Alves D, Morejón R, Pina O, Rivero M, Carvalho G, Oliveira D, Bueno V. 2013. Bioatividade de frações de acetogeninas para *Tetranychus tumidus* Banks (Acari: Tetranychidae). En: XIII Simpósio de Controle Biológico. Sociedade Entomológica do Brasil.
- Andrés J & L. Andrés. 2011. Biología, diversidad, conservación y uso sostenible de los recursos genéticos de Annonaceae en México. Universidad Autónoma Chapingo, Centro Regional Universitario Centro Occidente. Texcoco, México. 49 pp.

- Ansante T, do Prado L, Bicalho K, Fernandes J, Vieira P, Vendramim J. 2015. Secondary metabolites from Neotropical Annonaceae: Screening, bioguided fractionation, and toxicity to *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). *Industrial Crops and Products*, 74:969-976.
- Ascencio-Alvarado JI. 2012. Evaluación de la actividad insecticida y repelente del extracto obtenido a partir de la semilla de *Annona diversifolia* (anona) sobre el *Zabrotes subfasciatus* (gorgojo común del frijol). Tesis de Licenciatura. Universidad de El Salvador. San Salvador, El Salvador. 99 pp.
- Ashmead WH. 1894. Descriptions of new parasitic Hymenoptera. *Transactions of the American Entomological Society* (1890-), 21(3), 318-344.
- Baden CU, Franke S, Dobler S. 2013. Host dependent iridoid glycoside sequestration patterns in *Cionus hortulanus*. *Journal of Chemical Ecology*, 39, 1112-1114.
- Ballesteros G, Rodríguez LA, De la Paz J, Zavala F, Martínez JP, Flores L, Puche F, Marroquín L. 2006. Diversidad en las ilamas (*Annona diversifolia* Saff.) de la Tierra Caliente del Balsas, México. SAGARPA, REMA, CINVESTAV, Instituto Tecnológico de Cd. Hidalgo. 55 pp.
- Bakker ME. & P. Bass. 1993. Cells walls in oil and mucilage cells. *Acta Botanica Neerlandica*, 42(2):133-139.
- Bakker ME. & AF. Gerritsen. 1990. Ultraestructure and development of oil idioblastos in *Annona muricata* L. *Annals of Botany*, 66:673-686.
- Bakker ME & AF Gerritsen. 1992. Oil and mucilage cells in *Annona* (Annonaceae) and their systematic significance. *BLUMEA*, 36: 411-438
- Bandeira WT, Pereira V, Porto L. 2011. Bioatividade do extrato bruto de *Annona mucosa* (Annonaceae) sobre ninfas do percevejo marrom *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae). Anais do Congresso de Iniciação Científica, Brasil.
- Barbosa PMJ, dos Anjos N, Picanco M. 1997. Ciclo biológico del barrenador de semilla de Guanábana (Hymenoptera: Eurytomidae). *Agronomía tropical*, 47 (4): 507-519.

- Bermejo A, Figadère 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*, 22:269-303
- Bobadilla M, Zabala F, Sisniegas M, Zavaleta G, Mostacero J, Taramona L. 2005. Larvicidal evaluation of aqueous suspensions of *Annona muricata* Linneaus «custard apple» against *Aedes aegypti* Linnaeus (Diptera, Culicidae). *Revista Peruana Biología*, 1(12): 145-152.
- Bobadilla M, Zabaleta G, Gil F, Pollack L, Sisniegas M. 2002. Efecto bioinsecticida del extracto etanólico de las semillas de *Annona cherimolia* Miller y *A. muricata* Linneaus “graviola” seeds against *Anopheles* sp. *Revista Peruana de Biología*, 9(2): 64-73.
- Bonfil A. 2010. Semilla. En: Azcárraga M, Jáquez MP, Bonfil A, Sandoval E (eds). Atlas de anatomía vegetal. Universidad Nacional Autónoma de México. Pp: 251-268.
- Brechú-Franco A, Laguna-Hernández G, De-la-Cruz-Chacón I, González-Esquinca AR. 2016. In situ histochemical localisation of alkaloids and acetogenins in the endosperm and embryonic axis of *Annona macrophyllata* Donn. Sm. seeds during germination. *European Journal of Histochemistry*, 60:2568. doi:10.4081/ejh.2016.2568
- Brower LP, Seiber JN, Nelson CJ, Lynch SP, Hoggard MP, Cohen JA. 1984. Plant determined variation in cardenolide content and thin-layer chromatography profiles on monarch butterflies, *Danaus plexippus* reared on milkweed plants in California *Asclepias californica*. *Journal of Chemical Ecology*, 12(10): 1823-1857.
- Bruner S. & J. Acuña. 1967. Sobre la biología de *Bephrata cubensis* Ahsm., el insecto perforador de las frutas de anonáceas. Academia Ciencias Cuba. *Inst. Agrono. Ser. Agr*, 1:14.
- Castañeda-Vildózola A, Nava-Díaz C, Váldez-Carrasco J, Ruiz-Montiel C, Vidal-Hernández L, Barrios-Matías S. 2010. Distribution and host range of *Bephratelloides cubensis* Ashmead (Hymenoptera: Eurytomidae) in Mexico. *Neotropical Entomology*, 39(6): 1053-1055.
- Cavé A, Figadère B, Laurens A, Cortés D. 1997. Acetogenins from Annonaceae. *Fortschritte der Chemie Organischer Naturstoffe*, 70:81-288.



