



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Instituto de Biología

Alcaloides Bencilisoquinolínicos y su relación
órgano-específica en las primeras fases de
desarrollo de *Annona diversifolia* Safford.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A

IVÁN DE LA CRUZ CHACÓN

Comité Tutorial

Tutora Principal: **Dra. Alma Rosa González Esquinca**

Cotutora: **Dra. Patricia Guevara Fefer**

Miembro del comité tutorial: **Dr. Luis Felipe Jiménez García**

MÉXICO, D.F.

SEPTIEMBRE, 2012



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.



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

Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 21 de mayo de 2012, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de DOCTOR EN CIENCIAS del alumno DE LA CRUZ CHACÓN IVÁN con número de cuenta 506010305 con la tesis titulada: "Alcaloides Bencilisoquinolínicos y su relación órgano-específica en las primeras fases del desarrollo de *Annona diversifolia* Safford", realizada bajo la dirección de la DRA. ALMA ROSA GONZALEZ ESQUINCA:

Presidente:	DRA. ANA LUISA ANAYA LANG
Vocal:	DRA. MARÍA DEL ROCIO CRUZ ORTEGA
Secretario:	DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA
Suplente:	DR. MARIANO MARTÍNEZ VÁZQUEZ
Suplente	DRA. PATRICIA GUEVARA FEFER

De acuerdo con lo anterior, el alumno se acogió a la nueva normatividad, para la integración de su jurado con cinco sinodales, con base en el artículo QUINTO TRANSITORIO, en apego a lo establecido en el Artículo 31 del Reglamento General de Estudios de Posgrado.

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F. a 13 de agosto de 2012.

M. del Coro Arizmendi
DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

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

Agradecimientos Institucionales

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

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo invaluable para realizar los estudios de posgrado, otorgandome la beca con número de registro 20512 y CVU 177251

A la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas por el nido para realizar los experimentales.

A mi Comité Tutorial: la Dra. Alma Rosa González Esquinca, la Dra. Patricia Guevara Fefer y el Dr. Luis Felipe Jiménez García, por las orientaciones, los cuidados y la paciencia que me tuvieron durante el posgrado

Agradecimientos a título personal

Son varias las personas que me han acompañado en esta travesía, debo a ellas, en parte, lo que soy. Quiero agradecer su amable ayuda que permitió que este capítulo académico llegara a buen puerto.

A la Dra. Alma Rosa González Esquinca, por compartir conmigo los sueños, el óxido de los días, las tardes-noches de Venus y los martes que vienen. Por permitirme la libertad y la autonomía de las ideas. Mi corazón con usted, gracias por todito-todo. La amo.

Agradezco a los miembros del jurado: Dra. Ana Luisa Anaya Lang, Dra. Rocío Cruz Ortega y Dr. Mariano Martínez Vázquez por las valiosas contribuciones que hicieron al trabajo final y por el tiempo que dedicaron para revisarlo, aún a pesar de tantas actividades que los ocupan.

A Christian Anabí Riley Saldaña, por su amistad y nobleza, por la solidaridad en varios de los experimentales que hicieron el camino más fácil. Mi agradecimiento para ti no cabe en estas líneas.

A la Dra. Lorena M. Luna Cazáres y al Ing. Ruben Montoya Arredondo, por el apoyo, la amistad y el cariño que me demuestran a diario.

A Marisol Castro Moreno y a Agustín Orozco Castillo por disfrutar las pequeñas victorias y aminorar los sinsabores experimentales.

Al Dr. Mariano Martínez Vázquez por sus valiosos consejos y la determinación estructural de la liriodenina. Desde hace tiempo y con mucho afecto tiene un lugar en el club de la melancolía.

A los habitantes del Laboratorio de Fisiología y Química Vegetal. Facultad de Ciencias Biológicas. UNICACH. Llegar a este sitio es de las cosas más importantes que me han sucedido en la vida.

A mi familia, como decir agua.

A Gisela Ferreira por el aliento en la redacción final y por poner en mis ojos la letra y la cadencia de Vinicius. Noossa! Finito.

Yo soy porque nosotros somos

Não sou nada.
Nunca serei nada.
Não posso querer ser nada.
À parte isso, tenho em mim todos os sonhos do mundo

Tabacaria (1928)
Fernando Pessoa a través de Álvaro de Campos

Índice

Resumen	1
Abstract	3
I. Introducción	5
II. Revisión de la literatura	
2.1. Alcaloides bencilisoquinolínicos (ABI)	7
2.2. La familia Annonaceae	26
2.3. Alcaloides bencilisoquinolínicos en Annonaceae	28
2.4. Metabolitos secundarios en el desarrollo temprano de las plantas	33
III. Antecedentes	51
IV. Planteamiento de los Objetivos	55
V. Diseño Experimental y Métodos	
5.1. Diseño general	58
5.2. Parte experimental	60
VI. Resultados	
6.1. Alcaloides en el desarrollo temprano de <i>Annona diversifolia</i>	74
6.1.1. Caracterización del desarrollo temprano de <i>A. diversifolia</i>	74
6.1.2. Presencia temprana de alcaloides totales	80
6.1.3. Perfiles de composición de extractos e identificación de ABI	83
6.1.4. Variación órgano-específica de ABI en el desarrollo temprano	88
6.2. Aspectos de la biosíntesis de ABI en la vida temprana de <i>A. diversifolia</i>	99
6.2.1. Presencia de precursores para la biosíntesis de ABI	99
6.2.2. Distribución de la actividad enzimática	105
6.3. Liriodenina y su posible papel como defensa antimicrobiana	111
VII. Consideraciones Finales	121
VIII. Conclusiones	127
IX. Bibliografía	129
X. Anexos	156
Publicaciones derivadas de la tesis	157
Algunos detalles experimentales	164
Índice de cuadros y figuras	168

Resumen

La germinación y el subsecuente desarrollo de la plántula son las etapas iniciales para el establecimiento de un nuevo individuo de cualquier especie vegetal. Durante este desarrollo temprano, el metabolismo secundario es un factor que puede contribuir a la sobrevivencia de las plantas en su ecosistema. Las especies de la familia Annonaceae se caracterizan por producir alcaloides bencilisoquinolínicos (ABI), derivados de los aminoácidos fenilalanina y tirosina.

En este trabajo se demuestra que *Annona diversifolia* Safford biosíntetiza ABI desde sus primeras etapas de vida. El estudio abarcó 4 etapas fenológicas, semillas secas, semillas en imbibición, semillas con emergencia radicular y plántulas en desarrollo correspondientes a los estadios 0 y 1 de las escalas decimales de Zadoks y de la BBCH (Biologische Bundesanstalt, Bundessortenamt und Chemische Industrie).

Cada etapa se dividió en fases en función del tiempo y su fenología, por lo que la variación cuantitativa y cualitativa del perfil de alcaloides se determinó en 11 fases de desarrollo y hasta entre 3 a 6 tejidos. También se cuantificó la presencia de los precursores tirosina y fenilalanina en los endospermos durante las fases estudiadas y además en algunas fases seleccionadas la actividad de las enzimas, monofenol oxidasa (MFO, EC 1.14.18.1), tiramino oxidasa (TyrAO, EC 1.4.3.4), tirosina-dopa descarboxilasa (TYDC, EC 4.1.1.25) y norcoclaurina sintasa (NCS, EC 4.2.1.78) involucradas en su biosíntesis. La importancia de los alcaloides producidos se relacionó con la actividad *in vitro* de algunos de los extractos y del alcaloide principal sobre los hongos *Aspergillus glaucus* y *Rhizopus stolonifer* responsables en gran medida de la pudrición de semillas de esta anonácea.

También se compilan antecedentes relacionados con la biología, química y bioquímica de los ABI y se documenta, a partir de una revisión bibliográfica, la expresión del metabolismo secundario de otras especies en etapas tempranas de desarrollo.

De acuerdo con los resultados, se puede señalar que los alcaloides identificados en etapas tempranas del desarrollo de *A. diversifolia* no son un aporte

de la planta madre, ni se biosintetizan durante la embriogénesis, sino que aparecen al inicio de la germinación. Tanto la cantidad (hasta 3.383 mg/g material seco) como el número (al menos cinco) de alcaloides, aumentan conforme avanza el desarrollo. Se logró caracterizar tres de los cinco alcaloides, cuyas estructuras corresponden a ABI de tipo aporfina conocidas como lisicamina, atherospermidina y liriodenina, esta última sobresale por su abundancia (2827 $\mu\text{mol/g ms}$).

En la producción temprana de alcaloides se encontraron algunas relaciones temporales, la liriodenina se detecta desde los 5 días de imbibición, la lisicamina y la atherospermidina, durante la emergencia radicular (13 y 16 días de germinación respectivamente). Los otros dos alcaloides (no identificados) se biosintetizan cuando las plántulas son fotosintéticamente activas (plántulas de seis hojas). Se estimó que mientras la producción depende de la movilización de reservas se utilizan hasta un 0.9 % de los aminoácidos precursores de la reservas del endospermo.

Esta biosíntesis esta regulada exclusivamente por el embrión, ya que las actividades de las enzimas solo se detectaron en embriones en desarrollo. En las plántulas, la actividad de MFO, AO, TYDC está en todos los tejidos, la de NCS solo en tallos y raíces.

La producción de alcaloides parece estar justificada por la actividad antifúngica que exhiben, ya que los extractos de alcaloides totales inhibieron el crecimiento de los fitopatógenos *Aspergillus glaucus* y *R. stolonifer* y el efecto estuvo relacionado positivamente con la cantidad y la actividad de liriodenina (concentración inhibitoria mínima de 100 y 200 μM respectivamente). La cantidad de liriodenina en los extractos de los diferentes tejidos durante el desarrollo temprano de *A. diversifolia* sugiere también su importancia en el control de cerca de 30 fitopatógenos. Por su presencia constitutiva y su amplia actividad antifúngica, se sugiere que la liriodenina es un MS de defensa constitutiva, una fitoanticipina de biosíntesis temprana.

Se discute y concluye que la producción de MS representa un recurso ventajoso en el desarrollo temprano de las plantas, lo que representa una contribución al conocimiento del significado y biología del metabolismo secundario en el reino vegetal.

Abstract

Germination and subsequent plant development are the initial stages for establishing a new individual of any plant species. The secondary metabolism during this early development is a strategy that can contribute to the survival of plants into its ecosystem. The Annonaceae species produce benzyloquinoline alkaloids (BIA), this BIA are derived from phenylalanine and tyrosine amino acids.

This research demonstrates that *Annona diversifolia* Safford biosynthesize BIA from their early life stages. The study covered four phenological stages: dry seeds, imbibition seed, radicular emergence and seedling development, which correspond to the Zadoks and BBCH (Biologische Bundesanstalt, Bundessortenamt und Chemische Industrie) decimal scales stages 0 and 1.

Each phase was divided into stages in terms of time and phenology, whereby the qualitative and quantitative variation profile of the alkaloids was determined within 11 stages of development and between 3 to 6 tissues. The presence of tyrosine and phenylalanine precursors in the endosperm was measured during the studied stages. Also, in some selected phases, the activity of the following enzymes, involved in its biosynthesis, was measured: monophenol oxidase (MFO, EC 1.14.18.1), tyramine oxidase (TyrAO, EC 1.4.3.4), tyrosine-dopa decarboxylase (TYDC, EC 4.1.1.25) and norcoclaurine synthase (NCS, EC 4.2.1.78). The importance of the alkaloids produced was associated with the *in vitro* activity of some of the extracts and with the principal alkaloid against fungi *Aspergillus glaucus* and *Rhizopus stolonifer*, largely responsible for the rot of this species seed.

This work also compiled the background related to the biology, chemistry and biochemistry of the ABI; likewise the expression of secondary metabolism of other species in early stages of development was documented from a bibliographic review.

According to the results, that the alkaloids identified in early developmental stages of *A. diversifolia* have not a contribution from the mother plant, nor are biosynthesized during embryogenesis, but appear at the beginning of germination. Both the quantity (up to 3383 mg / g dry material) and the number (at least five) of alkaloids, increase as development proceeds. Three of the five alkaloids were

characterized, their structures correspond to the aporphine types alkaloids known as lisicamine, liriodenine and atherospermidine, and this last one stands out for its abundance (2827 micromol / g ms).

Temporal relations in the early production of alkaloids were found. Liriodenine is detected from 5 days of imbibition, while the lisicamine and atherospermidine are detected during root emergence (13 and 16 days of germination, respectively). The other two alkaloids (unidentified) are biosynthesized when the seedlings are photosynthetically active (six leaves seedlings). It was estimated that, as long as the production depends on the mobilization of reserves, up to 0.9% of the amino acid precursors of endosperm reserves are used.

This biosynthesis is regulated exclusively by the embryo, since enzyme activities were detected only in developing embryos. In seedlings, the MFO, AO and TYDC activity is detected in all tissues, while the NCS activity is only in stems and roots.

The alkaloid production seems justified by exhibiting antifungal activity, since the total alkaloids extract inhibited the growth of the phytopathogenic *A. glaucus* and *R. stolonifer*. Further, the effect was positively correlated with the amount and activity of liriodenine (minimum inhibitory concentration of 100 mM and 200 respectively). The amount of liriodenine extracts in different tissues during the early development of *A. diversifolia* also suggests its importance in controlling around 30 phytopathogenic. For its constitutive presence and antifungal activity, it is suggested that the liriodenine is a secondary metabolite constitutive defense, an early biosynthetic phytoanticipin.

It is discussed and concluded that the production of secondary metabolites represents an advantageous resource in the early development of plants. This means a contribution to the knowledge and biology of secondary metabolism in the plant kingdom.

I. Introducción

Las plantas producen metabolitos secundarios (MS), conocidos también como metabolitos especializados, son moléculas orgánicas de distribución restringida que no intervienen en su metabolismo primario, pero que en general, constituyen el conjunto de señales químicas que relacionan al organismo con su ambiente (Jenke-Kodama *et al*, 2008; Hagel & Facchini, 2008; Pichersky & Lewinsohn, 2011; Mithofer & Boland, 2012). Se han identificado cerca de 100,000 MS (Wink, 2008a), pero según estimaciones de Hartmann (2007) y de Pichersky & Lewinsohn (2011) pudieran ser cerca de 200,000. Por su estructura química y su origen biosintético pueden ser clasificados en terpenoides, fenilpropanoides y MS nitrogenados (Croteau *et al*, 2000; Dixon, 2001).

La importancia de los MS aún no es del todo entendida y es materia de debate en los círculos académicos. En un principio, el término secundario implicó que su papel en la fisiología de la planta no era tan evidente, ahora se sabe de su participación como mecanismos de defensa contra depredadores (fitopatógenos, y herbívoros), de que modulan la competencia con otros organismos vegetales, que son moléculas que atraen a polinizadores, dispersores de semillas y microorganismos fijadores de nitrógeno, que actúan como barreras de protección contra radiación UV y que algunos más son moléculas de recambio metabólico ya que son reservorios “tóxicos” de nitrógeno y carbono (Wink & Witte, 1985; Berenbaum, 1995; Oldroyd, 2001; Winkel-Shirley, 2002; Dixon & Sumner, 2003; Dixon *et al*, 2005; Rohloff & Bones, 2005; Wink, 2006, 2008a Wink 2010).

Para que los MS desempeñen sus funciones, deben ser producidos en cantidad suficiente, y en espacio y tiempo determinados, es decir los MS son formados en células especializadas y en etapas de crecimiento y desarrollo particulares (Facchini, 2001; Cseke *et al*, 2006). Estas condiciones espacio-temporales son diferentes para cada uno de los tipos de MS e incluso para un mismo MS entre las especies vegetales que lo producen. Más aún, se conoce que existen variaciones de un MS durante la ontogenia de la planta que lo biosintetiza (Gregianni *et al*, 2004; Elger *et al*, 2009). Todo ello demuestra la existencia de programas

metabólicos específicos que incluyen un sistema genómico diferente o complementario al del metabolismo primario, y la conveniente formación de proteínas especializadas (Dewick, 2002; Goossens *et al*, 2003; Facchini *et al*, 2007; Ziegler & Facchini, 2008).

Una característica típica de los MS es que son almacenados en tejidos y etapas de desarrollo que a menudo son importantes para la sobrevivencia y reproducción vegetal. Por ejemplo, los MS responsables de los pigmentos, sabores y olores de las flores se producen para atraer insectos polinizadores o repeler herbívoros, según sea el caso (Adler *et al*, 2006; Dexter *et al*, 2008). También se conoce que muchas especies almacenan MS en las semillas, lo que significa que durante la embriogénesis la planta dispone de recursos metabólicos, no solo para almacenar sustancias de reservas, sino que además, la provee con sustancias de defensa que representarían una clara ventaja para que la plántula en crecimiento se establezca en el ecosistema.

Porque una de las etapas poco atendidas en relación al metabolismo secundario, específicamente en las Angiospermas, es la del desarrollo temprano, en este trabajo se demuestra las variaciones órgano-específicas y fenológicas de alcaloides tipo bencilisoquinolínicos durante la germinación y el desarrollo de la plántula de *Annona diversifolia* y la posible importancia que tiene la biosíntesis de estas moléculas para la planta.

II. Revisión de la literatura

2.1. Alcaloides bencilisoquinolínicos (ABI)

Los alcaloides constituyen una de las clases más amplia y diversa de metabolitos secundarios, son biosintetizados por especies de prácticamente todos los *phyla* tanto de organismos marinos como terrestres, en cualquier nivel evolutivo (Wink, 2008b).

En casi todos los tratados especializados que versan sobre los alcaloides, se ha discutido continuamente el significado del término alcaloide (Cordell, 1981; Pelletier, 1983; Mann *et al*, 1994; Waterman, 1998; Hesse, 2002; Aniszewski, 2007; Apendino, 2008). Una definición simple y general que se acepta actualmente, fue sugerida por Pelletier en 1983 *Un alcaloide es un compuesto cíclico con al menos un átomo de nitrógeno en un estado de oxidación negativo y cuya distribución esta limitada a organismos vivos*". Esta definición incluye tanto a alcaloides con el átomo de nitrógeno como parte de un sistema heterocíclico, como aquellos con un nitrógeno no aromático como la colchicina o la capsicina (Roberts & Wink, 1998).

Según Wink (2008b) actualmente se conocen cerca de 21,000 alcaloides diferentes, constituyéndose así en los MS nitrogenados más abundantes (además de los 700 aminoácidos no proteínicos, 100 aminas, 60 glicósidos cianogenéticos, 100 glucosinolatos y 150 alquilamidas). En las plantas cerca del 20% de las especies son productoras y al contrario de lo que ocurre con los fenoles que son abundantes en todo el reino vegetal, los alcaloides están a menudo restringidos a ciertas familias de plantas o incluso a ciertas especies vegetales (Verpoorte, 2000; Oksman-Caldentey *et al*, 2007).

Son clasificados comúnmente de acuerdo a su estructura química o a su origen biosintético (Roberts & Wink, 1998). De acuerdo a su biosíntesis la clasificación, se agrupan en: a) alcaloides derivados de aminoácidos (ornitina/arginina, lisina, histidina, fenilalanina/tirosina, triptófano, ácido antranílico y ácido nicotínico); b) alcaloides purínicos (derivados de bases nitrogenadas); c)

alcaloides terpénicos aminados; y d) alcaloides policetídicos (Herbert, 2003; Loyola-Vargas *et al*, 2007) (Figura 1).

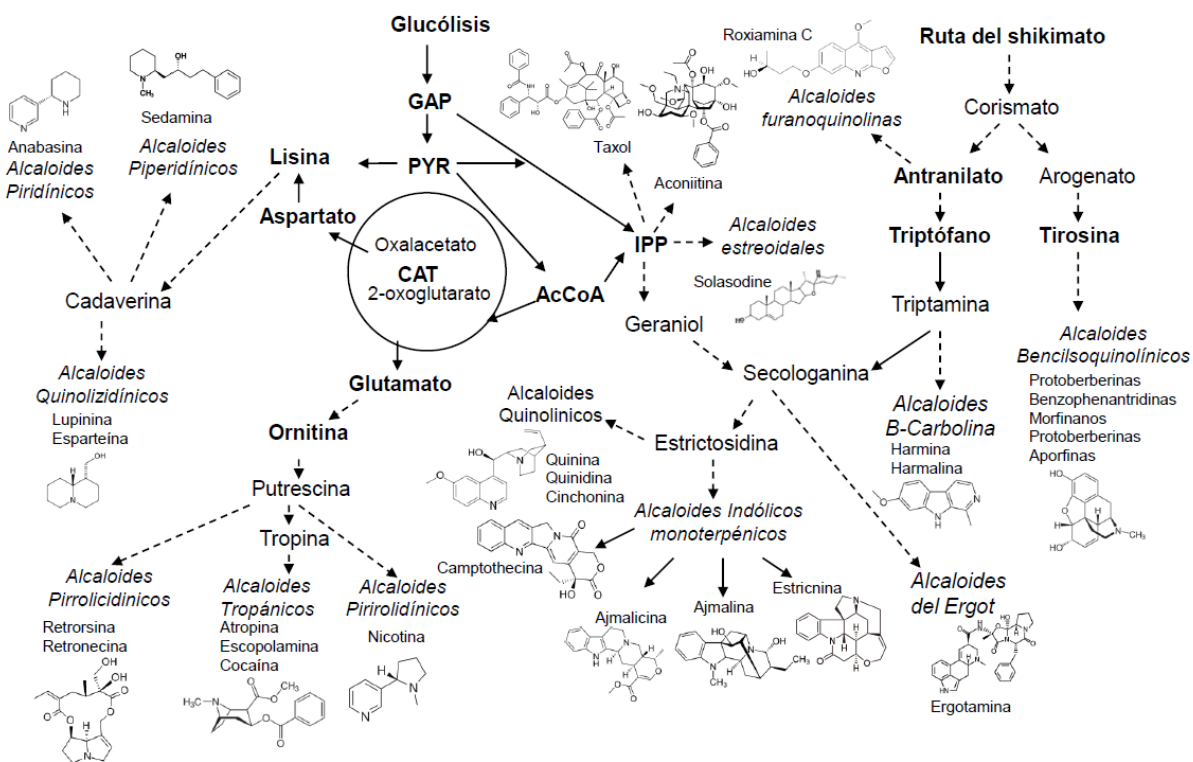


Figura 1. Rutas de biosíntesis de los principales grupos de alcaloides (Adaptado de Wink, 2010).

Entre los alcaloides derivados de fenilalanina y tirosina se encuentran los alcaloides bencilisoquinolínicos (ABI) que se caracterizan por presentar un esqueleto carbonado básico consistente en un enlace entre un anillo isoquinolínico y otro bencil (sistema 1-benciltetrahydroisoquinolina, 1-btiq) (Figura 2) (Waterman, 1998; Ziegler & Facchini, 2008). Los ABI conforman una familia con cerca de 2,500 estructuras, de las cuales en varios casos, se conoce sus propiedades farmacológicas (Singla *et al*, 2010) (Cuadro 1).

La diversidad estructural de los ABI resulta de las modificaciones al esqueleto carbonado básico 1-btiq por hidroxilaciones, reducciones, oxidaciones, formación de enlaces C-C y O- y N-metilaciones (Zenk *et al*, 1985, Ziegler *et al* 2009). Los subgrupos más reconocidos son: aporfinas, benzofenantridinas, bisbencilisoquinolinas, cularinas, morfinanos, morfandienonas, pavinias/isopavinias, phtalideisoquinolinas, protoberberinas, protopinas, rhoeadinas/paverrubinas, y

secoberberinas (Fig. 2) (Shama, 1972; Rezende *et al* 1975; Zenk *et al* 1985; Facchini *et al*, 1997; Bentley, 1998; Shulgin & Perry, 2002; Liscombe *et al*, 2005).

Cuadro 1. Alcaloides benclisoquinolínicos de interés farmacológico

Alcaloide	Actividad farmacológica	Aplicación farmacéutica	Planta de donde se aisló
Berberina	Antimicrobiano	Antibiótico	<i>Coptis japonica</i>
Codeína	Analgésico, Antitusígeno	Mitiga el dolor y reprime la tos	<i>Papaver somniferum</i>
Colchicina	Disruptivo muscular	Represor de la Gota	<i>Colchium autumnale</i>
Emetina	Parasiticida	Antiamebiano	<i>Uragoga ipecacuanha</i>
Morfina	Analgésico narcótico	Mitigante de dolor	<i>Papaver somniferum</i>
Noscapina	Antiespasmódico	Represor de la tos	<i>Papaver somniferum</i>
Papaverina	Vasodilatador	Relajante muscular	<i>Papaver somniferum</i>
Sanguinarina	Antimicrobiano	Higiene Oral	<i>Sanguinaria canadensis</i>
(+)-Tubocurarina	Bloqueador muscular	Relajante muscular	<i>Chondodendron tomentosum</i>
Tetrandrina	Bloqueador de canales de Ca ²⁺	Desórdenes circulatorios	<i>Stephania tetandra</i>

Basado en Singla *et al*, 2010

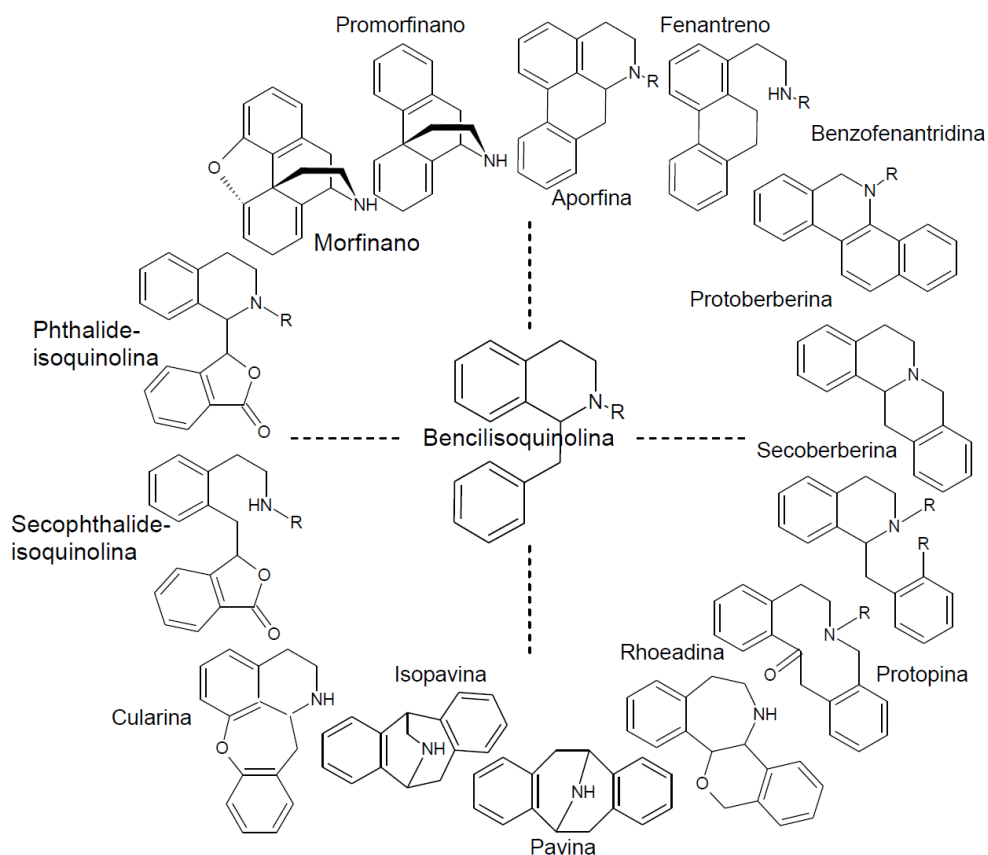


Figura 2. Tipos estructurales de alcaloides benclisoquinolínicos (Adaptado de Liscombe *et al*, 2005).

La distribución de los subgrupos de ABI presenta, hasta hoy, algunas particularidades quimiotaxonómicas, se sabe por ejemplo, que las aporfinas y los fenantrenos son los ABI con la presencia más amplia; que las protoberberinas y benzofenantridinas también muestran una distribución taxonómica extensa, pero son más frecuentes en Papaveraceae, Menispermaceae, Berberidaceae, Ranunculaceae y Rutaceae. Mientras que los morfínicos y promorfínicos son producidos solo por ciertos géneros de Papaveraceae. Algo parecido ocurre con los phtalidos y seco-phtalideisoquinolinas que están restringidas a *Eschscholzia*, *Papaver*, *Dicentra* y *Glaucium* en Papaveraceae y *Cocculus* en Menispermaceae. Finalmente, las pavinas, isopavinas, cularinas y rhoedinas están presentes en todos los géneros de Papaveraceae, excepto en *Stylophorum*, *Glaucium* y *Bocconia* (Shulgin & Perry, 2002; Liscombe *et al*, 2005).

Como se puede observar, hay familias que se caracterizan por producir este tipo de alcaloides, la presencia de ABI está documentada en diversos clados evolutivos de las angiospermas (Figura 3). Novecientas de las aproximadamente 1000 especies de plantas en las que se han reportado pertenecen a las Magnoliidas (de las Angiospermas primitivas) y al orden Ranunculales (de las Eudicotiledóneas) (Liscombe *et al*, 2005; Wink, 2010), encontradas en familias distantemente relacionadas como Rutaceae, Lauraceae, Cornaceae, Nelumbonaceae, Moraceae y Araceae (González-Esquinca, 2001; Shulgin & Perry, 2002; Liscombe *et al*, 2005). Por lo que la presencia de esta clase de MS a través de varias familias sugirió que su biosíntesis pudiera reflejar tanto orígenes monofiléticos como eventos evolutivos paralelos (Jensen, 1995; Wink, 2003).

Liscombe *et al* (2005) mediante una combinación de herramientas bioquímicas y moleculares sugieren una evolución monofilética de la biosíntesis de ABI en angiospermas. Estos investigadores compararon en 90 especies (incluyendo un gran número de angiospermas basales) la acumulación de ABI y la presencia de (S)-Norcoclorina sintasa (NCS; EC 4.2.1.78, enzima central en la biosíntesis de ABI) sobre una filogenia molecular de los géneros estudiados. Los resultados señalaron que la habilidad de las angiospermas para producir ABI pudiera haber ocurrido antes de la emergencia de la eudicotiledóneas. Esta inferencia es soportada por la

aparente ausencia de ABI en taxas que divergieron antes que las eudicotiledóneas (v.gr. monocotiledóneas y Commelinidae), por los altos niveles de actividad NCS detectada en varios miembros de Chloranthaceae y por la acumulación de aporfinas y proteberberinas en Magnoliidae. Incluso hay algunos datos que indican que NCS pudo probablemente haberse originado tan tempranamente como la emergencia de las angiospermas basales, dado que se detectaron actividades residuales de NCS en miembros de las Austrobaileyales. Más aún se ha reportado la presencia de ABI simples (coclaurina) en familias de angiospermas basales *Nymphaea stellata* y *Lisichiton camtschatcense* (Mukherjee *et al*, 1986; Katsui & Sato, 1966). Sin embargo no han sido reportados más ABI en éstas o en otras especies estrechamente relacionadas.

Resulta además interesante que de acuerdo a los análisis filogenéticos de NCS y de otras enzimas involucradas en pasos más avanzados de la ruta de ABI (Enzima del puente de la berberina y varias O-metiltransferasas) exista una huella molecular latente de esta ruta ancestral de alcaloides en angiospermas (inclusive Gimnospermas) que no se caracterizan por acumular ABI.

Esta posible evolución monofilética de la biosíntesis de ABI contrasta con las evidencias que soportan el origen polifilético de la biosíntesis de alcaloides de tipo pirrolizidínicos, ya que al parecer, en este último tipo de alcaloides, ocurrió independientemente al menos en tres familias de plantas (incluyendo dos veces en las Asteraceae) (Ober & Hartmann, 2000; Anke *et al*, 2004). Orígenes monofiléticos están también sugeridos para la distribución de alcaloides del tropano y quinolípidínicos (Wink, 2003), y de algunos alcaloides indólicos (Lorence & Desster, 2004).

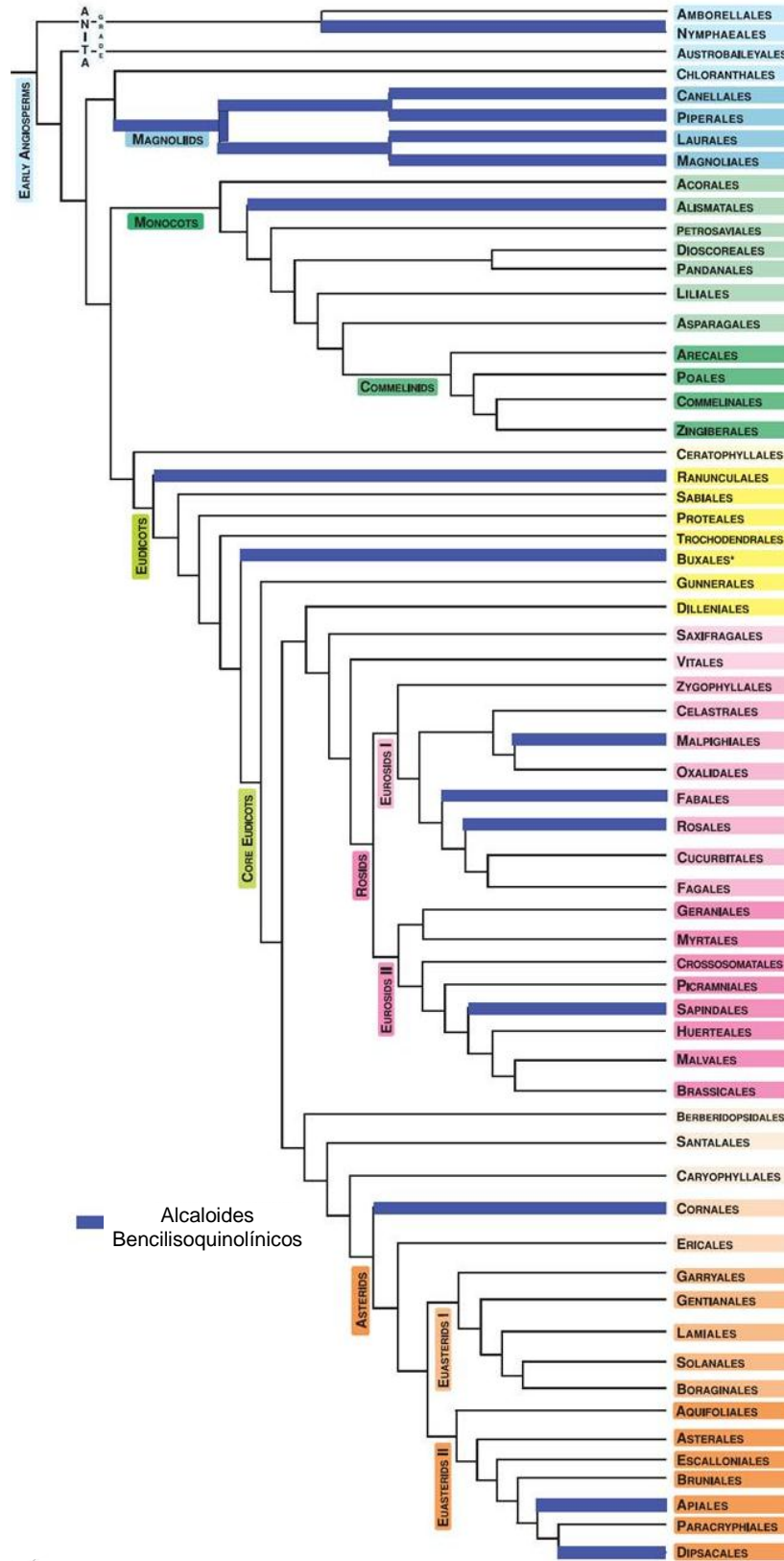


Figura 3. Distribución de ABI en Angiospermas de acuerdo a APG III (Wink 2010).

Importancia ecológica de los alcaloides bencilisoquinolínicos.

Muchas plantas invierten cantidades considerables de nitrógeno y energía metabólica en la biosíntesis y acumulación de numerosos y diversos alcaloides, sugiriendo que estos MS juegan un papel esencial ecoquímico y/o fisiológico en las especies que los producen (Schmeller *et al*, 1997; Wink, 2003).

Las funciones demostradas y aceptadas (hasta donde se sabe) de los alcaloides en las plantas que los producen son: a) como defensas químicas contra herbívoros y/o depredadores (insectos, moluscos y vertebrados), fitopatógenos (bacterias, hongos y virus) y competencia entre plantas por recursos nutrimentales y b) como reservorios de nitrógeno (Wink, 2008b).

En el caso de los alcaloides bencilisoquinolínicos aunque presentan diferentes actividades biológicas son muy escasos los estudios hechos en torno a su papel ecológico. Sin embargo si se toman en cuenta algunas de sus actividades farmacológicas (Cuadro 1), éstas pueden ofrecer un indicio de su posible función en las plantas. Por ejemplo, la potencia analgésica de la morfina, el bloqueo del impulso nervioso de la tubocurarina (Facchini *et al* 1997), los efectos que tienen arecolina, berbamina, berberina, bulbocapnina, columbamina, dicentrina, estilopina, hidrastina, laudonosina, reticulina, tetrandrina, tetrahidrocolumbamina entre otros, sobre los canales de Na⁺, K⁺, Ca²⁺ y sobre receptores nerviosos incluyendo los del tipo acetilcolina, adrenérgicos, dopaminérgicos, GABA y serotónicos (Schemeller *et al*, 1997; Revisado en Wink, 2008; Singla *et al*, 2010), dan indicios para sugerir que estos alcaloides pudieran funcionar como agentes disuasorios de herbívoros. Mientras que las propiedades antimicrobianas, sobre un amplio rango de bacterias y/o hongos, de actinodafina, aknadicina, arecolina, berberina, emetina, kyoberina, ladunosina, papaverina, sanguinarina, talicarpina y talidasina sugieren que su acumulación constitutiva le confiere a la planta protección contra patógenos (Schemeller *et al*, 1997; Singla *et al*, 2010); la biosíntesis de berberina y sanguinarina inclusive puede ser inducida con la presencia de fitopatógenos (Eilert *et al*, 1985; Park, 1992). Por otro lado, arecolina, emetina, berberina, noscapina y sanguinerina inhibien el desarrollo y crecimiento radicular de plántulas de *Lepidium sativum* por lo

que pueden ser consideradas también como sustancias alelopáticas (Wink *et al*, 1998).

Varios de los ABI mencionados anteriormente también provocan alteraciones del citoesqueleto, inhiben la replicación del ADN incluyendo el efecto sobre las topoisomerasas I y II, provocan la alquilación e intercalación del ADN lo que usualmente provoca muerte celular por apoptosis y explica varias de sus actividades tóxicas (Wink, 2008). Todas estas actividades y posibles funciones de los ABI, representan un rasgo que ha estado sujeto a la selección natural a través de la evolución en las plantas que tienen la habilidad para producirlos (Wink, 2003).

Aspectos de la biosíntesis de alcaloides bencilisoquinolínicos.

Aunque teóricamente los aminoácidos L-fenilalanina y L-tirosina son considerados como precursores básicos para la producción de alcaloides bencilisoquinolínicos, únicamente con la L-tirosina se han reportado trabajos de incorporación a la ruta (Zenk *et al*, 1985; Rueffer & Zenk, 1987; Hashimoto & Yamada, 1994; Facchini, 2001). Ambos aminoácidos pueden proceder vía biosíntesis *de novo* (ruta del ácido shikímico) o de las proteínas de reserva a través de la acción de enzimas proteolíticas.

La biosíntesis de ABI puede agruparse artificialmente en tres pasos generales a) la producción de S-norcoclaurina, el precursor central de todos los ABI; b) la transformación de S-norcoclaurina a reticulina, el intermediario de diversificación más importante de la ruta y c) las rutas de diversificación particulares que dan origen a los diferentes tipos de ABI citados en la figura 2. Un esquema generalizado puede observarse en la figura 4 y se detalla posteriormente.

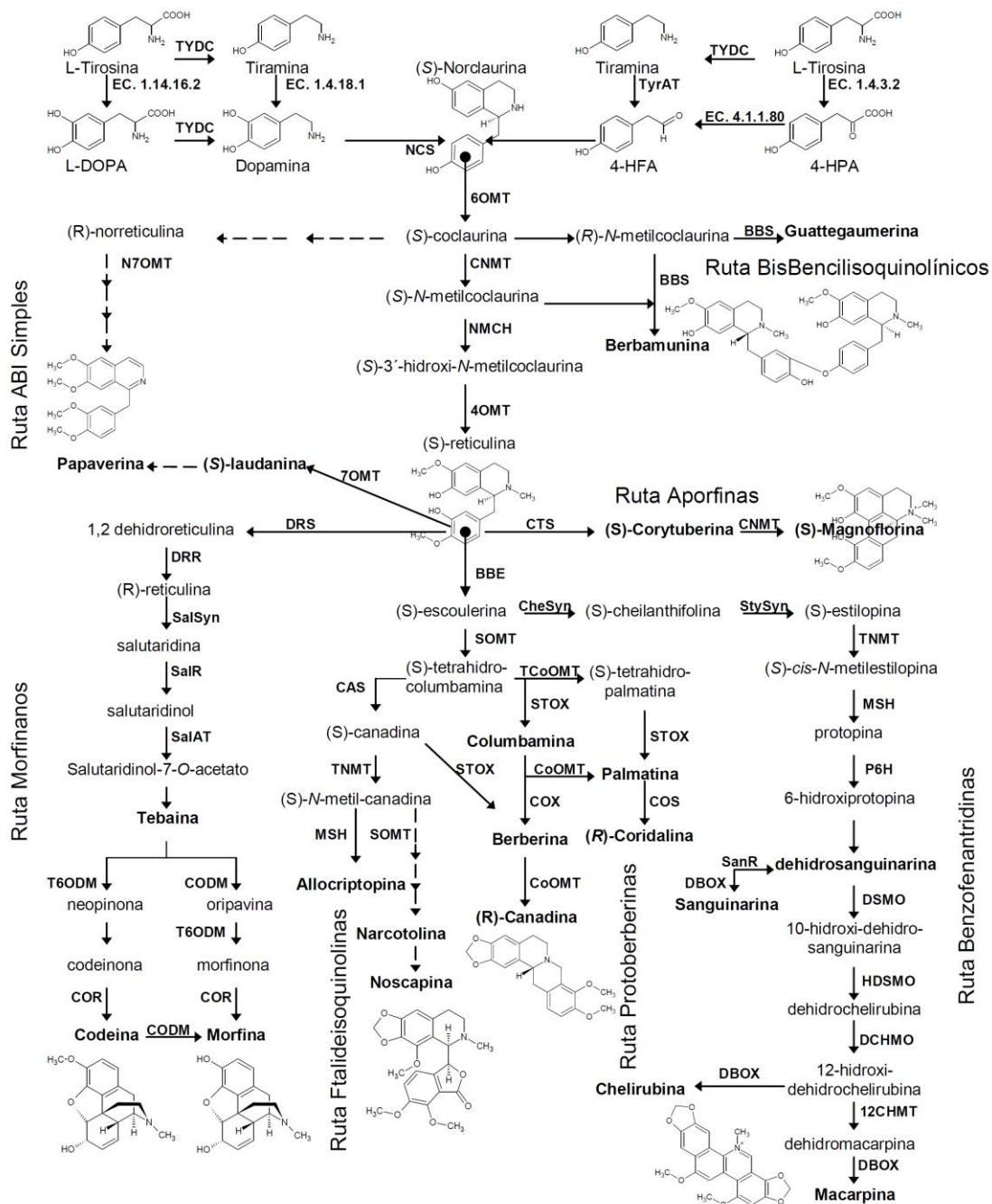


Figura 4. Biosíntesis de alcaloides bencilisoquinolínicos. Adaptado de Facchini & De Luca, 2008; TYDC = Tirosina Dopa descarboxilasa; EC. 1.4.16.2 = tirosina 3 monooxigenasa; EC. 1.4.18.1 = monofenol oxigenasa; EC. 1.4.3.2 = L amino-acido oxidasasa; EC. 4.1.1.80. = 4-Hidroxiifenilpiruvato decarboxilasa; TyrAT = tiramina oxidasa; NCS = Norcoclaurina sintasa; 6OMT = (S)-norcoclaurina-6-O-metiltransferasa; CNMT = (S)-coclaurina-N-metiltransferasa; NMCH = (S)-N-metilcoclaurina-3'-hidroxilasa; 4OMT = (S)-3'-hidroxi-N-metilcoclaurina-4'-O-metiltransferasa; N7OMT = norreticulina 7-O-metiltransferasa; 7OMT = reticulina 7-O-metiltransferasa; CTS = corituberina sintasa; CNMT = magnoflorina sintasa; BBE = berberina sintasa; SOMT = (S)-scoulerina-9-O-metiltransferasa; CAS = (S)-canadina sintasa; TNMT = Tetrahidroprotoberberina sintasa; MTMO = metiltetrahidroprotoberberina 14- monooxigenasa; STOX = (S)-tetrahydroxyprotoberberina oxidasa; TCoOMT = tetrahydrocolumbamina O-metiltransferasa; CoOMT = columbamina O-metiltransferasa; COX = columbamina oxidasa; COS = coridalina sintasa; CheSyn = cheilanthifolina sintasa; StySyn = Stilopina sintasa; P6H = protopina 6-hidroxilasa; DSMO = dehidrosanguinarina 10-monooxigenasa; HDSMO = hidroxidehidrosanguinarina 10-monooxigenasa; DCHMO = dehidrochelirubina 12-monooxigenasa; 12 CHMT = 12-hidroxidehidrochelirubina 12-O-metiltransferasa; DBOX = dihidrobenzofenantridina oxidasa; DRS = 1,2-dehidroreticulina sintasa; DRR = 1,2-dehidroreticulina reductasa; SalSyn = Salutaridina sintasa; SalR = Salutaridina reductasa; SalAT = Salutaridinol 7-O-acetiltransferasa; T6ODM = tebaina 6-O-demetilasa; CODM = codeína O-demetilasa; COR = codeinona reductasa; BBS = berbaminina sintasa.

La primera parte de la ruta inicia con una serie de descarboxilaciones, *ortho*-hidroxilaciones y desaminaciones que convierten a dos moléculas de tirosina, una en dopamina y otra en 4 hidroxifenilacetaldehído, la formación de ambos derivados pueden proceder por caminos diferentes (Zenk *et al*, 1985; Rueffer & Zenk, 1987; Facchini & Bird 1998), en donde, según algunos indicios, los intermediarios pueden ser interconvertibles, formando una red metabólica en esta parte temprana de la ruta (Fig. 4); inicialmente se pensaba que estas transformaciones eran conducidas exclusivamente por la enzima tirosina/dopa descarboxilasa (TYDC; EC 4.1.1.25) (Facchini *et al*, 1997), sin embargo, actualmente se reconoce la participación alternativa y/o complementaria de las enzimas monofenoloxidasas (MFO, EC 1.4.18.1), tiramina oxidasa (TyrAO, EC 1.4.3.4), amino oxidasa (AO, EC 1.4.3.2) (Rueffer & Zenk, 1987; KEGG GENOME, 2011). Estas enzimas son entonces las responsables de dirigir a L-tirosina al metabolismo secundario. El primer paso obligatorio para todos los ABI es la unión de los dos derivados por la enzima norcoclaurina sintasa (NCS; EC 4.2.1.78) (Samanani y Facchini, 2001; Samanani *et al*, 2004), la condensación es una reacción estereoselectiva conocida como tipo Pictet-Spengler con un mecanismo electrofílico que consiste en una ciclización en dos pasos con una sustitución aromática directa (Müller & Zenk, 1992; Luk *et al*, 2007). El producto es el alcaloide trihidroxibencilisoquinolínico (S) norcoclaurina, precursor central de todos los ABI en las plantas (Stadler *et al*, 1989). La dopamina origina la parte isoquinolínica, mientras que el 4 hidroxifenilacetaldehído da lugar al componente bencil (Fig. 2).

En la segunda parte, la conversión de (S) norcoclaurina a (S) reticulina implica la *O*-metilación en la posición 6, la metilación del nitrógeno, la hidroxilación en la posición 3 y una segunda *O*-metilación en la posición 4 (Zenk & Juenger, 2007). Las enzimas implicadas son la norcoclaurina 6-*O* metiltransferasa (6OMT, EC 2.1.1.128), la coclaurina *N*-metiltransferasa (CNMT, EC 2.1.1.140), la (S)-*N*-metilcoclaurina-3'-hidroxilasa (NMCH, EC 1.14.13.71) y la 3-hidroxi-*N* metilcoclaurina 4-*O*-metiltransferasa (4 OMT, EC 2.1.1.116) respectivamente (Ziegler *et al*, 2009). El alcaloide (S)-reticulina es el intermediario central de la ruta del cual derivan la mayoría de los ABI, a excepción de los alcaloides diméricos tipo bisbenzilisquinolina

que se originan de (S)-N- metilcoclaurina y de la papaverina que puede proceder también tanto de (S) reticulina como de (S) coclaurina (Weid *et al*, 2004; Han *et al*, 2010).

En relación con las rutas de diversificación, los avances más importantes se han centrado sobre seis ramas que inician con (S) reticulina y permiten la biosíntesis de alcaloides: a) bencilisoquinolínicos simples (papaverina) (Pienkny *et al*, 2007; Han *et al*, 2010); b) tipo protoberberina (berberina) (Hashimoto & Yamada, 1994; Samanini *et al*, 2005), c) tipo benzofenantidrina (sanguinerina) (Kutchan & Zenk, 1993; Zenk 1994; Díaz Chávez *et al*, 2011; Takemura *et al*, 2012), d) morfina (morfina) (Facchini & Bird, 1998; Ziegler *et al*, 2009), e) aporfina (magnoflorina) (Ikezawa *et al*, 2008) y f) tipo fthalideisoquinolina (noscapina) (Dang *et al*, 2012). Así también se conocen las enzimas que producen los ABI diméricos como la berbaminina que se originan de un precursor que precede a la (S)-reticulina (Stadler y Zenk, 1993; Kraus y Kutchan, 1995). Dependiendo de la ruta de diversificación se necesitan entre diez y veinte enzimas para obtener un alcaloide como producto final.

El panorama aquí descrito sobre la diversidad biosintética de los ABI se ha construido con estudios de biosíntesis de unos 10 alcaloides que incluyen a la morfina, sanguinerina, berberina, papaverina, tebaína, codeína, columbamina, palmatina y laudanina, con las siguientes plantas: *Papaver somniferum*, *Papaver bracteatum*, *Coptis japonica*, *Thalictrum flavum*, *Thalictrum tuberosum*, *Sanguinaria canadense*, *Eschscholzia californica*, *Berberis stolonifera*, *Berberis beaniana*, *Corydalis vaginans*, *Thalictrum bulgaricum*. Los modelos de estudio más utilizados son las plántulas y los cultivos celulares de *P. somniferum* y *T. flavum* (Facchini *et al*, 2007). De varias enzimas ha sido posible caracterizar los ADN complementarios lo que está permitiendo conocer aspectos moleculares sobre la regulación de esta ruta, un panorama más detallado puede leerse en Facchini (2006); Zenk & Juenger (2007); Facchini & De Luca (2008)

Compartimentación de los sitios de biosíntesis y acumulación de ABI.

La producción y almacenamiento de MS están a menudo regulados temporal y espacialmente y están relacionados con el desarrollo y la especialización celular. Wink & Roberts (1998) mencionan que se pueden distinguir diferentes situaciones entre ambos procesos: a) que la biosíntesis y acumulación se lleve a cabo por todas las células de la planta, b) que la biosíntesis y almacenamiento ocurra en algún órgano o tejido particular, y c) que la biosíntesis se realice en un órgano o tejido específico y su almacenamiento en otro sitio de la planta. Aunque estas observaciones están hechas con un número limitado de estudios, es casi seguro generalizar que la segunda y tercera posibilidad son las que ocurren con más frecuencia en las plantas.

En la biosíntesis y almacenamiento de ABI participan diferentes tipos de tejidos, células y orgánulos, por ejemplo en *P. somniferum*, la biosíntesis de morfina y noscapina ocurre en los tallos y raíces y se acumulan en los carpelos y cápsulas de los frutos, mientras que sanguinarina es biosintetizada y acumulada en las raíces; en *B. stolonifera*, la berberina al parecer es biosintetizada y almacenada en todos los órganos (Wink & Roberts, 1998; Facchini & De Luca, 1995; Samanani *et al*, 2005). Generalmente, las enzimas se encuentran reunidas en un solo tejido aunque pueden tener una distribución más amplia, algunas como NCS, SalSyn y SalR involucradas en la biosíntesis de morfina, son más abundantes en raíces y brotes que en el resto de las plantas (Gerardy & Zenk, 1993; Unterlinner *et al*, 1999; Huang & Kutchan, 2000). Otras como NMCH son más abundantes en tallos y disminuyen gradualmente en raíces, hojas y tejidos florales (Huang & Kutchan, 2000).

Esta diferenciación espacial es aún más detallada inter e intracelularmente, ya que la expresión genética y la actividad de las enzimas correspondientes están ubicadas exclusivamente solo en ciertas células o compartimentos subcelulares, por ejemplo, en *Papaver somniferum*, Bird *et al* (2003), Weid *et al* (2004) y Samanani *et al*. (2006) demostraron que en la biosíntesis y acumulación de morfina, sanguinarina y alcaloides relacionados, participan distintos tipos de células del floema tanto de los tallos como de las raíces. Utilizando técnicas de inmunofluorescencia e hibridación de ARN *in situ*, Bird *et al* (2003) y Samanani *et al* (2006) encontraron que 7 de las 14

enzimas de la ruta para alcaloides tipo morfina [6OMT, CNMT, NMCH, 4'OMT, BBE, SaIAT y COR] están localizadas en los elementos cribosos, mientras que los transcritos de sus genes en las células acompañantes y su acumulación en células laticíferas (Figura 5a). En tanto que Weid *et al* (2004) y Kutchan (2005), señalan que en los tallos las enzimas 4'OMT y SaIAT están ubicadas en el parénquima y COR en las células laticíferas de acumulación, mientras que en la raíz 4'OMT, 7'OMT y SaIAT fueron encontradas en el periciclo del estele y BBE en las células del parénquima del cortex. Además, Bock *et al* (2002) señalan que BBE está también en los idioblastos de las hojas. La aparente diferencia de resultados pareciera estar en el grado de desarrollo de los tejidos vasculares que se analizaron en ambos estudios, mientras que Weid *et al* (2004) aparentemente tomaron muestras en donde los elementos cribosos aun eran inmaduros, Samanani *et al* (2002 y 2006) analizaron ejemplares con grados de madurez completos. Los autores por su lado, atribuyen diferencias también en los métodos y técnicas de estudio, en variedades de las plantas analizadas, por ejemplo la variedad de pobreza en morfina vs silvestre, así como condiciones de cultivo (controladas vs campo). En todo caso pareciera surgir una pregunta ¿La biosíntesis de alcaloides en *P. somniferum* ocurre durante su desarrollo en sitios diferentes? Esta interesante discusión entre el grupo de P. Facchini y T.M. Kutchan, tienen en común la mención de que la localización de los componentes del metabolismo de ABI está altamente compartimentado. A su vez, la participación de los elementos cribosos en la biosíntesis de ABI rompe el paradigma de que estas células solamente poseían un número limitado de proteínas requeridas para la conservación celular y el transporte de solutos (Ziegler & Facchini, 2008); en la última década, también se le han atribuido otras funciones fisiológicas que incluyen el transporte de macromoléculas de información y la biosíntesis de ácido jasmónico, ácido ascórbico y compuestos de defensa (Hancock *et al*, 2003).

Thalictrum flavum produce y acumula también cantidades abundantes de ABI tipo protoberberina en distintas células de las raíces y rizomas. En raíces los ABI se localizan en las células maduras de la endodermis durante el inicio del crecimiento secundario, mientras que los transcritos génicos de nueve de las doce enzimas (TYDC, NCS, 6OMT, CNMT, NMCH, 4'OMT, BBE, SOMT, CAS) implicadas en su

biosíntesis están ubicados en la endodermis inmadura, periciclo y en algunos casos en las células adyacentes corticales del meristemo apical. Mientras que, en los rizomas, los alcaloides se depositan en la médula y el cortex y los transcritos génicos de las nueve enzimas en el protoderma del primordio foliar (Samanani *et al* 2002, 2005). Esto significa que los sitios de biosíntesis y acumulación están separados espacialmente e involucran células diferentes a los que participan en *P. somniferum* (Figura 5b).

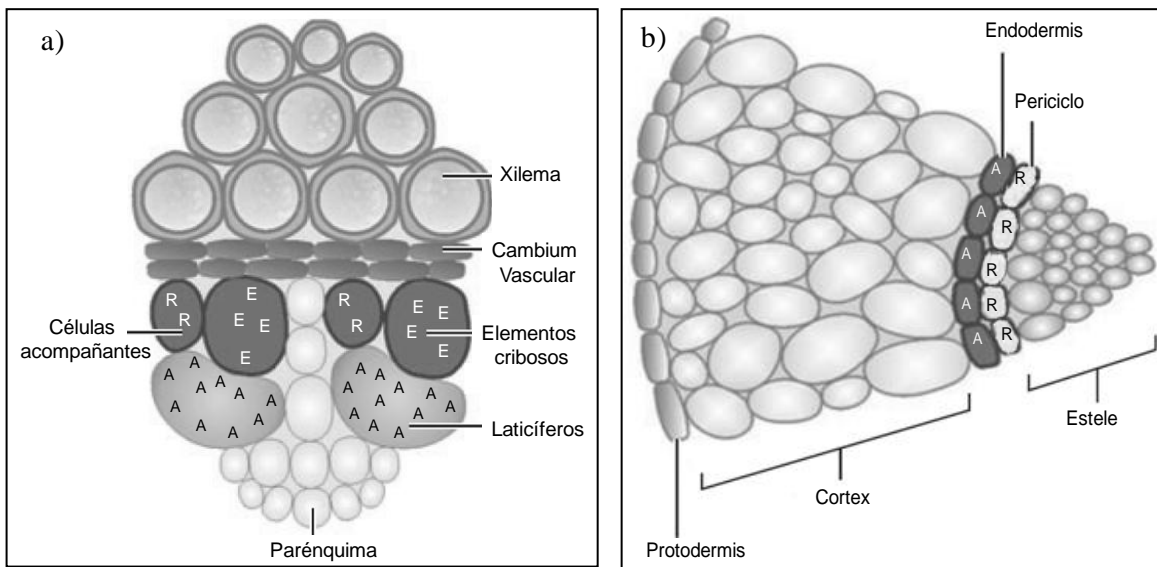


Figura. 5. Compartimentación de la biosíntesis y acumulación de alcaloides (Adaptado de Ziegler & Facchini, 2008). a) En haces vasculares de *Papaver somniferum*; b) En raíces de *Thalictrum flavum*. A = alcaloides, E= enzimas, R = transcritos génicos

La biosíntesis de ABI está incluso compartimentada subcelularmente, las dos primeras partes de la ruta de tirosina a (S)-norcoclaurina y de (S)-norcoclaurina a (S)-reticulina, se realizan en el citosol, mientras que las rutas de diversificación se ubican en vesículas membranosas cuya independendencia o asociación al reticulo endoplásmico está en plena discusión (Figura 6) (Facchini & Bird, 1998; Facchini, 2001; Zenk & Juenger, 2007; Ziegler & Facchini, 2008).

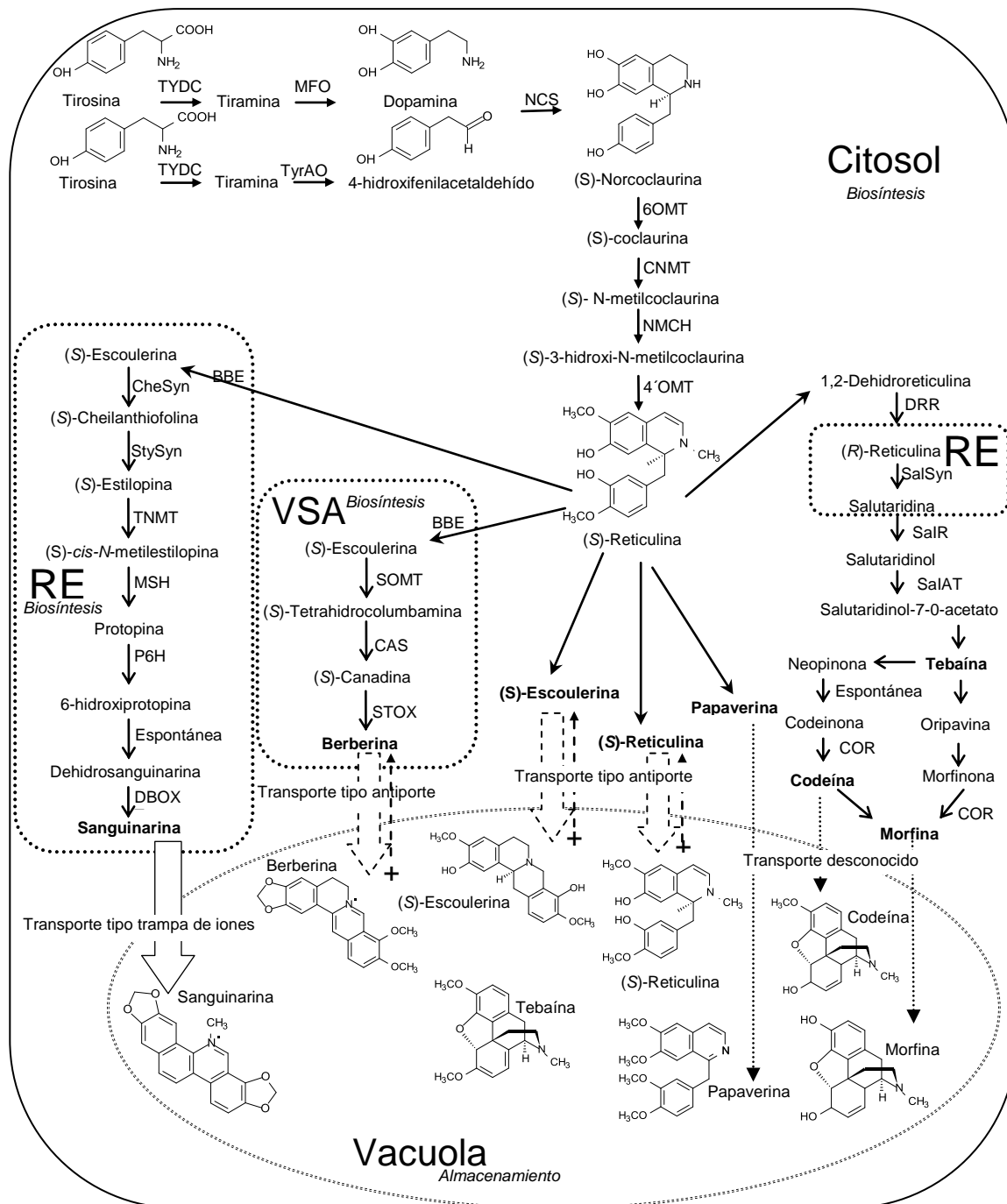


Figura 6. Compartimentación intracelular de la biosíntesis y acumulación de ABI. Estructurado básicamente de Facchini & Bird 1998; Wink & Roberts, 1998; Alcántara *et al.* 2005; Otani *et al.* 2005; Ziegler & Facchini 2008; TYDC = Tirosina Dopa descarboxilasa; MFO = Monofenol oxidasa; TyrAO = Aminooxidasa; NCS = Norcoclaurina sintasa; 6OMT = (S)-norcoclaurina-6-O-metiltransferasa; CNMT = (S)-coclaurina-N-metiltransferasa; NMCH = (S)-N-metilcoclaurina-3'-hidroxilasa; 4'OMT = (S)-3'-hidroxi-N-metilcoclaurina-4'-O-metiltransferasa; BBE = berberina sintasa; SOMT = (S)-scoulerina-9-O-metiltransferasa; CAS = (S)-canadina sintasa; STOX = (S)-tetrahydroxyprotoberberina oxidasa; CheSyn = cheilanthesfolina sintasa; StySyn = Stilopina sintasa; TNMT = Tetrahidroprotoberberina sintasa; MSH = N-metilstilopina 14-hidroxilasa; P6H = protopina 6-hidroxilasa; DBOX = dihidrobenzofenantridina oxidase; DRS = 1,2-dehidroreticulina sintasa; DRR = 1,2-dehidroreticulina reductasa; SalSyn = Salutaridina sintasa; SalR = Salutaridina reductasa; SalAT = Salutaridinol 7-O-acetiltransferasa; COR = codeinona reductasa. RE = Retículo endoplásmico; VSA = Vesícula biosintetizadora de alcaloides.

Esta separación de enzimas, sustratos y productos en distintos compartimentos implica la coordinación y regulación de la ruta lo que no ocurriría si las enzimas y los sustratos se movieran libremente en el citosol (Facchini, 2006; Ziegler & Facchini, 2008).

Para la producción de alcaloides tipo benzofenantridina (sanguinarina) desde (S)-reticulina, se necesitan siete enzimas, cuatro de ellas (BBE, CFS, SPS y *N*-MSH), se localizaron (utilizando gradientes de centrifugación con sacarosa) en fracciones de membranas con una densidad específica de $\delta = 1.14$ g/mL y solo una (P6H) estuvo asociada a una fracción de membrana con una densidad de $\delta = 1.11$ g/mL, consistente con la del retículo endoplasmático (RE) (revisado en Facchini & Bird 1998; Facchini, 2001 y Ziegler & Facchini, 2008). La enzima STS que participa en la biosíntesis de alcaloides tipo morfina, y las enzimas STOX, canadina oxidasa (CDO: CYP719A1) y CoOMT, participantes en la biosíntesis de alcaloides tipo protoberberina se localizan también en fracciones microsomales con una densidad 1.14 g/mL (Facchini & Bird 1998; Facchini *et al.* 1997). La asociación de estas enzimas con fracciones de membrana de densidad más grande que las del retículo endoplásmico, es lo que permitió especular la presencia de “vesículas biosintetizadoras de alcaloides (VSA)” (Alcantara *et al.*, 2005).

Estas vesículas se han encontrado en algunas especies productoras de ABI (Annonaceae, Berberidaceae, Menispermaceae y Ranunculaceae), en *Berberis* y *Coptis* se observaron como agregados dentro de vacuolas pequeñas conteniendo alcaloides y enzimas (Facchini *et al.*, 1997; Zenk & Juenger, 2007). Es interesante el hecho de que al adicionarles precursores a las vesículas éstas produjeron intermediarios avanzados de la ruta, y si además se les suplementaba con una sola enzima (SOMT), que no estaba asociada a estos compartimentos), el resultado fue la producción de ABI congruente con la ruta (Facchini *et al.*, 1997).

Sin embargo, otros autores opinan diferente en relación con la autonomía de estas vesículas, argumentado que con excepción de la BBE, las enzimas anteriormente mencionadas, son dependientes del citocromo P450, por lo que se ha sugerido que son proteínas ubicadas (integrales o parciales) en las membranas del retículo endoplásmico (RE) o en compartimentos derivados de éste, asociadas a la

enzima NAD(P)H, dependiente de citocromo P450, como donadora de electrones (Facchini & Bird, 1998; Facchini, 2001; Ziegler & Facchini 2008). Además el pH óptimo de BBE es de 8.8, acorde al de las membranas del RE (Steffens *et al*, 1985; Facchini, 2001).

Alcantara *et al* (2005) utilizó fraccionamientos con centrifugación en gradiente de densidad y técnicas de inmunolocalización, para localizar las enzimas NMCH y BBE en el retículo endoplasmático y COR en el citosol de células de *P. somniferum*. En este mismo estudio se observó que al contaminar los cultivos celulares de *P. somniferum* con el hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea*, aumentaron tanto las enzimas como el alcaloide sanguinarina, pero lo más interesante es que estos aumentos estuvieron asociados con el desprendimiento de vesículas que se extendían desde el lumen del RE hasta a la vacuola central. En estas extensiones también estuvieron presentes las enzimas NMCH y BBE, lo que permite pensar que la biosíntesis de ABI está asociada con el retículo endoplásmico.

Un hecho contundente es que los ABI se almacenan en vacuolas; berberina, codeína, morfina, noscapina, papaverina, (S)-reticulina, sanguinarina, (S)-escoulerina y tebaína, fueron encontradas en vacuolas de diferentes densidades en cultivos celulares de *P. bracteatum* y *Coptis japonica* (Revisado en Kutchan, 1986; Facchini & Bird, 1998; Wink & Roberts, 1998; Otani *et al*, 2005; Yazaki *et al*, 2008). En las vacuolas del latex de *Chelidonium majus* las concentraciones de sanguinarina, chelidonina y berberina se aproximaron a los 500 y 1000 mM, mientras que en las del latex de *P. somniferum* se almacenan hasta 500 mM de morfina, y en vacuolas de células de *Coptis japonica* hasta 72 mM de berberina (Wink & Roberts, 1998; Otani *et al*, 2005).

La participación de varios tipos de células y de organelos en la biosíntesis y acumulación de ABI supone el transporte de sustratos, intermediarios y productos desde las sitios productores (vesículas de RE de elementos cribosos y/o parénquima en *P. somniferum*) a los sitios de depósito (vacuolas de células laticíferas). El transporte de metabolitos secundarios aún es un tema poco estudiado, algunas revisiones respecto al tema pueden leerse en Yazaki, 2005. *FEBS Lett* 580:1183–1191; y Yazaki *et al*, 2008. *Phytochem Rev.* 7:513–524.

Para los alcaloides bencilisoquinolínicos se han propuesto y documentado dos mecanismos de transporte hacia las vacuolas y uno en el tránsito por la membrana plasmática. En la primera situación Matile (1984) y Otani *et al* (2005) señalan que algunos ABI pueden almacenarse en la vacuola mediante un modelo simple causado por un gradiente de pH conocido como “trampa de iones”; proponen que en el caso de alcaloides de carácter lipofílico y en una situación de pH neutro como la del citosol, pueden cruzar el tonoplasto (membrana que delimita la vacuola) por difusión simple, y una vez dentro debido al ambiente ácido que hay en ella y a la presencia de sales inorgánicas son protonizados a cationes hidrofílicos, y por lo tanto son incapaces de regresar por la membrana quedando atrapados en este compartimento (Roytrakul & Veerporte, 2007), un ejemplo de esto parece ocurrir con sanguinarina (una molécula lipofílica) y con otros alcaloides no bencilisoquinolínicos (ajmalicina, cinchonamina, colchicina, ergotamina, nicotina, vinblastina y vindolina) (Revisado en Wink & Roberts, 1998).

Otani *et al* (2005) señalan, por otra parte, que el tráfico puede llevarse a cabo por medio de un mecanismo de transporte secundario aprovechando un gradiente electroquímico de protones (H^+), estos investigadores sugieren que berberina se mueve de esta forma a través del tonoplasto mediante una proteína cotransportadora tipo antiporte que aprovecha la expulsión de un protón para introducir el alcaloide a la vacuola con una K_m de 43.7 mM.

Para el paso por las membranas plasmáticas se ha implicado la participación de proteínas transportadoras de la membrana impulsadas por ATP tipo ABC (ATP *binding cassette*), el único ejemplo estudiado es el paso de berberina a través del plasmalema de células de *Coptis japonica* y de *Thalictrum flavum* (Sakai *et al*, 2002; Shitan *et al*, 2003; Terasaka *et al*, 2003). Para *C. japonica* la proteína fue genéticamente caracterizada como CjMDR1 (*Coptis japonica* multidrug resistance 1), dada su similitud con la familia de las proteínas transportadoras ABC de resistencia a múltiples fármacos (MDR por sus siglas en inglés) (Shitan *et al*, 2003).

Conjuntando estos estudios se puede señalar que el transporte de berberina en las células ocurre mediante dos mecanismos de transporte, uno impulsado por proteínas transportadoras ABC (intracelular) y el otro por cotransportadores proton-

antiportador (intercelular). Este último tipo de mecanismo parece estar también implicado en el tráfico de (S)-reticulina y (S)-escoulerina en las vacuolas de *Fumaria capreolata* (Deus-Neumaan & Zenk, 1986; Otani *et al*, 2005; Yazaki *et al*, 2008).

Este análisis recopilatorio de estudios fue convertido en un artículo de revisión cuya versión con modificaciones menores ha sido recientemente aceptado y será publicado en breve con el nombre de: **Biosíntesis de Alcaloides bencilisoquinolínicos**. Revisión de estudios. De la Cruz Chacón Iván, González-Esquinca AR, Riley-Saldaña CA. **2012. Universitas Scientiarum** 17 (2): 5-18. ISSN Impreso: 0122-7483 (Anexos)

2.2 La familia Annonaceae. Jussieu (1789) *nom. cons.* (IPNI, 2005).

Annonaceae es una familia antigua de plantas, cuya edad se estima entre los 62 y 110 millones de años; está distribuida principalmente en regiones tropicales y subtropicales (Stevens, 2011; Pirie & Doyle 2012). La familia ha sido objeto de revisiones en cuanto a su taxonomía, sistemática, diversidad y abundancia; González Esquinca *et al* (2007, 2008) y Chatrou *et al* (2012) hacen un análisis de ello.

Annonaceae es una familia muy bien definida y natural, tanto por su estructura anatómica como floral (Hutchinson, 1964); de fácil distinción y considerada desde siempre como un grupo primitivo de Angiospermas formando parte del complejo Ranaleano e incluidas en el Orden Ranales, Magnoliales o Annonales basal, según los diferentes autores (discutido en González-Esquinca *et al*, 2008). El sistema de clasificación APG III (Angiosperm Phylogeny Group) las ubica dentro del Clado Magnólidas, y las considera una familia avanzada del Orden Magnoliales y evolutivamente un grupo hermano de las Eupomatiaceae (APG II, 2003; APG III, 2009; Stevens 2011). Las anonáceas son una familia representativa de este orden debido a que son plantas leñosas y poseen un perianto de tépalos diferenciados en sépalos y pétalos, presentan numerosos estambres, polen monosulcado y son polinizadas por coleópteros (Cronquist, 1968; Endres, 2010; Stevens, 2011). Son árboles, arbustos o enredaderas, de hojas simples, enteras y alternas, flores simples o en inflorescencias terminales o axilares frecuentemente con tres sépalos y seis pétalos en dos verticilos de tres. Los pétalos aparecen libres o fusionados. La mayoría de las especies tienen más de doce estambres. Los frutos son de diversos tamaños, lisos o con proyecciones. De semillas lisas o tuberculadas; con o sin tapón micropilar. El endospermo es voluminoso y ruminado. El embrión es diminuto (Standley & Steyermark, 1946; Doyle & Le Thomas, 1994; Heusden, 1992; Koek-Noorman *et al*, 1990). Ninguna especie es herbácea ni de ciclo de vida anual.

También es la familia más grande y diversa de las Magnoliides (Doyle *et al*, 2004). Cronquist (1981) señala 130 géneros y 2500 especies, mientras que recientemente Chatrou *et al* (2012) menciona ~2400 especies agrupadas en 108

géneros. La mayoría de los géneros tienen de 1 a 20 especies, los más grandes son *Annona* (162 especies), *Guatteria* (210), *Uvaria* (187) y *Xylopia* (157).

La división interna de la familia usualmente distinguía entre dos subfamilias, Annonoideae y Monodoroideae, teniendo la primera un gineceo apocárpico que, a lo sumo, da un fruto sincarpo plurilocular, mientras que la segunda presentaba un ovario unilocular con placentación parietal; la primera subfamilia se dividía en 3 tribus: Uvarieae, Miliuseae y Unoneae (Discutido en González-Esquínca *et al*, 2008). Esta clasificación clásica, que se remonta a Hutchinson (1964), ha sido desechada por artificial (Kessler, 1993). Los avances recientes en la metodología de la filogenia morfológica y, sobre todo, molecular, han permitido asegurarse de que en el árbol evolutivo de la familia existen 3 ramas principales: 1) una rama basal, formada por el género *Anaxagorea*, que es el grupo hermano de las otras dos; 2) una rama formada por el llamado "grupo Ambavia" (*Ambavia*, *Cananga*, *Cleistopholis*, *Mezzettia*, *Tetrameranthus*, y 3) una rama terminal que engloba al resto de los géneros, en la que se puede distinguir dos clados principales: uno con poca divergencia molecular y géneros con pocas especies (incluyendo *Malmea*, *Piptostigma*, *Miliusa* y *Polyalthia*), y otro clado con más divergencia molecular y géneros con más especies (Stevens, 2011). Recientemente Chatrou *et al* (2012) reafirma esta idea y usando marcadores moleculares de plástidos propone sistematizar a la familia en 4 subfamilias: Anaxagoreoideae, Ambavioideae, Annonoideae y Malmeoideae.



Figura 7. Distribución de Annonaceae (Tomado de Stevens, 2011)

2.3 Alcaloides Bencilisoquinolínicos en Annonaceae.

El metabolismo secundario de las anonáceas ha sido documentado sistemáticamente desde la primera revisión hecha por Leboeuf *et al*, 1982, en ella se detalló la diversidad fitoquímica de la familia, que incluía hasta ese entonces, a los aceites esenciales, alcaloides, flavonoides, polifenoles, glucósidos cianogénicos y terpenos, señalando como característica química de la familia la producción abundante de alcaloides bencilisoquinolínicos derivados de la tirosina y fenilalanina en la mayoría de los casos con una estructura aporfínica. Justo en ese año, también se iniciaba el reporte de acetogeninas con algunas distinciones estructurales exclusivas hasta hoy solo de las anonáceas (Jolad *et al*, 1982) y que al parecer son, junto con los alcaloides, los MS más numerosos y diversos de la familia (Zafra-Polo *et al*, 1996; Cave *et al*, 1997; Zafra-Polo *et al*, 1998; Alali *et al*, 1999; Bermejo *et al*, 2005).

El aislamiento del primer alcaloide en Anonáceas data de hace más de cien años y fue realizado por Lloyd en 1897, al reportar la presencia de asimina en *Asimina triloba* (Henry, 1949). Existen 4 revisiones sistematizadas sobre alcaloides de la familia, una muy temprana y no exclusiva para anonáceas de Henry (1949), la segunda que incluye, hasta ese entonces, toda la fitoquímica de Annonaceae (Leboeuf *et al*, 1982), una sobre alcaloides derivados del triptófano que incluyen indólicos simples e indolesquiterpénicos de Waterman (1985) y la de alcaloides aporfínicos de Cave *et al*, 1987, por lo que la última revisión tiene 24 años. Nuestro grupo (González-Esquinca 2001 y González-Esquinca *et al*, 2007), ha ido recopilando datos sobre este tema por lo que podemos mencionar que hasta el 2009 se han reportado cerca de 300 estructuras diferentes solo de aporfinas para la familia (Henry 1949; Shama 1967; Guinaudeau *et al*, 1975, 1979; 1983; 1994; Cave *et al*, 1987; Bentley 1997, 1999, 2001, 2003, 2005, 2006, 2007; Shulgin & Perry, 2002; González-Esquinca *et al*, 2001; 2007).