- Champy P, Melot A, Guérineau E, Gleye C, Fall D, Höglinger G, Ruberg M, Lannuzel A, Laprèvote O, Laurens A, Hocquemiller R. 2005. Quantification of acetogenins in *Annona muricata* linked to atypical parkinsonism in guadeloupe. *Movement Disorders Journal*, 20(12): 1629-1633.
- Chang R. 1998. Descripción de *Bephratelloides duguetiphagus* n. sp (HYMENOPTERA: EURYTOMIDAE) criados de frutos de *Duguetia panamensis* Standl. (Annonaceae). Tesis de maestría. Universidad de Panamá. Panamá, República de Panamá. 38 pp.
- Chatrou L. 2013. Annonaceae, a model group for plant evolution in the tropics. En: V International Congress & Brazilian Meeting about Annonaceae: from gene to exportation. Brazil. Pp. 11.
- Chatrou L, Pirie M, Erkens R, Couvreur T, Neubig K, Abbott J, Mols J, Maas J, Saunders R, Chase M. 2012. A new subfamilial and tribal classification of the pantropical flowering plant family Annonaceae informed by molecular phylogenetics. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 169: 5-40.
- Claramunt R. 2013. Introducción a la química de los productos naturales. En: Claramunt R, Farrán M, López C, Pérez M, María D. (Coordinadores). Química Bioorgánica y Productos Naturales. Universidad Nacional de Educación a Distancia. Pp: 197-218.
- Corner E. 1949. The annonaceous seed and its four integuments. *New Phytol* 48(3):332-364.
- Corona TL, Andrés-Hernández RA, Figueroa-Castro DM, Campos A. 2016. Anatomy of the reproductive structures of *Stenanona flagelliflora* (Annonaceae). *Brazilian Journal of Botany*. 39(2): 679-687.
- Cortés D, Moreno L, Párraga J, Galán A, Cabedo N. 2014. Nuevos fármacos inspirados en Annonáceas. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 36: 22-31. <https://dx.doi.org/10.1590/S0100-29452014000500003>
- Costa MS, Pinheiro DO, Serrão JE, Pereira MJB. 2012. Morphological changes in the midgut of *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) larvae following exposure to an *Annona coriacea* (Magnoliales: Annonacea). *Neotropical Entomology*, 41(4): 311-314.
- Coto D & JL. Saunders. 2004. Insectos plagas de cultivos perennes con énfasis en frutales en América Central. CATIE. 400 pp.

- Couvreur TL, Maas PJ, Meinke S, Johnson DM, Keßler, PJ. 2012. Keys to the genera of Annonaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 169(1): 74-83.
- Dadang EDF, Dwi E, Prijono D. 2009. Effectiveness of two botanical insecticide formulations to two major cabbage insect pests on field application. *International Society for Southeast Asian Agricultural Sciences*, 15(1): 42-51.
- Dadang EDF, Dwi E, Prijono D. 2011. Field efficacy of two botanical insecticide formulations against cabbage insect pest, *Crocidolomia pavonana* (F.) (Lepidoptera: Pyralidae) and *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Yponomeutidae). *International Society for Southeast Asian Agricultural Sciences*, 17(2): 38-47.
- De la Cruz Chacón I. 2001. Acetogeninas bioactivas de *Annona diversifolia* Safford. Tesis de licenciatura. Ingeniería Bioquímica. Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México. 86 pp.
- De la Cruz Chacón I. 2012. Alcaloides Bencilisoquinolínicos y su relación órgano-específica en las primeras fases de desarrollo de *Annona diversifolia* Safford. Tesis de Doctorado. Posgrado en Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Autónoma de México. 164 pp.
- De-la-Cruz-Chacón I, Riley-Saldaña CA, González-Esquinca AR. 2013. Secondary metabolites during early development in plants. *Phytochem Rev*, 12:47-64.
- De-la-Cruz-Chacón I, Castro-Moreno, M, Luna-Cázares LM, González-Esquinca AR. 2016. La familia Annonaceae Juss. En México. *LACANDONIA*, 2(10): 71-82.
- Del Val E. 2012. Herbivoría. En: Del Val, E., Boege, K. (coordinadoras). Ecología y evolución de las interacciones bióticas. Fondo de Cultura Económica/ Centro de Investigaciones en Ecosistemas/ Universidad Nacional Autónoma de México. Pp: 43-74
- De Mendoça FAC, Da Silva KFS, Dos Santos KK, Ribeiro KAL, Sant'Ana AEG. 2005. Activities of some Brazilian plants against larvae of the mosquito *Aedes aegypti*. *Fitoterapia*, 76: 629-636.
- Després L, David J, Gallet C. 2007. The evolutionary ecology of insect resistance to plant chemicals. *Trends in Ecology & Evolution*, 22(6): 298-307.

- Di-Toto L, Álvarez O, Popich S, Neske A, Bardón A. 2010. Antifeedant and toxic effects of acetogenins from *Annona montana* on *Spodoptera frugiperda*. *Journal of Pests Science*, 83: 307-310.
- Domínguez Gutú LM. 2010. Estudios de germinación de *Annona diversifolia* Safford (Annonaceae) variedad blanca (papausa). Tesis de licenciatura. Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México. 94 pp.
- Dos Santos R., Ribeiro L., Mercadente-Simões M. O., Costa M., Nietzsche S., Pereira M. 2014. Stenospermy and seed development in the “Brazilian seedless” variety of sugar apple (*Annona squamosa*). *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*, 86(4): 2101-2108.
- Duarte M, Oliveira R, & Souza D. 2016. Leaf and stem anatomy of two Species of *Rollinia* (Annonaceae): *R. rugulosa* and *R. mucosa*. *Visão Acadêmica*, 16(3).
- Durán-Ruiz CA, Cruz-Ortega R, Zaldívar-Riverón A, Zavaleta-Mancera HA, De-la-Cruz-Chacón I, González-Esquinca AR. 2018. Ontogenic synchronization of *Bephratelloides cubensis*, *Annona macrophyllata* seeds and acetogenins from Annonaceae. *Journal of Plant Research*, en prensa.
- Durán-Ruiz CA, Zavaleta-Mancera HA, González-Esquinca AR. 2016. Estudio preliminar de las ruminaciones durante el desarrollo de semillas de *Annona macrophyllata* Donn. Smith. En: Memorias Técnicas del 6° Congreso Internacional y 8° Congreso Nacional de Anonáceas “Las anonáceas en el Antropoceno”. 19 al 22 de octubre de 2016, Nuevo Vallarta, Nayarit.
- Endress PK. 1996. Diversity and evolutionary biology of tropical flowers. Cambridge University Press.
- Esposti M, Ghelli A, Ratta M, Cortes D, Estornell E. 1994. Natural substances (acetogenins) from the family Annonaceae are powerful inhibitors of mitochondrial NADH dehydrogenase (Complex I). *Biochem J*, 301:61-167.
- Espinosa-Osornio G, Engleman M. 1998. Breve recopilación de anatomía de semillas. Colegio de Postgraduados. México. 45 pp.

- Evangelista LS, Valdés EME, & Llanos LA. 1999a. Tabla de vida de *Bephratelloides cubensis* (Hymenoptera: Eurytomidae) bajo condiciones de laboratorio. Memorias del II Congreso Internacional de Anonáceas. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. México. Pp. 209-216.
- Evangelista LS, Llanos LA, Valdés EME. 1999b. Descripción morfológica de *Bephratelloides cubensis* (Hymenoptera: Eurytomidae), Segundo congreso internacional de Anonáceas. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. México. Pp 204-208.
- Florez Y. & Martínez E. 2010. Obtención y evaluación de extractos bioactivos presentes en semillas de *Annona muricata* de la región cafetalera. Tesis de licenciatura. Universidad Tecnológica de Pereira. Pereira, Colombia. 76 pp.
- Fontana JD, Lanças FM, Passos M, Cappelaro EE, Vilegas J, Baron M, Nosedá M, Pomílio A. B, Vitale A, Webber AC, Maul AA, Peres WA, Foerster LA. 1998. Selective polarity- and adsorption- guided extraction/purification of *Annona* sp. polar acetogenins and biological assay against agricultural pests. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 70: 67-76.
- Freitas AF, Pereiral FF, Formagio ASN, Lucchetta JT. 2013. Atividade bioinsecticida de extractos metanólicos sobre *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). En: XIII Simpósio de Controle Biológico. Sociedade Entomológica do Brasil. Brasil.
- Fujimoto Y, Eguchi T, Kakinuma K, Ikekawa N, Sahai M, Gupta Y. 1988. Squamocin, a new cytotoxic bis-tetrahydrofuran containing acetogenin from *Annona squamosa*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 36(12): 4802-4806.
- Fürstenberg-Hägg J, Zagrobelny M, Bak S. 2013. Plant defense against insect herbivores. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(5): 10242-10297.
- Galastri N. Morfoanatomía e ontogenese de frutos e sementes de *Annona dioica* A. St.-Hil., *bonfil* (A. St-Hil.) Saff. e *Xylopia emarginata* Mart. (Annonaceae). 2008. Tesis de Posgrado. Maestría en Ciencias Biológicas. Universidade Estadual Paulista.
- González-Coloma A, Guadano A, Inés C, Martínez-Díaz R, Cortes D. 2002. Selective action of acetogenin mitochondrial complex I inhibitors. *Z Naturforsch*, 57C(11-12):1028-1034.

- González Esquinca AR. 2001. Contribución al Estudio del Género *Annona* (Annonaceae), Análisis Fitoquímico de Tres Especies del Estado de Chiapas. Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas- Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- González-Esquinca A, Luna-Cazáres L, Gutiérrez-Jiménez J, Schlie-Guzmán M, Vidal-López D. 2011. Anonáceas: plantas antiguas, estudios recientes. UNICACH. pp. 14-15.
- González-Esquinca AR, De-La-Cruz-Chacón I, Castro-Moreno M, Orozco-Castillo JA, Riley-Saldaña CA. 2014. Alkaloids and acetogenins in Annonaceae development: biological considerations. *Rev Bras Frutic*, 36(SPE1):01-16.
- González-Esquinca AR, De-La-Cruz-Chacón I, Castro-Moreno M, Riley-Saldaña CA. 2016. Phenological strategies of *Annona* species from the tropical deciduous forest of Chiapas, Mexico. *Botanical Sciences*, 94(3): 531-541.
- González-Esquinca AR, De-la-Cruz-Chacón I, Domínguez-Gutú LM. 2015. Dormancy and germination of *Annona macrophyllata* (Annonaceae): the importance of the micropilar plug and seed position in the fruits. *Botanical Sciences*, 93(3): 509-515.
- González-Esquinca AR, Luna-Cazáres LM, Schlie-Guzmán MA, Chacón I, Laguna Hernández G, Flores Breceda S, Montoya Gerardo P. 2012. In vitro larvicidal evaluation of *Annona muricata* L., *A. diversifolia* Saff. and *A. lutescens* Saff. extracts against *Anastrepha ludens* Larvae (Diptera, Tephritidae). *Interciencia*, 4(37): 284-289.
- González M, Tormo J, Bermejo A, Zafra-Polo M, Estorell E, Cortés D. 1997. Rollimembrina, a novel acetogenin inhibitor of mammalian mitochondrial complex I. *Bioorg Med Chem Lett*, 7(9):1113-1118.
- González-Sánchez JN, 2014. Interacción de *Bephratelloides cubensis* con frutos de *Annona macrophyllata* Donn Sm. Tesis de licenciatura. Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México. 57 pp.
- Gottsberger G. 2012. How diverse are Annonaceae with regard to pollination? *Botanical Journal of the Linnean Society*, 169: 245-261.
- Gottsberger G. 2014. Evolutionary steps in the reproductive biology of Annonaceae. Palestra Anonáceas. V Congresso Internacional & Encontro Brasileiro sobre