Debido a que al parecer las aporfinas son el grupo principal de alcaloides en la familia, se detallan algunos aspectos de su estructura. Las aporfinas se caracterizan por presentar cuatro anillos, tres de su origen bencilisoquinolínico (A, B, y D) y el

cuarto formado por la unión directa de los anillos aromáticos A y D que caracteriza a su núcleo aporfínico (C), cuya numeración aceptada formalmente se muestra en la Figura 8. El átomo de nitrógeno en la posición 6 es usualmente terciario en su forma básica pero puede ser cuaternario, es poco frecuente que esté acetilado o formilado, o N-oxidado, cuando es secundario el alcaloide recibe el nombre de noraporfina. El núcleo tetracíclico pueden estar di, tri, tetra, penta y hexa sustituido por grupos carbonilo, hidroxilo, metoxilo, metilendioxilo y metilo, en las posiciones 9, 10, y 11, y menos frecuentemente en las posiciones 3 y 8, y en varios casos la posición 7 ó 4 esta oxosustituida (Guinaudeau *et al*, 1975; Israilov *et al*, 1980; Stévigny, 2005). En aporfinas naturales las posiciones 1 y 2 siempre están sustituidas por grupos hidroxilo, metoxilo o metilenedioxilo. Las aporfinas son ópticamente activas y tienen tanto la configuración absoluta R(-) ó S(+) dependiendo de la estereoquímica del C6a (Stévigny, 2005).

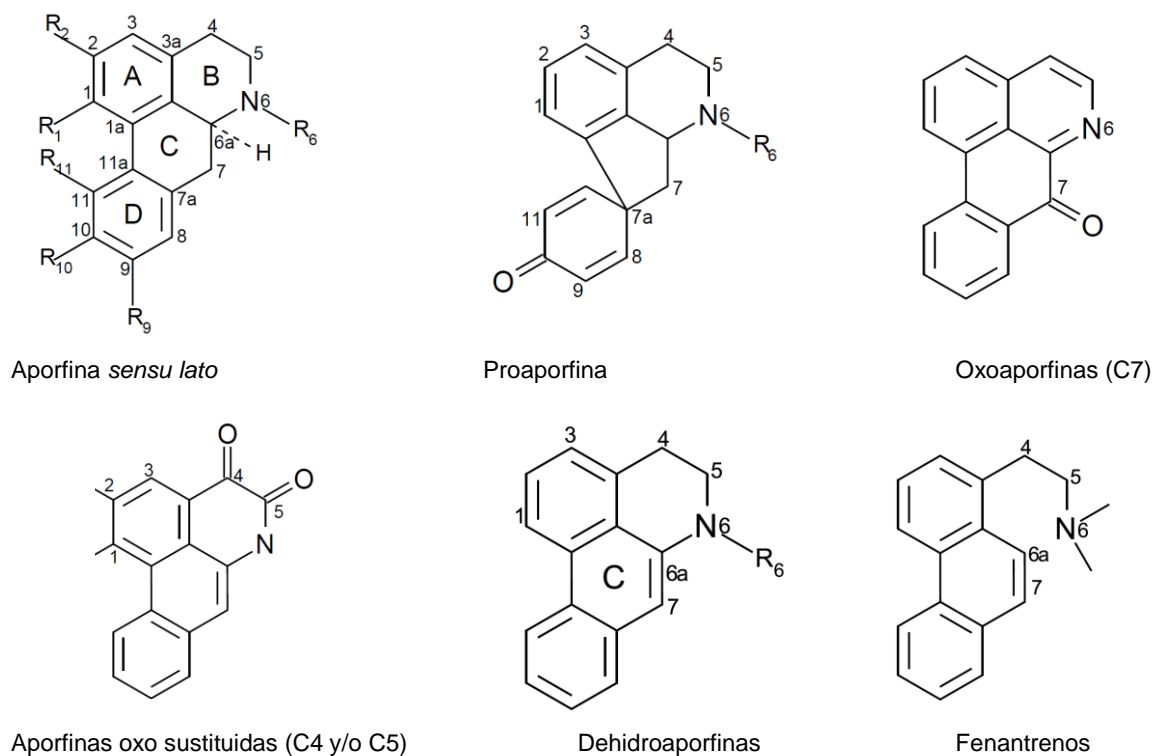


Figura 8. Variedad de estructuras aporfínicas en Annonaceae (Adaptado de Cave et al, 1987).

Las aporfinas no son exclusivas de la familia, pero las que producen las anonáceas presentan algunas características particulares: a) regularmente tienen O-sustituciones; b) el C1 y el C2 están invariablemente sustituidos como resultado de su origen bencilisoquinolínico; c) el anillo D generalmente se caracteriza por presentar cuatro patrones comunes, no estar sustituido, estar monosustituido en cualquiera de las cuatro posibles posiciones, aunque la sustitución en el C8 esta escasamente reportada, estar disustituido usualmente en C9/C10 ó C10/C11 y finalmente por no estar trisustituido como ocurre en las aporfinas de las Lauraceae (Cave *et al*, 1987).

La gama estructural de las aporfinas puede ser agrupada según Cave *et al*, 1987 en siete tipos :1) *Proaporfinas*, numéricamente son aún un grupo pequeño en las anonáceas, pero con la importancia de ser, presumiblemente, los precursores de las aporfinas verdaderas; 2) *Aporfinas sensu lato*, son el grupo principal, el cual a su vez puede subdividirse en 4 subgrupos: las aporfinas *sensu stricto* (s.s.) consistente en O- sustituciones solo en el anillo A (C1 y C2) o también en el anillo D (C9, C10 y C11); las dehidroaporfinas, un grupo pequeño que a diferencia de las aporfinas s.s. se caracterizan por presentar una insaturación adicional exclusivamente entre el C 6a y el C7; los 7 alquil-aporfinoides, en las cuales el C7 puede estar doblemente metilado o alternativamente sustituido como 7, 7, hidroxil, metil aporfina, e invariablemente contener insaturaciones, algunas veces como dehidroaporfinas, o como 6, 6a dehidroaporfinas, o en algunos casos como 4, 5, 6, 6a tetrahydroaporfinas con un anillo B completamente aromatizado; el subgrupo final son las aporfinas 7-oxisustituidas u ocasionalmente 4, 7 dioxi sustituidas, el grupo sustituyente puede ser un hidroxilo y/o un metoxilo; 3) *Oxoaporfinas*, alcaloides con un sustituyente oxo (cetónico) en el C7 y un esqueleto completamente aporfínico; 4) *Aporfinas oxo sustituidas* (cetónicas) en el anillo B ya sea en el C5 o doblemente sustituidos en los C4 y C5, un grupo raro y pequeño en número; 5) *Aporfinoideos diméricos*, la mayoría de estos alcaloides son el resultado de la unión entre el C4 de una oxoaporfina y el C7 de una 4, 5, 6a, 7 tetrahydroaporfina, algunas más son monómeros idénticos de oxoaporfinas unidas mediante C7 a C7; 6) *Fenantrenos*, alcaloides de origen aporfínico pero en los cuales esta roto el anillo B por medio de una escisión entre el

N6 y el C(6a) que permite la aparición de un núcleo fenantreno (tricíclico) con una cadena lateral de etilamina, el N tiene uno o dos sustituyentes metilo y 7) *Alcaloides derivados de aporfinoïdes*, un grupo pequeño de alcaloides que aparentemente son derivados aporfínicos pero que no han podido ser colocados dentro de los grupos anteriores.

Aun cuando el conocimiento que se tiene sobre la sistematización del aislamiento de alcaloides en la familia es fragmentario, se puede mencionar que por lo menos en 50 géneros y aproximadamente en unas 300 especies se han reportado aporfinas, es decir un 12 a 15% del total de las anonáceas. Las aporfinas s. s. y las oxoaporfinas están presentes en el 71 y 69% de las especies estudiadas. Estructuralmente las aporfinas *sensu lato* y las oxoaporfinas son las más diversas (64 y 20% respectivamente). En particular las aporfinas s. s., anonaína, anolobina, asimilobina, xylopina y las oxoaporfinas, lanuginosina y liriodenina son los alcaloides más ampliamente distribuidos. *Guatteria* y *Annona* son los géneros más explorados, en algunas especies se han identificado hasta 35 alcaloides acumulados en varios de sus tejidos (Henry 1942; Shama 1967; Guinaudeau *et al*, 1975, 1979; 1983; 1994; Cave *et al*, 1987; Bentley 1997, 1999, 2001, 2003, 2005, 2006, 2007; Shulgin & Perry, 2002; González-Esquinca *et al*, 2001; 2007).

Las aporfinas de las anonáceas se han investigado en relación a su actividad biológica, en cuanto a sus propiedades farmacológicas, por ejemplo kuafumina, liriodenina, O-metilatherolina y oxopurpureína muestran actividad citotóxica considerable de acuerdo a los criterios del NCI (National Cancer Institute, USA) sobre 15 líneas celulares de cáncer, entre ellas a las de: carcinoma de pulmón humano (A-549), carcinoma de colón humano (HCT-8), carcinoma epidérmico (KB), leucemia celular (P-388) y leucemia linfocítica (L-1210), las células KB parecen ser las más sensibles (CI₅₀ de 0.5, 8.5, 15.2 y 14.5 µM respectivamente) (Sonnet *et al*, 1971; Wu *et al*, 1987; Wu *et al*, 1988); sin embargo su poca solubilidad en disolventes inocuos hace que su actividad antitumoral *in vivo* sobre KB sea considerada no viable y por lo tanto son candidatos aun relativamente moderados de posibles fármacos clínicos (Sonnet *et al*, 1971; Suffnes & Cordell, 1985; Aniszewski, 2007). En tanto que dicentrina y actinodaphnina son considerados posibles

antitumorales, dicentrina en un régimen *in vivo* de administración intraperitoneal de 100 µg/ratón dos veces por 4 semanas, inhibió significativamente el crecimiento celular de células de leucemia mieloide (K562) en ratones con inmunodeficiencia combinada severa (SCID) (Huang *et al*, 1998).

Las actividades antimicrobianas de las aporfinas quizás sean de las más conocidas dado su amplio espectro, tan solo por citar dos ejemplos, anonaina, liriodenina, lisicamina, norushinsunina y xylopina *inhiben in vivo e in vitro* el crecimiento de *Candida albicans* (Clark *et al*, 1987; Clark & Hufford, 1992; Schiff, 1996), y liriodenina, lisicamina, *O*-metilmoschatolina y coridina tienen actividad contra *Mycobacterium phlei* (Menachery, 1996). También son conocidas por sus propiedades antiparasitarias, entre ellas dehidrooemerina, xylopina, criptodorina, neolitsina, nornanteina y nornuciferina tienen actividad significativa sobre *Leishmania donovani*, *L. mexicana*, *L. major*, *L. panamensis*, *Plasmodium falciparum*, *Leishmania donovani*, *Trypanosoma cruzi* y *T. brucei* con DL₅₀ que van en el mejor de los casos desde los 0.4 pmol/mL a los 15 µmol/mL (Montenegro *et al*, 2003; Correa *et al*, 2006; Bero *et al*, 2009). Sin embargo estos alcaloides también tienen alta citotoxicidad, lo cual puede limitar el uso de su bioactividad en el desarrollo de posibles productos antimalaria.

Algunos aporfinas también son agentes dopaminérgicos y pueden tener actividad sobre neurotransmisores adrenérgicos y serotoninérgicos, otros más poseen efectos vasodilatadores (por inhibición de la entrada de calcio extracelular y algunas veces por modificaciones de tejidos específicos del transporte de calcio), finalmente también se las ha determinado actividades antiplaquetarias (Stévigny, 2005; Singla *et al*, 2010; Wink 2010).

Solo una aporfina, la boldina, está disponible en el mercado como producto farmacéutico, este alcaloide aislado originalmente de *Peumus boldus* y presente en algunas especies de *Desmos* y *Polyalthia*, posee propiedades antioxidantes y coleréticas (estimulación de la secreción de bilis) y es suministrado en medicina como tratamiento para la disfunción hepatobiliar menor, perturbaciones digestivas y como auxiliar en el estreñimiento (Stévigny, 2005).

2.4. Metabolitos secundarios en el desarrollo temprano de las plantas

La germinación y el subsecuente desarrollo de la plántula son las etapas iniciales para el establecimiento de un nuevo individuo de cualquier especie vegetal. La germinación inicia con la absorción de agua por parte de la semilla (imbibición) y termina en *sensu stricto* según Nonogaki *et al*, 2007 y Weibrecht *et al*, 2011 cuando una parte del eje embrionario (usualmente la radícula) se extiende y atraviesa las cubiertas seminales (emergencia). La emergencia representa el comienzo del desarrollo de la plántula sustentado inicialmente en las reservas energéticas del endospermo o los cotiledones (Bewley & Black, 1994; Nonogaki, 2010).

Estos procesos han sido estudiados desde mediados del siglo pasado, abarcando los aspectos genéticos, fisiológicos, metabólicos y ecológicos que rodean el crecimiento y desarrollo de la nueva generación vegetal (Figura 9). Algunas revisiones bien sistematizadas de los temas son las de Koller *et al*, 1962; Thomas 1993; Bewley & Black, 1994; Bewley 1997; Baskin & Baskin, 1998; Bove *et al*, 2001; Koornneeff *et al*, 2002; Bradford & Bewley, 2002; Kucera *et al*, 2005; Finch-Savage & Leubtner-Metzger, 2006; Bradford & Nonogaki, 2007; Nonogaki, 2010; Weibrecht *et al*, 2011.

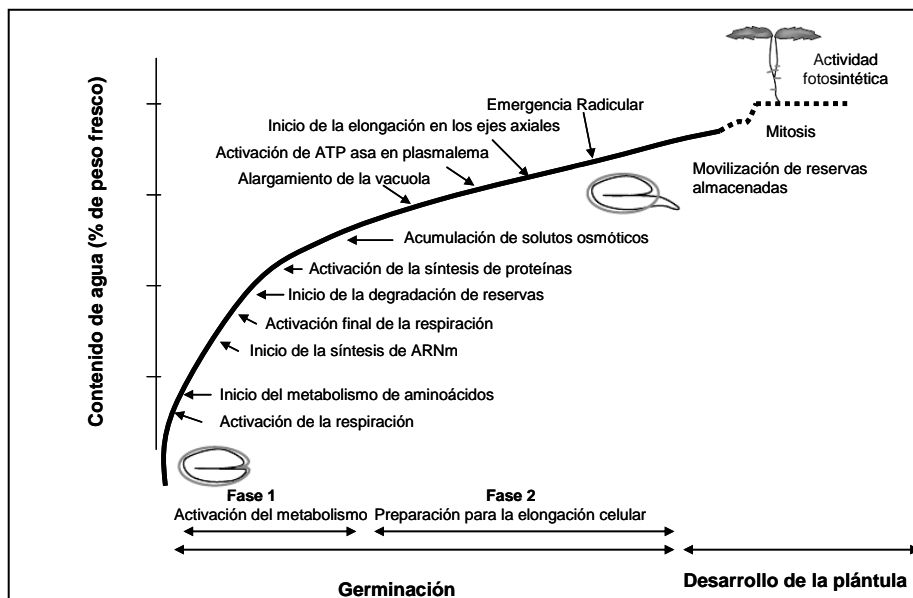


Figura 9. Germinación y desarrollo temprano de las plantas (Adaptado de Bove *et al*, 2001).

Entre los sucesos metabólicos escasamente atendidos está el relacionado con la presencia de moléculas del metabolismo secundario, que suelen desempeñar funciones ecológicas y por lo tanto tal vez intervendrían en su establecimiento y comunicación con el ambiente en el que crecerán (Berenbaum, 1995; Dixon, 2001, Hartmann, 2008).

Los MS que pudieran estar presentes en estas etapas pueden ser aportes de la planta madre y acumularse en los endospermos o cotiledones del embrión y a lo largo del desarrollo distribuirse en la plántula en crecimiento o ser biosintetizados *de novo*; cualquiera de las dos situaciones ha sido escasamente documentada. Como quiera que sea los metabolitos secundarios representarían un recurso ventajoso en el desarrollo temprano de la planta, suponiendo un punto interesante en el significado y biología de los MS en el reino vegetal.

En esta parte se documenta la presencia e importancia de MS durante el desarrollo temprano. La recopilación de la literatura abarcó una revisión retrospectiva desde el 2012, utilizando los buscadores y las bases de datos tradicionales, se emplearon y combinaron las palabras claves early plant development, early ontogeny, ontogenic development, germination, seedling, seedling development con secondary metabolism, secondary metabolites, natural products, plant secondary products, plant secondary metabolites, alkaloids, anthocyanins, anthocyanidins, cyanogenic glycosides, flavonoids, hydroxamic acids, phenols, terpenes, terpenoids, polyketides, phenylpropanoids, pigments, flavours, essential oils, volatile oils, acetogenins, coumarins, and allelopathy, además también (por separado) metabolism early plant development, metabolism germination, and metabolism seedling.

Las fases de desarrollo que se consideraron en esta revisión son la germinación y el desarrollo de la plántula correspondientes a la escala decimal 0 (1-9) y 1 (10-15) de Zadoks (1974) y BBCH (Hess *et al*, 1997) que fisiológicamente comprenden desde la semilla seca hasta que la plántula tiene capacidad fotosintética.

Se registraron al menos 203 MS reportados en 99 especies: 85 fenoles en 33 especies, 78 alcaloides en 39 especies y 40 terpenoides en 17 especies (Cuadro 2, 3 y 4), 48 % de los metabolitos se encontraron en la etapa de germinación y 52 % durante el desarrollo de la plántula. En los reportes que evaluaron ambas etapas (10% de las citas), 80% de los MS aparecen desde la germinación y se mantienen en la etapa de plántula.

Los primeros reportes encontrados sobre los MS en el desarrollo temprano vegetal son los de Leete & Marion en 1951, con la biosíntesis del alcaloide gramina derivado del triptófano en *Hordeum vulgare*, el de Reinouts Van Haga en 1954 para los alcaloides de *Atropa belladonna* y el de Tso & Jeffrey en 1956 para los alcaloides nicotina y nornicotina para *Nicotiana tabacum* y *N. rustica*.

Los metabolitos mas frecuentes en la literatura científica que aluden a aspectos de química estructural y significancia biológica, son los ácidos hidroxámicos en cereales trabajados por el grupo de H. Niemeyer, los alcaloides quinozilídnicos del género *Lupinus* por el grupo de M. Wink iniciados en la década de 1980 y con estudios de biosíntesis, los alcaloides indólicos de *Catharantus roseus* por el grupo de V. de Luca y de alcaloides bencilisoquinolínicos en Papaveraceae y Berberidaceae por el grupo de P. Fachini en 1990. En las últimas décadas destacan en número, los estudios de ecología química que explican el papel de los ácidos hidroxámicos frente a la herbivoría de áfidos durante el desarrollo temprano del trigo, cebada y maíz (~20 citas en dos décadas) y la actividad alelopática de los alcaloides de *Lupinus* (~15 citas en dos décadas).

Cuadro 2. Alcaloides y otros MS nitrogenados en el desarrollo temprano de las plantas.

Especies	Compuestos	Etapas	Referencias
<i>Atropa belladonna</i>	alcaloides totales	Plántula	Reinouts VH, 1954; Abdel-Haady, 2008
<i>Camellia sinensis</i>	cafeína, theobromina	Germinación	Suzuki & Waller, 1987
<i>Camptotheca acuminata</i>	camptothecina	Germinación	López-Meyer & Nessler 1997; Valletta <i>et al</i> , 2007
<i>Catharanthus roseus</i>	camptothecina, 10 hidroxycamptothecina	Plántula	Zu <i>et al.</i> , 2003
	cabersonina, catharantina vindolina,	Germinación	Aerts <i>et al</i> , 1994; Aerts <i>et al</i> , 1996; Shukla <i>et al</i> , 2006
<i>Cinchona ledgeriana</i>	ajmalicina, catharantina, tabersonina, vinblastina, vincristina, vindolina	Plántula	Bonzom <i>et al</i> , 1998; Magnotta <i>et al</i> , 2006; Vázquez-Flota <i>et al</i> 2004; Guo <i>et al</i> , 2007; Miranda-Ham <i>et al</i> , 2008
	cinchonina, dehydro-cinchonina	Germinación, Plántula	Aerts <i>et al</i> , 1990; Aerts <i>et al</i> , 1991; Aerts <i>et al</i> , 1994
<i>Coffea arabica</i>	cafeína, theophilina, trigonelina	Germinación	Friedman & Waller, 1983; Baumann & Gabriel, 1984; Shimizu & Mazzafera, 2000.
<i>Crotalaria scassellatii</i>	trigonellina, theobromina, cafeína	Plántula	Zheng & Ashihara, 2004
	N oxido-(axillaridina, axillarina, desoxiaxillarina)	Plántula	Toppel <i>et al</i> , 1988
<i>Cytisus scoparius</i>	lupanina, 13-hidroxilupanina, 13-tigloiloxilupanina, tetrahidrohombifolina, 17-oxosparteina, (-)-3 β -hidroxi-13 α -tigloiloxilupanina	Plántula	Wink & Witte 1985; Saito <i>et al</i> , 1994
<i>Datura innoxia</i>	atropina, escopolamina	Plántula	Petri, 1982
<i>Festuca pratensis</i>	lolina	Plántula	Justus <i>et al</i> , 1997
<i>Glycine max</i>	trigonellina	Plántula	Cho <i>et al</i> , 2008
<i>Heimia salicifolia</i>	fenilquinolizidinas, (2-hidroxi-4-(3-hidroxi-4-metoxifenil) quinolizidinas	Plántula	Rother & Schwarting, 1975
<i>Hordeum distichum</i>	hydroxinamic acids	Plántula	Argandoña <i>et al</i> , 1981;
<i>Hordeum vulgare</i>	gramina, hordenina, N-metiltiramina	Germinación, Plántula	Leete Marion, 1954; Tyler, 1958; Mann <i>et al</i> , 1963; Liu & Lovett, 1993; Ahman <i>et al</i> , 2000, Matsuo <i>et al</i> , 2001;
<i>Laburnun anagyroides</i>	citisina, N-metilcitisina, 5,6 dehidrolupanina, anagirina, lupanina, rhombifolina, 13-hidroxianagirina, N-metilcitisina, ammondendrina	Plántula	Wink & Witte 1985
<i>Lupinus albus</i>	albina, α -isolupanine, lupanina, 13-hidroxilupanina, 13-angeloil-oxilupanina, 13-tigloiloxilupanina, 13-benzoiloxilupanina, angustifolina, 17-oxolupanina, N-metilalbina, multiflorina	Germinación	Wink, 1983; Wink & Witte 1985; de la Cuadra <i>et al</i> , 1994; de Cortes <i>et al</i> , 2005
	13-tigloiloxilupanina, lupanina	Plántula	Wink, 1983; Wink 1987
<i>Lupinus angustifolius</i>	ester 13-tigloiloxilupanina	Germinación	Wink, 1987; de Cortes <i>et al</i> , 2005
<i>Lupinus campestris</i>	hidroxiafillina, hidroxiafillidina	Germinación	de Cortes <i>et al</i> , 2005
<i>Lupinus harwegii</i>	gramina	Germinación, Plántula	Leete, 1975
<i>Lupinus hirsutus</i>	(+)-(trans-4'-acetoxicinnamoil) epilupinina,	Germinación, Plántula	Takamatsu <i>et al</i> , 1991
	(-)-13 α -tigloiloximultiflorina, (-)- multiflorina, (+)-epilupinina		
<i>Lupinus luteus</i>	lupinina, sparteina, lupanina	Germinación	de la Cuadra <i>et al</i> , 1994
<i>Lupinus polyphyllus</i>	4-hidroxilupanina, 13-tigloiloxilupanina	Germinación, Plántula	Wink & Witte, 1985
<i>Nicotiana rustica</i>	nicotina, nornicotina, anabasina, anatabina,	Germinación	Week & Bush, 1974

<i>Nicotiana tabacum</i>	nicotina, nornicotina, anabasina, anatabina	Germinación	Tso & Jeffrey, 1956; Week & Bush, 1974
<i>Nicotiana glutinosa</i>	nicotina	Germinación	Tso & Jeffrey, 1956
<i>Papaver bracteatum</i>	thebaina, sanguinarina	Germinación	Rush <i>et al</i> , 1985
<i>Papaver somniferum</i>	thebaina, sanguinarina	Germinación, Plántula	William & Ellis, 1989; Facchini, <i>et al</i> , 1996; Huang & Kutchan, 2000
<i>Phaseolus aureus</i>	trigonellina	Germinación	Zheng <i>et al</i> , 2005; Zheng <i>et al</i> , 2008
<i>Pinus ponderosa</i>	pinidina, otros alcaloides piperidínicos	Germinación	Tawara <i>et al</i> , 1995
<i>Pisum sativum</i>	trigonellina	Germinación, Plántula	Evans <i>et al</i> , 1979; Evans & Tramontano, 1984
<i>Psychotria brachyceras</i>	brachicerina	Plántula	Gregianni <i>et al</i> , 2004
<i>Lolium spp.</i>	perlolina, halostachina	Plántula	Aasen <i>et al</i> , 1969
<i>Ricinus communis</i>	ricinina	Plántula	Dubeck & Kirkwood, 1952
<i>Secale cereale</i>	ácidos hidroxámicos (DIBOA, DIMBOA)	Germinación, Plántula	Argandoña <i>et al</i> , 1980
<i>Senecio jacobaea</i> , S. <i>vulgaris</i>	alcaloides pirrolizidínicos	Germinación, Plántula	Schaffner <i>et al</i> , 2003
<i>Triticum aestivum</i> , T. <i>durum</i> , T. <i>carthlicum</i> , T. <i>compactum</i> , T. <i>macha</i> , T. <i>dicochum</i> , T. <i>monococcum</i> , T. <i>polonicum</i> , T. <i>spelta</i> , T. <i>sphaerococcum</i> , T. <i>turgidum</i> , T. <i>zhukovskyi</i>	ácidos hidroxámicos (DIBOA, DIMBOA)	Germinación, Plántula	Argandoña <i>et al</i> , 1980; Argandoña <i>et al</i> , 1981; Niemeyer <i>et al</i> , 1989b; Thackray <i>et al</i> , 1990; Gianoli & Niemeyer, 1997; Niemeyer <i>et al</i> , 1998
<i>Zea mayz</i>	ácidos hidroxámicos (DIBOA, DIMBOA)	Germinación, Plántula	Klun & Robinson, 1969; Collantes <i>et al</i> , 1998

Cuadro 3. Fenoles en el desarrollo temprano de las plantas.

Especies	Compuestos	Etapas	Referencias
<i>Arabidopsis thaliana</i>	anthocianinas	Germinación, Plántula	Kubasek <i>et al</i> , 1992; Martin <i>et al</i> , 2002; Poustka <i>et al</i> , 2007; Scheible <i>et al</i> 2004
	ácido cafeico, ácido cinámico, rutina, ácido ferulico, ácido benzoico	Plántula	
<i>Arachis hypogaea</i>	ácido trans-cafeico, ácido clorogénico, ácido cis-cafeico, ácido protocatechuico, ácido cis-p-coumarico, ácido p-hidroxi benzoico, ácido trans-p-coumarico, ácido trans-ferulico, ácido sinapínico, ácido vanillico, ácido cis-ferulico.	Germinación, Plántula	Devi & Reddy, 2002; Wu <i>et al</i> , 2011
<i>Betula pendula</i>	anthocianina, miricetin-3-galactósido, miricetin-3-glucósido, ácido clorogénico, quercetin 3-galactósido, quercetin 3-rhamnósido, kaempferol 3-rhamnósido	Plántula	Tegelberg <i>et al</i> , 2004.
<i>Betula pubescens</i>	ácidos fenólicos, salidroside, rhododendrin, ellagitanninas, flavan-3-oles, taninos condensados solubles	Plántula	Keski-Saari & Julkunen-Tiito, 2003; Keski-Saari <i>et al</i> , 2007
<i>Brassica napus</i>	compuestos fenólicos	Germinación	Zobel <i>et al</i> , 1994; Wronka <i>et al</i> , 1994
<i>Brassica oleracea</i> , <i>Brassica rapa</i>	Anthocianinas	Germinación	Siegelman & Hendrichs, 1957; Zhou <i>et al</i> , 2007
<i>Capsicum annuum</i>	ácido ferulico, ácido cafeico, ácido clorogénico	Germinación, Plántula	Diaz <i>et al</i> , 1997
<i>Coffea arabica</i>	ácido clorogénico (ácido 5-O-cafeoil-quinico).	Plántula	Aerts & Baumann, 1994
<i>Cypripedium macranthos</i> var. <i>rebunense</i>	lusianthrina, chrisina	Germinación	Shimura <i>et al</i> , 2007

<i>Daucus carota</i>	quercetina, kaempferol, rutina y quercetina 3-rutinósidos, flavonas (apigenina, luteolina)	Plántula	Poulin <i>et al</i> , 1993
<i>Dolichos lablab</i>	taninos, polifenoles totales	Germinación	Ramakrishna <i>et al</i> , 2006
<i>Fagopyrum esculentum</i>	rutina, quercitina	Germinación	Kim <i>et al</i> , 2004; Choi <i>et al</i> , 2007
<i>Glycyne max</i>	anthocianinas, proanthocianinas, luteolina	Plántula	Zabala <i>et al</i> , 2006
<i>Glycine max</i>	kampferol, quercetina, isorhamnetina, daidzeína, genisteína	Germinación	Grahamn, 1991
<i>Hordeum vulgare</i>	(+) - catechina, ácido ferulico	Germinación	Lu <i>et al</i> , 2007
<i>Lactuca sativa</i>	ácido clorogénico	Plántula	Narukawa <i>et al</i> , 2009
<i>Lens culinaris</i>	aldehido p-hidroxibenzoico, ácido p-hidroxifenilpropionico, vanillina, T4 (tetramero de proacnidina), ácido ferulico, B5 [(±)-epicatechin-(4-6)-epicatechina]	Germinación	Bartolome <i>et al</i> , 1997
<i>Lotus japonicus</i>	glucósidos de kaempferol	Plántula	Suzuki <i>et al</i> , 2008
<i>Lupinus luteus</i>	Apigenina, 7-O-beta-neohesperidosido, genisteína 8-C-beta-glucósido, Genisdteína 7-O-(6-malonil) glucósido	Plántula	Katagiri <i>et al</i> , 2002
<i>Lycopersicon esculentum</i>	Anthocianinas	Germinación, Plántula	Hubb <i>et al</i> , 1997; El-Araby <i>et al</i> , 2006; Guo <i>et al</i> , 2010
<i>Medicago sativa</i>	4',7-dihidroxi-flavona, 4'-7-dihidroxi-flavanona, 4,4'-dihidroxi-2'-methoxichalcona	Germinación	Maxwell <i>et al</i> , 1989
<i>Medicago sativa</i>	daidzeína, 7,4-dihidroxi-flavona, formononetina, isoliquiritigenina, liquiritigenina, 2-metoxi-isoliquiritigenina.	Plántula	Silveira <i>et al</i> , 1998
<i>Oriza sativa</i>	ácid férulico, ácido sinapínico	Germinación	Tian <i>et al</i> , 2004
<i>Pangium edule</i>	fenoles totales	Germinación	Andarwulan <i>et al</i> , 1999
<i>Pennisetum glaucum</i>	polifenoles totales	Germinación	Abdelrahman <i>et al</i> , 2007
<i>Pennisetum typhoideum</i>	polifenoles totales	Germinación	Abdelrahman <i>et al</i> , 2007
<i>Phaseolus, Lens, Pisum spp</i>	fenoles totales	Germinación	López-Amorós <i>et al</i> , 2006
<i>Ricinus communis</i>	flavonoides, anthocianinas	Germinación Plántula	Khogali <i>et al</i> , 1993.
<i>Sesamum indicum</i>	(+)-pinoresinol, (+)-sesaminol,	Germinación	Ono <i>et al</i> , 2006
<i>Sesbania vesicaria, S. drummondii</i>	flavonoides totales, taninos condensados totales	Germinación	Ceballos <i>et al</i> , 1998
<i>Sesbania virgata</i>	(+)-catechina	Germinación	Simões <i>et al</i> , 2008.
<i>Sinapis alba</i>	Flavonoides	Plántula	Zenner & Bopp, 1987.
<i>Solanum lycopersicum</i>	petunidina 3-(caffeoil) rutinosido-5-glucósido, petunidina 3-(p-coumaroil) rutinosido-5-glucósido, malvidina 3-(p-coumaroil) rutinosido-5-glucosido, quercetina kaempferol	Plántula	Bovy <i>et al</i> , 2002
<i>Sorghum bicolor</i>	dhurrina, apigeninidina, luteolinidina, 3-anthocianinas	Plántula	Nicholson <i>et al</i> , 1987; Weiergang <i>et al</i> , 1996; Huang & Backhouse, 2005
<i>Trapa natans</i>	fenoles totales	Plántula	Baldisserotto <i>et al</i> , 2007
<i>Vigna radiata</i>	anthocianinas	Plántula	Dumortier & Vendrig, 1982a
<i>Vitis amurensis</i>	(+) catechina, (-) epicatechina	Germinación	Weidner <i>et al</i> , 2007
<i>Zea mays</i>	anthocianinas	Plántula	Duke & Naylor, 1976

Cuadro 4. Terpenos en el desarrollo temprano de las plantas.

Especies	Compuestos	Etapa	Referencias
<i>Chrysanthemum cinerariaefolium</i>	piretrina	Plántula	Matsuda <i>et al</i> , 2005
<i>Brassica</i>	triterpenos esteroides	Germinación	Ingrams <i>et al</i> , 1968 En: Baisted 1971
<i>Calendula officinalis</i>	triterpenos esteroides	Germinación	Kasprzyk <i>et al</i> , 1971 En: Baisted 1971
<i>Cheiranthus cheiri</i>	triterpenos esteroides	Germinación	Ingrams <i>et al</i> , 1968 En: Baisted 1971
<i>Eucalyptus nitens</i>	α -pineno, sideroxilona, cineole	Plántula	MCarthur <i>et al</i> , 2010
<i>Gossypium hirsutum</i>	desoxihemigossipol, desoxi-6-methoxihemigossipol, 6-methoxihemigossipol, 6-methoxigossipol, 6,6'-dimethoxigossipol	Plántula	Hunter <i>et al</i> , 1978
	(Z)-3-hexenil acetato, hexil acetato, (E)- β -3-ocimeno, (3E)-4,8-dimetil-1,3,7-nonatrieno, and (Z)-3-hexenil butirato	Plántula	McCall <i>et al</i> , 1994
	α -pineno, β -pineno, (E)- β -ocimeno, myrceno, α -humuleno, β -bisabolol, (E)- β -ocimeno, (E)- β -caryophylleno	Plántula	Opitz <i>et al</i> , 2008
<i>Happlopappus heterophyllus</i>	triterpenos esteroides	Germinación	Bennett <i>et al</i> , 1967 En: Baisted 1971
<i>Melaleuca alternifolia</i>	α -pinene, β -pinene, & terpinolene	Plántula	Southwell & Russell, 2003.
<i>Melaleuca alternifolia var rich oil</i>	1,8-cineole, α -pinene, β -pinene, & terpinolene	Plántula	Southwell & Russell, 2003.
<i>Nicotiana tabacum</i>	estigmasterol, campesterol	Germinación	Bush & Grunwald, 1972
<i>Phaseolus vulgaris</i>	triterpenos esteroides	Germinación	Duperon & Duperon, 1965, En: Baisted, 1971
<i>Plantago lanceolata</i> , <i>P. major</i>	glucósidos iridioides,	Plántula	Barton, 2007
<i>Pisum sativum</i>	triterpenos esteroides	Germinación	Vilyams & Krochina, 1966 En: Baisted, 1971
<i>Raphanus sativus</i>	triterpenos esteroides	Germinación	Ingrams <i>et al</i> 1968 En: Baisted, 1971
<i>Ricinus communis</i>	sasbeno	Plántula	Sitton & West, 1975
<i>Sinapis alba</i>	triterpenos esteroides	Germinación	Knights <i>et al</i> , 1968 En: Baisted 1971
	estigmasterol, β -sitosterol	Germinación	Kemp, Goad & Mercer, 1967
<i>Zea mays</i>	sesquiterpenoide naphthaleno, 1,2,4a,5,8,8a-hexahidro-4,7-dimetil-1-(1-metiletil) (1a,4ab,8aa)	Plántula	Shen <i>et al</i> , 2000

Variación de los MS durante el desarrollo temprano.

La presencia de los MS, como ya se comentó, puede ser un aporte directo de la planta madre (Bauman & Gabriel, 1984; Susuki & Waller, 1987) o biosintetizarse *de novo* (Aerts *et al*, 1990; Niemeyer, 1988; Aerts *et al*, 1996; Huub *et al*, 1997;

Matsuda *et al*, 2005). Estas dos situaciones presuponen en todo caso un desvío considerable de recursos energéticos y una maquinaria biosintética, primero durante la embriogénesis y/o maduración de las semillas y después en algún momento de la germinación o del crecimiento de la plántula. Hay especies con las dos estrategias: acumulan MS en las semillas y durante el desarrollo temprano incrementan y/o disminuyen tanto la cantidad como la diversidad de estos (Takamatsu *et al*, 1991; Wink & Witte, 1985; de la Cuadra *et al*, 1994; Keeski-Saari & Julkunen-Tiito, 2003; Zheng *et al*, 2004; Zheng *et al*, 2005), originando una característica sobresaliente en la dinámica de los MS, ya que la expresión genética del conjunto de MS de una especie no es un reflejo de la situación individual, lo que señala una regulación genética diferencial para cada molécula. *Coffea arabica* representa un buen ejemplo de la variación de los MS durante la germinación, las semillas contienen los alcaloides cafeína y trigonelina y el fenol ácido clorogénico en cantidades aproximadas al 1 y 2 % en peso seco, inmediatamente iniciada la germinación (entre 1 y 5 días) los compuestos se mueven desde los cotiledones a los otros tejidos del embrión en crecimiento o se excretan al medio circundante, al calcular las cantidades en cada tejido o excretadas, resulta que la presencia de cafeína es 2.5 veces mayor que la encontrada previa a la germinación, la trigonelina prácticamente permanece igual, mientras que el nivel de ácido clorogénico se reduce a un tercio del contenido inicial. Casi toda la trigonelina acumulada en los cotiledones es transportada a la plántula en desarrollo, en tanto que la cafeína y el ácido clorogénico son detectados tanto en la plántula como en el medio circundante. Las diferencias entre las cantidades originales de cafeína y las cuantificadas posteriormente (entre 51 y 86 % más) señalan que no toda la cafeína detectada en la plántula es aporte de la planta madre sino que debió haber existido síntesis *de novo*, contrario a lo que ocurre con el ácido clorogénico (Bauman & Gabriel, 1984; Aerts & Baumann, 1994; Zheng *et al*, 2004). Otro caso similar es el de los alcaloides nicotina, nornicotina, anabatina y anabasina de *Nicotiana tabacum*, los contenidos iniciales de nicotina y nornicotina (183 y 74 µg/g peso seco) en las semillas disminuyen a 30 y 60 µg/g desde las 24 a las 96 horas de la germinación, para luego incrementarse considerablemente a 1325 y 119 µg/g justo con la emergencia de la radícula (48 horas después de haber

disminuido), mientras que la cantidad de anabatina (32 µg/g) disminuyen hasta no detectarse, lo opuesto ocurre con la anabasina que de cantidades trazas alcanza niveles de 127 µg/g (Weeks & Bush, 1974).

Choi *et al*, 2007, describieron otro estudio referido a los flavonoides durante la germinación de *Fagopyrum esculentum* y *F. tataricum*; la cantidad de flavonoides totales aumenta durante la germinación de 8 a 145 mg/g peso seco. De ellos la rutina se incrementa a razón de 10 veces más (de 4.5 a 52.7 mg/g peso seco), mientras que la quercetina aparentemente desaparece. A su vez quercitrina y otro flavonoide no identificado son biosintetizados *de novo*, a tal grado que a las 48 h de haberse iniciado la germinación, juntos suman casi el 50% del contenido total de flavonoides.