- Annonaceae: do gene à exportação (19 a 23 de Agosto de 2013). Botucatu-SP. 36: 032-042.
- Gotssberger G. 2016. The reproductive biology of the early-divergent genus *Anaxagorea* (Annonaceae), and its significance for the evolutionary development of the family. *Acta Botanica Brasilica*, 30(2): 313-325.
- Grissell E. & Schauff M. 1990b. A synopsis of the seed-feeding genus *Bephratelloides* (Chalcidoidea: Eurytomidae). *Proceedings of the Entomological Society of Washington*, (92)2: 177-187.
- Grissell EE. & Foster MS. 1996. A new *Bephratelloides* (Hymenoptera: Eurytomidae) from seed of *Cymbopetalum* (Annonaceae) in Mexico. *Proceedings of the Entomological Society of Washington*, 98(2): 256-263.
- Guadaño A, Gutiérrez C, De la Peña E, Cortés D, González-Coloma A. 2000. Insecticidal and mutagenic evaluation of two annonaceous acetogenins. *Journal of Natural Products*, 63: 773-776.
- Gupta A, Pandey S, Shah D, Yadav J, Seth N. 2011. Annonaceous Acetogenins: the unrevealed area for cytotoxic and pesticidal activities. *Systematic Reviews in Pharmacy*, 2(2): 104-109.
- Hammer Ø, Harper DAT, Ryan PD. 2001. PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analysis. *Paleontología Electrónica*, 4(1):1-9.
- Hayat MF. 1963. Morphology of seed germination and seedling in *Annona squamosa*. *Botanical Gazette*, 124: 360-362.
- He K, Zeng L, Ye Q, Shi G, Oberlies N, Zhao G-X, Njoku C, McLaughlin J. 1997. Comparative SAR evaluations of annonaceous acetogenins for pesticidal activity. *Journal of Pests Sciences*, 49: 372-378.
- Hernández-Fuentes LM, Urias-López MA, Bautista-Martínez N. 2010. Biología y hábitos del barrenador de la semilla *Bephratelloides cubensis* Ashmead (Hymenoptera: Eurytomidae). *Neotropical Entomology*, 39(4): 527-534.
- Heu R. 1988. *Bephratelloides* (= *Bephrata*) *cubensis*. *Proceedings of the Hawaiian Entomological Society*, 28: 4.



- Hincapié C, Lopera D, Ceballos M. 2008. Actividad insecticida de extractos de semilla de *Annona muricata* (Anonaceae) sobre *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). *Revista Colombiana de Entomología*, 34(1): 76-82.
- Jolad D, Hoffmann J, Schram K, Cole J. 1982. Uvaricin, a new antitumor agent from *Uvaria accuminata* (Annonaceae). *The Journal of Organic Chemistry*, 47(16): 3151-3153.
- Julián-Loeza AP. 2011. Chemical composition, color, and antioxidant activity of three varieties of *Annona diversifolia* Safford fruits. *Industrial Crops and Products*, 34: 1262– 1268.
- Kawazu K, Alcantara J, Kobayashi A. 1989. Isolation and structure of neoannonin, a novel insecticidal compound from the seeds of *Annona squamosa*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 53(10): 2719-2722
- Kemprij V. & S. Bath. 2011. Acute and reproductive toxicity of *Annona squamosa* to *Aedes albopictus*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 100: 82–86.
- Korytkowski G. & D. Ojeda. 1966. *Bephrata cubensis* Ashmead (Hym.: Eurytomidae), una nueva especie dañina a las anonáceas en el Perú. *Rev. Per. de Ent.*, (9)1: 56-60.
- Krinski D. & A. Massaroli. 2014. Nymphicidal effect of vegetal extracts of *Annona mucosa* and *Annona crassiflora* (Magnoliales, Annonaceae) against rice stalk stink bug, *Tibraca limbativentris* (Hemiptera, Pentatomidae). *Revista Brasileira de Fruticultura*, 36: 210-217.
- Laguna G, Brechú A, De-la-Cruz-Chacón I, González-Esquinca AR. 2015. Histochemical detection of acetogenins and storage molecules in the endosperm of *Annona macrophyllata* Donn Sm. seeds. *European Journal of Histochemistry*, 59:2502. doi:10.4081/ejh.2015.2502
- Langel D. & D. Ober. 2011. Evolutionary recruitment of a flavin-dependent monooxygenase for stabilization of sequestered pyrrolizidine alkaloids in arctiids. *Phytochemistry* 72, 1576-1584.
- Lannuzel A, Michel P, Höglinger G, Champy P, Jousset A, Medja F, Lombès A, Darios F, Gleye C, Laurens A, Hocquemiller R, Hirsch EC, Ruberg M. 2003. The mitochondrial complex