Otro aspecto a destacar es que esta variación metabólica es distinta incluso entre plantas cercanas que contienen inicialmente perfiles semejantes, es decir que el movimiento de metabolitos secundarios iguales pudiera también estar regulado por la especie; esta documentado que varias especies de *Lupinus* depositan en sus semillas alcaloides quinolizidinicos, por ejemplo *L. angustifolius*, *L. albus* y *L. campestris* acumulan cerca de 2.5 % en peso seco (15, 23.6 y 24.5 mg/g respectivamente) (de Cortes *et al*, 2005), usualmente una gran parte son lupanina e hidroxilupanina (Wink & Witte, 1985). Durante los primeros días de la germinación la cantidad de alcaloides totales disminuye de un 20 a 50%, sin embargo esta aparente pérdida se recupera en los días posteriores, coincidiendo con el inicio de la capacidad fotosintética (Wink & Witte, 1985). Este comportamiento general como se ha señalado en los casos anteriores, no representa la situación de cada uno de los MS, en este ejemplo en *L. albus*, lupanina se incrementa y albina y 13-hidroxilupanina disminuyen sustancialmente, en tanto que en *L. angustifolius* solo 13-hidroxilupanina disminuye. En *L. campestris* hidroxiafilina y hidroxiafilidina se incrementan, mientras que epihidroxiafilidina y dehidroepihidroxiafilidina disminuyen, y lupanina se mantiene constante (de Cortes *et al*, 2005). Se observa también que mientras los alcaloides libres disminuyen, sus derivados tipo ester aumentan, el más importante es 13-tigloiloxilupanina -con una actividad antimicrobiana 20 veces mayor que la de su precursor (13-hidroxilupanina)- que se incrementa progresivamente

durante la germinación de *L. angustifolius* (de 0 a 4.4 mg/g) y en *L. albus* (de 10 a 200 µg/g) (Wink & Witte 1985; de Cortes *et al*, 2005).

El número de MS no siempre se incrementa ni es proporcional al desarrollo de la plántula, por ejemplo las semillas de lenteja (*Lens culinaris*) contienen 45 fenoles que en total suman 41.72 µg/g peso seco, durante la germinación (6 días después) el número y la cantidad de fenoles disminuyen a 15 ms y 4.47 µg/g, 67 y 89 % menos de diversidad y abundancia química; en este fenómeno como en los otros, hay comportamientos individuales, ya que por un lado (+) catequina deja de detectarse y las principales proantocidinas se convierten en un tetrámero (Bartolome *et al*, 1997).

En los ejemplos anteriores las especies referidas contenían algunos MS formados durante la embriogénesis en las semillas, sin embargo hay especies que parecieran biosintetizar *de novo* prácticamente todos sus MS durante el desarrollo temprano, entre ellas están las plántulas de *Arabidopsis thaliana* que con 3 a 5 días de germinación producen antocianinas (Ehman *et al*, 1991; Kubasek *et al*, 1992; Shirley *et al*, 1995; Kubasek *et al*, 1998; Murphy *et al*, 2000; Jeong *et al*, 2010); y también las de *Catharanthus roseus* que con 7 a 10 días de germinación acumulan los alcaloides catharanthina, tabersonina, vindolina, vinblastina y vincristina en cantidades que alcanzan hasta un 2% de su biomasa (Balsevich *et al*, 1988; De Luca *et al*, 1986; Aerts *et al*, 1994; Guo *et al*, 2007). *Zea mays*, *Secale cereale*, *Triticum durum* y *T. aestivum* entre otras gramíneas biosintetizan ácidos hidroxámicos desde el segundo día de germinación, la mayor tasa de producción se detecta al cuarto día (15.2 mmol/kg de biomasa fresca por día en maíz, 7.4 en centeno, 5.0 y 3.2 en los trigos), a partir del quinto día la producción decrece (1-3 mmol/kg peso fresco), pero el contenido total de ácidos hidroxámicos sigue incrementándose conforme avanza el desarrollo de la plántula (Argandoña *et al*, 1981). En los casos mencionados las semillas aparentemente no contenían indicios de los MS biosintetizados más tarde durante las etapas tempranas de las especies.

La riqueza de MS en el desarrollo temprano en algunas especies es relativamente alta, las plántulas de 10 a 20 días de edad del algodón (*Gossypium hirsutum*) biosintetizan 10 terpenos, las de *Lupinus* con 9 días acumulan hasta 13 alcaloides y siete días más tarde empiezan a biosintetizar una mezcla de 23

flavonoides (Hunter *et al*, 1978; Wink, 1983; Bednarek *et al*, 2001). Otras como *Camptoteca acuminata* durante el desarrollo temprano acumulan mayor cantidad de algún MS en particular, por ejemplo el alcaloide camptotecina se deposita en los hipocótilos en cantidades de 4.23 mg/g, cincuenta veces más que en cualquier etapa posterior (Valleta *et al*, 2007).

Al igual que en otras etapas fenológicas los MS se distribuyen órgano-específicamente, Murphy *et al* (2000) y Peer *et al* (2001) demostraron la localización específica de flavonoides en plántulas de *Arabidopsis*, quercitina, kamferol y naringerina están concentrados solo en tres lugares de la plántula, en el nodo cotiledonario, en la zona de transición hipocótilo- raíz y en el hipocótilo. En *Phaseolus aureus* a partir del segundo día de germinación casi toda la cantidad de trigonelina acumulada en los cotiledones de las semillas (~240 nmol) se transporta hacia el hipocótilo del eje embrionario, en el quinto día cuando trigonelina alcanza su nivel más alto (380 nmol), la proporción más importante (~35%) se observa en la parte apical de los hipocótilos (Zheng *et al*, 2005). *Lupinus albus* también mueve los alcaloides contenidos en sus cotiledones hacia los hipocótilos, hojas y raíces en formación durante la germinación (Wink & Witte, 1985). En plántulas de *C. arabica*, la cafeína es distribuida principalmente en hojas y cotiledones, y solamente se encuentran en cantidades trazas se encuentran en radículas y brotes foliares (Zheng & Ashihara, 2004). Los aceites esenciales formados en estas etapas se acumulan en las partes áreas de las plántulas de *Chrysanthemum*, *Citrus*, *Eucalyptus*, *Equinacea* y *Zea* (McCall *et al*, 1994; Turlings *et al*, 1998; Jones *et al*, 2003).

Importancia de los MS durante el desarrollo temprano

La germinación y el desarrollo de las plántulas son etapas cruciales de la vida de los vegetales cuyo éxito permitirá a las plantas establecerse en el ambiente, la presencia de MS durante estas etapas y su distribución espacio-temporal, pueden ser estrategias importantes para sobrevivir. En este apartado se documenta el papel de los MS como reservorios de nitrógeno, sustancias de defensa contra fitopatógenos e insectos, agentes alelopáticos, moléculas con papel de fotoprotección, así como señales de atracción de microorganismos fijadores de nitrógeno.

El nitrógeno y el déficit hídrico son los principales factores que limitan la producción de biomasa y con ello el desarrollo de las plantas, el papel como reservorios de nitrógeno se ha documentado en estudios con *C. arabica*, *Phaseolus aureus* y algunas especies de *Lupinus*. Wink & Witte (1985) propusieron esta función a partir de ensayos con especies de *Lupinus* en diferentes momentos de la germinación y durante el desarrollo de sus plántulas, estos investigadores siguieron (con técnicas espectrométricas clásicas) la movilidad de alcaloides quinolizidínicos (AQ) y determinaron que entre 20 y 50 % de la cantidad inicial de AQ en los cotiledones de las semillas se transfiere a las raíces e hipocótilos durante la germinación y que después de dos semanas los cotiledones casi no tienen AQ. La cantidad que se transfiriere al embrión en crecimiento durante este tiempo (6-10 días) disminuye hasta 60% y solo 4% del total se pierde por exudación al ambiente, por lo que estos autores sugieren que el 54% restante debió ser catabolizado y el nitrógeno utilizado para el crecimiento de la plántula. Un dato más concreto es el proporcionado por Shimizu & Mazzafera (2000), estos investigadores analizaron los cambios en el contenido del alcaloide trigonelina en varias etapas de la germinación de las semillas de *Coffea arabica*; con ensayos de sustratos radiactivos determinaron que las plántulas pueden convertir la trigonelina (*carboxil*-¹⁴C) en ácido nicotínico durante la germinación y ser empleada para la síntesis de NAD, sugiriendo entonces que la trigonelina actúa como un reservorio de nitrógeno en estas etapas (Ashihara, 2006). Aunque Zheng *et al* (2005) y Zheng *et al* (2008) con el empleo de plántulas de 1-2 días de *Phaseolus aureus* determinaron el fenómeno inverso, es decir la biosíntesis de trigonelina desde el ácido nicotínico (*carboxil*-¹⁴C) pasando por NAD, tanto los cotiledones como los embriones en esta etapa incorporaron de 60 a 70% de la molécula marcada a la trigonelina y con el hecho de que el crecimiento de las plántulas es inhibido por la aplicación exógena de ácido nicotínico y nicotinamida, no así con la trigonelina, sugirieron entonces que el alcaloide se biosintetiza desde el ácido nicotínico, y de esta manera, se elimina la toxicidad del exceso de ácido nicotínico y nicotinamida liberados del ciclo de NAD celular (Zheng *et al*, 2005). En todo caso pareciera que trigonelina sería un MS de recambio involucrado en el metabolismo de los nucleótidos dependiendo de las características de las especies.

Algunos autores han señalado además que la trigonelina funciona como un fitoregulator durante la germinación, entre otras cosas porque induce fuertemente la detención del ciclo celular en la fase G2 impidiendo la división celular (Evans *et al*, 1979; Evans & Tramontano, 1984; Minorsky *et al*, 2002). Este metabolito secundario parece ser una molécula típica en plántulas de varias leguminosas (Cuadro 1) (Rozan *et al*, 2000).

Los MS también están implicados en la defensa de las plantas frente a diversos organismos anticipándose a la depredación o a ataques microbianos; en las fases del desarrollo temprano de las plantas también se ha documentado el papel de defensa, un trabajo clásico es el referido a la biosíntesis temprana de ácidos hidroxámicos en gramíneas como sustancias de defensa contra insectos (Argandoña *et al*, 1980; Bohidar *et al*, 1986; Xie *et al*, 1991; Assabgui *et al*, 1995; Davis *et al*, 2000). Argandoña *et al*, (1980) demuestran que la susceptibilidad de tres especies de gramíneas (*Hordeum distichum*, *Secale cereale*, *Triticum durum*) a los áfidos (*Metopolophium dirhodum*) está relacionada con la presencia-ausencia de ácidos hidroxámicos (AHx). Después de infestar con áfidos a plántulas de centeno, cebada y trigo de diferentes edades (10, 16, 22, 28 y 34 días) se observó que las plántulas más jóvenes contenían mayor cantidad de ácidos hidroxámicos y a su vez mostraron mayor resistencia a los áfidos que las plantas con mayor grado de desarrollo. En este mismo estudio, las plántulas de centeno y trigo de 20 días de germinación y posterior a una infestación con áfidos, mostraron un incremento en la biosíntesis de AHx, lo cual fue acompañado de la disminución del número de insectos, a diferencia de las plántulas de cebada que con menor producción de AHx fueron menos tóxicas. Además con ensayos *in vitro* con áfidos alimentados a base de dietas con diferentes AHx en varias concentraciones, se determinó que el DIMBOA (2,4-dihidroxi-7-metoxi-1,4-benzoxacin-3-ona) es el constituyente activo más importante (Argandoña *et al*, 1980). Concluyendo que los AHx actúan como defensas naturales contra *M. dirhodum*. El hecho de que los AHx se biosintetizan recién iniciada la germinación permite suponer su participación en el mecanismo de defensa en esta etapa. Resultados similares se han encontrado con maíz y con diferentes variedades de

trigo frente a *Rhopalosiphum maidis*, *Schizaphis graminum* y *Sitobion avenae* (Bohidar *et al*, 1986; Wratten *et al*, 1988; Niemeyer *et al*, 1989a).

Al parecer también desde el inicio de su vida, las plantas producen compuestos que inhiben el crecimiento de otros organismos vegetales, se ha documentado actividades alelopáticas en *Camellia sinensis*, *Coffea arabica*, *Ipomoea tricolor* y *Lupinus albus* (Wink, 1983; Suzuki & Waller 1987; Macias-Ruvalcaba *et al*, 2008). En *L. albus* Wink (1983) examinó las propiedades alelopáticas de los exudados acuosos de las semillas en germinación a intervalos de 0 a 42 horas, observando que una parte de alcaloides totales se excretan por las raíces de manera exponencial, de 0 hasta 3 mg en un periodo de 1 a 2 días. Los exudados están compuestos principalmente de lupinina (50-75%), cistisina (5-10%) y 13-tigloiloxilupanina (10-20%), los dos primeros son aporte de las semillas, el tercero se forma exclusivamente en ese periodo de germinación, presumiblemente de 13 hidroxilupanina presente en las semillas (Wink & Witte, 1985). Una sola semilla contiene aproximadamente 9 mg de alcaloides y libera al menos durante su germinación cerca de 0.7 mg por las raíces (equivalente a ~ 2 μ mol alcaloides), cantidad suficiente para inhibir el 90% de la germinación de *Lactuca sativa* (Wink, 1983), el autor sugiere que el fenómeno supondría condiciones reales *in vivo*, por lo que propone la actividad alelopática para estos alcaloides, en todo caso probablemente un estudio en el que crezcan juntas las dos especies podría confirmar la hipótesis.

Weir *et al*, 2003 realizaron estudios *in vitro* con *Centaurea maculosa* y determinaron que la secreción de (-) – catequina en niveles fitotóxicos (5 a 40 μ g/mL) inicia dentro de la primera y tercera semana de emergencia de la plántula cultivada en medios líquidos. Para ello compararon diferentes concentraciones de (-) –catequina sobre *Digitalis purpurea*, *Papaver orientale*, tres especies de pastos (*Festuca idahoensis*, *Stipa tenuissima* y *Koeleria cristata*) y sobre la propia *C. maculosa*, los resultados señalaron que mientras concentraciones bajas (10–50 μ g/mL) causaron quemaduras sobre el sistema radicular de todas las especies, solo concentraciones iguales o superiores a 600 μ g/mL fueron suficientes para inhibir el crecimiento de las plántulas de *C. maculosa*, es decir de 12 a 60 veces más.

Indicando que la secreción natural de (-) – catequina por las plántulas ocurren a niveles no tóxicos para ella misma, pero si para otras especies.

Así mismo, se ha documentado que los flavonoides son un mecanismo de defensa de las plantas frente a fitopatógenos, estos MS generalmente son inducibles y se producen antes de la lignificación de tejidos circundantes a la infección (Dixon *et al*, 1994; Dixon & Steele, 1999).

Este fenómeno se ha observado con la inducción del flavonoide antifúngico gliceolina en plántulas de diferentes variedades de *Glycine max* (Graham *et al*, 1990; Graham, 1991; Mohr y Cahill, 2001; Lozovaya *et al*, 2004). Graham *et al* (1990) y Graham (1991) evidenciaron que las plántulas de 7 días de *G. max* acumulan en sus cotiledones los isoflavonoides daidzeína y genisteína (en forma de conjugados glicosilados), daidzeína es precursor directo de gliceolina y genisteína es antifúngico en su forma libre. Al exponer las plántulas al fitopatógeno *Phytophthora megasperma*, se observa que a las 24 h de la infección los isoflavonoides conjugados se hidrolizan y se inicia también la biosíntesis de gliceolina; a las 48 horas la formación de gliceolina alcanza hasta 700 nmol/g peso fresco en los tejidos infectados y la presencia de daidzeína aumenta hasta en 6000 nmol/g. La cantidad que se biosintetiza de gliceolina es hasta 7 veces más que su dosis efectiva (100 nmol/mL) sobre *P. megasperma*, mientras que la de genisteína es de 1 a 10 veces más, por otra parte la presencia de daidzeína es suficiente como para formar gliceolina de 2 a 75 veces más que las requeridas para su actividad antifúngica. Gliceolina también es en parte responsable de la resistencia a *Phytophthora sojae*, de plántulas de soya de 7 a 10 días de edad (Battacharyya & Ward, 1985; Morris *et al*, 1991; Mohr & Cahill, 2001). El papel de defensa de gliceolina también fue soportado por los estudios de Lozovaya *et al*, 2004, estos autores determinaron que gliceolina se produce en las raíces de plántulas de *G. max* como consecuencia de la infección con *Fusarium solani*, y que las cantidades detectadas (100–200 µg/mL, correspondientes a 300–600 µM) en las zonas de infección son superiores a las concentraciones de gliceolina (25-215 µM) que inhiben *in vitro* a *F. solani*. En conclusión los niveles de daidzeína, genisteína y gliceolina en los tejidos de las plántulas de soya pareciera que son suficientemente adecuadas para ofrecer resistencia a los fitopatógenos.

Los flavonoides e isoflavonoides también están implicados como promotores de la nodulación en las raíces de las plántulas de *G. max* y *Medicago sativa* por microorganismos fijadores de nitrógeno (Graham, 1991; Hartwig *et al*, 1991). Las semillas de la alfalfa (*M. sativa*) poseen flavonoides pero no son capaces de inducir la nodulación, sin embargo a las 24 horas después de emergidas las radículas se detecta la presencia de los isoflavonoides conjugados (glucósidos de medicarpina-6"-O-malonato (MGM), glucósido de formononetina 7-O-malonato (FGM), glucósidos de coumestrol (CG), luteoina 7- glucósido y quercitina 3-galactosido) en cantidades suficientes para inducir los genes de nodulación de *Rhizobium meliloti*. Graham (1991) realizó un seguimiento continuo de la germinación de *G. max*, recolectando los exudados de las semillas y de las raíces de las plántulas. Los datos de estos experimentos sugieren que los flavonoides conjugados de daidzeina y genisteina son liberados rápidamente durante la imbibición de las semillas y hasta cuando las plántulas tienen un sistema radicular desarrollado, las cantidades detectadas en los exudados (1-10 μM) fueron suficientes como para atraer a *Bradyrhizobium japonicum* y para la inducción de los respectivos genes de nodulación (*nod*).

La presencia de flavonoides coloridos durante la germinación de varias especies (*Brasica* spp., *Vigna radiata*, *Solanum lycopersicum*, *Sinapis alba*, *Z. mays*, *A. thaliana*, *L. luteus*) ha permitido especular y estudiar el papel fotoprotector de estos MS (Siegelman & Hendricks, 1957; Dumortier & Vendrig, 1982a; Rengel & Kordan, 1988; Kubasek *et al*, 1992; Kubasek *et al*, 1998; Huub *et al*, 1997; Katagiri *et al*, 2002, Zhou *et al*, 2007). Hubb *et al* (1997) evaluaron esta hipótesis con plántulas de 3 días de *Solanum lycopersicum* a las cuales se les irradió con luz roja (681 nm) a diferentes intensidades (0.0001 a 10 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$), después de 24 horas y con un control en la oscuridad, se observó una relación positiva proporcional entre la producción de antocianinas coloridas y la intensidad de la luz. Resultados similares se encontraron en *V. radiata* en donde se relacionó el grado de desarrollo de las plántulas con la presencia de fitocromos para la producción de antocianinas rojas, las plántulas con 36-48 horas (con la presencia de fitocromos), después de la irradiación con luz roja sobreexpresan la producción de antocianinas a diferencia de plántulas

en condiciones normales o con menor grado de desarrollo (Dumortier & Vendrig, 1982 a y b).

Perspectivas de los estudios de los MS en estas fases

Parece natural que el metabolismo secundario se manifieste en etapas tempranas del desarrollo de las plantas, aun cuando la cantidad de estudios son escasos, se evidencia una maquinaria biosintética programada para tal efecto. Los MS producidos *de novo* o como aporte de la planta madre, biosintetizados en las raíces, los tallos o las hojas, intercambiados, utilizados o excretados, se traducen en ventajas constitutivas o inducidas para la nueva planta en desarrollo, ya que la capacita inicialmente para establecer las relaciones con el nuevo ambiente que la rodea. Los estudios modernos debieran dirigirse a establecer la regulación molecular (genómica o proteómica) de los procesos que rigen la presencia de MS en fases tempranas, por ejemplo, recientemente se ha documentado la regulación mediante los microRNAs (miRNAs), de los eventos que ocurren durante las etapas tempranas (Holdsworth *et al*, 2008; Martin *et al*, 2010; Nonogaki, 2010; Kumar *et al*, 2011), resultaría interesante conocer si estos están involucrados también en la regulación de la expresión del metabolismo secundario.

Los estudios de la presencia de MS en el desarrollo temprano de las plantas también podrían contribuir a fortalecer las diferentes hipótesis que intentan explicar la asignación de recursos energéticos para la producción y diversidad de MS en las plantas (Berenbaum, 1995; Stamp, 2003; Hartmann, 2008). El aspecto del grado de desarrollo permitiría quizá conocer las producciones básicas independientes de las presiones ambientales, tanto bióticas como abióticas. La variación de la composición temporal y espacial entre los órganos y los cambios durante su ontogenia temprana podría aportar pruebas a favor de una u otra teoría sobre las defensas químicas de las plantas. Parece ser que las plantas destinan recursos tanto para el desarrollo rápido como para la producción de MS, quizás para proteger la vulnerabilidad de la plántula en crecimiento. Es necesario además establecer el porcentaje de recursos asignados para su biosíntesis, la importancia biológica que desarrollan y si éstos pueden trasladarse de estudios *in vitro* a estudios en campo.

Algunas de las aplicaciones de estos estudios podrían estar relacionadas con una regulación óptima en la producción de algún MS que se produzca en mayor cantidad en estas etapas, o en la presencia de compuestos tóxicos en los germinados que se consumen.

Por otro lado las semillas durante la germinación y las plántulas en desarrollo representarían un modelo de estudio para determinar varios aspectos del metabolismo, ofrecen rapidez de respuesta, economía de espacios físicos y un mejor control de las condiciones ambientales. Finalmente representan “un tiempo cero fisiológico”, un arranque del metabolismo primario y por lo tanto del metabolismo secundario.

Este análisis recopilatorio de estudios fue convertido en un artículo de revisión cuya versión en inglés ha sido recientemente publicado (17 de Agosto del 2012) como **Secondary metabolites during early development plant**. De-la-Cruz Chacón I, Riley-Saldaña CA, González-Esquinca AR. **2012. Phytochemi Reviews**. DOI: 10.1007/s11101-012-9250-8. ISSN: 1568-7767

III. Antecedentes

Biología de *Annona diversifolia* Safford.

Árbol pequeño, de ramas glaucas, completamente glabras; hojas pecioladas, de 8 a 18 mm de largo, de 4 a 6 cm de ancho, redondeadas o subagudadas en el ápice, agudas o redondeadas en la base, glabras en el envés, las hojas inferiores a los brotes florales orbiculares y cordado-ceñidas, de 2 a 4 cm de largo; flores solitarias, pedicelos adelgazados, glabros recurvados o péndulos, de 3 a 5 cm de largo, bracteolados por debajo de la mitad; sépalos redondeados a triangulares, ferrugíneo-pilosos por fuera, de 2 a 3 mm de largo; pétalos exterior linear-oblongos, obtusos, pubescentes por fuera, de 2.5 cm de largo, cerca de 6 mm en la base, los pétalos internos rudimentarios; frutos ampliamente ovoides, tomentosos, generalmente de 13 a 15 cm de largo y de 12 a 15 cm de ancho, cubierto con protuberancias ligeramente redondeadas (Standley & Steyermark, 1946). Las semillas oblongo-ovoides de 2 cm de largo, por 1 cm de ancho, presentan una coloración cobriza y dos cubiertas una testa dura y una endostesta laminar cuya inclusión y elongación radial en el endospermo provoca su ruptura y lo hace típicamente ruminado (Periasamy, 1962; Standley & Steyermark, 1946; Niembro, 1988). El endospermo es masivo, parenquimatoso, duro, blanquecino y cristalino, con reservas de aceite y almidón, en tanto que el embrión es pequeño, recto, lineal, colocado cerca del hilo, y esta provisto de dos cotiledones (Periasamy, 1962).

Se distribuye principalmente en el sureste de México en la costa del Pacífico (Chiapas, Guerrero, y Oaxaca), Guatemala (Chiquimula, Jutiapa y Chimaltenango) y El Salvador (Standley y Steyermark, 1946). Se le puede encontrar tanto en forma silvestre como cultivada entre los 0 y 1800 msnm. Prospera mejor en climas cálidos donde prevalece la alternancia de estación seca y húmeda, se cultiva más intensamente entre los 200 y 600 msnm. Su cultivo se ha introducido a Costa Rica, USA, Colombia, Bolivia, Ecuador y Perú (Ochse *et al*, 1986; Martínez, 1990). El fruto es comestible y conocido con los nombres de anona blanca, papauce, papausa y en México también como ilama (derivado de la lengua Nahuatl) (Standley & Steyermark, 1946).



Figura 10. *Annona diversifolia* Safford (Annonaceae)

Estudios con Annona diversifolia

Esta especie ha sido estudiada principalmente para explicar y resolver los problemas de germinación que presentan sus semillas, por la presencia de metabolitos secundarios con actividad farmacológica, y para la caracterización de sus frutos en la búsqueda de tipos sobresalientes que permitan explotar su producción comercial.

Estudios de germinación

Las semillas presentan un periodo de latencia que van de 3 a 6 meses según varios autores (Campbell y Popenoe, 1962; Porras, 1992; González-Esquinca *et al*, 1997a; Domínguez *et al*, 2010), y cuando germinan lo hacen con valores que no sobrepasan el 70%; sin embargo la viabilidad de las semillas permanece prácticamente intacta (90 a 100%) durante todo un año (Domínguez *et al*, 2010), y durante este tiempo no se observan cambios anatómicos en los embriones durante todo ese tiempo (González-Esquinca *et al*, 1997b), por lo que se descarta una latencia debido a la inmadurez anatómica del embrión. La latencia de acuerdo con González *et al* (1997a) tampoco es producto de la dureza de la cubierta de la semilla, sino que pareciera tener relación con una estrategia adaptativa al medio, por lo que esta latencia podría tener entonces un valor definitivo en la sobrevivencia de esta especie. La aplicación de ácidos giberélicos, así como el tiempo de almacenamiento promueven la germinación (González *et al*, 1999). Se ha reportado la presencia de material de reservas lipídicas en los endospermos (más del 50% en peso seco), en forma de triglicéridos ricos en ácido palmítico, esteárico, oléico y linoleico (13.27, 5.22, 65.97 y 15.54 % respectivamente) (Pérez-Amador *et al*, 1997; de la Cruz, 2001). Reyes *et al* (2000) reporta también la presencia de sacarosa.

Estudios sobre su cultivo

No existen plantaciones comerciales de esta especie, sus frutos son recolectados de árboles silvestres y de huertos mixtos en traspatio. La papaya o ilama presenta un gran potencial para mercados locales y de exportación, debido a la variabilidad en formas, sabor y color de su pulpa. Algunos autores consideran que el fruto compite en sabor con especies en la misma familia (chirimoyas, guanábanas y

anonas) (Ochse *et al*, 1986; Julián-Loeza, 2011). Los frutos presentan problemas de postcosecha, debido a que se agrietan desde el punto de abscisión, lo cual disminuye la calidad y la vida en anaquel. En algunos cultivos rústicos la especie es afectada por antracnosis foliar (*Colletotrichum gloeosporioides*). A pesar de ello la rusticidad, la tolerancia a la sequía, la calidad potencial de sus frutos y su aceptación gustosa en el mercado la convierten en una especie frutícola promisoría. De ahí que se hayan iniciado investigaciones para la selección natural de variedades que permitan el mejoramiento genético de la especie (Chavéz Primitivo *et al*, 1999; Závala & Patrón, 2000; Ballesteros *et al*, 2010, Segura 2010; Cruz Pineda & Guerrero 2010).

Estudios fitoquímicos

Las semillas presentan MS principalmente las acetogeninas laherradurina, cherimolina-2 y rolliniastatina-2 (Reyes *et al*, 1997, de la Cruz, 2001; Schlie *et al*, 2009; Luna-Cazáres & González-Esquinca, 2010), estigmasterol y ácido 15-octadecenoico (Reyes, 1997), y en menor proporción, aceites esenciales (Pérez-Amador *et al*, 1997; González, 2001). Mientras que las raíces poseen alcaloides bencilisoquinolínicos (liriodenina) y acetogeninas (laherradurina, cherimolina-2 y rolliniastatina-2) (González-Esquinca, 2001; de la Cruz, 2001). Con liriodenina y laherradurina y extractos orgánicos de varios de sus tejidos se ha evaluado su actividad contra insectos y bacterias (Luna-Cazáres *et al*, 2003; Riley, 2007; Luna-Cazáres & González-Esquinca, 2008; Rueda, 2007; Acuña *et al*, 2010).

IV. Planteamiento de los Objetivos

El metabolismo secundario se caracteriza por encontrarse generalmente restringido a fases específicas del desarrollo tanto del organismo como de células especializadas (van der Fits & Memelink, 2000; Davies & Schwin, 2003; Kutchan, 2005; Piñol *et al*, 2008; Taiz & Zeiger, 2010; Wink, 2010). La presencia oportuna de metabolitos secundarios durante la ontogenia y en tejidos específicos suele ser revelante, ya que permite que las plantas que los producen, respondan favorablemente a las circunstancias ambientales a las que se enfrentan (Berenbaum, 1995; Kutchan, 2001, Dixon, 2001; Hartmann, 2008).

La germinación y el desarrollo de la plántula representan etapas críticas y quizás sean las más vulnerables a los peligros latentes del ambiente, entre ellos, la presencia de fitopatógenos, herbívoros y la competencia por nutrientes con otras plantas (Bewley 1997; Jurado & Moles 2003; Barton & Koricheva, 2010). La biosíntesis de MS en estas etapas sería una estrategia importante para establecerse en el ambiente en el que crecerán.

Se han reportado cerca de 300 ABI en aproximadamente el 20% de las especies de Annonaceae estudiadas (Leboeuf *et al*, 1982; Cave *et al*, 1987). Estos MS se han aislado de raíces, tallos y hojas, pero escasamente en semillas, lo que implica que al parecer este proceso está delimitado a ciertas etapas del ciclo de vida y restringido solo a algunos tejidos.

Annona diversifolia Safford es una especie que biosintetiza varios alcaloides bencilisoquinolínicos y es capaz de acumularlos abundantemente durante la fructificación, principalmente en las raíces (hasta en un 0.2 % del peso seco), moderadamente en tallos (0.04 %), y en cantidades muy pequeñas en hojas (0.0001%), pero no en las semillas, señalando una distribución variable entre sus órganos (González-Esquinca, 2001). También se sabe que plántulas del género *Annona*, incluida *A. diversifolia*, son capaces de producir alcaloides sin ningún aporte previo de la planta madre (González-Esquinca, 2001, Alfaro, 2005; Castro, 2005), por lo que la biosíntesis de alcaloides debe activarse en algún momento al inicio de la germinación, hipotéticamente cuando la semilla inicia la movilización de reservas.

Este trabajo busca responder las preguntas ¿qué tan temprano aparecen los alcaloides bencilisoquinolínicos en *Annona diversifolia*?, ¿qué tan abundante y diverso es el perfil de alcaloides?, ¿existen asociaciones temporales, fenológicas y órgano-específicas?, ¿qué tantos recursos comprometería la especie para tal biosíntesis?, ¿cuál es su importancia para la planta?

Para contestar estas preguntas se estructuró un diseño experimental fundamentado en un inicio en la descripción y tipificación morfofisiológica de las primeras fases desarrollo de *A. diversifolia* y su asociación con los perfiles químicos de alcaloides, así como la determinación de la actividad de enzimas involucradas en la biosíntesis, su dependencia del material de reserva y finalmente la determinación del posible papel de los alcaloides producidos.

Hipótesis

Se ha demostrado que los metabolitos secundarios son producidos como medios comunicantes entre las plantas y el ambiente, con variaciones durante varias etapas de la ontogenia vegetal, se espera que desde la vida temprana de *Annona diversifolia* Safford se inicie la biosíntesis de alcaloides bencilisoquinolínicos, debido a la protección química que le brinda al embrión en desarrollo.

V. Diseño Experimental y Métodos

5.1. Diseño General

El trabajo experimental se fundamentó en el análisis de posibles relaciones órgano-específicas en la producción de alcaloides bencilisoquinolínicos durante la primera etapa de vida de *A. diversifolia*. Por lo que para ello, se tipificó el desarrollo temprano de esta especie empleando la escala decimal BBCH (Biologische Bundesanstalt, Bundessortenamt and Chemical industry) que codifica numéricamente las características fenológicas de los estadios de crecimiento de las plantas (Hess et al, 1997). Las etapas estudiadas abarcaron 4 etapas fenológicas, semillas secas, semillas en imbibición, semillas con emergencia radicular y plántulas en desarrollo; éstas a su vez se dividieron en fases, en función del tiempo en la etapa de imbibición y de su fenología en la etapa de emergencia radicular y en la de plántula. En suma, se analizaron los perfiles de alcaloides en 11 fases de desarrollo y hasta en 3 a 6 tejidos en cada etapa (cuadro 5).

Para conocer la disponibilidad de recursos para la producción temprana de alcaloides se estimó la cantidad de proteínas totales, aminoácidos totales, y en particular de los aminoácidos aromáticos tirosina y fenilalanina. Para éste objetivo, se seleccionaron los endospermos de las fases estudiadas, con fundamento en el hecho de que la movilización de reservas acumuladas en este tejido sustenta el metabolismo del embrión en crecimiento, y por lo tanto la fuente de los precursores de los alcaloides (Bewley, 1997; Nonogaki, 2008).

También se buscaron las relaciones espacio-temporales desde la perspectiva bioquímica de actividades enzimáticas, por lo que a partir del análisis de los perfiles de alcaloides se seleccionaron las fases de semillas con 5 días de imbibición (momento en el que se detectó por primera vez la presencia de alcaloides), semillas con 1 cm de emergencia radicular (al inicio de la producción exponencial de alcaloides), plántulas de las fases con primordio foliar y con dos hojas (cuando la biosíntesis depende de la fotosíntesis), para determinar la actividad de cuatro enzimas (Monofenol-oxidasa EC 1.14.18.1; Tirosina-dopa descarboxilasa EC

4.1.1.25; Tiramina-oxidasa EC 1.4.3.4., Norcoclaurina sintasa EC 4.2.1.78) involucradas en la biosíntesis de ABI (Fachini & De Luca, 1995; Samanani *et al*, 2002; Bilka *et al*, 2003; Bilkova *et al*, 2005; BRENDA, 2011). La actividad se determinó en embriones y endospermos, raíces, tallos y hojas según la fase a estudiar.

Para la evaluación del posible papel biológico que justificaría la producción de alcaloides en estas etapas, se consideraron los antecedentes sobre las actividades biológicas que desempeñan estas moléculas y la observación personal de que las semillas que imbiben agua y no germinan son infestadas por fitopatógenos, por lo que se tomaron muestras de hongos de semillas contaminadas, se aislaron e identificaron dos fitopatógenos y sobre ellos se evaluaron algunos extractos que contuvieran perfiles que caracterizaron en diversidad y abundancia la producción temprana de alcaloides, así como también, por si solo, el alcaloide mas abundante, la oxoaporfina liriodenina. Los extractos seleccionados fueron las de las semillas secas, las semillas con 1 día de imbibición, las radículas de semillas con emergencia radicular de 1 y 5 cm, y las raíces de plántulas con seis hojas.

Cuadro 5. Etapas y fases del desarrollo estudiadas en *A. diversifolia*

Etapas	Fases de desarrollo	Tejidos u órgano
Semilla seca	Semillas sin imbibición	Testa, endospermo y embrión
	Semillas con 1 día de imbibición	Testa, endospermo y embrión
Imbibición	Semillas con 2 días de imbibición	Testa, endospermo y embrión
	Semillas con 5 días de imbibición	Testa, endospermo y embrión
	Semillas con 10 días de imbibición	Testa, endospermo y embrión
	Semillas con 1cm de radícula	Testa, endospermo, cotiledones y radícula
Emergencia radicular	Semillas con 2 cm de radícula	Testa, endospermo, cotiledones, hipocótilo y radícula
	Semillas con 5 cm de radícula	Testa, endospermo, cotiledones, hipocótilo y radícula
	Plántulas con primordio foliar	Testa, endospermo, cotiledones, tallo, raíz y primordio
Desarrollo de la plántula	Plántulas con una hoja	Raíz, tallo y hojas
	Plántulas con 6 hojas	Raíz, tallo y hojas

5.2 Parte experimental

Material Vegetal

Cada año durante septiembre y octubre de los años 2006 a 2009 se recolectaron cerca de 200 frutos de *A. diversifolia*, variedad blanca, en el municipio de Copoya, Tuxtla Gutiérrez, México. Un ejemplar de referencia de *A. diversifolia* Safford fue depositado e identificado en el Herbario Eizi Matuda de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas con el número de colección 352.

Anualmente se obtuvieron aproximadamente 5,000 semillas que se limpiaron y se secaron a la sombra. El almacenamiento se realizó en bolsas de papel de estraza y se guardaron hasta su utilización en una alacena de madera limpia y cerrada en condiciones ambientales. Antes de iniciar cada prueba, las semillas se revolvieron y se eligieron al azar para formar bloques experimentales de entre 200 y 500 semillas según la fase de desarrollo analizada y de acuerdo a los ensayos realizados.

Las semillas de esta especie presentan latencia durante 6 meses, por lo que las semillas se pusieron a germinar justo después de este tiempo.

Condiciones de germinación y desarrollo.

Para cada ensayo las semillas se pusieron a germinar empleando la técnica de “entre papel” (Ministerio de Agricultura, 1976). Las semillas fueron desinfectadas en hipoclorito de sodio al 1% y durante el proceso fueron revisadas y lavadas con agua destilada estéril cada tercer día. Las semillas fueron colocadas, hasta alcanzar el desarrollo deseado, dentro de cámaras de ambiente controlado Conviron® a 24-28 °C, con 12 h al día de luz blanca y fría de lámparas de fluorescencia a una intensidad de $500 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y una humedad relativa entre 65 y 75%.

Métodos para la determinación de ABI en el desarrollo temprano.

Obtención de extractos de alcaloides.

De cada etapa se separaron cuidadosamente los embriones, endospermos, testas, radículas, raíces, hipocótilos, tallos, cotiledones, primordios foliares y hojas. Para la extracción se utilizó alrededor de 20 g de material vegetal seco, lo cual significó en algunos casos la utilización de hasta 200 ejemplares distintos, con excepción de los embriones en el que se emplearon 500 semillas para obtener el mismo número de embriones (aproximadamente de 3 a 5 g).

El método de extracción fue el propuesto por González-Esquinca (2001), que consistió en una técnica ácido-base tradicional. Todo el material vegetal se secó a temperatura ambiente. Las muestras fueron reducidas a polvo fino y posteriormente se humedecieron con una disolución saturada de Na_2CO_3 , y se dejaron secar aproximadamente de 48 a 72 horas a temperatura ambiente. Para obtener los alcaloides las muestras se colocaron en CHCl_3 durante 2 horas en agitación constante. Se filtraron para eliminar el material vegetal y obtener la fase clorofórmica, el procedimiento se repitió una vez más y las fases clorofórmicas fueron reunidas en una sola. Este extracto clorofórmico alcaloidal fue lavado con agua destilada, para después ser extraído con una solución de HCl 1N (tres veces). El extracto acidulado de alcaloides se alcalinizó con una disolución saturada de Na_2CO_3 hasta un pH 9.5 y se extrajo nuevamente con CHCl_3 (dos veces). Se eliminaron los restos de agua con Na_2SO_4 anhidro, se filtraron y se concentraron a vacío hasta un volumen de 3 a 5 mL. El extracto final de alcaloides se guardó en la oscuridad hasta su análisis en Cromatografía en capa Fina (CCF) y HPLC. La cantidad obtenida de extracto fue referida como la cantidad de alcaloides totales.

Extracción de los alcaloides de referencia.

El alcaloide bencilisoquinolínico liriodenina utilizado como referencia fue obtenido de raíces (300 gramos) de ejemplares adultos y de raíces de plántulas de 6 hojas. En tanto que lisicamina y atherospermidina fueron obtenidos de raíces de plántulas de 6 hojas. En ambos casos se utilizó el método de extracción ácido-base que se describe

en el apartado de extracción de alcaloides. La liriodenina precipitó del extracto crudo en forma de agujas amarillas, las cuales fueron purificadas por recristalizaciones fraccionadas utilizando una mezcla de cloroformo-metanol hasta obtener cerca de 300 mg, que dieron positivo a los reactivos de Dragendorff y Mayer. Para obtener lisicamina y atherospermidina se utilizaron cromatografías de gel de sílice (HF₂₅₄ con 1 mm de espesor) impregnadas con ácido oxálico al 5% desarrolladas en una mezcla de CHCl₃: MeOH, 8:2. Después de obtener las bandas cromatográficas con factores de retención de 0.6, y 0.7 (lisicamina y atherospermidina respectivamente), éstas se alcalinizaron hasta un pH 9 y se reextrajeron con CHCl₃.

Identificación de liriodenina.

El alcaloide liriodenina fue identificado por el Dr. Mariano Martínez Vázquez del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México. A continuación se enlistan los datos espectrométricos.

IR (CHCl₃) max (cm⁻¹): 2987, 2918, 1660, 1598, 1578, 1467, 1442, 1420, 1308, 1258, 1055, 969 y 865.

EM [m/z] (abundancia relativa): M⁺ a 275 (100) que concuerda con la fórmula condensada C₁₇H₉O₂N. Otras fragmentaciones significativas fueron: 247 (16), 217 (9), 188 (21) y 162 (14).

RMN-¹H (CDCl₃, 300 Mhz): δ (ppm): 8.90 (H5, d, J = 5.4 Hz), 8.66 (H11, dt, J = 7.95 Hz), 8.59 (H8, dd, J = 7.95), 7.79 (H4 d, J = 5.19 Hz), 7.58 (H10, dt, J = 7.8), 7.52 (H9, dt, J = 7.94 Hz), 7.20 (H3, s), 6.39 (s, 2H).

RMN ¹³C (50 Mhz CDC₁₃/DMSO): δ 181.8 (C-7), 151.28 (C-2), 144.54 (C-1), 144.15 (C-6a), 135.16 (C-5), 133.47 (C-10), 132.34 (C-11a), 130.5 (C-9), 127.57 (C-8), 126.88 (C-11), 123.86 (C-7a), 122.60 (C-4), 107.76 (C-1a), 102.15 (C-3).

Análisis en cromatografía de capa fina.

El perfil de los extractos de alcaloides totales de cada tratamiento fue realizado en placas de cromatografía de capa fina (CCF) de gel de sílice (HF₂₅₄ con 1 mm de espesor, Sigma Aldrich) y desarrollados en una fase móvil consistente de CHCl₃: MeOH, 9:1. Para la identificación de alcaloides se utilizaron los reactivos de Dragendorff y Mayer.

Análisis de alcaloides en HPLC.

La cuantificación de alcaloides se realizó por cromatografía líquida adaptando el método de Moreira y Leitão (2001), en un HPLC Perkin Elmer Serie NCI 900, Norwalk, CT, USA, empleando una columna de fase reversa Spheri-5 RP- 18 (100 x 4.6 mm y diámetro de partícula de 5 µm). La fase móvil consistió en agua-metanol, 30:70 isocrático con una velocidad de flujo de 1 mL.min⁻¹, manteniendo la temperatura de la columna en 30°C. La detección se hizo con UV a 254 nm. Las condiciones del análisis se determinaron utilizando la plataforma de trabajo Turbochrom de Perkin Elmer. Los extractos fueron disueltos a 1 mg.mL⁻¹ y 20 µL de esta solución fueron analizados en el HPLC.

Para la cuantificación de liriodenina se realizaron dos curvas de calibración mediante el análisis dos series de soluciones stock conteniendo una 500, 250, 125, 62.5, 31.1 15.6, mL⁻¹ y la otra, 50, 25, 6.25, 3.13, 1.56, 0.78 y 0.39 µg.mL⁻¹. Las curvas fueron lineales en estos intervalos con valores de [Y= 85643 (X) -1625603; r² = 0.98 y Y= 66789.95 (X) -1625603; r² de 0.98 respectivamente]. El tiempo de retención de liriodenina en los extractos fue de 3.5 ± 0.2 min y fue idéntico al de la liriodenina estándar. Subsecuentemente, se obtuvieron los espectros de absorción que coincidieron con las bandas de absorción características (248 (log ε 4.47), 272 (log ε 4.41), 310 (log ε 3.91) y 414 nm (log ε 4.01)) del alcaloide de referencia.

Las cantidades de liriodenina en los tejidos vegetales fueron obtenidas individualmente de cada repetición hecha, mediante la siguiente ecuación.

$$\text{Liriodenina } (\mu\text{moles/gr MV}) = (L \times E / p.m \times Mv)$$

Donde:

L = cantidad de liriodenina en el mg de extracto analizado

mg E = mg de extracto

MV = gramos de material vegetal

p.m. = peso molecular de la formula gramo de liriodenina expresado en milimoles por miligramo

Métodos para la determinación de aspectos de la biosíntesis de ABI.

Cuantificación de proteínas y aminoácidos totales y de fenilalanina y tirosina.

Para la caracterización de proteínas y aminoácidos se evaluaron únicamente los endospermos de las 11 etapas analizadas. En cada situación las semillas y plántulas se mantuvieron en las mismas condiciones controladas mencionadas anteriormente.

Extracción de Proteínas totales.

La extracción se realizó según Wang *et al* (2001). Para ello, el material vegetal (1 gramo) se homogenizó con un mortero y pistilo de porcelana congelados. Posteriormente se agregaron 5 mL del amortiguador de extracción Tris HCl a pH 6.8, 0.2% SDS y 1% de 2 mercaptoetanol (Tris SDSM) y se homogenizó durante 2 minutos. Después de esto, el homogenizado se depositó en tubos de 15 mL y se centrifugaron a 10,000 g por 5 minutos a 4 °C en una ultracentrífuga Sorvall®. El sobrenadante fue recuperado y se realizó una precipitación con dos volúmenes de acetona fría (0 °C) durante dos horas a 0 °C. Las proteínas se terminaron de separar por centrifugación a 10,000 g por 10 minutos a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante y se lavó la pastilla dos veces con acetona fría, las pastillas se secaron al aire y se guardaron a 4 °C toda la noche. Se redisolviéron en 5 mL de buffer de extracción sin SDS. Se tomó una alícuota de 100 µL para cuantificar las proteínas por el método de Bradford (1976). Cada extracción se hizo por quintuplicado.

Cuantificación de Proteínas.

La cuantificación de proteínas se realizó mediante la técnica de Bradford (1976). En una celda espectrofotométrica de cuarzo se colocaron 100 µL de los extractos de proteínas, se les añadió 2 mL del reactivo Azul brillante de Comassie G250 a 0.1 mg.mL⁻¹, se mezclaron vigorosamente en vortex y se dejó reposar durante 5 minutos, se registró su absorbancia a una longitud de onda de 595 nm en un espectrofotómetro digital Spectronic® 10 UvVis. Las determinaciones se hicieron por triplicado. Los valores de absorbancia se transformaron a µg/mL utilizando una curva

patrón de albúmina sérica de bovino (ASB) y como reactivo colorante al azul brillante de Comassie a 0.1 mg.mL^{-1} , para ello se prepararon por dilución diez concentraciones de ASB 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y $100 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$. Se utilizó como diluyente el mismo buffer en el cual quedaron disueltas las proteínas extraídas. La ecuación de la curva ($Y = 0.0005 X + 1.0864$; $r^2 = 0.9889$) fue el resultado de cinco repeticiones para cada serie de diluciones.

Reactivo de Bradford

A 25 mg de Azul brillante de Comassie G250 disueltos en 12.5 mL de etanol, se les añadió 25 mL de ácido fosfórico al 85% y se aforó con H_2O hasta 250 mL. La concentración final del reactivo fue de 0.1 mg/mL de Azul brillante de Comassie G250, en 5% metanol y 8.5% de H_3PO_4 . La solución de color marrón tuvo un pH de 1.1 y se guardó en un frasco oscuro a 4°C mientras se utilizó.

Extracción de Aminoácidos

La extracción de aminoácidos se realizó de acuerdo a Brückner & Westhauser (2003). Los endospermos (1 g) de cada fase se homogenizaron con 10 mL de etanol al 70% y se extrajeron con agitación magnética durante 15 minutos a 70°C , después se centrifugó a $1650 \times g$ para coleccionar el sobrenadante, el residuo fue vuelto a extraer con las mismas condiciones. Los sobrenadantes combinados se ajustaron a un pH de 2 con la adición de solución de HCl 0.1 M y se extrajeron con una mezcla de éter de petróleo y éter dietílico 1:1, se recuperó la fase acuosa y se llevó a un volumen final de 2 mL con HCl 0.1M. Alícuotas de $20 \text{ } \mu\text{L}$ se analizaron en HPLC y de 1 mL en el ensayo de ninhidrina.

Prueba de Ninhidrina.

Se utilizó el método modificado de Ninhidrina de Yokoyama & Hiramatsu (2000). Para ello se preparó el reactivo de ninhidrina, con 1 g de ninhidrina en 60 mL metilcelosolve y 60 mg de ácido ascórbico. A cada mL de la solución de aminoácidos de las diferentes muestras, se le añadieron 2 mL de buffer de acetato 0.5 M, pH 5.5 y 1 mL del reactivo de ninhidrina, se agitaron suavemente, y se llevaron a baño

María a 100 °C por 15 minutos. Se enfriaron en baño de hielo a 0 °C y se les adicionó 1 mL de etanol al 70%. Finalmente, se registró la absorbancia a 570 nm en un espectrofotómetro. Se realizaron dos curvas patrón con concentraciones de 400, 300, 200, 150, 100, 75, 50, 25 mM de leucina ($Y = 0.0043 X + 0.2581$, $R^2 = 0.9931$); y de 50, 25, 12.5, 6.2, 3.1, 1.6 y 0 mM de leucina ($Y = 0.0045x + 0.2704$; $R^2 = 0.9913$).

Análisis de Tirosina y Fenilalanina en HPLC.

La cuantificación de tirosina y fenilalanina se realizó por cromatografía líquida adaptando los métodos de de Khan *et al*, 1999; Holme & Woods, 2002; Perkin Elmer, 2007. El análisis en HPLC se realizó en un equipo Perkin-Elmer serie 900 en una columna de fase reversa spheri 5RP18 (de un tamaño de 100 x 4.6 mm y con un diámetro de partícula de 5 micras). La fase móvil consistió de una mezcla isocrática de acetonitrilo y KH_2PO_4 20 mM pH 3 (75:25). La velocidad de flujo de 1 mL/min a 30 °C. La detección se realizo con luz UV de 210 nm. Las muestras se analizaron por triplicados con alícuotas de 20 μL a una concentración de 1 mg/mL, disueltas en agua. La identificación de tirosina y fenilalanina se realizó con estándares internos y comparación de espectros en UV de los aminoácidos estándares. Estas condiciones se establecieron en un análisis previo en donde se probaron límites de detección a diferentes longitudes de onda, eficacia de la fase móvil para la separación de los tiempos de retención, limite de cuantificación de la muestra y los estándares. Se construyó una curva de calibración para cada aminoácido con soluciones de 100, 75, 50, 25, 10, 5, 2.5 y 1 $\mu\text{mol/mL}$. La curva fue lineal en este rango y tuvieron valores de r^2 de 0.998 y 0.995 respectivamente. Las condiciones analíticas se determinaron mediante el uso del software Turbochrom Workstation de Perkin Elmer. En estas condiciones tirosina y fenilalanina tienen un tiempo de retención de 1.1 (± 0.1) y de 1.7 (± 0.2) minutos. Los espectros de absorción se obtuvieron con un espectrofotómetro GenesysTM 10uv en el rango de 190 nm a 300 nm y con un barrido con 2 nm de distancia. A una concentración de 0.1 mM en agua.

Determinaciones de las actividades enzimáticas.

Para la determinación de las actividades enzimáticas se evaluaron únicamente las fases de semillas con 5 días de imbibición, semillas con 1 cm de emergencia radicular, plántulas de las fases con primordio foliar y con dos hojas. En cada situación las semillas y plántulas se mantuvieron en las mismas condiciones controladas mencionadas anteriormente.

Actividad de Monofenol oxidasa (MFO; EC 1.14.18.1).

Los métodos de extracción y evaluación fueron adaptados de Escribano *et al*, 1997; Bilka *et al*, 2003 y Balažova *et al*, 2007. De 1 a 2 gramos de material vegetal se homogenizaron durante 10 minutos en un mortero de porcelana precongelado con 20 mL de solución amortiguadora fría de fosfato de sodio 0.1 M a pH 6.5, con 30 mM ácido ascórbico, 1 mM EDTA Na, 1 mM MgCl₂, 0.5 M de manitol y 1% de PVPP. El homogenizado se filtró sobre 8 capas de gasa estéril y centrifugó a 20,000 x g por 1 hora a 4 °C. El sobrenadante se usó como extracto crudo de enzimas. La actividad se determinó utilizando a tiramina como sustrato. La reacción de mezcla contuvo de 6 a 400 µM de tiramina en 3 mL de amortiguador de fosfatos 50 mM a pH 6.5, 1mM de SDS y extracto crudo de proteínas a 100 µg/mL. Las actividades se obtuvieron midiendo la aparición de dopamina a 280 nm cada 30 segundos durante 25 min a 37°C. Los datos se graficaron y la velocidad de reacción de cada concentración de sustrato se obtuvo de la parte lineal. Se utilizó una curva de calibración de L-dopamina.

Actividad de Amino oxidasa (AO, EC: 1.4.3.4)

Los métodos de extracción y evaluación fueron adaptados de Bilková *et al* (2004) y 2005; Sigma (1995). De 1 a 2 gramos de material vegetal se homogenizaron con 20 mL de solución amortiguadora fría de fosfato de potasio 0.1 M a pH 7.0, 19 mM de cisteína hidroclicorada y 1% PVPP, el extracto se filtró a través de 8 capas de gasa de algodón estéril y se centrifugó a 20,000 x g y 4 °C por 1 hora. El sobrenadante se usó como extracto crudo de enzimas. La actividad se determinó fundamentada en el

desprendimiento de H_2O_2 producido al transformar tiramina en 4-hidroxifenilacetaldehído, el H_2O_2 se hace reaccionar con 4 aminoantipirina y forma el colorante quinoneimina con un coeficiente de extinción a 480 nm. La mezcla de reacción consistió en 2 mL de amortiguador de fosfato de potasio 20 mM y pH 6.5, con 2.12 mM de fenol, 1.48 mM de 4-aminoantipirina, con una serie de soluciones de 0.25 a 1 mM de tiramina a pH 7.0 y 10 unidades/mL de peroxidasa. A esta mezcla ajustada a pH 7.5 se le añadió una cantidad equivalente de 100 $\mu\text{g/mL}$ del extracto de proteínas, se mezcló e incubó por 10 min a 37 °C. La reacción se detuvo con 2 mL de acetona a 4 °C y se centrifugó a 10000 x g por 10 min. Al sobrenadante se le añadió 2 mL de etanol y se registró su absorbancia a 480 nm. Se realizó un blanco sin extracto de proteínas. La actividad enzimática se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{unidades/mg enzima} = (\text{A ensayo} - \text{A blanco}) / (\text{Vr})(\text{fd}) (\text{t})(\text{c})(17.17)(0.5)$$

Vr = Volumen total (mL) de reacción; fd = Factor de dilución; 17.17 = Coeficiente de extinción de quinoneimina ($\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$); 0.5 = Factor de conversión ya que 2 μmoles de H_2O_2 producen 1 μmol de quinoneimina; t = Tiempo (minutos) del ensayo; c = Cantidad (mg) de extracto de enzimas usado.

Actividad de Tirosina dopa decarboxilasa (TyDC; EC 4.1.1.25).

El método de extracción y evaluación fueron adaptados de Phan *et al*, 1983; Facchini & de Luca, 1995 y Sempruch *et al*, 2009. De 1 a 2 g de material vegetal se homogenizaron con 10 mL de solución amortiguadora de acetato 0.5 M a pH 5.6, 1 mM de EDTA Na y 28 mM de β mercaptoetanol durante 10 min. El homogenizado se filtró sobre 8 capas de gasa estéril y se centrifugó a 20,000 x g y 4 °C por 1 hora. El sobrenadante se usó como extracto crudo de enzimas. La actividad se ensayó en una solución amortiguadora de Tris 200 mM a pH 7.2, 100 μM de fosfato de piridoxal, 28 mM de β -mercaptoetanol con una serie de disoluciones de tirosina de 0.25 a 4 mM y extracto de proteínas a 100 $\mu\text{g/mL}$ en un volumen total de 3 mL. Después de 30 min la reacción se detuvo con la adición de 3 mL de K_2CO_3 1 M. Se centrifugó a 10000 x g y a 4 °C por 15 minutos. Se mezcló 1 mL del sobrenadante conteniendo el

producto de la reacción (tiramina) con 1 mL de ácido 2, 4, 6 trinitrobenzensulfónico (TNBS), durante 2 horas a 40 °C. El TNBS y la tiramina producen un producto soluble en tolueno. Por lo que cada muestra se extrajo con 5 mL de tolueno, 0.5 mL de SDS al 10% y 0.25 mL de HCl 1N y se registró su absorbancia a 335 nm. La cuantificación se realizó con una curva estándar de tiramina en tolueno.

Ensayo para Norcoclaurina sintasa (NCS; E.C. 4.2.1.78)

El método de extracción y evaluación fueron adaptados de Samanani *et al*, 2002 y Minami *et al*, 2007. De 1 a 2 gramos de material vegetal se homogenizaron durante 10 min con 20 mL de solución amortiguadora de fosfato de sodio 0.1 M a pH 6.5, 30 mM ácido ascórbico, 1 mM EDTA, 1 mM MgCl₂, 0.5 M de manitol y 1% de PVPP. El homogenizado se filtró sobre 8 capas de gasa estéril y se centrifugó a 20,000 x g por 1 h a 4 °C. El sobrenadante se usó como extracto crudo de enzimas. La actividad se determinó en 4 mL de solución amortiguadora de Tris-HCl 50 mM a pH 7.4, 10% glicerol y 5 mM de 2-mercaptoetanol, 0.5 mg de extracto proteico, 0.25 mL de 4 HPAA (4 hidroxifenilacetaldehido) 2 mM y 0.25 mL de una serie de soluciones de 0.06 a 4 mM de dopamina. Esta mezcla se incubó a 30 °C por 4 horas en la oscuridad, la reacción se detuvo añadiendo 5 mL de acetona a 4 °C y se centrifugó a 10,000 x g durante 15 minutos. Dado que el producto de la reacción es el alcaloide norcoclaurina y/o sus derivados, la actividad de la enzima se determinó cuantificando la presencia de alcaloides totales, para ello, el sobrenadante se sometió a una extracción ácido-base (típica para alcaloides) de acuerdo a González-Esquinca (2001). El extracto se concentró al vacío, se redisolvió en metanol y cuantificó a 254 nm empleando una curva patrón de liriodenina (el alcaloide más abundante de esta especie). Para validar la presencia de alcaloides se aplicaron 5 µL del extracto en una placa cromatográfica de silicagel 60 F254 y se eluyó en una solución de cloroformo:metanol, 9:1, acompañado de una referencia de liriodenina y un blanco de proteínas sin sustrato y se revelaron con el reactivo Dragendorff (específico para alcaloides).

El 4 HPAA se produjo por la transformación de tiramina por la tiramina oxidasa (1 unit/ml) de *Arthrobacter* sp (Sigma) en una mezcla de reacción con amortiguador

Tris-HCl 50 mM, pH 7.4, conteniendo 2 mM de tiramina. Después de incubar la reacción por 2 h a 30 °C, se detuvo por ebullición durante 5 min. La muestra se centrifugó a 15,000 x g por 15 min a 4 °C y el sobrenadante se usó como solución de 2 mM de 4HPAA.

En todos los casos la cuantificación de las proteínas se realizó de acuerdo al método de Bradford (1976) usando albúmina de suero de bovino de referencia. Para confirmar la actividad de las enzimas, la actividad fue comparada con un extracto proteico inactivado con calor como control negativo. La actividad se determinó en 5 experimentos separados. Todas las determinaciones espectrofotométricas se realizaron en un espectrofotómetro Thermo Electron Genesys 10 UV empleando celdas de cuarzo.

Determinación de la actividad enzimática específica.

Para cada una de las enzimas se construyeron las gráficas de doble recíproco de Lineweaver-Burck. La actividad enzimática se calculó empleando la velocidad máxima y se expresó en katal por miligramo de extracto de proteínas (NC-IUB 1979; Dybkaer 2001).

Métodos para determinar la actividad antifúngica de extractos y de la liriodenina.

Se seleccionaron cinco etapas dentro del desarrollo temprano de *A. diversifolia*: semillas sin imbibir, con 1 día de imbibición, semillas con 2 y 10 días de germinación (radícula de 1 y 5 cm respectivamente) y plántulas con 50 días de edad (6 hojas); para ello en cada ensayo se utilizaron 500 semillas empleando la técnica de entre papel para su germinación (Ministerio de Agricultura, 1976). Mantenido en las mismas condiciones controladas que ya se han señalado anteriormente. De cada etapa se separaron cuidadosamente los embriones, radículas y raíces correspondientes utilizando para la extracción de alcaloides 50 g de peso fresco de material vegetal, con excepción de los embriones cuyo peso fue de 2 g. Los ensayos se realizaron por quintuplicado.

Aislamiento de hongos de las semillas de A. diversifolia.

Se seleccionaron al azar 10 semillas contaminadas con hongos antes y durante el proceso de imbibición, las esporas de los hongos se tomaron con un asa microbiológica estéril y se cultivaron en placas con Agar dextrosa saboraud y Agar dextrosa y papa BIOXON^{MT} en una incubadora RIOSSA^{MT} durante 7-8 a días a 30 °C. De los organismos que crecieron en el agar se seleccionaron esporas y de éstas se hicieron 7 resiembras consecutivas en ambos medios de cultivo, hasta lograr el aislamiento y purificación de los microorganismos. Los hongos aislados se inocularon en Agar dextrosa saboraud (ADS) para la obtención de cepas, las que se guardaron en glicerol y/o parafina líquida a 4 °C hasta su utilización.

La identificación de los hongos *Rhizopus stolonifer* y *Aspergillus glaucus* fue realizada por personal del Laboratorio Fitosanitario “Grupo de estudios moleculares aplicados a la biología” (GeMBio) del Centro de Investigación Científica de Yucatán, México, empleando claves morfométricas de los cultivos en agar dextrosa papa. Los ejemplares fueron depositados con los registros GeMBio NACF0010 y NACF0011. Para los ensayos los hongos fueron resembrados dos veces consecutivas en ADS e incubados a 37 °C en intervalos de 24 a 72 h antes de usarse.

Ensayos antifúngicos

La actividad antifúngica de liriodenina se determinó mediante tres ensayos, difusión en agar (Baüer *et al*, 1966), concentración mínima en macrodilución (NCCLS, 1997) e inhibición del metabolismo de glucosa (Riesselman *et al*, 2000 y Li *et al*, 2000). Mientras que la de los extractos solo por el último. En todos los métodos se empleó un inóculo de $1-5 \times 10^6$ conidios/mL en caldo dextrosa sabouraud (CDS) DIFCO® ajustado turbidimétricamente a 0.1 de absorbancia a 530 nm de acuerdo a la escala 0.5 de McFarland con un espectrofotómetro GENESYS 10 UV. Todas las determinaciones se elaboraron por triplicado.

Para el ensayo de difusión en Agar se emplearon discos de papel Whatman N° 2 (5 mm de diámetro) impregnados con 50, 100, 200 y 400 μg de liriodenina. El ensayo se realizó en ADS, después de incubarse durante 48 hr para *R. stolonifer* y a 72 horas para *A. glaucus* a 37 °C, el efecto se determinó midiendo los halos de inhibición.

La CMI fue determinada como la concentración más baja que inhibió el crecimiento. El ensayo se realizó en un volumen final de 2 mL de caldo dextrosa sabouraud (CDS) DIFCO® a 37 °C. Liriodenina fue evaluada a concentraciones de 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.25 y 1.1 μM disuelta en etanol Baker® a una concentración final de 0.5% v/v. Los cultivos fueron incubados por 48 h a 37 °C.

La inhibición del metabolismo de glucosa determinó la cantidad de glucosa consumida por los hongos como fuente de carbono y energía después de 48 h. En este ensayo la liriodenina fue evaluada en concentraciones de 100, 10, 1, μM y los extractos a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. El volumen de ensayo fue de 2 mL de CDS que contuvo inicialmente 20 mg/mL de glucosa. La inhibición de los hongos se cuantificó de manera indirecta al determinar la cantidad residual de glucosa que quedó en el medio después de 48 h de incubación a 37 °C. La determinación de la glucosa se realizó mediante el método de determinación de azúcares reductores de Nelson-Somogyi y con la utilización de la ecuación de regresión lineal de una curva patrón.

El porcentaje de glucosa residual de cada concentración se calculó comparando la concentración de glucosa de cada ensayo con la concentración de glucosa en el medio de cultivo basado en la siguiente ecuación: (Glucosa del

ensayo/Glucosa del medio de cultivo) X 100. El porcentaje de inhibición de la utilización de la glucosa debido a liriodenina fue determinado por la siguiente ecuación: $(1 - [\% \text{ glucosa residual en cada concentración} / \% \text{ glucosa residual en el control de crecimiento}]) \times 100$.

Analisis estadísticos.

Todos los datos experimentales fueron expresados como el promedio \pm desviación estándar de tres o cinco repeticiones según se indicó en el diseño experimental. Los datos fueron analizados por ANOVA (95 y 99 % de confiabilidad según se indique en los resultados), además las medias se separaron utilizando contraste múltiples de intervalos con el método de LSD y Tukey al 95 % de confiabilidad. Se verificó la varianza mediante la prueba de Levene.

VI Resultados

6.1. Alcaloides en el desarrollo temprano de *Annona diversifolia*.

6.1.1. Caracterización del desarrollo temprano de *Annona diversifolia*

Como se justificó en el diseño experimental, el desarrollo temprano de *A. diversifolia* fue dividido en 11 fases secuenciales, en este apartado se describe y tipifica cada una de ellas con la escala decimal BBCH (Hess *et al*, 1997), que es un sistema que codifica las características fenológicas de los estadios de crecimiento de las plantas. Este código decimal, se divide en 9 estadios de crecimiento principales divididos cada uno de ellos en 10 secundarios y está basado en el código desarrollado inicialmente para cereales por Zadoks (1974), en el caso de las etapas evaluadas del desarrollo temprano de *Annona diversifolia* se abarcaron la etapa de Germinación (0), en todas sus fases subsecuentes (00-09) y la etapa de Desarrollo de las hojas (brote o tallo principal) (1) en las fases 10 a 16 (Cuadro 7).

La primera fase evaluada corresponde a la de las semillas secas (BBCH: 00). Las semillas de *A. diversifolia* tienen en promedio 2 cm de largo con una cubierta dura (Fig. 11A). El embrión es basal, rudimentario localizado en la región micropilar, de aprox. 1 mm de largo y ocupa sólo la quinta o sexta parte de la longitud con relación al tamaño del endospermo, característica muy frecuente en la familia Annonaceae (Hayat & Canright, 1965). En el embrión son distinguibles la radícula y los cotiledones. En tanto que el endospermo es abundante, ruminado, duro con reservas de lípidos y almidón (Pérez Amador *et al*, 1997). Al colocar las semillas en contacto con agua se inicia la imbibición (toma de agua por la semilla), de acuerdo con González *et al* (1997) la testa de esta especie es permeable al agua en toda su superficie, por lo que la imbibición es rápida provocando la hidratación del endospermo durante los días 1 y 2 subsecuentes (BBCH: 01 – 02; Fig. 11B-C), superficialmente se observa un cambio de volumen en la semilla y una coloración oscura de la testa, sin cambio aparente en los embriones, según Bewley & Black (1994) estos dos días corresponden a la fase I de la imbibición, la cual es un

fenómeno totalmente físico e independiente de la viabilidad de la semilla. Según González-Esquinca (comunicación personal), la imbibición completa ocurre entre el segundo y el cuarto día. A los cinco días de la imbibición (BBCH: 03; Fig. 11D) el embrión crece casi dos veces (de 1 a 2 – 2.5 mm) y algo del endospermo circundante se torna blando y blanquecino, señal física del inicio de la movilización de reservas (proteínas, azúcares y lípidos), estas características son acordes con la fase II de la imbibición (Bewley & Black 1994; Bewley, 1997). A los diez días de imbibición (BBCH: 04; Fig. 11E), el crecimiento del embrión es claramente visible (9 mm), la movilización de reservas se extiende a todo el plano del endospermo que rodea el embrión (obsérvese el aspecto blanquecino del endospermo). Exteriormente se observaron rupturas en la cubierta de la semilla a partir de la región micropilar sin que aún haya protrusión radicular, este punto pudiera ser utilizado como un marcador morfológico para señalar el inicio de la germinación y podría ser considerado como el inicio de la Fase III de la imbibición (Bewley & Black, 1994; Nonogaki *et al*, 2007).

La emergencia de la radícula ocurre entre los 12 y 15 días, y a los 13 (en promedio) la radícula mide aproximadamente 1 cm (BBCH: 05; Fig. 11F), de acuerdo con Raven *et al*, (1999), esta emergencia es desencadenada en varias especies por el alargamiento celular del embrión, particularmente de su ápice radicular obturando la cubierta de la semilla por la presión de turgencia de las células localizadas en la región subapical (zona de elongación). El endospermo se hace blando en diferentes planos, en gran parte debido a la utilización en la respiración de algunos de los elementos de reserva. Los cotiledones crecieron casi al mismo tamaño que el eje embrionario.

Algunos autores consideran la finalización de la germinación con la emergencia de la radícula y que a partir de aquí se inicia el desarrollo de la plántula, mientras que otros consideran que la germinación termina hasta que la plántula se vuelve fotosintética e independiente de las reservas del endospermo (Nonogaki *et al*, 2007). En esta especie consideramos que la germinación *sensu stricto* termina con la aparición de la radícula. En este punto entonces, de acuerdo con Taiz & Zeiger (2006), el embrión rompe su estado latente y, apoyado en la movilización de reservas, las plántulas comienzan un periodo de crecimiento vegetativo.

Después de tres días a la emergencia radicular, es decir a los 16 días de iniciada la imbibición, la radícula creció hasta tener dos centímetros de longitud (BBCH: 06; Fig. 11G), en este momento se pudo observar la aparición del hipocótilo (1 cm) en el eje embrionario (apreciable por el tono rosa-rojizo), los cotiledones ocuparon gran parte del endospermo (1.2 cm) que a su vez redujo su volumen. Cuando la radícula tiene cinco centímetros de radícula (20 días; BBCH: 07), el hipocótilo se torna totalmente rojizo y en la parte alta de la radícula se desarrollan entre tres y siete raíces secundarias, esta diferenciación según Ravén *et al*, (1999) está integrada por la actividad mitótica, la elongación y la diferenciación celular (Fig. 11H). Los cotiledones alcanzan 1.5 cm de longitud y 1 cm de ancho, y aunque casi ocupa todo el plano del endospermo, siguen dentro de él.

Transcurridos aproximadamente 25 días se observa la presencia del primordio foliar (BBCH: 11; Fig. 11I), de acuerdo con la clasificación de Duke (1969) y Font Quer (1985), la germinación es típicamente epigea y curva, cuando al elongarse considerablemente el hipocótilo (8-10 cm y aún rojizo en la parte media-inferior) los cotiledones se elevaron por sobre el suelo, también puede categorizarse como germinación criptocotiledonar según De Vogel (1980), ya que los cotiledones dispuestos de forma opuesta no emergen totalmente de la envoltura seminal, la parte expuesta de los cotiledones mostraron signos de fotosíntesis (visiblemente verdes), mientras que la interna permanece con su color original (blanco amarillentas). La raíz es axonomorfa (una raíz principal) de 8-10 cm, con pocas raíces secundarias (15-30) de 2-5 cm de longitud que se extienden principalmente desde la base del cuello. Es natural inferir que ante el desarrollo inicial de las hojas, se inicia la etapa fotosintética de la especie, aun cuando hay remanentes de reservas en el endospermo.

A los 30-32 días se observan dos hojas totalmente fotosintéticas (BBCHH: 12; Fig. 11J), alternas, de unos 4-8 cm de longitud y de 3-5 cm de ancho, el tallo presenta el epicótilo corto, de 2 a 3 cm, cilíndrico, color verde, mientras que el hipocótilo permanece sin cambios significativos en tamaño longitudinal (8-10 cm), pero si con un aumento en el grosor a unos 8 mm, aún quedan rastros de un color rojo-marrón en la parte basal, se conservan los cotiledones dentro de un endospermo totalmente agotado, el sistema radicular permanece sin cambios significativos en el

tamaño de la raíz principal, pero aumenta el número de raíces secundarias (40-60), que a su vez también se ramifican. Esta etapa significa entonces la independencia de la plántula de las reservas del endospermo.

A los 60-65 días desde que se inició la imbibición se observan 6 hojas fotosintéticas (BBCHH: 16; Fig. 11K). La plántula alcanza una altura cercana a 16 – 18 cm. El sistema radicular presenta finas y abundantes raíces secundarias (60-80), de 5 a 8 cm de longitud y de 1 a 2 mm de de diámetro, de color blanco a café. Las hojas son alternas simples, de elípticas a oblongas, de 6 a 10 cm de longitud, 2.5 a 4.0 cm de ancho, limbo elíptico, base aguda arredondeada, margen entero, ápice obtuso a redondeado, nervación eucamptódroma, de color verde intenso, peciolo de 0.3-0.5 cm. El endospermo junto con los cotiledones se desprende.

En resumen, el desarrollo temprano de *Annona diversifolia* aquí estudiado puede dividirse básicamente en tres etapas: imbibición, emergencia radicular y formación de plántula, con fases intercaladas entre ellas (Cuadro 7).

Cuadro 6. Parámetros de la germinación de semillas *A. diversifolia*

Parámetros	
Inicio de germinación (días)	12 ± 5.3
Germinación de la última semilla (días)	22-30
Día para alcanzar el 50% de las semillas geminadas	13 ± 3
Velocidad máxima de germinación (%)	61.1
Porcentaje de germinación total (%)	71.1 ± 13.5

Los valores representan el promedio de 10 repeticiones, se señala también la desviación estándar

Cuadro 7. Caracterización del desarrollo temprano de *A. diversifolia*

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

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

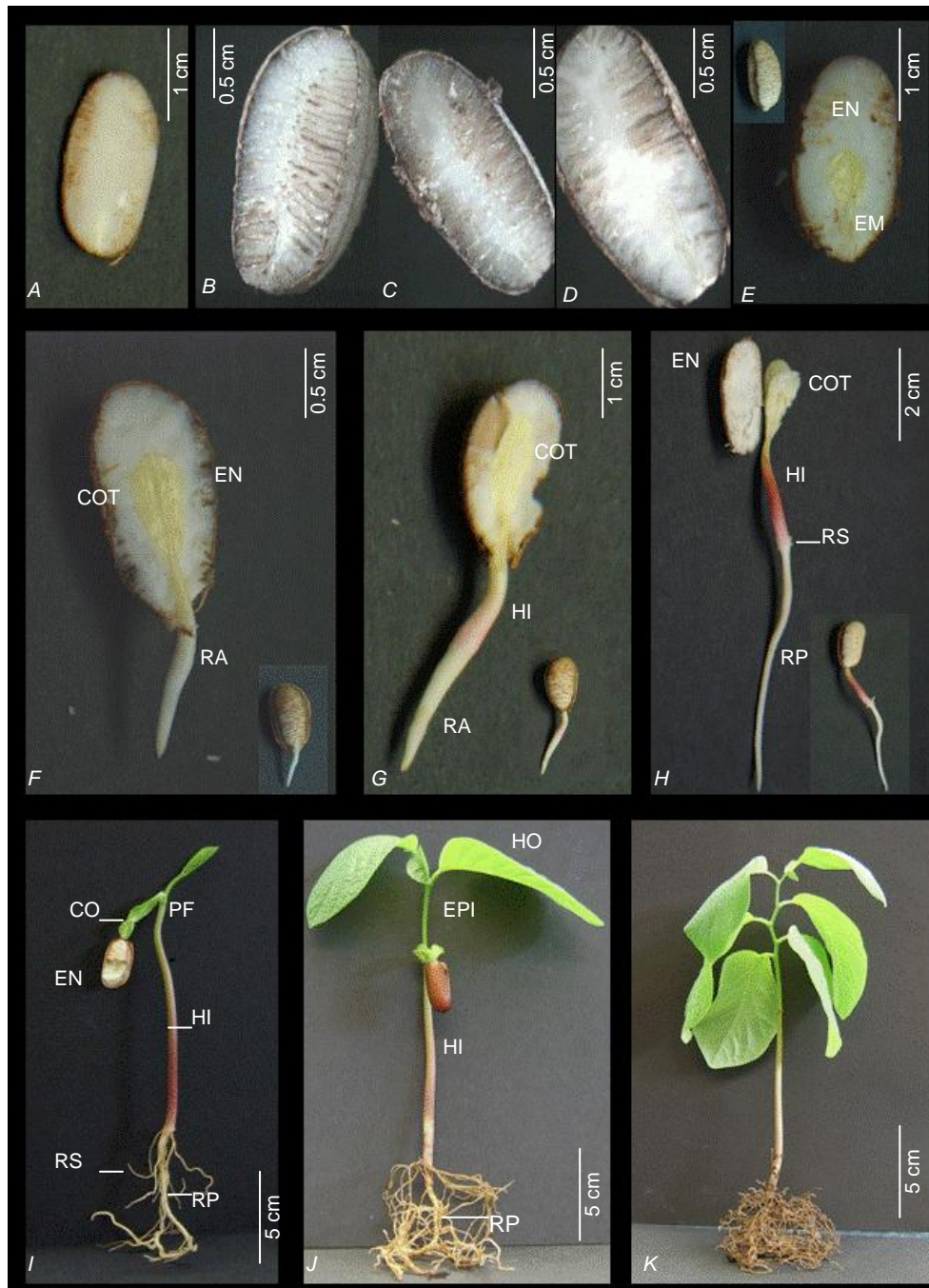


Figura 11. Proceso de germinación y desarrollo de *Annona diversifolia*. A) Sin imbibición, B) 1 día en imbibición, C) 2 días en imbibición, D) 5 días en imbibición, E) 10 días en imbibición, F) Semillas con 1 cm de radícula, G) Semillas con 2 cm de radícula, H) Semillas con 5 cm de radícula, I) Plántula con primordio foliar, J) Plántula con 2 hojas, K) Plántula con 6 hojas. COT: Cotiledón, EN: Endospermo, EM: Embrión, EPI: Epicótilo, HI: Hipocótilo, PF: primordio foliar, RP: Raíz principal, RS: Raíz secundaria

6.1.2. Presencia temprana de alcaloides totales en *A. diversifolia*

En este apartado se describen la producción de alcaloides totales, es decir la cantidad de extracto obtenido de cada tejido en las etapas y fases analizadas.