- I inhibitor annonacin is toxic to mesencephalic dopaminergic neurons by impairment of energy metabolism. *Neuroscience*, 121(2): 287-296.
- Lau, J., Pang, C., Ramsden, L., Saunders, R. 2016. Reproductive resource partitioning in two sympatric *Goniothalamus* species (Annonaceae) from Borneo: floral biology, pollinator trapping and plant breeding system. *Nature*, 6: 1-14.
- Leatemia A. & M. Isman. 2004a. Insecticidal activity of crude seed extracts of *Annona* spp., *Lansium domesticum* and *Sandoricum koetjape* against lepidopteran larvae. *Phytoparasítica*, 32(1): 30-37.
- Leatemia A. & M. Isman. 2004b. Toxicity and antifeedant activity of crude seed extracts of *Annona squamosa* (Annonaceae) against lepidopteran pests and natural enemies. *International Journal of Tropical Insect Science*, 24(2): 150–158.
- Leboeuf M, Cavé A, Bhaumik PK, Mukherjee B, Mukherjee R. 1982. *Phytochemistry*, 21(12): 2783-2813.
- Lewis M, Arnason J, Philogene B, Rupprecht J, McLaughlin. 1993. Inhibition of respiration at Site I by Asimicin, an insecticidal acetogenin of the Pawpaw, *Asimina triloba* (Annonaceae). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 45: 15-23.
- Li N, Shi Z, Tang Y, Chen J, Li X. 2008. Recent progress on the total synthesis of acetogenins from Annonaceae. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 4(98): 1-62.
- Liaw C-C, Liou J-R, Wu T-Y, Chang F-R, Wu Y-C. 2016. Acetogenins from Annonaceae. In: Kinghorn AD, Falk H, Gibbons S, Kobayashi J (eds.) Progress in the Chemistry of Organic Natural Products. *Springer International Publishing Switzerland*, 113(101) DOI 10.1007/978-3-319-22692-7\_2
- Lieb F, Nonfon M, Wachendorff-Neumann U, Wendisch D. 1990. Annonacins and Annonastatin from *Annona squamosa*. *Planta Medica*, 56(3): 317-319.
- Lima L, Alves T, Zani C, Sales P, Romanha A, Johann S, Cisalpino P, Pimenta L, Boaventura M (2014) *In vitro* cytotoxic, antifungal, trypanocidal and leishmanicidal activities of acetogenins isolated from *Annona cornifolia* A. St. -Hil. (Annonaceae). *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 86(2):829-839.

- Londershansen M, Leicht W, Lieb F, Moescheler H, Weiss H. 1991. Molecular mode of action of annonins. *Pesticide Science*, 33(4): 427-438.
- Lora J, Hormaza JI, Herrero M. 2010. The progamic phase of an early-divergent angiosperm, *Annona cherimola* (Annonaceae). *Annals of Botany*, 105: 221-231.
- Luna-Cazares LM. & AR González-Esquinca .2010. Susceptibility of complete bacteria and spheroplasts of *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella typhi* to rolliniastatin-2. *Natural Product Research*, 24(12): 1139-1145.
- Marroquín-Andrade L, Cuevas-Sánchez JA, Guerra Ramírez D, Reyes L, Reyes-Chumacero A, Reyes-Trejo B. 2011. Proximate composition, mineral nutrient and fatty acids of the seed of ilama, *Annona diversifolia* Saff. *Sci Res Essays* 6(14):3089–3093.
- Martin J, Madigosky S, Gu Z-M, Zhou D, Wu J, McLaughlin J. 1999. Chemical defense in the zebra swallowtail butterfly, *Eurytides marcellus*, involving annonaceous acetogenins. *Journal of Natural Products*, 62:2–4.
- Martínez F, Miranda L, Magnitskiy S. 2013. Anatomy of sugar apple (*Annona squamosa* L.) seeds (Annonaceae). *Agronomía Colombiana*, 31(3): 279-287.
- Martínez M. 1999. Introducción. En: II Congreso Internacional de Anonáceas. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México. Pp: 9-13.
- Martínez-Vázquez M. & R. Estrada-Reyes. 2013. Secondary metabolism in Annonaceae: potential source of drugs. En: V International Congress & Brazilian Meeting about Annonaceae: from gene to exportation. Brazil. Pp: 21-22.
- Massaroli A, Pereira MJB, Foerster L. 2013. En: XIII Simpósio de Controle Biológico. Sociedade Entomológica do Brasil, Brasil.
- Mello MO. & MC. Silva-Filho .2002. Plant-insect interactions: an evolutionary arms race between two distinct defense mechanisms. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 14(2), 71-81.
- Micheletti S, Broglio MF, Agra AGSDM, Barbosa GVS, Gomes FL. 2001. Control of *Cerconota anonella* (Sepp.) (Lep.: Oecophoridae) and *Bephratelloides pomorum* (Fab.)(Hymenoptera: Eurytomidae) in soursop (*Annona muricata* L.). *Revista Brasileira de Fruticultura*, 23(3), 722-725.