No se encontraron alcaloides en las testas, los embriones y endospermos de semillas sin imbibir, tampoco durante los dos primeros días de la etapa de imbibición. Los alcaloides se detectan por primera vez a los 5 días de la imbibición y su presencia aumenta sustancialmente en las etapas de emergencia radicular y de plántula. También se observa que una vez que los alcaloides se detectan en algún tejido, éstos permanecen, aunque con diferencias específicas en su dinámica de acumulación (Cuadro 8). Es pertinente señalar que los extractos alcaloidales obtenidos no fueron totalmente selectivos, en algunos casos como el de las semillas secas, y semillas con 1 y 2 días de imbibición, aunque se obtienen cantidades pequeñas de extractos ninguno de ellos dió positivo en CCF a los reactivos de identificación para alcaloides (Draguendorff y Mayer) y en los extractos que fueron positivos no todo el perfil es exclusivamente de alcaloides. Aun así la cantidad de extracto está directamente relacionado con la cantidad de alcaloides.

Se realizó un análisis particular de cada tejido, de esta forma, se observó que los endospermos a los 5 días de imbibición son los primeros tejidos en acumular alcaloides (0.05 mg/g ms), la cantidades detectadas en este tejido aumentaron progresivamente hasta alcanzar su acumulación más alta en la etapa de emergencia radicular en semillas con 2 cm de radícula (0.673 mg/g ms) ($F = 35$, $P = 0.000$), tomando en cuenta las diferencias de alcaloides (0.673 – 0.05 mg) y el tiempo (5 a 16 días) que transcurre en ambas fases, se puede señalar que los alcaloides se acumulan con una velocidad de hasta 0.052 mg/día, para luego disminuir (hasta 80%, 0.133 mg/g ms) durante las dos etapas subsecuentes ($P \leq 0.05$) (Cuadro 8). En contraparte los rendimientos en las radículas-raíces aumentaron constantemente a partir de que la radícula emerge y hasta que las plántulas alcanzan las 6 hojas ($F = 10.92$, $P = 0.0004$), a un poco más del doble de velocidad (0.079 mg/día) que los endospermos y hasta casi cinco veces más en cantidades netas (3.383 mg/g ms). Algo similar ocurrió con los hipocótilos-tallos desde que este tejido se diferencia (2

cm de radícula) hasta la última fase estudiada ($F = 16.83$, $P = 0.0002$), pero con una velocidad (0.0380 mg/día) parecida a la de los endospermos y por tanto, menor que el de las radículas. Esta dinámica progresiva también fue observada en las tres etapas estudiadas para las hojas ($F = 28.31$, $P = 0.0009$), pero con una tasa mucho más discreta (0.0027 mg/día) y hasta cantidades veinte veces menores (0.05 mg/g ms). Los cotiledones solo presentaron alcaloides en dos etapas (5 cm de radícula y primordio foliar) y en proporciones de 16 a 37 veces menos (0.20 y 0.09 mg/ms respectivamente) que los otros tejidos ($P \leq 0.05$).

La producción de alcaloides totales se caracterizó por presentar dominancias temporales en tejidos diferentes, inicialmente los endospermos tuvieron mayor cantidad de extracto (cerca de dos veces más) que los otros tejidos en las etapas de 1 y 2 cm de radícula ($P \leq 0.05$), después los hipocótilos en las etapas de 5 cm de radícula y primordio foliar tienen hasta casi dos y nueve veces más que los endospermos y radículas respectivamente ($P \leq 0.05$); finalmente las raíces en las etapas de 2 y 6 hojas contienen hasta dos y veinte más alcaloides totales que tallos y hojas respectivamente ($P \leq 0.05$). Los cotiledones y las hojas siempre tuvieron cantidades menores a los tejidos anteriores.

La mayoría de los tejidos (con excepción de los cotiledones) acumulan alcaloides totales de manera proporcional a su desarrollo, particularmente pueden explicarse con modelos de regresión lineal fuertemente relacionados en algún intervalo de tiempo característico a cada tejido (Cuadro 9). En todos los casos para obtener el modelo lineal de este aumento, no se consideraron las etapas iniciales (de 0 a 2 días) ya que no se detectaron alcaloides, y se tomó en cuenta el día en que se observó diferenciación de tejidos y el día en el que se alcanzó la mayor cantidad de alcaloides totales. Por ejemplo, para los endospermos la acumulación de alcaloides es proporcional al desarrollo fue desde los 5 días de imbibición hasta los 16 días (fase de 2 cm de radícula), para las radículas-raíces y los hipocótilos y tallos el intervalo fue desde su diferenciación hasta la etapa de plántulas con 6 hojas. Si tomamos en cuenta a la pendiente del modelo lineal como una velocidad de acumulación, se observa que las raíces son las que tienen el mayor aporte a la cantidad total de las plántulas en desarrollo.

Cuadro 8. Producción de alcaloides totales (mg g⁻¹ de mat. seca) durante el desarrollo temprano de *A. diversifolia*

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

Los valores se representan como el promedio de 5 repeticiones y su desviación estándar.

Las letras en minúsculas señalan diferencias en las cantidades de alcaloides de un mismo tejido entre las etapas evaluadas (arreglo en filas). Mientras que las letras en mayúsculas señalan diferencias entre los tejidos de una misma etapa (arreglo en columnas). Las medias fueron separadas con la prueba de Tukey 95%

Cuadro 9. Relación de la producción de alcaloides totales en el desarrollo temprano de *A. diversifolia*

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

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

6.1.3. Perfiles de composición de los extractos e identificación de ABI

Se determinó la presencia de cinco alcaloides con tiempos de retención de 1.8, 2.7, 3.5, 5.1 y 6.2 minutos en las condiciones de HPLC que se describieron anteriormente, de cada uno de ellos se recolectaron muestras en las diferentes corridas que se realizaron, estos cinco compuestos dieron positivo al reactivo de Dragendorff y Mayer, los tres últimos aparecen en varios momentos del desarrollo y distribuidos en varios tejidos, mientras que los dos primeros son aparentemente exclusivos de los tallos y raíces de plántulas de 6 hojas.

Para lograr su identificación se realizó su aislamiento de raíces de plántulas con 6 hojas, el alcaloide con tiempo de 3.5 min pudo determinarse como la oxoaporfina liriodenina– de acuerdo con los datos espectroscópicos de UV, IR, masa y RMN ¹H y ¹³C hechos por el Dr. Mariano Martínez Vázquez del Instituto de Química de la UNAM y por el Dr. Diego Cortés del departamento de Farmacia de la Universidad de Valencia, mientras que los tiempos correspondientes a 5.1 y a 6.2 min, y de acuerdo –hasta ahora- con comparaciones de absorción en UV y puntos de fusión, presumiblemente pueden ser las oxoaporfinas lisicamina y atherospermidina respectivamente (Figura 12 y Cuadro 10). Los alcaloides con tiempos de retención 1.8 y 2.7 min debido a las cantidades tan pequeñas no pudieron aislarse. Liriodenina representó casi el 80% del extracto original, mientras que lisicamina y atherospermidina el 2 y 10% respectivamente.

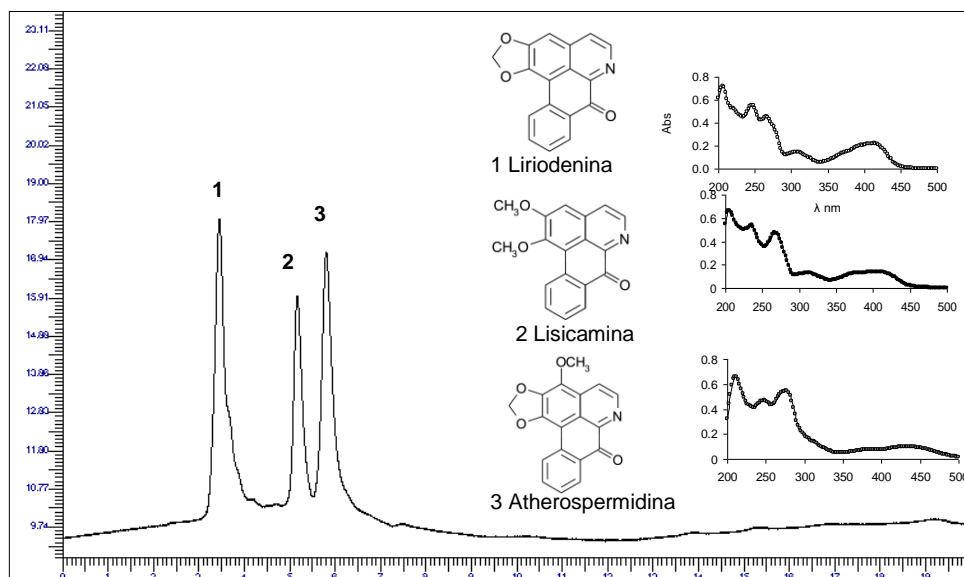


Figura 12. Alcaloides aislados e identificados en raíces de plántulas de *A. diversifolia*

Cuadro 10. Comparación de algunos parámetros físicos de los alcaloides aislados en *A. diversifolia* con otros estudios

Alcaloides	UV: $\lambda_{\text{máx}}$ nm	p.f. °C	Referencias
Atherospermidina	246, 280, 384, 436	275-276 (dec) Agujas anaranjadas	Aislada en este estudio
	247, 281, 316, 383, 440	275-276 (dec.)	Shama <i>et al</i> , 1973
	247, 281, 316, 383, 440		Chen <i>et al</i> , 1997
	246, 280, 380, 436		Pung, 2000
Lisicamina	236, 267, 312, 400	212-214, Agujas verdes	Aislada en este estudio
	235, 270, 307, 400	210 - 211	Shama <i>et al</i> , 1973
	235, 271, 308, 400	212	Park <i>et al</i> , 1991
	250, 283, 335	185 - 187	Chang <i>et al</i> , 2000
Liriodenina	236, 267, 312, 400	273 - 275 (dec) Agujas doradas	Aislada en este estudio
	247, 268, 309, 413	270 - 272 (dec)	Shama <i>et al</i> , 1973
	246, 265, 304	282 - 283 (dec)	Pérez-Amador <i>et al</i> , 2004
	246, 269, 307, 413		Simas <i>et al</i> , 2001

Chang F.R., Chen C.Y., Hsieh T. J, Cho C.P. and Wu Y.C. 2000. J. Chinese Chem. Soc.. 47, 913-920.

Chen, K.S., Wu, Y.C., Teng, C.M., Ko F.N., Wu T.S. 1997. J. Nat. Prod. 60, 645-647.

Park M.K, Park J.H., Shin Y.G., Cho K.H., Han B.H. y Park M. H. 1991. Arch. Pharm. Res. 14 (2), 99-102.

Pérez-Amador MC, González-Esquinca A, Morales MC, Toriz F. 2004. Phytol 2004: 53-55

Shamma M. and Castenson R.L. 1973. The Alkaloids Chemistry and Physiology. Vol. XIV. Academic Press Inc. 226-262.

Simas N. K., Ferrari S.F., Pereyra S. N. y Leitão G. G. 2001. J. Chem. Ecol. 27(1):93-107.

Pung T. 2000. The isolation of natural products from plant extracts. Tesis de Maestría. Master of Science in Chemistry Virginia Polytechnic Institute and State University

Los tres alcaloides son característicos de Annonaceae (Cuadro 11, Anexo 6). La liriodenina y la lisicamina están distribuidas en otros taxones, atherospermidina, solo se ha reportado para esta familia.

Liriodenina es quizás la oxoaporfina más abundante, la revisión realizada hasta febrero del 2011, principalmente pero no de manera exclusiva, en artículos de revisión revela su presencia en 3 subclases, 7 órdenes, 14 familias, 86 géneros y aproximadamente 240 especies (Guinaudeau *et al*, 1975, 1979, 1983, 1988, 1994; Leboeuf *et al*, 1982; Cavé *et al*, 1987; Bentley, 1997, 1999, 2001, 2002, 2003, 2004, 2005 y 2006). El alcaloide está distribuido principalmente en especies de la subclase Magnoliidae (Magnoliales, Laureales, Nymphaeales, Ranunculales y Papaverales), con mayor frecuencia en el orden de las Magnoliales, de manera particular las familias Annonaceae y Magnoliaceae tienen el mayor número de registros (48 y 8 géneros y 143 y 35 especies respectivamente). *Annona*, *Guatteria*, *Magnolia*, *Polyalthia*, *Xylopi*a y *Rollinia* son los géneros con más referencias, 23, 21, 18, 13, 9 y 7 respectivamente. Inclusive es producida por familias más recientes como, Rutaceae y Moraceae de la subclase Rosidae (Orden Sapindales) y Thymelaeaceae (subclase Dilleniidae: Orden Malvales) (Figura 13).

Esta distribución relativamente extensa del alcaloide señala que se trata de una ruta biosintética altamente conservada a través del tiempo, y cuya razón de ser debería implicar alguna significancia biológica. Liriodenina pudiera ser considerada un alcaloide típico, pero no exclusivo, de las Magnolidas.

La mayoría de las citas (58%) reportan el aislamiento de liriodenina de tallos y raíces, solamente en 15 citas la refiere a hojas y cuatro a semillas (*A. cherimollia*, *A. glabra*, *A. muricata* y *A. squamosa*).

Cuadro 11. Distribución de liriodenina, liscamina y atherospermidina

Familias (número de Géneros y especies)	Géneros (Número de Especies)
Liriodenina	
Annonaceae (48, 143)	<i>Alphonsea</i> (2), <i>Annona</i> (23), <i>Artabotrys</i> (4), <i>Asimina</i> , <i>Cananga</i> (2), <i>Cardiopetalum</i> , <i>Cleistopholis</i> , <i>Cyathosthema</i> , <i>Cymbopetalum</i> , <i>Disepalum</i> , <i>Desmos</i> (2), <i>Duguetia</i> (3), <i>Enicosanthum</i> , <i>Enantia</i> (2), <i>Eupomatia</i> (2), <i>Fissistigma</i> , <i>Fusaea</i> , <i>Goniothalamus</i> (4), <i>Guatteria</i> (21), <i>Guatterioopsis</i> , <i>Hexalobus</i> , <i>Hornschuchia</i> , <i>Lettowianthus</i> , <i>Isolona</i> , <i>Meiogyne</i> , <i>Melodorum</i> , <i>Miliusa</i> (3), <i>Mitrella</i> , <i>Mitrephora</i> , <i>Monodora</i> , <i>Oncodostigma</i> , <i>Oxandra</i> (2), <i>Oxymitra</i> , <i>Papualthia</i> , <i>Pachypodanthium</i> , <i>Polyalthia</i> (13), <i>Pseudomalmea</i> , <i>Pseudovoria</i> (4), <i>Popowia</i> , <i>Rollinia</i> (7), <i>Saphranthus</i> , <i>Saccopetalum</i> , <i>Schefferomitra</i> , <i>Trivalvaria</i> , <i>Unonopsis</i> (4), <i>Uvaria</i> (3), <i>Uvariopsis</i> , <i>Xylopi</i> (9)
Eupomatiaceae (1, 2)	<i>Eupomatia</i>
Hernandiaceae (1, 1)	<i>Illigera</i>
Lauraceae (5, 6)	<i>Litsea</i> (2), <i>Neolitsea</i> , <i>Cryptocarya</i> , <i>Lindera</i> , <i>Neolitsea</i>
Magnoliaceae (8, 35)	<i>Aromadendron</i> , <i>Elmerrillia</i> , <i>Liriodendron</i> , <i>Kmeria</i> , <i>Magnolia</i> (18), <i>Michelia</i> (8), <i>Paramichelia</i> , <i>Talauma</i> (4)
Menispermaceae (8, 17)	<i>Anisochyla</i> , <i>Chamasenthra</i> (2), <i>Cissampelos</i> , <i>Pachygone</i> , <i>Pycnarhea</i> , <i>Rhigiocarya</i> , <i>Sinomenium</i> (2), <i>Stephania</i> (4)
Monimiaceae (7, 18)	<i>Atherosperma</i> , <i>Doryphora</i> , <i>Dryadodaphne</i> , <i>Glossocalyx</i> , <i>Laurelia</i> , <i>Mollinedia</i> (5), <i>Siparuna</i> (7)
Nelumbonaceae (1, 1)	<i>Nelumbo</i>
Papaveraceae (2, 2)	<i>Roemeria</i> , <i>Papaver</i>
Ranunculaceae (2, 4)	<i>Thalictrum</i> (3), <i>Xanthorhiza</i> (1)
Rhamnaceae (2, 2)	<i>Colubrina</i> , <i>Zyziphus</i>
Rutaceae (1,4)	<i>Zanthoxylum</i> (4)
Thymelaeaceae (1, 1)	<i>Aquillaria</i>
Moraceae (1, 1)	<i>Broussonetia</i>
Liscamina	
Annonaceae (17, 34)	<i>Annona</i> (4), <i>Artabotrys</i> (2), <i>Cananga</i> , <i>Duguetia</i> , <i>Enantia</i> (2), <i>Fissistigma</i> , <i>Guatteria</i> (8), <i>Heteropetalum</i> , <i>Oncodostigma</i> , <i>Oxandra</i> (2), <i>Polyalthia</i> (4), <i>Rollinia</i> (2), <i>Trivalvaria</i> , <i>Unonopsis</i> , <i>Uvaria</i> , <i>Uvariopsis</i> , <i>Xylopi</i>
Hernandiaceae (1, 1)	<i>Illigera</i>
Lauraceae (3, 3)	<i>Cassytha</i> , <i>Cryptocarya</i> , <i>Lindera</i>
Magnoliaceae (2, 2)	<i>Liriodendron</i> , <i>Michelia</i>
Menispermaceae (4, 5)	<i>Abuta</i> (2), <i>Chamasenthra</i> , <i>Limacia</i> , <i>Stephania</i> , <i>Telitoxicum</i>
Rhamnaceae	<i>Zyziphus</i>
Atherospermidina	
Annonaceae (12, 15)	<i>Artabotrys</i> (3), <i>Desmos</i> , <i>Duguetia</i> , <i>Enantia</i> , <i>Fissistigma</i> , <i>Guatteria</i> (2), <i>Polyalthia</i> , <i>Popowia</i> , <i>Pseudomalmea</i> , <i>Pseudovoria</i> , <i>Rollinia</i> (2), <i>Oxandra</i>
Monimiaceae	<i>Atherosperma</i>

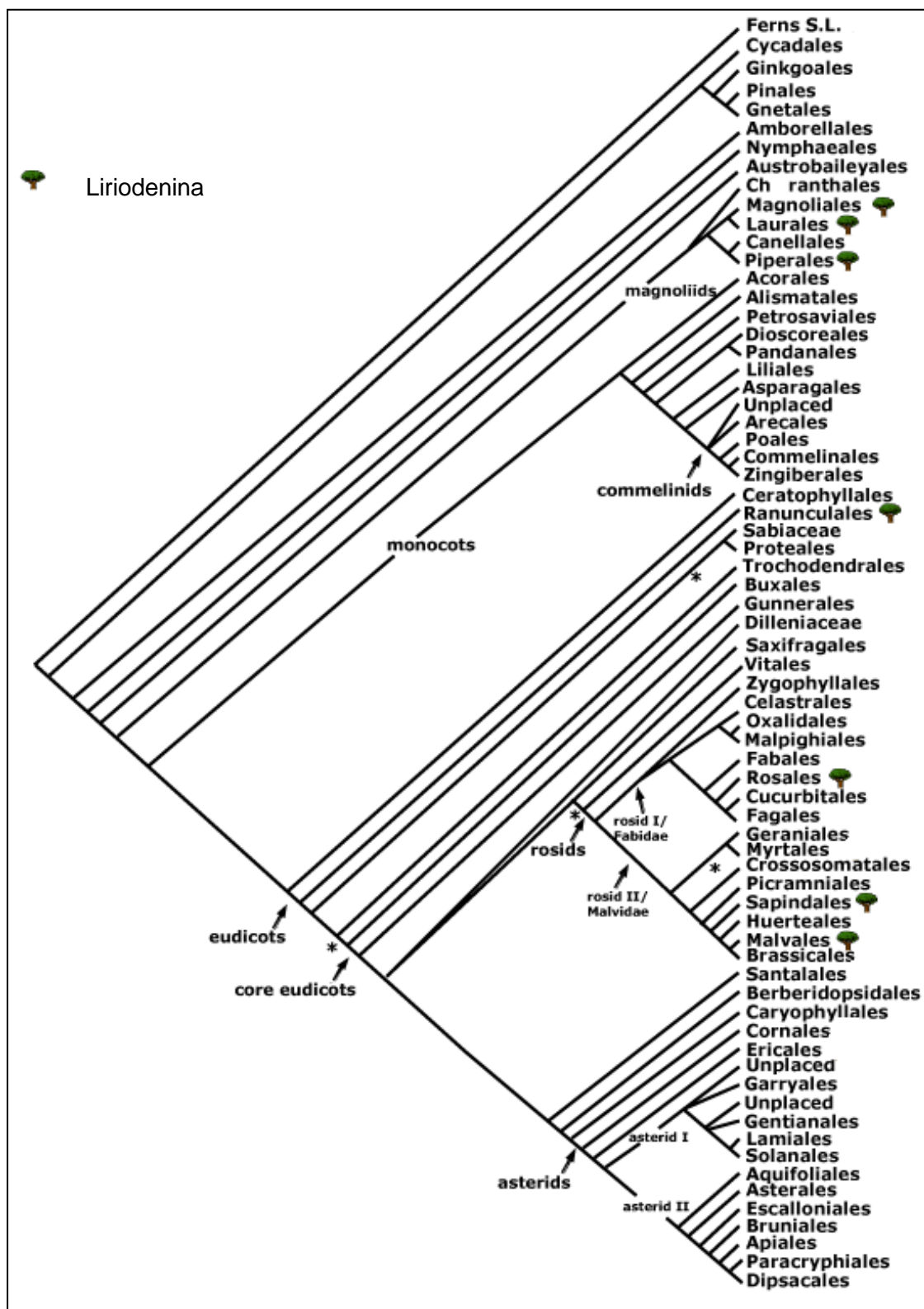


Figura 13. Distribución filogenética de liriodenina en angiospermas. Árbol filogenético según APG III 2009.

6.1.4. Variación órgano-específica de ABI en la vida temprana de *Annona diversifolia*

Liriodenina en el desarrollo temprano de A. diversifolia

Liriodenina es el primer alcaloide en aparecer, inicialmente en los endospermos a los 5 días durante la imbibición y después en el embrión a los 13 días durante la emergencia de la radícula, su presencia se extiende posteriormente a los tallos y raíces de las plántulas en crecimiento (Cuadro 12). En todos los tiempos y tejidos analizados la liriodenina es el alcaloide mayoritario.

La producción total de este compuesto se incrementa de manera constante y proporcional (con excepción de los 30 días) con respecto al tiempo ($P \leq 0.001$), es decir en función del desarrollo de la plántula (cantidad total en Cuadro 12). La velocidad con la que se produce y/o acumula guarda también relación con las etapas de desarrollo. Los aumentos más grandes ocurrieron durante las tres fases de la emergencia radicular (159, 90 y 226 $\mu\text{mol}/\text{día}$ respectivamente), mientras que en las otras etapas la producción es más discreta. En la de imbibición, liriodenina aumenta hasta 12 $\mu\text{mol}/\text{día}$ y en la de plántula hasta 47 $\mu\text{mol}/\text{día}$.

Esta dinámica de *in crescendo* (incrementos progresivos) detectada en la cantidad total del alcaloide, no está dada en función de todos los tejidos, dado que los comportamientos individuales son heterogéneos ($P \leq 0.001$). En las radículas-raíces los incrementos siempre son progresivos y en gran medida dan pauta al comportamiento general descrito con anterioridad, los cambios más sobresalientes ocurren precisamente en la etapa de emergencia radicular, a razón de 135 y 200 $\mu\text{mol}/\text{día}$ en las fases de 2 y de 5 cm de radícula respectivamente. Mientras que la dinámica de los endospermos y tallos es diferente, en ambos después de incrementos iniciales (de hasta 15 y 111 $\mu\text{mol}/\text{día}$ respectivamente), las cantidades disminuyen en las fases finales, en los endospermos en la fase de primordio foliar cuando se han agotado sus reservas nutrimentales ($P \leq 0.05$) y en los tallos cuando la plántula posee hojas ($P \leq 0.05$). Esto hace que los incrementos de liriodenina se comporten linealmente diferentes en cada tejido, para los endospermos los incrementos constantes van desde los 5 días hasta los 2 cm de radícula, para los

hipocótilos-tallos desde 1 cm de radícula hasta el primordio foliar, mientras que para las radículas-raíces se extiende durante todo el desarrollo (Cuadro 13).

Salvo en la etapa de 1 y 5 cm de radícula, la liriodenina siempre está en mayor cantidad en las raíces, que en los tallos y en los endospermos ($P \leq 0.001$), aunque no siempre en ese orden, ya que la proporción entre los tres tejidos cambia por etapa, con 2 cm de radícula, la radícula tiene 15 veces más liriodenina que el hipocótilo y 3 más que el endospermo, 9 días después, en las plántulas con primordio foliar las proporciones se invierten, la raíz solo tiene 2 veces más que el tallo, pero 59 veces más que el endospermo, finalmente en la etapa de plántula (con 2 y 6 hojas) cuando el endospermo se ha desprendido, la proporción entre raíz y tallo es de 6 y 8 veces más. Es evidente también que el incremento alcanza su valor máximo en tiempos distintos para cada tejido, mientras que en los endospermos el alcaloide se acumula mayormente en la fase de 2 cm de radícula ($132.826 \mu\text{mol. mg}^{-1} \text{ ms}$), en el tallo ocurre en la fase de primordio foliar ($660.673 \mu\text{mol. mg}^{-1} \text{ ms}$), y en las raíces en la plántula de seis hojas ($2827.11 \mu\text{mol. mg}^{-1} \text{ ms}$).

No se detectó liriodenina en hojas, cotiledones y en las testas.

Cuadro 12. Liriodenina (nmol. g⁻¹ de mat. seca) en el desarrollo temprano de *Annona diversifolia*

Etapas	Semilla seca		Imbibición		Emergencia radicular			Plántula		
	0 días	1 y 2 días	5 días	10 días	1 cm de radícula	2 cm de radícula	5 cm de radícula	Primordio foliar	2 hojas	6 hojas
Fases	00	01 y 02	03	04	05	06	07	11	12	16
Escala BBCH	0	1, 2	5	10	13	16	20	25	30	60
Endospermos	0.0	0.0	2.06 ± 0.2 e	65.11 ± 3.7 c	87.14 ± 5.9 Ab	132.83 ± 5.0 Ba	81.58 ± 3.5 Cb	23.3 ± 5.5 Cd		
Embriones	0.0	0.0	0.0	0.0						
Radículas- Raíces					3.68 ± 0.54 Bd	408.88 ± 9.4 Ac	372.66 ± 32.4 Bc	1376.7 ± 96.6 Ab	1496.4 ± 61.2 Ab	2827.1 ± 93.7 Aa
Hipocótilos- Tallos						25.78 ± 4.9 Ce	473.10 ± 38.4 Ab	660.7 ± 31.9 Ba	234.5 ± 36.8 Bd	333.7 ± 32.4 Bc
Cotiledones					0.0	0.0 D	0.0 D	0.0 C	0.0 C	
Hojas						---	---	0.0 C	0.0 C	0.0 C
Total	0.0 f	0.0 f	2.06 ± 0.2 f	65.11 ± 3.7 f	90.81 ± 6.2 f	567.49 ± 17 e	927.34 ± 11.2 d	2060.7 ± 87.1 b	1730.9 ± 57.4 c	3160.8 ± 76.6 a

Los valores se representan como el promedio de 5 repeticiones y su desviación estándar. Literales diferentes indican diferencias estadísticas significativas. En mayúsculas señalan las diferencias entre los tejidos en cada etapa (columnas), mientras que en minúsculas muestran las diferencias entre las etapas de cada tejido (filas)

Cuadro 13. Modelación matemática de la presencia de liriodenina (μmol. mg⁻¹x día⁻¹ ms)

Tejido	Regresión lineal Liriodenina (μmol/mg ms)	Coefficientes de correlación	ANOVA
Endospermo	= 1.801 + 2.572 X (días transcurridos)	r = 0.980; r ² = 94.00	F= 342.44, P= 0.000
Radícula/Raíces	= -142.254+ 16.077 X (días transcurridos)	r= 0.961; r ² = 92. 50	F= 848.84, P= 0.000
Hipocótilos /Tallos	= -229.33 + 16.724 X (días transcurridos)	r= 0.962; r ² = 88.89	F= 175.50, P= 0.000
Cantidad Total	= -66.421 + 16.562 X (días transcurridos)	r= 0.945; r ² = 87.89	F=2134.12, P= 0.000

Cuadro 14. Lisicamina? (area en mv. mg⁻¹de mat. seca) en el desarrollo temprano de *Annona diversifolia*

Etapas	Semilla seca	Imbibición	Emergencia radicular			Plántula		
			1 cm de radícula	2 cm de radícula	5 cm de radícula	Primordio foliar	2 hojas	6 hojas
Fases	0 días	1, 2, 5 y 10 días						
Escala BBCH	00	01, 02, 03, 04	05	06	07	11	12	16
Días	0	1, 2, 5, 10	13	16	20	25	30	60
Endospermos	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		
Embriones	0.0	0.0	0.0					
Radículas- Raíces						3473.8 ± 1051.6 Aa	2220.8 ± 998 Aab	415.16 ± 44.8 Ab
Hipocótilos- Tallos				0.90 ± 0.7 c	394.59 ± 42.6 b	2125.5 ± 433.9 Aa	281.7 ± 31.4 Bb	500.9 ± 156.8 Ab
Cotiledones				---	---	0.014 ± 0.02 B		
Hojas						2.133 ± 1.3 Ba	0.096 ± 10.5 Ba	2.965 ± 10.5 Ba
Total	0.0 f			0.90 ± 0.7 d	394.59 ± 42.6 c	5601.35 ± 175.4 a	2502.6 ± 967 b	919.03 ± 747 c

Los valores se representan como el promedio de 5 repeticiones y su desviación estándar. Endospermo: F= 342.44, P= 0.000; Radículas/Raíces: F= 848.84, P= 0.000; Hipocótilos /Tallos: F= 175.50, P= 0.000; Cantidad Total: F=2134.12, P= 0.000; Las letras en mayúsculas señalan las diferencias entre los tejidos en cada etapa (columnas), mientras que las letras minúsculas muestran las diferencias entre las etapas de cada tejido (filas)

Cuadro 15. Atherospermidina? ($\mu\text{mol. mg}^{-1}$ de mat. seca) en el desarrollo temprano de *Annona diversifolia*

Etapas	Semilla seca	Imbibición	Emergencia radicular			Plántula		
			1 cm de radícula	2 cm de radícula	5 cm de radícula	Primordio foliar	2 hojas	6 hojas
Fases	0 días	1, 2, 5 y 10 días	1 cm de radícula	2 cm de radícula	5 cm de radícula	Primordio foliar	2 hojas	6 hojas
Escala BBCH	00	01, 02, 03, 04	05	06	07	11	12	16
Días	0	1, 2, 5, 10	13	16	20	25	30	60
Endospermos	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		
Embriones	0.0	0.0	0.0					
Radículas- Raíces					---	114.17 \pm 41.3 Ab	67.41 \pm 27.3 Bb	2094.8 \pm 482 Aa
Hipocótilos- Tallos				0.90 \pm 0.7 c	1.317 \pm 1.49 Ab	118.968 \pm 32.99 Ab	1006.3 \pm 242 Aa	150.76 \pm 54.2 Bb
Cotiledones				---	0.033 \pm 0.02 Aa	0.027 \pm 0.02 Ba		
Hojas						0.13 \pm 1.6 Ba	0.0399 \pm 1.7 Ba	0.355 \pm 1.8 Ba
Total	0.0 f			0.90 \pm 0.7 d	1.351 \pm 1.5 c	233.29 \pm 61.5 b	1073.7 \pm 219 b	2245.9 \pm 533 a

Endospermo: F= 342.44, P= 0.000; Radículas/Raíces:: F= 848.84, P= 0.000; Hipocótilos /Tallos: F= 175.50, P= 0.000; Cantidad Total: F=2134.12, P= 0.000; Las letras en mayúsculas señalan las diferencias entre los tejidos en cada etapa (columnas), mientras que las letras minúsculas muestran las diferencias entre las etapas de cada tejido (filas)

Atherospermidina y lisicamina en el desarrollo temprano de A. diversifolia.

La imposibilidad de determinar a tiempo la identidad absoluta de los alcaloides presumiblemente lisicamina y atherospermidina, impidió su cuantificación, por lo que los resultados de ambos se presentan como abundancias relativas tomando en cuenta el área de los cromatogramas. Al igual que liriodenina, estos dos alcaloides tampoco están presentes en las semillas secas, su aparición es más tardía y en otros sitios diferentes a los de la primera (Cuadro 14 y 15). Ambos compuestos se detectan inicialmente en las etapas de emergencia radicular, la lisicamina en los hipocótilos cuando la radícula tiene 2 cm y la atherospermidina en hipocótilos y cotiledones cuatro días después, cuando la radícula tiene 5 cm. La lisicamina se acumula en mayor cantidad en plántulas con primordio foliar (5601.35 mAu.mg masa seca), en tanto que atherospermidina muestra un aumento progresivo un poco más lento, alcanzando su máximo contenido cuando la plántula tiene 6 hojas (2245.9 mAu.mg⁻¹ ms). La velocidad de incremento de la lisicamina es más alta en las etapas de radícula (hasta 1041 mAu día⁻¹), mientras que la de la atherospermidina es más alta en la de plántulas (hasta 168 mAu.día⁻¹).

Esta dinámica general lleva consigo varias diferencias significativas entre los tejidos, mientras que las raíces y los tallos siempre son más ricos en alcaloides, con dominancia intercalada entre las etapas, las cantidades detectadas en hojas y cotiledones solo aportan cantidades menores a 0.3% de la sumatoria total.

La lisicamina muestran dinámicas de acumulación similares en raíces y tallos, ya que las cantidades más grandes en ambos tejidos se encontraron en plántulas con primordio foliar (3473.8 y 2220.8 mAu.mg⁻¹ ms respectivamente), en contraparte, la atherospermidina se acumula en mayor cantidad en las raíces de plántulas con seis hojas (2094.8 mAu.mg⁻¹ ms), y en los tallos en plántulas con 2 hojas (1006.3 mAu.mg⁻¹ ms). Por lo que la acumulación progresiva de ambos alcaloides en la plántula, esta explicado por las cantidades detectadas inicialmente en el hipocótilo-tallo y después por el incremento en las raíces. En las hojas y los cotiledones, estos alcaloides no tuvieron cambios significativos.

Los alcaloides con los tiempos de retención de 1.8 y 2.7 min solo aparecieron en las etapas de plántulas con seis hojas tanto en raíz como en tallo.

El análisis anterior deja ver claramente relaciones órgano-específicas particulares para cada alcaloide, un análisis de abundancia relativa (independiente de las cantidades netas), mostrado en la figura 14 permite comparar las dinámicas características de cada alcaloide en cada tejido

De esta manera liriodenina y atherospermidina en la sumatoria total muestran comportamientos similares correspondientes a aumentos progresivos y continuos durante todo el desarrollo. La liriodenina lo hace más temprano (a partir del quinto día de imbibición) y por ende con velocidades más moderadas, mientras que atherospermidina al detectarse hasta en la fase de 2 cm de radícula (16 días), se acumula en menor tiempo. La lisicamina se desfasa de estos alcaloides por acumularse en mayor cantidad tres fases antes (plántula con primordio foliar), disminuyendo en las dos últimas (Fig. 14A).

Los comportamientos por tejido explican las características de la dinámica general. La abundancia de los tres alcaloides en las radícula-raíces muestra semejanza en la forma de los incrementos y/o decrementos con el contenido total de cada uno de ellos en la sumatoria total (Fig. 14B). La dinámica en los hipocótilos-tallos (Fig. 14C) determinan a su vez la presencia inicial de lisicamina y atherospermidina (2 cm de radícula y primordio foliar); en el de las hojas se puede observar la ausencia de la liriodenina, mientras que la de los endospermos (Fig. 14F) muestra la presencia exclusiva y la aparición inicial de la de liriodenina.

También se observan semejanzas tejido-específicas entre los alcaloides, en radícula-raíces, la liriodenina y la atherospermidina tienen dinámicas parecidas; en los hipocótilos-tallos la liriodenina y la lisicamina son los que muestran similitud, en hojas y cotiledones lisicamina y atherospermidina (Fig. 14D-E). Los tallos y las raíces tienen mayor diversidad de alcaloides, aunque en las raíces son más abundantes.

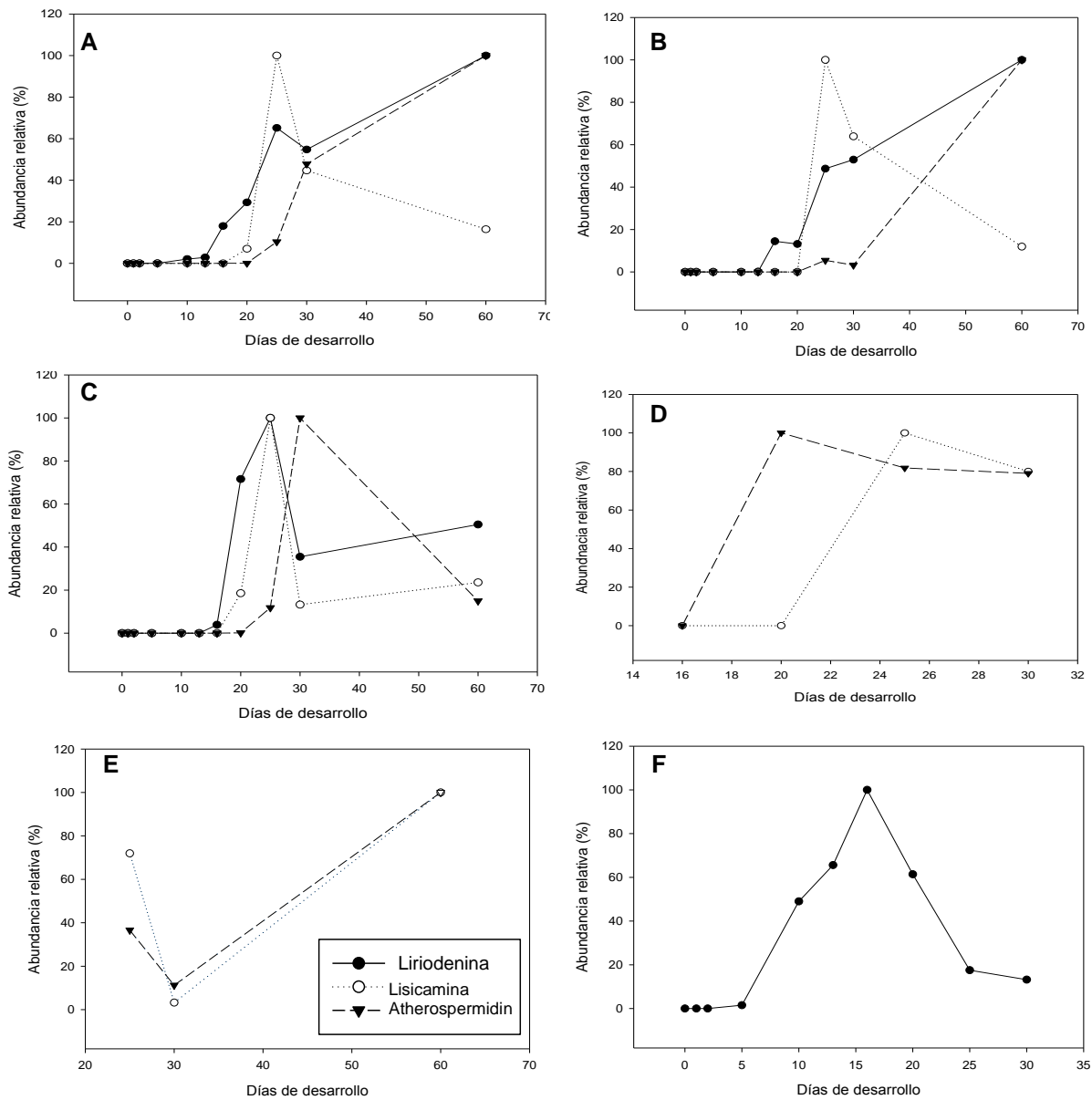


Figura 14. Dinámicas organoespecíficas de ABI en el desarrollo temprano de *A. diversifolia*. A) Cantidad total, B) Radículas-Raíces, C) Hipocótilos-Tallos, D) Cotiledones, E) Hojas, F) Endospermo. **Abundancia relativa** = [(cantidad detectada en x tiempo / la cantidad más alta detectada en un tejido en particular) X 100]

Discusión

Los resultados señalan que los alcaloides en general, y en particular la liriodenina, lisicamina y atherospermidina, no se encuentran en el embrión, el endospermo y la testa de la semilla seca, ni durante los primeros días de imbibición de *Annona diversifolia*, por lo que su presencia posterior no es un aporte de la planta madre, y por lo tanto no se forman durante la embriogénesis, como sucede con otras semillas y alcaloides, por ejemplo los alcaloides purínicos cafeína y teobromina en *Coffea*, *Camellia* y *Theobroma*, la nicotina en *Nicotiana*, los alcaloides quinolizidinicos en *Lupinus*, la morfina y codeína en *Papaver* (de Cortes *et al*, 2005; Guerreiro Filho & Mazzafera, 2000; Grove *et al*, 1976).