- Miyoshi H, Ohshima M, Shimada H, Akagi T, Iwamura H, McLaughlin JL. 1998. Essential structural factors of annonaceous acetogenins as potent inhibitors of mitochondrial complex. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1365(3): 443-452.
- Morales CA, González R, Aragón R. 2004. Evaluación de la actividad larvica de extractos polares y no polares de acetogeninas de *Annona muricata* sobre larvas de *Aedes aegypti* y *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae). *Revista Colombiana de Entomología*, 30(2): 187-192.
- Morré DJ, De Cabo R, Farley C, Oberlies NH, McLaughlin JL. 1995. Mode of action of bullatacin, a potent antitumor acetogenin: inhibition of NADH oxidase activity of HeLa and HL-60, but not liver, plasma membranes. *Life Sciences*, 56(5): 343-348.
- Murcia DA. & M.F. Salamanca. 2006. Búsqueda de microorganismos potenciales controladores de *Bephratelloides maculicollis* plaga de *Annona muricata* L., en algunos cultivos de los departamentos del Tolima y Cundinamarca. Tesis de Posgrado. Pontificia Universidad Javeriana. 61 pp.
- Nadel H. & J. Peña. 1991. Hosts of *Bephratelloides cubensis* (Hymenoptera: Eurytomidae) in Florida. *Florida Entomologist*, 74(3): 476-479.
- Narangoda SRCNK. & MMSC. Karunaratne. 2009. Oviposition deterrent and insecticidal activities of some indigenous plants extracts against the rice moth, *Corcyra cephalonica* (Stainton). *Vidyodaya Journal of Sciences*, 14: 143-150.
- Nieves-Aldrey JL, Fontal-Cazalla FM, Fernández F. 2006. Filogenia y evolución de Hymenoptera. En: Fernández, F. & M. J. Sharkey (eds.). Introducción a los Hymenoptera de la Región Neotropical. Sociedad Colombiana de Entomología y Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D. C. 37-56 pp.
- Noyes JS. 2014. Universal Chalcidoidea Database. Publicación electrónica. <http://www.nhm.ac.uk/chalcidoids>
- Ohsawa K, Kato S, Honda H, Yamamoto I. 1990. Pesticidal active substances in tropical plants-insecticidal substance from the seeds of Annonaceae. *Journal of Agricultural Science*, 34(4): 253-258.

- Ornosa C, Ortíz-Sánchez F J. 2004. Hymenoptera, Apoidea I. En: Ramos M A et al (eds) Fauna Ibérica. Museo Nacional de Ciencias Naturales, Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Madrid, 556 pp
- Ortíz-Rodríguez, A.E., Schatz, G., Licona-Vera, Y., Ruiz-Sánchez, E. 2014. A new species of *Stenanona* (Annonaceae) endemic to Chiapas, México. *Botanical Sciences*. 92(1): 37-41.
- Parellada E, Ramos A, Valdez J, Cartagena E, Bardón A, Neske A. 2011. Acetogeninas de anonáceas estimulantes de la producción de autoinductores y biofilms de bacterias degradadoras de HAPs. En: González-Esquica A, Luna-Cazáres L, Gutiérrez-Jiménez J, Schlie-Guzmán M, Vidal-López D (eds). Anonáceas: plantas antiguas, estudios recientes. UNICACH. pp. 143-153.
- Parvin S, Islam E, Rahman M, Haque E. 2003. Pesticidal activity of pure compound annotemoyin-1 isolated from chloroform extract of the plant *Annona squamosa* Linn. against *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 6(12): 1088-1091.
- Pasteels J. 1992. Chemical defense in chrysomelid leaf beetles: storage of host-derived pyrrolizidine alkaloids versus de novo synthesized cardenolides. *Naturwissenschaften*, 79: 521-523.
- Peña JE, Glenn H, Baranowski RM. 1984. Importante insect of *Annona* spp. In Florida. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, 97: 337-340.
- Peña JE. & FD. Bennett. 1995. Arthropods associated with *Annona* in the neotropics. *Florida Entomologist*, 7(2): 329-349.
- Peña J. & J. Nagel. 1988. Effectiveness of pesticides against two tropical fruit pests. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, 101: 249-251.
- Pérez-Amador MC, González Esquinca A, García Argáez A, Bratoeff E, Labastida C. 1997. Oil composition and flavonoid profiles of the seeds of three *Annona* species. *Phyton*, 61(1/2):77-80.

- Pérez-Pacheco R, Rodríguez C, Lara-Reyna J, Montes R, Ramírez G. 2004. Toxicidad de aceites, esencias y extractos vegetales en larvas de mosquito *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). *Acta Zoológica Mexicana*, 20(1): 141-152.
- Pereira MJB, Anjos N, Eiras AE. 2003. Oviposição da broca-da-semente de graviola *Bephratelloides pomorum* (Fabricius, 1908) (Hymenoptera: Eurytomidae). *Arquivos do Instituto Biológico*, 70(2), 221-224.
- Perioto N. 1997. Emergence of *Bephratelloides* sp. (Hymenoptera: Eurytomidae) from seeds collected in dregs of *Xylopiá aromática* (Annonaceae). *Arquivos do Instituto Biológico*, 64: 135-137.
- Pettit G, Riesen R, Leet J, Polonsky J, Smith C, Schmidt J, Dufresne C, Schaufelberger D, Moretti C. 1989. Isolation and structure of Rolliniastatin 2: a new cell growth inhibitory acetogenin from *Rollinia mucosa*. *Heterocycles*, 28(1):213-217.
- Pimenta AC, Rego SS, Zuffellato-Ribas KC, Nogueira AC, Koehler HS. 2013. Morphological characterization of fruits, seeds and seedlings of araticum plant (*Annona crassiflora* Mart-Annonaceae). *Journal of Seed Science*, 35(4), 524-531.
- Pinheiro A, Barbosa MJ, Galbiati C. 2011. Efeito biocida de *Annona coriacea* Mart 1841 sobre ovos e ninfas do vetor *Rhodnius neglectus* Lent 1954. *Neotropical Biology and Conservation*, 6(2): 131-136.
- Pinheiro A, Barbosa MJ, Galbiati C. 2013. Biocide activity of *Annona coriacea* seeds on *Rhodnius neglectus* (Hemiptera: Reduviidae). *Revista de Biología Tropical*, 61(1): 419-427.
- Piñol M, Palazón J, Cusidó R. 2008. Introducción al metabolismo secundario. En: Azcón-Bieto J. & M. Talón (Coordinadores). *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. McGraw-Hill/ Interamericana. Universitat de Barcelona. España. Pp: 323-348.
- Pirie MD. & JA. Doyle. 2012. Dating clades with fossils and molecules: the case of Annonaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 169(1), 84-116.
- Plagge C, Son NT, Ng PL, Türkay M, Streit B, Klaus S. 2016. *Liocarcinus corrugatus* (Pennant, 1777)(Crustacea: Brachyura: Portunidae): a cosmopolitan brachyuran species?. *Raffles Bulletin Of Zoology*, 64, 374-388.