La cantidad en la que se acumulan estos alcaloides es semejante a la de un ejemplar adulto, la cantidad de extracto de alcaloides totales (0.55 % de masa seca) y de manera particular la de liriodenina (casi 0.1% de ms), son parecidos a los encontrados en las raíces (0.2%) de árboles adultos (González-Esquinca, 2001).

La presencia temprana de los tres alcaloides, liriodenina desde los 5 días de imbibición y de lisicamina y atherospermidina 16 y 20 días respectivamente (2 y 5 cm de radícula), señala que la biosíntesis de estos alcaloides no depende directamente de la actividad fotosintética, y sugiere que pueden producirse sin depender de ella. La biosíntesis temprana de estos alcaloides sugiere una relación natural con la degradación de las proteínas de reserva, de acuerdo con Bewley & Black (1994), Rout & Chrungoo (1999), Müntz *et al* (2001), y Fait *et al* (2006) estas se producen y almacenan durante la embriogénesis de la semilla, particularmente en la etapa media y tardía y son consideradas como un reservorio de nitrógeno que puede ser utilizada durante la germinación, por lo que presumiblemente los precursores de estos alcaloides, los aminoácidos L-tirosina y/o L-fenilalanina (Cave *et al*, 1987; Waterman, 1998), son liberados durante la degradación de proteínas y después dirigidos a la biosíntesis de los alcaloides aporfínicos. En cambio la biosíntesis de los alcaloides con tiempos de retención de 1.5 y 2.5 minutos, detectados solo en plántulas con hojas, parece depender de la actividad fotosintética.

En *A. diversifolia* la biosíntesis y acumulación de alcaloides está asociada con el desarrollo de la germinación. A medida que la plántula crece, el perfil de alcaloides

aumenta en riqueza y abundancia. De manera particular pareciera que la biosíntesis de liriodenina es favorecida por el tiempo, espacio y recursos, ya que es la primera en biosintetizarse y se acumula en cantidades altas y en tejidos en los que lisicamina y atherospermidina no están presentes. Estas diferencias dan origen entonces a una asociación temporal y órgano-específica para cada alcaloide. Aunque no está descrito claramente, en *Papaver somniferum* ocurre lo mismo; durante la embriogénesis se acumulan morfina y codeína (Grove *et al*, 1976), y la sanguinerina solo durante la germinación (Facchini *et al*, 1995). En *Nicotiana tabacum*, *Catharantus roseus* y *Senecio jacobea*, parece que se presenta el mismo tipo de asociación, el desarrollo temprano de las plántulas coincide con el inicio o aumento de la presencia de solo ciertos alcaloides piridínicos y quinolínicos (Weeks & Bush, 1974; De Luca *et al*, 1986; Aerts *et al*, 1994; Schaffner *et al*, 2003; Suhkla *et al*, 2006), es decir la biosíntesis de alcaloides está asociada al desarrollo temprano de la planta y se restringe a fases específicas; cada alcaloide es dependiente de las enzimas correspondientes a cada fase, lo que concuerda con el hecho de que la expresión del metabolismo secundario está relacionado, como menciona Seigler (1998), con un proceso de diferenciación, que en estos casos ocurre tempranamente en varias especies.

La asignación de recursos para la producción de metabolitos, supone entonces que los alcaloides deben jugar un papel importante para la planta. Ya que a la par de la cantidad de reservas energéticas que se destinan para el conjunto de cambios graduales y progresivos en tamaño, estructura y función, que hacen posible la transformación de un cigoto en una planta completa, existe un stock reservado para la biosíntesis de metabolitos secundarios. Aunado a esto se debe considerar que quizás las etapas de germinación y desarrollo de la plántula son las más críticas para la sobrevivencia de cualquier vegetal, debido a las fluctuaciones caóticas de temperatura, humedad, dióxido de carbono, luz, nutrientes dispersos desigualmente, y la presencia común de enemigos variables (fitopatógenos, depredadores y/o competidoras) (Bewley 1997; Trewavas, 2003).

En general, los tejidos vulnerables son mejor protegidos que los tejidos viejos o senescentes (Potter & Kimmerer, 1989; Kus *et al*, 2002; Zhang *et al*, 2009). Por lo

que la presencia de metabolitos secundarios en diferentes tejidos durante el desarrollo temprano puede estar acorde con la premisa básica de la hipótesis de la teoría de la defensa óptima, la cual señala que los metabolitos secundarios requieren la inversión de recursos, y por lo tanto, deben ser preferentemente asignados a sitios de gran valor y de riesgo al ataque de consumidores (McKey, 1974; Rhoades, 1979, Zangerl & Bazzaz, 1992; Kaplan *et al*, 2008). Pero, al mismo tiempo parece contraponer lo dicho por la hipótesis de las defensas vegetales llamada *tasa de crecimiento* (Coley *et al*, 1985), la cual señala básicamente que en las plantas la cantidad de inversiones en la defensa (en este caso MS) aumentará a medida que disminuye el potencial de crecimiento, en este caso es claro que en *A. diversifolia* ambas cosas van asociadas intrínsecamente. Por lo que la presencia de alcaloides en etapas tempranas de la germinación, podría tomar relevancia si éstos tienen actividades de defensa en contra de depredadores o fitopatógenos. Papel relevante, cuando además por la hidratación de tejidos y degradación de reservas los tejidos (especialmente el endospermo) se vuelven susceptibles a microorganismos oportunistas. Entonces, la presencia de alcaloides, particularmente la de liriodenina (por su abundancia y actividades biológicas) podría representar un posible mecanismo de defensa

Parte de este capítulo fue publicado bajo el título: **Liriodenine alkaloid in *Annona diversifolia* during early development**. De la Cruz-Chacón I. & González-Esquinca A.R. 2012. **Natural Product Research** 26 (1): 42-49. <http://dx.doi.org/10.1080/14786419.2010.533373>. ISSN impreso: 1478-6419, Online ISSN: 1478-6427

6.2. Aspectos de la biosíntesis de ABI en la vida temprana de *A. diversifolia*

6.2.1. Presencia de precursores para la biosíntesis de ABI

Movilización de reservas de proteínas totales.

La movilización de las proteínas de reserva se caracterizó en las nueve fases en las que teóricamente el crecimiento de la plántula solo depende de las reservas de los endospermos, lo que permitió calcular aproximadamente la cantidad de los aminoácidos fenilalanina y tirosina que se destina a la biosíntesis de alcaloides en estas fases.

Las proteínas comprenden casi el 17 % de la masa del endospermo seco (174 mg/gms), este contenido proteico disminuyó desde el inicio de la imbibición, aunque la proporción de proteínas que disminuyen por día (diferencia de proteínas entre cierto intervalo de días), no fueron significativas (1 a 2 mg/día, cerca del 0.5 a 1% del contenido de proteínas totales). La disminución de proteínas fue evidente entre los 5 y 10 días de imbibición, coincidiendo con el crecimiento visible del embrión y la consecuente emergencia radicular; en esta fase se degradaron aproximadamente 6.7 mg proteína/día, cerca del 25% del contenido total. Las cuatro fases siguientes, desde semillas con 1 cm de radícula hasta plántula con primordio foliar, comprenden un periodo logarítmico de proteólisis, las tasas de degradación son las más pronunciadas (11.4, 2.6, 8.9 y 3.7 mg proteína/día respectivamente); en este lapso de 20 días el volumen proteico del endospermo disminuye casi un 85% (Figura 15). La degradación de las proteínas traería como consecuencia la aparición de péptidos pequeños y aminoácidos libres, disponibles como recursos energéticos y bloques de construcción de nuevas proteínas (Bewley & Black, 1994; Muntz, 1998); o posiblemente como precursores de metabolitos secundarios.

El seguimiento de los aminoácidos libres (aal) durante la germinación (Figura 15) señala que éstos están presentes en el endospermo desde el inicio (1.712 mmol/g) y que se mantienen casi constantes durante los primeros tres días, incluso hay una disminución, no significativa. Un primer incremento abrupto de aal, se presentan entre los 5 y 10 días de la imbibición, a razón de 324 μ moles/día. La

disminución de proteínas, el incremento de aminoácidos y la presencia de alcaloides, señalarían que los 5 días de imbibición pueden indicar, tal como lo mencionan Bewley (1997) y Müntz *et al* (2001) para otras especies, el inicio de la actividad del metabolismo secundario en *A. diversifolia*.

Entre los 10 y 13 días, el incremento de aal persiste aunque a una velocidad menor (173 mmol/g.día), coincidiendo con la aparición de la radícula, esta diferencia indica un transporte de los aminoácidos libres hacia el eje embrionario en crecimiento, destinados a la biosíntesis de proteínas *de novo*, o como fuente de energía ya que al romper la radícula la cubierta seminal, se favorecería el paso de la respiración aerobia. Los aal solamente son oxidados como α -cetoácidos en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos después de su desaminación (Müntz, 1998; Mooney *et al*, 2002).

A medida que la plántula avanza en su desarrollo, entre los 13 y 17 días, la cantidad de aal en el endospermo se incrementa a una razón de 373 mmol/g.día entre los 13 y 17 días y después a 912 mmol/g.día entre los 17 y 21 días. En este intervalo las cantidades de aal son las más grandes, es evidente que el crecimiento del embrión está supeditado a las reservas del endospermo y los aal pueden seguir siendo transportados para ser utilizados en la construcción de moléculas, entre ellas la de precursores de coenzimas, fitoreguladores y nucleótidos. Todo ello se refleja en la velocidad del crecimiento del embrión (cerca de 5 mm por día). Una vez que en la plántula aparecen los primordios foliares, la cantidad de aal en el endospermo disminuye drásticamente a 637 mmol/g.día, coincidiendo también con la desaparición de proteínas.

Hay entonces dos periodos importantes en el metabolismo de las proteínas de reservas y los aminoácidos libres del endospermo: 1) el inicio del aumento en los aal (alrededor de los 5 días) y 2) el punto máximo de la proteólisis (entre los 13 y 20 días); en ambos la relación proteína-aminoácidos libres es evidente, es decir la aparición de aal está naturalmente relacionada con la degradación de proteínas (Figura 15).

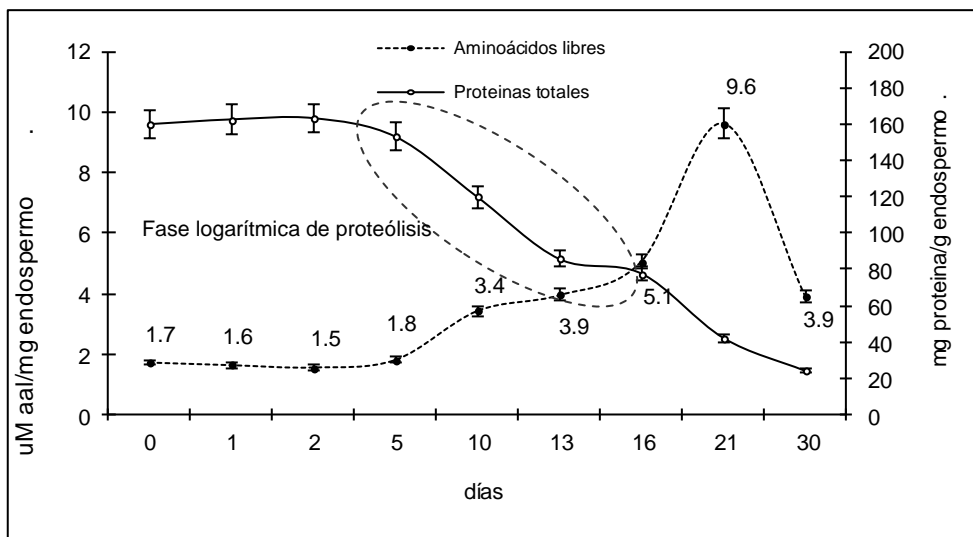


Figura 15. Relación de proteínas totales y aminoácidos libres en la germinación. Se indican la cantidad de aal en los días correspondientes. Los valores expresan el promedio (n=5) y la desviación estándar.

Presencia de fenilalanina y tirosina durante la germinación

Los aminoácidos aromáticos fenilalanina y tirosina están presentes en los endospermos secos (21 y 4 $\mu\text{mol/g}$ de materia seca respectivamente), lo que significa que son acumulados durante la embriogénesis de la semilla. La presencia de ambos aumenta con relación al desarrollo del embrión, con una dinámica de producción semejante al de los aal totales. La concentración de fenilalanina se mantiene en general siempre por debajo de tirosina, con excepción de los días 1 y 5 (Figura 16). Los cambios significativos inician en el día 10 de imbibición, coincidiendo con la emergencia de la radícula. La fase de incremento se extiende hasta la etapa de 5 cm de radícula (20 días después de la imbibición y/o 10 días de la emergencia radicular). La velocidad de producción más alta para fenilalanina (4.8 $\mu\text{mol/g.día}$) se alcanza entre los 13 y 17 días, mientras que para tirosina (11 $\mu\text{mol/g.día}$) ocurre entre los 16 y 21 días. En la siguiente fase analizada (primordio foliar), entre 21 y 30 días, se observa una disminución considerable en las cantidades de ambos (cerca del 70%), lo que significa que disminuyen aproximadamente entre 12 y 19 mmol/g.día respectivamente.

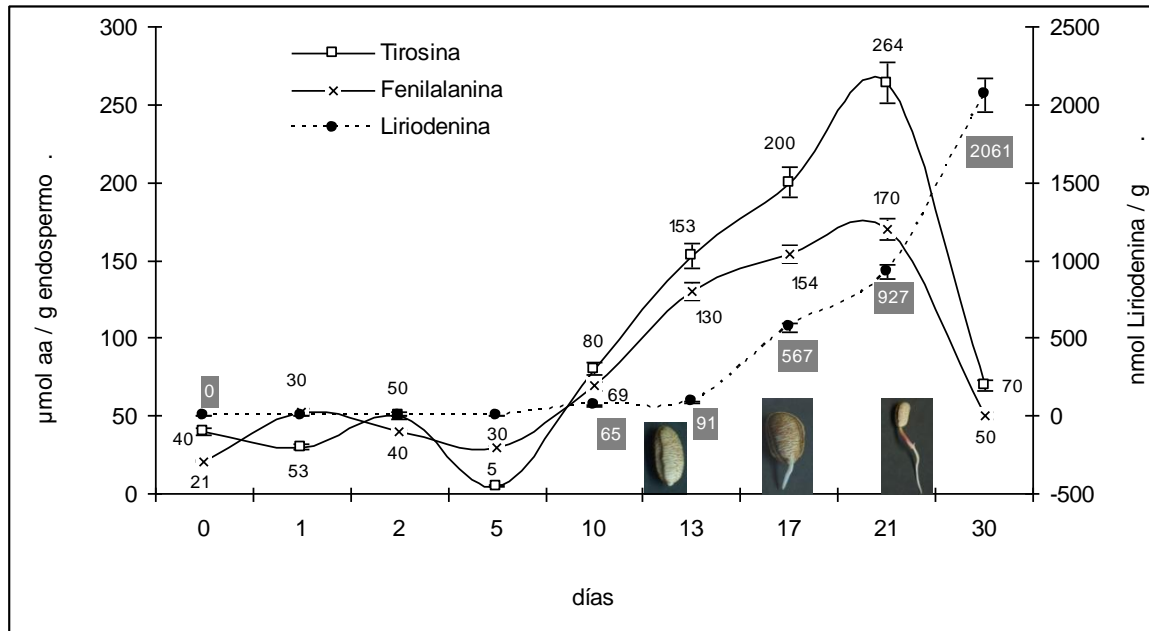


Figura 16. Relación de tirosina-fenilalanina y la liriodenina en la germinación. Se indican la cantidad de aa en los días correspondientes. Los valores expresan el promedio (n=5) y la desviación estándar.

La presencia de estos aminoácidos aromáticos en los endospermos durante el crecimiento del embrión sustenta la producción de alcaloides bencilisoquinolínicos descrita anteriormente (capítulo I). El incremento de ambos aminoácidos también puede determinar las cantidades escalonadas que se detectan por ejemplo de liriodenina durante el desarrollo. Sin embargo, en esta relación, las cantidades máximas en los endospermos entre la tirosina y la fenilalanina y el alcaloide están desplazadas por 4 días, liriodenina se acumula mayormente en el día 17 y ambos aa en el 21. Cabe recordar que en estos días la liriodenina también se detectó en el eje embrionario, en proporción de de 5 a 10 veces más que en el endospermo. Sugiriendo que los aa se transportan para la biosíntesis del alcaloide, o que la liriodenina se transloca al embrión en crecimiento, si es que la biosíntesis ocurriera en el endospermo.

Las correspondencias equimolares entre aa y el alcaloide son muy grandes los primeros se producen en escala micromolar y la liriodenina en nanomoles, la diferencia es en una proporción de 200 a 10,000 veces más. Para la biosíntesis de cualquier alcaloide bencilisoquinolínico se necesitan 2 moléculas de tirosina o fenilalanina, por lo que podemos estimar el porcentaje de estos aminoácidos en el

endospermo, asignado solo para la biosíntesis de liriodenina mediante las siguientes consideraciones.

$$\% \text{ de asignación de aa} = [(2 \times L \text{ en } \mu\text{mol}) / (\text{T ó F en } \mu\text{mol en la etapa anterior})] \times 100$$

L= liriodenina, T = tirosina, F = fenilalanina

Por ejemplo para la etapa de 5 cm de radícula (21 días), la cantidad total de liriodenina es de 927 nmol/g ms (cuadro 12, pág. 89, capítulo 6.1.4), lo que significa que se necesitaron para su biosíntesis el doble equimolarmente de algunos de los dos aminoácidos. Si consideramos que la cantidad de tirosina y fenilalanina en la etapa anterior es aproximadamente de 200 y 154 $\mu\text{mol/g}$ masa seca (Fig. 16), podemos estimar que se necesita 0.93 % de tirosina ($[2 \times 927 / \{200\ 000\}] \times 100$) o 1.2 % de fenilalanina. Si se considera que la sumatoria de liriodenina en todos los tejidos hasta la etapa de primordio foliar (2061 nmol/g ms) está supeditada únicamente de la tirosina del endospermo, se han destinado finalmente 1.6 % de éste aa (Figura 17).

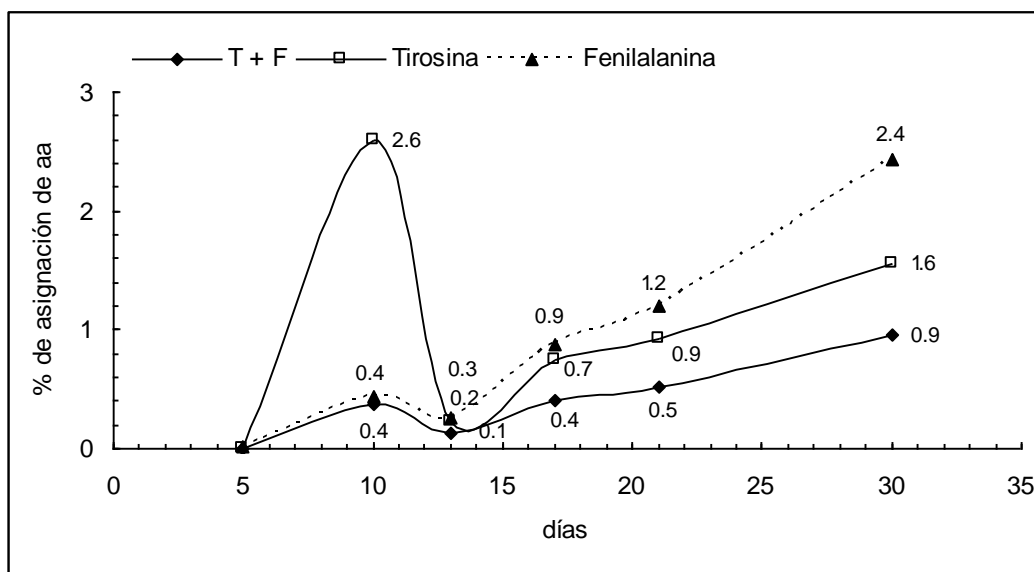


Figura 17. Cantidad asignada de aminoácidos para la biosíntesis de la liriodenina.

De acuerdo a Bewley & Black (1994) durante la germinación y desarrollo de la plántula se depende exclusivamente de las reservas almacenadas en los cotiledones o en los endospermos, por lo que es evidente que *A. diversifolia* durante la

germinación tiene en las proteínas de reserva los precursores necesarios para la biosíntesis de alcaloides.

La revisión de trabajos relatada en los antecedentes (págs. 33-50) permite ubicar que otras especies también asignan aminoácidos tempranamente para la biosíntesis de alcaloides. Por ejemplo, entre los alcaloides derivados del aminoácido triptófano encontramos a: gramina en *Hordeum vulgare*, ajmalicina y vindolina en germinados de 2 a 5 días de *Catharantus roseus*, camptotecina en plántulas de dos días de *Campotheca acuminata* y brachicerina de *Psychotria brachyceras* (Digenis *et al*, 1966; Vázquez Flota *et al*, 2000; Gregianini *et al*, 2004; Valleta *et al*, 2007); en los alcaloides derivados del aminoácido ornitina, están nicotina en *Nicotiana attenuata* (Hummel & cols, 2007); del aminoácido lisina, los alcaloides quinolizidínicos encontrados en las plántulas de *Lupinus luteus* (Wink & Witte, 1985); de modo similar alcaloides derivados de los aminoácidos tirosina y fenilalanina se encuentran los bencilisoquinolínicos (papaverina y morfina) en germinados de 2 a 3 días de *Papaver somniferum* (Samanani *et al*, 2006). De hecho los aminoácidos también originan otros MS, por ejemplo *Zea mays* destina aa para biosintetizar ácidos fenólicos (DIBOA y DIMBOA), MS derivados de fenilalanina o tirosina, durante la germinación temprana, e inclusive se incrementan si se inicia una depredación del tallo de la plántula (Niemeyer *et al*, 1989b). *Arabidopsis thaliana*, *Glycine max* y varias especies de *Lupinus* producen antocianinas a los tres, siete y veinte días de germinación respectivamente (Wink, 1983; Graham, 1991; Kubasek *et al*, 1992).

De estos trabajos se deduce que existe una relación natural entre la movilización de proteínas de reserva y la asignación de ciertas cantidades de aminoácidos para el metabolismo secundario en etapas tempranas de desarrollo.

6.2.2. Distribución de la actividad enzimática

La detección de liriodenina en el endospermo (a los 5 días de imbibición) y no en el embrión, sugiere o que existen las enzimas correspondientes en el endospermo para la biosíntesis del alcaloide o que hay una participación activa del embrión al biosintetizar el alcaloide y enviarlo al tejido de reserva. En cualquier caso, en la revisión bibliográfica hasta ahora no se encontraron datos sobre estudios particulares del metabolismo secundario en otras especies que señalaran alguna dirección. Por ello, se evaluó la presencia de la actividad de enzimas relacionadas con la biosíntesis de ABI solo en etapas que marcaban diferencias cruciales (5 días de imbibición, 1 cm de radícula (13 días después de la imbibición, 3 días de germinación), primordio foliar y plántula de 2 hojas según los resultados discutidos en el capítulo I.

Cavé *et al*, 1987 mencionan de manera particular para los ABI de Annonaceae y de manera general Zenk *et al*, 1985, Kutchan 1995, y Facchini, 2001 que todos los ABI provienen de los aminoácidos tirosina y fenilalanina, sin embargo no existe ningún reporte para esta familia sobre la semejanza de una maquinaria biosintética similar a otras especies (Papaveraceae, Berberidaceae, Menispermaceae) en donde los aspectos biosintéticos han sido muy documentados. La evaluación en *A. diversifolia* de 4 pasos (Fig. 4 pág. 15) de la ruta de biosíntesis común a todos los ABI (Zenk *et al*, 1985; Ziegler & Faccini, 2008; BRENDA, 2011; KEGG GENOME, 2011), permitió ubicar los probables sitios de biosíntesis y discriminar entre el embrión y el endospermo y entre las partes de la plántula en desarrollo, estableciendo algunos aspectos dinámicos sobre la biosíntesis de ABI en estas etapas cruciales de la vida de las plantas

Resultados

Se detectaron la actividades enzimáticas en todas las etapas estudiadas del desarrollo temprano de *A. diversifolia*, observándose diferencias espacio-temporales particulares de cada enzima. Durante la imbibición y la germinación (5 y 13 días respectivamente) los embriones tuvieron actividad enzimática, no así los endospermos en los que no se observó actividad alguna. En plántulas con primordio

foliar y con 2 hojas (25 y 30 días de desarrollo respectivamente) se encontraron actividades de TYDC, MFO y TyrAO en todos los órganos (raíz, tallo, primordio foliar y hoja), mientras que la de NCS solo se expresó en tallos y raíces (Figura 18).

La actividad enzimática fue proporcional al desarrollo ($P \leq 0.000$), entre la etapa inicial (5 días de imbibición) y la final (plántulas con 2 hojas) transcurren 25 días en promedio y considerando los valores más altos en la etapa final, las diferencias aumentaron 67, 344, 120 y 575 veces más para MFO, TYDC, TyrAO y NCS respectivamente. En general las actividades de MFO y TyrAO fueron las de mayor magnitud y la de NCS la menor, la expresión de estas actividades durante el desarrollo es propia de cada enzima. Sumando las actividades de los tres órganos en las plántulas, se encontró que la actividad de TYDC y MFO alcanzaron valores máximos (14.4 pkat/mg y 31.5 nkat/mg proteína respectivamente) en plántulas de primordio foliar ($P \leq 0.05$) (Fig. 18 A y B), y las de TyrAO y NCS (5.11 nkat/mg y 3.12 pkat/mg proteína) hasta la etapa de plántulas con dos hojas ($P \leq 0.05$) (Fig. 18 C y D).

En las etapas de plántulas también se encontraron relaciones asociadas a los órganos estudiados, las raíces de las plántulas con dos hojas mostraron las actividades más altas de MFO, TyrAO y NCS (17.2, 2.4 nkat/mg y 2.31 pkat/mg; $P \leq 0.05$) mientras que la actividad de TYDC solo fue superada por los tallos ($P \leq 0.05$). En las hojas resaltan las actividades de MFO y TyrAO ya que en alguna etapa son equiparables a las encontradas en raíces, para MFO en la de primordio foliar (13.7 nkat/mg; $P \geq 0.05$) y para TyrAO en la de 2 hojas (2.2 nkat/mg; $P \geq 0.05$). Estos órganos mostraron la menor actividad de TYDC (hasta 13 veces menos; $P \leq 0.05$) y en ningún caso se detectó actividad de NCS. En los tallos la actividad de TYDC es la más alta en ambas etapas de plántula (8 y 6.7 pkat/mg; $P \leq 0.05$), y resulta hasta 3 veces más que la detectada en las raíces y 13 más que las de hojas. En este órgano también se encontraron actividades de MFO, TyrAO y NCS pero en menor proporción (4, 5 y 3 veces menos respectivamente) que la de las raíces ($P \leq 0.05$).

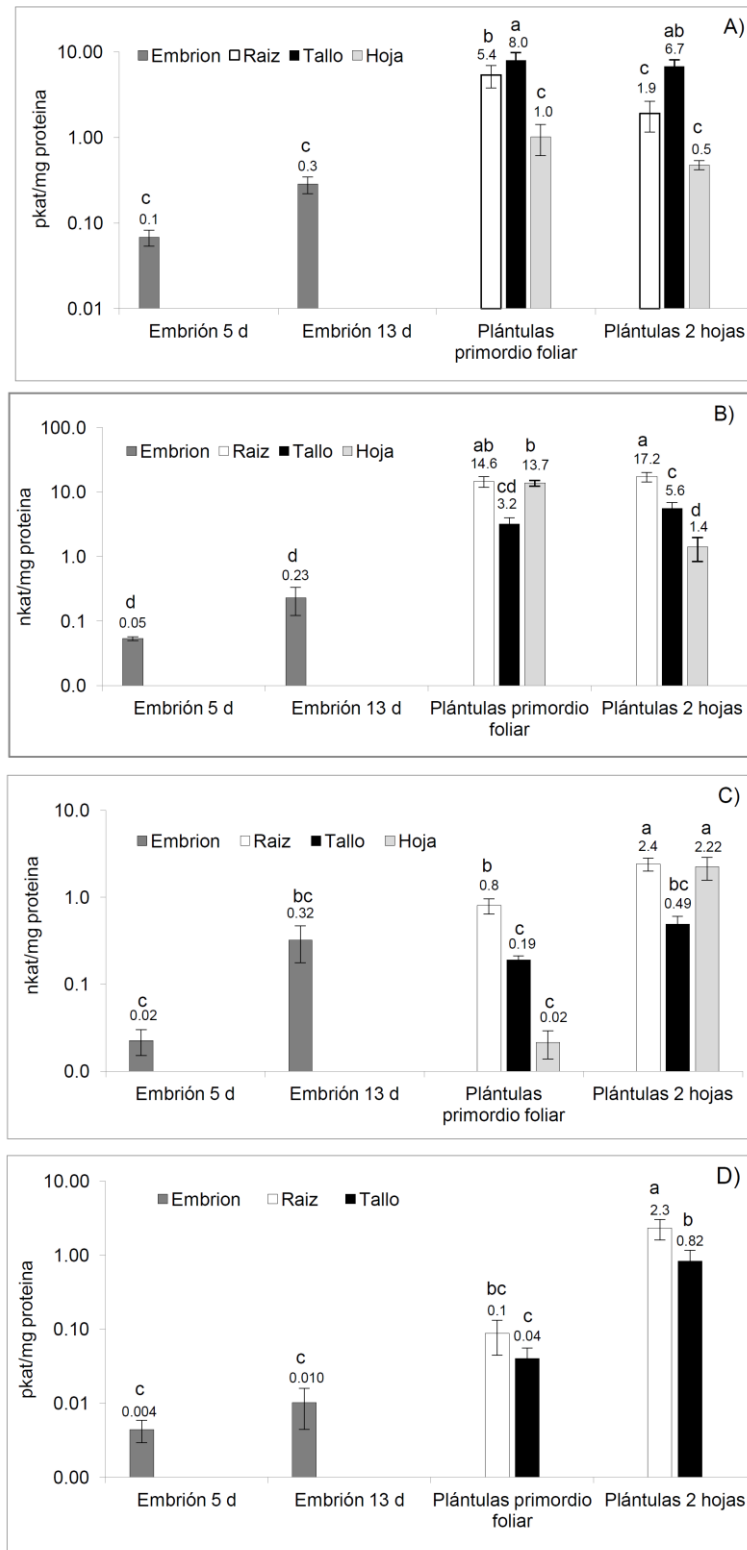


Figura 18. Actividad de enzimas involucradas en la biosíntesis de ABI en el desarrollo temprano de *A. diversifolia*. A) TYDC; B) MFO; C) TyrAO; D) NCS. Los valores representan la media y la d.e. de 5 repeticiones. La separación de medias se realizó mediante la prueba de Tukey al 95% de confianza.

Discusión

La ausencia de actividad enzimática en el endospermo y la presencia de las actividades enzimáticas de TYDC, MFO, TyrAO y NCS en el embrión, es una evidencia de que la biosíntesis de alcaloides bencilisoquinolínicos en etapas tempranas de *A. diversifolia* está controlada únicamente por el embrión y, por lo tanto, los alcaloides detectados anteriormente en el endospermo (1 a 100 nmol/g tejido) (Cuadro 12-15) de esta especie, de alguna manera son transportados desde el embrión en desarrollo. Se han reportado algunas proteínas transportadoras para metabolitos secundarios que pudieran realizar esta función, por ejemplo los transportadores MATE (transportadores de expulsión de multidroga y compuestos tóxicos) y las proteínas ABC (ATP-binding cassette) (Yazaki, 2008; Morita *et al*, 2009). Para alcaloides tipo bencilisoquinolínicos se ha documentado el transporte de berberina intra e intercelularmente en *Coptis japonica* mediante una proteína transportadora tipo antiporte y otra del tipo ABC de resistencia a múltiples fármacos (Sakaei *et al*, 2002; Shitan *et al*, 2003; Otani *et al*, 2005).

La biosíntesis temprana de alcaloides se justificaría por el papel de defensa que parece desempeñar el alcaloide antimicrobiano liriodenina sobre al menos 30 fitopatógenos y que pudiera proteger al embrión en desarrollo y a las reservas energéticas en el endospermo (Hufford *et al*, 1980; Wu *et al* 2011; Cuadro 18).

La distribución específica de NCS en raíces y tallos en la etapa de plántula señalarían a estos tejidos como sitios de biosíntesis, así mismo la mayor actividad de NCS y la mayor acumulación de alcaloides en raíces (~ 0.1% en peso seco) (cuadro 12-15), indican a estas como el principal órgano productor de ABI en *A. diversifolia*.

La presencia y la alta actividad en algunos momentos de MFO, TYDC y TyrAO en tallos y hojas, sugieren que los precursores inmediatos de los alcaloides pueden ser producidos indistintamente en cualquier tejido, pero que también pueden ser transportados al tallo o a la raíz para su conversión final. La alta actividad de MFO y TyrAO puede deberse a que estas enzimas están involucradas en varias rutas bioquímicas; en el caso de la MFO, además de participar en tres reacciones de la biosíntesis de alcaloides bencilisoquinolínicos, está implicada en la producción de otros MS (betalainas, betacianinas), en la biosíntesis de riboflavina y en el

metabolismo de la tirosina y de otros fenoles sencillos (KEGG, 2011b; KEGG, 2011c), por lo que es evidente pensar que esta enzima debe ser clave en la desviación de la tirosina al metabolismo secundario. En tanto que TyrAO pertenece a la familia multifuncional de las transaminasas responsables de desaminar a los aminoácidos y desviar el esqueleto carbonado a ciclos primarios, o como en este caso, a la biosíntesis de alcaloides, produce también radicales libres que son utilizados tanto como moléculas de defensa o de señalización contra patógenos (Cona *et al*, 2006). Aunque la actividad de TYDC es menor que las dos enzimas anteriores, se conoce que participa también en la biosíntesis de alcaloides p-hidroxifenilalquilaminas y de amidas derivadas del ácido hidroxinámico, por lo que ha sido propuesta como un punto de control ubicado en la interfase del metabolismo primario y secundario de la tirosina (Hosoi *et al*, 1970, Kawalleck *et al*, 1993; Faccini & De Luca, 1995). Mientras que NCS, la enzima con menor presencia, solo ha sido asociada, hasta ahora, al primer paso obligatorio en la biosíntesis de alcaloides bencilisoquinolínicos y de acuerdo a algunas características de su cinética enzimática ha llegado a considerársele como enzima clave en esta ruta (Samanani & Facchini, 2002).

La presencia de dos de estas enzimas (TYDC y NCS) ha sido documentada en diversas especies (Papaveraceae, Berberidaceae, Fumariaceae, Ranunculaceae y Menispermaceae) que se caracterizan por producir ABI (Ziegler & Facchini 2008). Las actividades de NCS en las raíces y tallos de ejemplares adultos de *Papaver somniferum* (1.67 y 0.32 pkat/mg proteína) y de *Thalictrum flavum* (0.24 y 0.17 pkat/mg proteína) son al parecer menores que las de las raíces y tallos de plántulas de *A. diversifolia* (2.3 y 0.8 pkat/mg proteína), pero a diferencia de esta última especie, las hojas de *P. somniferum* y *T. flavum* tienen presencia de NCS (0.02 y 0.13 pkat/mg proteína respectivamente) incluso en las yemas florales (0.02 y 0.05 pkat/mg proteína respectivamente) (Samanani & Facchini, 2001; Samanani & Facchini, 2002). La actividad de TYDC está presente en todos los tejidos de *P. somniferum* pero en proporciones de 100 a 1000 veces menor (35 para raíces y 5 fkat/mg proteína para pétalos) (Facchini & de Luca, 1994).

La expresión temprana de estas enzimas parece ser una constante, en *P. somniferum* la actividad de NCS se detecta a los 4 días de iniciada la imbibición, pero 80 veces más (0.32 pkat/mg proteína) que en *A. diversifolia* (0.004 pkat/mg proteína). La actividad TYDC fue reportada en plántulas de *Hordeum vulgare*, con 2 días de germinación, capaces de biosintetizar hidroxifenilalquilaminas (derivados también de la tirosina), aunque la actividad es más grande (8.3 nkat/mg proteína) que en *A. diversifolia* (0.30 nkat/mg proteína).

Las cuatro enzimas mencionadas parecen tener una importancia directa en la respuesta de defensa de las plantas, la actividad de NCS se incrementa en cultivos celulares de *P. somniferum* que son inoculados el hongo *Botrytis sp.*; aunque esta respuesta no parece depender de la diferenciación de tejidos, ya que en cultivos celulares en suspensión de *Eschscholzia californica*, *Thalictrum flavum* y *P. somniferum* se demostró que la actividad de NCS es la misma que en los tejidos diferenciados (1.02, 1.53 y 0.32 pkat/mg proteína respectivamente) (Samanani & Facchini, 2001). TYDC también se sobreexpresa en respuesta a la inoculación con hongos fitopatógenos en cultivos de células en suspensión de *Thalictrum rugosum* y *Eschscholtzia californica* (Marques & Brodelius, 1988; Facchini *et al*, 1996). MFO y TyrAO son también componentes inducibles del mecanismo de respuestas de las plantas contra herbívoros y fitopatógenos (Constabel *et al*, 1996; Cona *et al*, 2006; Bhonwong *et al*, 2009). Así que el estudio de estas enzimas puede llevar a conducir a un mejor entendimiento de la fisiología de la defensa de las plantas.

Finalmente las actividades enzimáticas señalan una distribución restringida para NCS en tallos y raíces, mientras que MFO, TyrAO y TYDC aunque están presentes en todos los órganos de las plántulas en desarrollo exhiben abundancias distintas, ello conduce a una localización órgano-específica de las enzimas para la biosíntesis de los ABI, confirmando que las rutas de biosíntesis del metabolismo secundario son expresadas específicamente por uno u otro tejido desde etapas tempranas de desarrollo, incluso en ausencia de actividad fotosintética.

La versión preliminar de este capítulo fue presentado en el IV Congreso Internacional de Anonáceas, con el título: Evaluación enzimática de la biosíntesis de alcaloides bencilisoquinolínicos en etapas tempranas de *A. diversifolia*. De la Cruz-Chacón I. & AR González-Esquinca. 2010. La versión en inglés fue sometido a la Revista Russian Journal of Plant Physiology (Ed. Springer) para su posible publicación con el título Enzymatic activities of benzylisoquinoline alkaloid biosynthesis in *Annona diversifolia* Safford during early development.