- Pomper K, Lowe J, Crabtree S, Keller W. 2009. Identification of annonaceous acetogenins in the ripe fruit of the north american pawpaw (*Asimina triloba*). *Journal of agricultural and food chemistry*, 57: 8339-8343.
- Quicke DL. 2015. Inmature stages. In: Quicke D (ed). *The Braconid and Ichneumonid Parasitoid wasps: Biology, Systematics, Evolution and Ecology*. First Edition. John Wiley & Sons. pp: 71-86.
- Ratnayake RMCS, Gunatilleke IAUN, Wijesundara ADS, Saunders RMK. 2006. Reproductive biology of two sympatric species of *Polyalthia* (Annonaceae) in Sri Lanka. I. Pollination by curculionid beetles. *International Journal of Plant Sciences*, 167(3):483–493.
- Read C & R Menary. 2000. Analysis of the contents of oil cells in *Tasmannia lanceolata* (Poir.) A. C. Smith (Winteraceae). *Annals of Botany*, 86:1193-1997.
- Reyes-Trejo B, Marroquin L, Peralta M, Navarrete A, Joseph-Nathan P. 1997. Laherradurina: Acetogenina activa de *Annona diversifolia* Safford. En: *Memorias del I Congreso Internacional de Anonáceas*. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Estado de México, México, pp. 24.
- Reyes-Trejo B, Vázquez V, Guerra D, Zuleta H, Reyes L, Sánchez H. 2014. Estudio fitoquímico biodirigido de la actividad insecticida de semillas de *Annona diversifolia* Saff. en larvas de *Aedes aegypti* L. En: *Memorias del VII Congreso Nacional de Anonáceas 2014*. Universidad Veracruzana. Xalapa, Veracruz. Pp: 56-57 pp.
- Riley-Saldaña CA, Cruz-Ortega MR, Vázquez M, De-la-Cruz-Chacón I, Castro-Moreno M, González-Esquinca AR. 2017. Acetogenins and alkaloids during the initial development of *Annona muricata* L.(Annonaceae). *Zeitschrift für Naturforschung C*, 72(11-12), 497-506.
- Rodrigues AMS, De Paula JE, Degallier N, Molez JF, Espíndola LS. 2006. Larvicidal activity of some cerrado plant extracts against *Aedes aegypti*. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 22(2): 314-317.

- Rodríguez G, Velasco J, Velasco M. 1980. Producción de guanábano (*Annona muricata*) en el estado de Nayarit). En: III Simposium de la Investigación, Desarrollo Experimental y la Docencia en CONAFRUT durante 1979. Xalapa, Veracruz. Pp: 141-153.
- Rohlf FJ. 2016a. tpsDig. digitize landmarks and outlines: Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook.
- Rohlf FJ. 2016b. tpsUtil. file utility program: Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook.
- Rohlf FJ. 2017. tpsRelw. relative warps analysis: Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook.
- Rosenthal G. 1983. Biochemical adaptations of the bruchid beetle, *Caryedes brasiliensis* to L-canavanine, a higher plant allelochemical. *Journal of Chemical Ecology*, 9(7): 803–815.
- Ríos JL, Cortés D, Valverde S. 1989. Acetogenins, Aporphinoids, and Azaanthraquinone from *Annona cherimolia* Seeds. *Planta Medica*, 55(3):321-3.
- Rueda-Pérez M. 2010. Actividad insecticida de *Annona diversifolia* Safford sobre *Anastrepha ludens*. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas, México.
- Safford W. 1912. *Annona diversifolia*, a custard-apple of the Aztecs. *Journal of the Washington Academy of Sciences*, 2(1): 118-125.
- Salminen, J. P., & Karonen, M. 2011. Chemical ecology of tannins and other phenolics: we need a change in approach. *Funct. Ecol.* 25(2), 325-338.
- Saunders RM. 2012. The diversity and evolution of pollination systems in Annonaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 169(1), 222-244.
- Scharaschkin T. & L. Doyle. 2006. Character evolution in *Anaxagorea* (Annonaceae). *American Journal of Botany*, 93(1):36-54.
- Schroeder CA. 1951. Fruit morphology and anatomy of the cherimoya. *Botanical Gazette*, 436-446

- Schlie-Guzmán MA, García-Carrancá A, González-Esquinca AR. 2009. *In Vitro* and *In Vivo* antiproliferative activity of laherradurin and cherimolin-2 of *Annona diversifolia* Saff. *Phytotherapy Research*, 23: 1128-1133.
- Schlie-Guzmán M, García-Carrancá A, Gutiérrez-Jiménez J, Vidal-López D. 2011. Administración *in vivo* de acetogeninas guiada por la concentración inhibitoria media *in vitro*. En: González-Esquinca A, Luna-Cazáres L, Gutiérrez-Jiménez J, Schlie-Guzmán M, Vidal-López D (eds). Anonáceas: plantas antiguas, estudios recientes. UNICACH. pp. 231-247.
- Seffrin R, Shikano I, Akhtar Y, Isman M. 2010. Effects of crude seed extracts of *Annona atemoya* and *Annona squamosa* L. against the cabbage looper, *Trichoplusia ni* in the laboratory and greenhouse. *Crop Protección*, 29: 20-24.
- Sharkey MJ. & F. Fernández. 2006. Biología y diversidad de Hymenoptera. In: Fernández F. & MJ.Sharkey (eds) Introducción a los Hymenoptera de la Región Neotropical. 1st edn, Sociedad Colombiana de Entomología y Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, pp 93-108.
- Silva ITSS, Fernandes MJB, Oliveira RA, Carvalho LD, Cortez PA, São José AR, Conceição AO (2016) *Annona squamosa* L. (Annonaceae): Chemical bioprospection and biological activity in two phenological stages. *Applied Ecology and Environmental Research*, 14(4):133-147
- Somoza Gómez D. 2015. Antocianinas durante en desarrollo temprano de *Annona macrophyllata* Donn Sm. (Annonaceae). Tesis de Licenciatura. Instituto de Ciencias Biológicas. Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. Chiapas, México.
- Spurr I. & R. Brown. 2010. Total Synthesis of Annonaceous Acetogenins Belonging to the Non-Adjacent Bis-THF and Non-Adjacent THF-THP Sub-Classes. *Molecules*, 15: 460-501.
- Standley P. & J. Steyermark. 1946. Flora of Guatemala. Chicago Natural History Museum. USA. 24(4). Pp: 274.
- Svoma E. 1997. Seed development and function in *Artabotrys hexapetalus* (Annonaceae). *Plant Systematic and Evolution*, 207: 205-223.

- Svoma E. 1998. Seed morphology and anatomy in some Annonaceae. *Plant Systematic and Evolution*, 209: 177-204.
- Taiz L. & E. Zeiger. 2002. *Plant Physiology*. 3rd. Ed. Pub. Sinauer.
- Takada M, Kuwabara K, Nakato H, Tanaka A, Iwamura H, Miyoshi H. 2000. Definition of crucial structural factors of acetogenins, potent inhibitors of mitochondrial complex I. *Biochimica et Biophysica acta*, 1460 (2-3): 302-310.
- Takahashi M, Friis EM, Uesugi K, Suzuki Y, Crane PR. 2008. Floral evidence of Annonaceae from the Late Cretaceous of Japan. *International Journal of Plant Sciences*, 169(7), 908-917.
- Tolosa D, Hidalgo J, Sal P, 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*, 3:156-160.
- Tormo J, González M, Cortés D, Stornell E. 1999. Kinetic Characterization of mitochondrial complex I inhibitors using annonaceous acetogenins. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 369(1):119-126.
- TROPICOS.ORG. Missouri Botanical Garden. 30 Sep 2016  
<http://www.tropicos.org/Image/80145>,<http://www.tropicos.org/Image/100160484>;<http://www.tropicos.org/Image/82738>;<http://www.tropicos.org/Image/100129788>
- Van Heusden ECH. 1992. Flowers of Annonaceae: morphology, classification and evolution. *BLUMEA*, 7: 1-218.
- Van Setten AK. & J. Koek-Noorman. 1986. Studies in Annonaceae. VI. A leaf anatomical survey of genera of Annonaceae in the Neotropics. *Botanische Jahrbücher für Systematik, Pflanzengeschichte und Pflanzengeographie*, 108(1):17-50.
- Villamil H, Corchuelo G, De Valencia M. 1999. Morphological, anatomical and chemical characterization of custard Apple seed, *Annona muricata* L. *Agronomía Colombiana*, 16(1-3): 19-23.

- Wink M. 2011. Annual plant reviews, biochemistry of plant secondary metabolism (Vol. 40). John Wiley & Sons.
- Wrozyna C, Neubauer TA, Meyer J, Piller WE. 2016. Shape Variation in Neotropical *Cytheridella* (Ostracoda) Using Semilandmarks-Based Geometric Morphometrics: A Methodological Approach and Possible Biogeographical Implications. *PLoS one*, 11(12): e0168438.
- Xu F. & R. De Craene. 2013. Pollen morphology and ultrastructure of selected species from Annonaceae. *Plant Systematics and Evolution*, 299: 11-24.
- Zafra-Polo M, González M, Estornell E, Sahpaz S, Cortés D. 1996. Acetogenins from Annonaceae, inhibitors of mitochondrial complex I. *Phytochemistry*, 42(2): 253-271.
- Zafra-Polo M, Figaderè B, Gallardo T, Tormo J, Cortés D. 1998. Natural acetogenins from Annonaceae, synthesis and mechanisms of action. *Phytochemistry*, 48(7): 1087-1117.
- Zelditch ML, Swiderski DL, Sheets HD, Fink WL. 2004. Geometric Morphometrics for Biologists: a primer. Academic Press. 488 pp.
- Zelditch ML, Swiderski DL, Sheets HD, Fink WL. 2012. A Practical Companion to Geometric Morphometrics for Biologists: Running analyses in freely-available software. Free download from <https://booksite.elsevier.com/9780123869036/> (18 June 2013).