6.3 Liriodenina y su posible papel como defensa antimicrobiana.

Se ha observado que las semillas de *A. diversifolia* que no germinan son atacados por hongos, estos fitopatógenos logran degradar parcialmente el endospermo y dañar el embrión, sin embargo cuando la germinación ocurre la población fúngica disminuye gradualmente, este hecho coincide con la aparición y el aumento de alcaloides, principalmente de liriodenina, por lo que es muy probable que su presencia este implicada en la inhibición de estos patógenos.

La revisión bibliográfica señala que los alcaloides identificados en este trabajo presentan algunas actividades biológicas, siendo comunes a los tres las propiedades antiprotozoarias y citotóxicas (Cuadro 16) (Chen *et al*, 1997; Waechter *et al*, 1999; Chang *et al*, 2004; Wirasathien *et al*, 2006). Mientras que lisicamina y liriodenina presentan además propiedades antimicrobianas (Cuadro 17). Inclusive son activos contra diversos fitopatógenos, liriodenina sobresale por el espectro amplio y la potencia de su actividad (Cuadro 18) (Hufford *et al*, 1975, Villar *et al*, 1987; Nissanka *et al*, 2001; Rahman *et al*, 2005). Estas actividades fortalecen la hipótesis de la posible importancia de liriodenina y de los otros alcaloides en el desarrollo temprano de *A. diversifolia*.

En busca de su posible papel de defensa, se evaluó la actividad de liriodenina y la de los extractos de algunos tejidos en fases consideradas como cruciales en la acumulación temprana de alcaloides frente a hongos aislados de semillas infestadas durante la imbibición. Las fases elegidas fueron las de, semillas sin imbibición, semillas con 1 día en imbibición, radículas de las etapas de 1 y 5 cm de radícula y raíces de plántulas con 6 hojas.

Cuadro 16. Actividad biológica de alcaloides identificados

Actividad Citotóxica *	
Liriodenina	DE ₅₀ µg/mL: CA-9KB (1.6), CA-A549 (0.72), CA-HCT-15 (2.2), CA-HCT-8 (0.7), CA-SK-OV-3 (2.0), Vero (48), -XF-498 (1.8), Hep ₂ : ATCC-CCL 23(44.3), Leuk-1210 (2.3), Leuk-P388 (0.57), KB (0.0036), MCF-7 (2.75), NCI-H460 (3.2), OVCAR-03 (372.2), P388, SF-268 (3.2), SK-MEL-2 (1.5), XF-498 (1), UACC-62 (1.8), Hep G2 (63) y SK-Hep-1
Lisicamina	CI ₁₀₀ :µM: MCF-7 (289.4), NCI-H460 (49.5), HT-29 (228.9), K562 (380.6), NCI-ADR/RES (528.6); Hep G(2) (CI ₅₀ 103,6 µM)
Atherospermidina	Hep G(2). KB cells (CI ₅₀ : 8.2 µM)
Actividad vs protistas **	
Liriodenina	<i>Leishmania amazonensis</i> (363.3 y 18 µM), <i>L. braziliensis</i> (363.3 y 18.2, 11.3 µM), <i>L. donovani</i> (26.2 y 11.3 µM), <i>L. major</i> (15 y 10.2 µM), <i>Plasmodium falciparum</i> (22.7 µM), <i>P. falciparum</i> cepas F32 y W32 (50 y 56 µg/mL), <i>Trypanosoma brucei</i> (22.7 µM), <i>T.cruzi</i> (22.7 µM)
Lisicamina	<i>L. donovani</i> (25 µg/mL), <i>L. major</i> (25 µg/mL)
Atherospermidina	<i>Plasmodium falciparum</i> cepas F32 y W2 (47 y 39 µg/mL)

* Warthen *et al*, 1969, Wu *et al*, 1989; Mondranonda *et al*, 1990; Wu *et al*, 1993; Montanha *et al*, 1995, Boustie *et al*, 1998; Waechter *et al*, 1999, Février *et al*, 1999; Kimand & Ryu, 1999; Liu *et al*, 2008; Hsieh *et al*, 2005; Yang *et al*, 2009; Costa *et al*, 2011.

** Queiroz *et al*, 1996; Février *et al*, 1999; Waechter *et al*, 1999; del Rayo-Camacho *et al*, 2000; Wirasathien 2006, Osorio *et al*, 2006.

Cuadro 17. Actividad antimicrobiana de alcaloides identificados

Microorganismos (sensibilidad a los alcaloides)

Liriodenina

Bacillus cereus (10 µg/d), *B. coagulans* (10 µg/d), *B. megaterium* (10 y 200 µg/d), *B. subtilis* (1; 6; 10 y 200 µg/d), *Candida albicans* (8,6.2, 5, 10 µg/d); *Citrobacter freundii* (10 µg/d), *Cladosporium cladosporoides* (100 µg), *C. sphaerospermum* (100 µg), *Cryptococcus neoformans* (12.5 µg), *Enterobacter aerogenes* (100 µg/d), *Escherichia coli* (10 y 200 µg/d), *Klebsiella pneumoniae* (10 µg/d), *Micrococcus luteus* (10 µg/d), *M. roseus* (10 µg/d), *Microsporium gypseum* (100, 3.12 µg/mL), *Mycobacterium tuberculosis* (12.5 y 3.1 µg/mL), *Neisseria gonorrhoea* (10 µg/d), *Proteus mirabilis* (10 µg/d), *P. vulgaris* (10 µg/d), *Pseudomonas aeruginosa* (10 y 200 µg/d), *Rhodococcus equi* (10 µg), *Sacharomyces cerevisiae* (6.2 µg), *Salmonella typhi* (10 y 200 µg/d), *Salmonella typhimurium* (10 µg/d), *Sarcina lutea* (200 µg/d), *Serratia marcescens* (10 µg/d), *Shigella boydii* (200 µg/d), *S. dysenteriae* (200 µg/d), *S. flexneri* (200 µg/d), *S. shiga* (200 µg/d), *S. sonnei* (200 µg/d), *Staphylococcus aureus* (25; 2; 3.1; 10 y 200 µg/disco), *S. aureus metilicina resistente* (3.1 µg/mL), *S. epidermidis* (3.1 µg/mL), *S. albus* (10 µg/d), *Streptococcus b haemolyticus* (200 µg/d), *S. faecalis* (10 µg/d), *S. mutans* (10 µg/d), *S. pneumonia* (10 µg/d), *Syncephalastrum racemosum* (3.1), *Tichophyton rubrum* (1 µg/mL), *T. mentagrophytes* (2; 3.12; 0.78; 12.5; 12.5 µg/mL). (1), (2), (3), (4), (5), (6), (7); (9), (10), (11), (12) (13).

Lisicamina

Bacillus cereus (10 µg/d), *B. coagulans* (10 µg/d), *B. megaterium* (10 µg/d), (10 µg/d), *B. subtilis* (10 µg/d), *Candida albicans* (100 µg/mL), *C. dubliniensis* (100 µg/mL), *Citrobacter freundii* (10 µg/d), *Enterobacter aerogenes* (10 µg/d), *Escherichia coli* (10 µg/d), *Klebsiella pneumoniae* (10 µg/d), *Micrococcus luteus* (10 µg/d), *M. roseus* (10 µg/d), *Mycobacterium phlei* (64 mg/L), *Neisseria gonorrhoea* (10 µg/d), *Proteus mirabilis* (10 µg/d), *P. vulgaris* (10 µg/d), *Pseudomonas aeruginosa* (10 µg/d) *Salmonella typhi* (10 µg/d), *S. typhimurium* (10 µg/d), *Serratia marcescens* (10 µg/d), *Staphylococcus albus* (10 µg/d), *S. aureus* (64 mg/L), *S. epidermidis* (100 µg/mL), *S. epidermidis* ATCC 12228 (50 µg/mL), *Streptococcus faecalis* (10 µg/d), *S. pneumoniae* (10 µg/d), *S. mutans* (10 µg/d), *T. mentagrophytes* (12.5 µg /mL) (1), (3), (8), (14).

Hufford *et al*, 1975 (1); Hufford *et al*, 1980 (2); Villar *et al*, 1987 (3); Clark *et al*, 1990 (4); Simeon *et al*, 1990 (5); Zhang *et al*, 2002 (6); Khan *et al*, 2002(7); Conserva *et al*, 2005(8); Rahman *et al*, 2005 (9); Wirasathien *et al*, 2006 (10); Camacho *et al*, 2009 (11); Monteiro *et al*, 2007(12); Costa *et al*, 2009(13); Costa *et al*, 2010(14)

Cuadro 18. Actividad de alcaloides identificados sobre fitopatógenos

Fitopatógeno (Sensibilidad)	Método de evaluación	Referencias
Liriodenina		
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> (b) (10), <i>Aspergillus flavus</i> (400, HI: 17 mm), <i>A. niger</i> (400, HI: 15 mm), <i>A. versicolor</i> (400, HI: 28 mm), <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (b) (10), <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (b) (10), <i>Xanthomonas campestris</i> (10)	Difusión en agar (µg/disco)	Khan <i>et al</i> 2002. Rahman <i>et al</i> 2005
<i>Aspergillus fumigatus</i> (25), <i>A. niger</i> (1000), <i>A. niger</i> ATCC 16888 (3.1), <i>Cryptococcus neoformans</i> (12.5); <i>Fomitopsis pinicola</i> (2); <i>Gloeophyllum trabeum</i> (2); <i>Laetiporus sulphureus</i> (2); <i>Lenzites betulina</i> (0.8); <i>Trametes versicolor</i> (3.5), <i>Syncephalastrum racemosum</i> (3.1)	Concentración Mínima Inhibitoria (µg/mL)	Hufford <i>et al</i> 1980; Hui <i>et al</i> 1989; Hufford <i>et al</i> 1980; Zhang <i>et al</i> 2002; Khan <i>et al</i> 2002; Wu, 2006; Wu, 2011
<i>Botrytis fabae</i> (38 y 300 µg/mL B y A); <i>Erysiphe polygoni</i> (300 µg/mL, B); <i>Helminthosporium teres</i> (38 y 300 µg/mL B y A); <i>Phytophthora infestans</i> (300 µg/mL, A), <i>Plasmopora viticola</i> (38 y 300 µg/mL, B y A), <i>Puccinia graminis</i> (300 µg/mL, B); <i>Pyricularia oryzae</i> (38 y 300 µg/mL, B y A)	<i>In vivo</i> A = Control total B = Control al 80%	Hufford <i>et al</i> 1980
<i>Cladosporium cladosporioides</i> (100 µg), <i>C. sphaerospermum</i> (100 µg)	Autobiografía	Hui <i>et al.</i> 1989; Monteiro <i>et al</i> 2007
Lisicamina		
<i>Xanthomonas campestris</i> (10 µg/disco), <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (10 µg/disco) <i>Rhizopus oryzae</i> (200 µg/disco), <i>Rhizopus oligosporus</i> 200 µg/disco), <i>Trichoderma spp.</i> (200 µg/disco)	Difusión en agar	Conserva <i>et al</i> 2005

El alcaloide liriodenina inhibió el crecimiento de los dos hongos en todos los ensayos probados (Cuadro 19), su actividad fue más significativa sobre *Aspergillus glaucus* (CIM 100 µM) que sobre *Rhizopus stolonifer* (CIM 200 µM). *A. glaucus* es susceptible a liriodenina desde los 50 µg/disco en el ensayo de difusión (P=0.0001) y a 1 µM en el ensayo del metabolismo de glucosa (P = 0.003), mientras que *R. stolonifer* fue sensible a 100 µg/disco (P=0.0000) y a 10 µM (P = 0.0002) respectivamente. Además en las concentraciones en las cuales no hay un efecto inhibitorio visible, ninguno de los microorganismos logró esporular. Los resultados en el ensayo del metabolismo de glucosa, sugieren que el efecto del alcaloide no es inmediato, por lo menos antes de las 48 horas, ya que en todas las concentraciones, los dos hongos consumen un porcentaje similar de glucosa. Este ensayo permitió analizar el efecto del alcaloide a concentraciones más pequeñas.

Cuadro 19. Actividad antifúngica de liriodenina con diferentes ensayos

	Ensayo de difusión (HI en mm)					% de Inhibición del metabolismo de glucosa			Concentración Mínima Inhibitoria	
	Concentración evaluada (µg/disco)					Concentración probada µM (µg/mL)				
	0	50	100	200	400	100 (27.5)	10 (2.75)	1 (0.27)	µM	µg/mL
<i>A. glaucus</i>	0	7 ± 0.8	11 ± 1.5	16 ± 2.1	26 ± 4.5	80 ± 6.0	67 ± 3.6	55 ± 5.0	100	27.50
<i>R. stolonifer</i>	--	--	7 ± 0.6	10 ± 1.5	12 ± 0.7	55 ± 6.8	35 ± 4.7	10 ± 5.1	200	55.10

Los valores representan la media y la desviación estándar de 5 repeticiones. Las letras diferentes señalan diferencias estadísticas significativas entre los valores de las filas (P = 0.05; prueba de LSD).

Los extractos alcaloidales de radículas y raíces inhibieron el crecimiento de ambos hongos (P=0.0000), el efecto fue ligero en el extracto de radículas de 1 cm, mientras que en los de las radículas de 5 cm y en los de las raíces de plántulas, las actividades se incrementaron significativamente hasta 3 y 9 veces más (P = 0.000; P = 0.000) (Cuadro 20). La intensidad inhibitoria de estos extractos fue cercana a la que presentó liriodenina entre las concentraciones de 2.75 y 27.5 µg/mL (cuadro 19), esta actividad puede explicarse en función del contenido de liriodenina en los extractos (Cuadro 21), mientras que el de las radículas de 5 cm contiene cantidades

en este intervalo (19.2 µg/mL), el de raíces de plántulas con 6 hojas (69 µg/mL) lo supera hasta 2.5 veces más ($P = 0.000$), lo que explica entonces también su mayor actividad (Cuadro 21).

Los perfiles de los extractos alcaloidales fueron pobres, estuvieron constituidos entre 3 a 5 compuestos, incluyendo a la liriodenina como molécula mayoritaria, y en el caso de raíces de plántulas de 6 hojas también la presencia de atherospermidina y lisicamina. La presencia de otros compuestos de naturaleza no alcaloidal, al parecer no tuvieron significancia en las concentraciones ensayadas, ya que cuando son parte mayoritaria del extracto (semillas con 1 cm de radícula), éste no mostró actividad inhibitoria suficiente, al aumentar la presencia de liriodenina, se incrementó la actividad del extracto (Cuadro 20 y 21). Los bioensayos prueban esta conclusión. El cuadro 19 muestra que en todas las concentraciones probadas, liriodenina fue menos activa sobre *R. stolonifer* que sobre *A. glaucus*. Sin embargo, los extractos de radículas de 5 cm y de raíces de plántulas (Cuadro 20) exhibieron el mismo nivel de actividad contra ambas especies, lo que sugiere la presencia de uno o más compuestos bioactivos en estos extractos además de la liriodenina, los cuales pudieran tal vez estar actuando de manera sinérgica.

Cuadro 20. Actividad antifúngica de extractos alcaloidales.

Extractos ensayados (100 µg/mL)	% Inh. Met. Glucosa	
	<i>A. glaucus</i>	<i>R. stolonifer</i>
Semillas sin imbibición	0.0 ^c ± 0.0	0.0 ^b ± 0.0
Semillas con 1 imbibición	0.0 ^c ± 0.0	0.0 ^b ± 0.0
Radículas 1 cm	29.7 ^b ± 1.9	9.2 ^b ± 3.1
Radículas 5 cm	81.8 ^a ± 12.3	79.9 ^a ± 10.1
Raíces de plántulas	89.2 ^a ± 5.7	84.3 ^a ± 9.9

Los valores representan la media y la desviación estándar de 5 repeticiones. Las letras diferentes señalan diferencias estadísticas significativas entre los valores de las filas ($P = 0.05$; prueba de LSD).

La actividad de los extractos, la de liriodenina pura y la proporción de ésta en los extractos señalan la importancia del alcaloide como sustancia responsable de la actividad que muestran los extractos. Existe al menos un segundo alcaloide, en

menor concentración que liriodenina, en los extractos de las raíces de las plántulas que pudiera contribuir a la actividad antifúngica.

Cuadro 21. Presencia de liriodenina en los extractos alcaloidales

Fases de desarrollo	Días de desarrollo	% de extracto	% Liriodenina en el extracto	µg/ Liriodenina / g planta	% de otros alcaloides
Semillas sin imbibición	0	0.0	--	--	
Semillas con imbibición	2	0.0	--	--	
Radículas 1 cm	13	0.004 ± 0.00	2.84 ± 0.51	1.13 ^c ± 0.39	
Radículas 5 cm	24	0.34 ± 0.01	19.2 ± 2.28	125.51 ^b ± 22.9	
Raíces de plántulas	50	0.12 ± 0.02	69.06 ± 4.22	849.04 ^a ± 177.58	10.7 ± 1.9

Las letras diferentes señalan diferencias estadísticas significativas entre los valores de las filas ($P = 0.05$; prueba de LSD).

Discusión

La biosíntesis temprana de liriodenina en *A. diversifolia* es un fenómeno similar al de *Glycine max*, cuyas plántulas de 7 días son capaces de biosintetizar isoflavonoides conjugados (daidzeína y genisteína) antes y durante la infección por *Phytophthora sojae*, en cantidad suficiente para inhibir al fitopatógeno (Graham, 1991 y Lozovaya *et al*, 2004). Así mismo varias especies de cereales que biosintetizan ácidos hidroxámicos como respuesta anticipada al ataque de áfidos (*Metopolophium dirhodum*, *Rhopalosiphum maidis*, *Schizaphis graminum* y *Sitobion avenae*). Las semillas en germinación de cebada, centeno y trigo comienzan la producción de ácidos hidroxámicos desde los 2 días de imbibición (Niemeyer, 1988).

Las dos especies de hongos aislados en este trabajo, son fitopatógenos para otras especies (International Society for Molecular Plant-Microbe Interactions, 2011), incluyendo algunas de la familia Annonaceae. *Rhizopus stolonifer* es el agente causal de la pudrición blanca de semillas y frutos (Amusa *et al*, 2003; Velázquez-del Valle *et al*, 2008), en *Annona muricata* causa la podredumbre parda de los frutos y se considera un problema serio de la postcosecha (Pinto *et al*, 2005). *Aspergillus glaucus* se alimenta de las reservas energéticas de semillas de varios cereales

(Christensen *et al*, 1990; Lillehoj, 1992), por lo que su inhibición traería consecuencias benéficas para la planta en desarrollo.

La potencia del alcaloide liriodenina contra los dos hongos, es menor que contra otros hongos fitopatógenos (cuadro 18), aunque con las concentraciones utilizadas en este estudio (valores de CMI de 27.5 y 55.1 µg/mL) el compuesto podría inhibir a la mayoría de estos microorganismos. Teniendo como probable blanco molecular a la girasa bacteriana, enzima análoga a la topoisomerasa II involucrada en la replicación y transcripción del ADN, que como lo demostraron Woo *et al* (1997 y 1999), es susceptible a liriodenina.

La cantidad de liriodenina en las radículas de 5 cm y de las raíces de plántulas se encuentra aproximadamente de dos a 14 veces más alta (125.5 y 849.04 µg/g tejido respectivamente) que la requerida para la CIM *in vitro* frente a *A. glaucus*, de 4 a 28 veces para *R. stolonifer* y de 90 a 300 veces más para los otros fitopatógenos. Además, de acuerdo con la dinámica de alcaloides en el desarrollo temprano de *A. diversifolia* (cuadros 12-15, capítulo I), liriodenina está presente durante la germinación en los endospermos entre 0.6 y 36.6 µg/g tejido y en los hipocótilos y tallos de las plántulas desde 7.1 hasta 181.9 µg/g tejido, por lo que prácticamente todo el embrión en desarrollo tendría concentraciones que igualan las cantidades requeridas *in vitro* para lograr una inhibición parcial o total de los hongos. Estas observaciones manifiestan una asignación de recursos energéticos de la planta para la biosíntesis temprana de liriodenina en vías de un probable mecanismo de defensa.

El hecho de que las semillas sin germinar sean susceptibles al ataque de estos hongos, implica que los metabolitos secundarios incluyendo las acetogeninas tóxicas laherradurina, rolliniastatina-2; isorolliniastatina y cherimolina-2, presentes en ellas (de la Cruz 2001; González, 2001; Schlie *et al*, 2009; Luna & González-Esquinca, 2010) no son barreras químicas suficientes para impedir la degradación del material de reserva. Laherradurina y rolliniastatina-2 se encuentran en las semillas en cantidades semejantes a los de liriodenina durante la germinación (1000 y 30 µg/g tejido, respectivamente). Esto sugiere la posibilidad de que *A. glaucus* y *R. stolonifer* sean resistentes a tales concentraciones de estas moléculas, y que es necesario, por lo menos, la presencia de alcaloides para ser inhibidos.

Varias veces se ha discutido si las propiedades de los metabolitos secundarios (MS) determinados en sistemas *in vitro* pueden ser relevantes en condiciones de campo. Wink (1998) propone que para que un MS sirva como compuesto de defensa, debería cumplir los siguientes criterios: 1) El alcaloide o la mezcla de alcaloides debe tener efectos significativos contra los fitopatógenos, 2) El MS debe estar presente en la planta en concentraciones que son del mismo orden o superior a las que se determinó en los bioensayos, 3) El compuesto debe estar presente en la planta en el tiempo y sitio correcto, y 4) La evidencia experimental debe mostrar que un alcaloide o una mezcla de alcaloides fomente el bienestar de la planta.

Liriodenina se encuentra en cantidades que van de 2.06 a 2827 $\mu\text{mol/g}$ de materia seca; si consideramos que el contenido de agua en los tejidos vegetales es de 80-90% estas cantidades se convierten en 0.44 a 565.4 $\mu\text{mol/g}$ de materia fresca, es decir casi tres veces la cantidad para la CMI de *R. stolonifer* y 6 para *A. glaucus*. Si el análisis es por tejido y por el método de difusión, encontramos que las raíces tendrían hasta 100 veces más liriodenina por gramo fresco, los tallos hasta 36 y los endospermos hasta 5. Es decir 155.6, 36.4 y 7.4 $\mu\text{mol/g m.f.}$

El alcaloide además es oportunamente biosintetizado en estas etapas de germinación y de plántula, y colocado en tejidos esenciales para el establecimiento de la plántula, por ejemplo, el endospermo durante la degradación de reservas energéticas (proteínas, lípidos y polisacáridos) ofrece un ambiente húmedo y rico en moléculas útiles (aminoácidos, ácidos grasos y azúcares sencillos), “atractivo” para los microorganismos. La pérdida de este tejido impediría el desarrollo del embrión. Además la liriodenina y los otros alcaloides se diseminan por todo el embrión. Es también notorio que el valor biológico de liriodenina tiene límites ecológicos, por lo menos para *A. diversifolia*, ya que no fue detectado en las hojas de plántulas y de adultos. Finalmente, la liriodenina es una molécula aparentemente constitutiva, que se produce en ejemplares sanos, *a priori* al ataque de herbívoros, fitopatógenos, daños químicos y estrés.

Estas observaciones sugieren una asignación de recursos energéticos de la planta para la biosíntesis temprana de liriodenina y su probable participación en un mecanismo de defensa durante las fases de desarrollo inicial de *A. diversifolia* y

quizás también para las especies que lo producen. Sin embargo es importante conocer algunas cosas más para determinar rotundamente el papel de este alcaloide como contestar las siguientes preguntas: ¿Las cantidades constitutivas de este metabolito secundario pueden ser estimuladas ante la presencia de fitopatógenos?, ¿Dónde se acumula liriodenina en las células?, ¿Este sitio hace que la molécula esté disponible para contrarrestar un ataque por fitopatógenos?, ¿La molécula está naturalmente en las células en su forma química activa?

Parte de este capítulo fue publicado bajo el título: **Liriodenine, early antimicrobial defence in *Annona diversifolia***. De la Cruz-Chacón I., González-Esquinca A.R., Guevara Fefer P., Jiménez García L.F. **2011. Z. Naturforschung. 66c**, 377-384. ISSN: 0939-5075. Editorial: VZN (Verlag der Zeitschrift für Naturforschung).

Consideraciones finales

La biosíntesis y la acumulación de metabolitos secundarios están comúnmente asociadas al desarrollo vegetal, y claramente sustentadas en varios ejemplos (Liu *et al*, 1998; Gregianini, 2004; Boege, 2005; Brenes-Arguedas 2006; Elger *et al* 2009; Parra-Garcés *et al*, 2010; Caropese *et al*, 2011). La relación desarrollo-metabolismo secundario permite que las especies sean capaces de responder de la mejor manera a las necesidades intrínsecas y a los estímulos externos (Bennett & Wallsgrove, 1994; Harborne, 1994). Los resultados de este estudio, así como la presencia temprana de otros metabolitos secundarios en varias especies, tal como se ha documentado en este trabajo, permiten generalizar que esta relación ocurre desde el desarrollo inicial de las plantas.

La biosíntesis de los alcaloides bencilisoquinolínicos en *A. diversifolia* permite plantear algunas de esas particularidades en tiempo y espacio, la diversidad de alcaloides está en relación con el grado de desarrollo y diferenciación de los tejidos, por ejemplo, la liriodenina es el primer alcaloide que se biosintetiza durante la imbibición y se acumula en los endospermos, cuando la germinación inicia y el embrión empieza su crecimiento, el alcaloide se encuentra también en radículas e hipocótilos y cuando la plántula se desarrolla, la liriodenina permanece en raíces y tallos. La atherospermidina y la liscamina se producen en la etapa de emergencia radicular, cuando aparece el hipocótilo en el eje embrionario y después en las radículas y raíces, hipocótilos y tallos, y cotiledones y hojas; los otros dos alcaloides no identificados están únicamente en tallos y raíces de plántulas fotosintéticas, es decir hay un desplazamiento temporal en la acumulación de los alcaloides y una riqueza que guarda relación con eventos cruciales del desarrollo de la planta, señalando una posible regulación ontogénica como resultado de la expresión coordinada de las enzimas, involucradas en su biosíntesis.

Por otro lado, las actividades enzimáticas muestran una distribución restringida para norcoclaurina sintasa en tallos y raíces, mientras que monofenol oxidasa, amino oxidasa y tirosina dopa descarboxilasa, aunque están presentes en toda la plántula en desarrollo, exhiben abundancias distintas en cada órgano, ello

conduce a una localización tejido-específica de las enzimas para la biosíntesis de los ABI, confirmando que las rutas de biosíntesis son expresadas de una forma órgano-específica (Samanani *et al*, 2005; Frölich *et al*, 2007; Matsuda *et al*, 2010; Hao *et al*, 2011).

La actividad de las enzimas, a su vez podría estar siendo regulada por mecanismos de retroalimentación, sin que esto llegue a ser un hecho contundente. Algunos estudios realizados en células PC12 sobre la biosíntesis de dopamina, señalan que la liriodenina es capaz de inhibir su producción (CI_{50} 8.4 μ M) interfiriendo en la actividad de tirosina hidroxilasa (TH, EC 1.14.16.2) y L-amino ácido aromática-descarboxilasa (AADC, EC 4.1.1.28), encargadas de transformar tirosina a dopa y luego a dopamina respectivamente (Jin *et al*, 2007); estas enzimas estarían emparentadas con monofenoloxidas (MFO; EC 1.4.18.1) y tirosina/dopa descarboxilasa (TYDC; EC 4.1.1.25) involucradas en la biosíntesis de ABI al transformar también tirosina a dopamina y convertirla en uno de los precursores tempranos en la biosíntesis de ABI. Idénticos resultados se han encontrados con otros ABI, anonaina y bulbocapnina (Lee *et al*, 2008). Algunos autores han señalado que la compartimentación podría evitar este tipo de regulaciones, en el caso de los ABI, la ruta está segregada; los primeros pasos de la biosíntesis se dan en el citosol, los últimos en vesículas, y la acumulación de los productos finales en la vacuola (Facchini & Bird 1998; Facchini, 2001; Loyola *et al*, 2004; Zenk & Juenger, 2007; Ziegler & Facchini, 2008).

La presencia de MS, su variación temporal y espacial y las funciones que cumplen durante el desarrollo temprano de plantas, posibilitan establecer claramente la importancia del metabolismo secundario como recurso necesario para que la plántula en crecimiento se establezca en el nuevo escenario al que se enfrenta. En algunos casos como el de la liriodenina en *A. diversifolia*, los MS son acumulados en órganos específicos antes de cualquier situación adversa, en el caso de antocianinas en *Lupinus luteus* e isoflavonoides en *Glycine max*, éstos son biosintetizados *de novo* después de una exposición a UV o una infección con hongos respectivamente (Katagiri *et al*, 2002; Lozovaya *et al*, 2004). Liriodenina es el alcaloide más favorecido en las rutas biosintéticas de *A. diversifolia*, es un metabolito secundario constitutivo

con actividad antimicrobiana amplia y potente, producida en tiempo y forma, por lo que puede considerársele junto con la berberina (otro ABI), hasta no demostrar su inducción, como una *fitoanticipina* (VanEtten *et al*, 1994; Dixon, 2001; Samanani *et al*, 2005), a diferencia del ABI sanguinarina que claramente es inducida por la presencia de fitopatógenos o de moléculas inductoras (Facchini *et al*, 1997). Estos tres ABI comparten algunas similitudes: se producen en cantidades copiosas, muestran actividades antimicrobianas potentes, se biosintetizan y/o acumulan durante el desarrollo temprano, pero divergen en su acumulación órgano-específica; la sanguinarina y la liriodenina se acumulan mayormente en raíces y en cantidades menores en tallos, la berberina se distribuye en casi todos los órganos de las especies que lo producen (Facchini *et al*, 1996; Samanani *et al*, 2005).

En *Annona diversifolia* existe mayor presencia de liriodenina en comparación a otros alcaloides, aunque también es necesario reconocer que no fue posible aislar e identificar el perfil completo de los alcaloides que componen a los extractos alcaloidales, dada la abundancia de liriodenina (entre el 50 - 90% en los extractos), situación totalmente diferente con la riqueza alcaloidal que llegan a expresar varias especies de *Lupinus* (Wink *et al*, 1983). Por lo que cabe esperar la presencia de otro tipo de MS en *A. diversifolia*.

Es claro que para la expresión temprana las plantas de MS comprometen recursos energéticos que, en este caso, están limitados a las reservas acumuladas durante la embriogénesis, y supone una competencia entre el desarrollo esencial y el metabolismo secundario, lo cual fortalece la suposición de que la coordinación entre las fases de desarrollo y la biosíntesis de MS debe estar regulada genéticamente de manera estricta.

La presencia del nitrógeno es relevante, ya que es un elemento fundamental, limitante y limitado en cualquier fase de desarrollo. En la germinación y durante el desarrollo de la plántula es utilizado con diferentes fines, si solo nos referimos al nitrógeno disponible en forma de aminoácidos, éstos se utilizan para la biosíntesis *de novo* de proteínas, de clorofilas, de nucleótidos, cofactores enzimáticos, bloques de polímeros estructurales, y de los fitoreguladores que controlan varios procesos vegetales (Singh, 1999), por lo que la biosíntesis de los alcaloides comparte los

aminoácidos con todo esos procesos; en el caso del los ABI, la fenilalanina y la tirosina necesarios para su biosíntesis, también están involucradas en la formación de otros MS como antocianinas y flavonoides. De ahí que, la cantidad destinada a la biosíntesis de liriodenina, atherospermidina, lisicamina debe estar estrictamente genéticamente regulada a favor para optimizar su utilización. Según lo estimado, *A. diversifolia* destina, en alguna etapa, hasta un 2.6 % de estos aminoácidos solo a la producción constitutiva de liriodenina, sin embargo ¿qué ocurriría si la planta se enfrenta a un ataque de fitopatógenos, sobre los cuales se ha demostrado el papel inhibitor de la liriodenina?, ¿se daría una inversión extra en la inducción de la biosíntesis del alcaloide?, ¿qué implicaciones traería para el desarrollo de la plántula, la utilización extra de recursos nitrogenados? Algunos estudios demuestran que los metabolitos son biosintetizados aún incluso a costa del crecimiento (Herms & Mattson, 1992; Vrieling & van Wijk, 1994; Coley & Kursar, 2001). Como observación personal vale mencionar que a partir de la diferenciación del hipocótilo en el eje embrionario, aparecen pigmentos rojos en este tejido (Fig. 11 E-K), los que presumiblemente pudieran ser antocianinas o antocianidinas, MS derivados de la fenilalanina; una competencia directa entre alcaloides y antocianinas pudiera ocurrir a partir de este punto.

También se ha observado que la competencia por el nitrógeno entre los procesos de defensa química y el crecimiento puede eludirse si una fase de desarrollo crítica es superada, Liu *et al* (1998) observó que durante la ontogenia temprana de las hojas, el alcaloide camptothecina se acumula en cantidades altas, pero cuando las hojas completan su desarrollo, el alcaloide disminuye y se incrementan la clorofila, como un claro ejemplo de que el nitrógeno está selectivamente destinado. Éstas y las observaciones de los alcaloides bencilisoquinolínicos en el desarrollo temprano de *Annona diversifolia*, sugieren que las plantas poseen un sistema de defensa químico programado durante las fases ontogénicas tempranas independientemente de la influencia biótica o abiótica, y a la vez un sistema de defensa químico inducible que puede ser activado en respuesta a estímulos externos, incluyendo herbívoros, patógenos o estrés ambiental. El caso de *Glycine max* pudiera servir como ejemplo de esto, constitutivamente se forman dos

isoflavonoides en forma de glucósidos *a priori* a la infección de varios fitopatógenos, después y durante el proceso infeccioso, estos isoflavonoides en forma libre tienen funciones diferentes, uno de ellos muestra actividad antifúngica y el otro se transforma en una molécula que contrarresta la infección, para ello es preciso la expresión de nuevas enzimas (Kubasek *et al*, 1992; Kubasek *et al*, 1998).

La presencia constitutiva de moléculas con algún significado biológico depende en primera instancia de la carga genética de la especie y solo después, es regulada por las circunstancias ambientales (Kleibenstein, 2004; Laitinen *et al*, 2005). De ahí que conocer las relaciones espacio-temporales durante el desarrollo permitirá conocer mejor el papel y la regulación de los MS. Un conocimiento detallado del metabolismo secundario en cada fase fenológica y de la variación entre ellas permitirá comprender mejor las relaciones entre la planta y su ambiente, pero también podrá tener implicaciones prácticas para la producción de MS particulares.

La importancia de conocer las cantidades constitutivas en las fases tempranas del desarrollo indica que este mecanismo puede ser una estrategia de defensa programada durante el desarrollo ontogénico normal, dependiente de la fase de desarrollo e independiente de los factores bióticos o abióticos, pero que se modelan plásticamente si se llegan a presentar factores adversos.

Las etapas tempranas también ofrecen la oportunidad de evaluar las diferentes teorías de defensa de las plantas (Berenbaum 1995; Espinosa-García, 2001; Stamp, 2003), cabe señalar que el desarrollo inicial de las plantas aún no ha sido incorporado a ellas. Los cambios durante la ontogenia, en este caso durante la germinación y el establecimiento de las plántulas, son evidencias que fortalecen la teoría de las defensas óptimas (OD) (McKey, 1974 y Rhoades, 1979 en Stamp, 2003; Langeheim, 2001), aunque también comparten las ideas de la hipótesis del balance crecimiento-diferenciación (GDB), que reconoce que los MS se producen dentro de las restricciones fisiológicas que anteponen los procesos de crecimiento y diferenciación celulares y de tejido (Herms & Mattson, 1992). Una comprensión más clara de estas hipótesis y de lo que se ha aprendido de las investigaciones que las utilizan puede facilitar el desarrollo de experimentos que estudien las lagunas en el conocimiento de la defensa de la planta.

Finalmente, con los datos mostrados en este trabajo, se puede demostrar que los embriones en desarrollo y los tejidos de plántulas de *A. diversifolia*, con o sin fotosíntesis, tienen la maquinaria biosintética (MFO, TYDC, TyrAO y NCS), los precursores necesarios (tirosina y/o fenilalanina) y los recursos energéticos capaces de producir alcaloides de defensa desde etapas tempranas (Fig. 19).

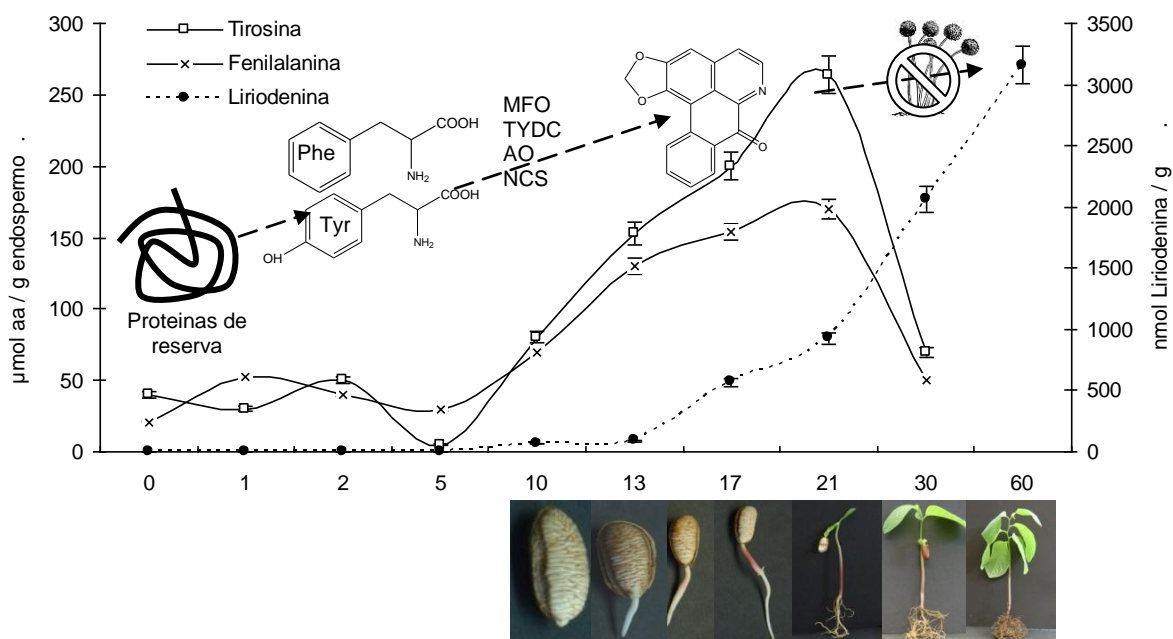


Figura 19. Relaciones de la biosíntesis de ABI en el desarrollo temprano de *A. diversifolia*

Conclusiones

La biosíntesis de alcaloides bencilisoquinolínicos se expresa desde las primeras etapas de vida de *Annona diversifolia* Safford.

La cantidad y la composición del perfil de alcaloides siguen un comportamiento de acumulación progresiva, en tanto que ninguno de los cinco alcaloides detectados guarda relación exacta con la dinámica general.

La biosíntesis y acumulación de cada alcaloide esta relacionado con algún proceso de crecimiento y/o diferenciación, es decir, se encuentran en tejidos diferentes y se biosintetizan en distintos momentos del desarrollo temprano.

La biosíntesis temprana de algunos alcaloides esta sustentada inicialmente por las reservas del endospermo, mientras que para otros se requiere el inicio de la actividad fotosintética de la plántula.

La actividad de las enzimas MFO, TYDC, TyrAO y NCS no fue detectada en el endospermo, lo que señala que la biosíntesis de ABI está al menos inicialmente controlada en estas etapas por el embrión.

La mayor acumulación de ABI y la mayor actividad de NCS en radículas y raíces, señalan a estos órganos como los sitios principalmente involucrados en la biosíntesis de ABI

Las relaciones de biosíntesis y localización de alcaloides señalan una regulación espacio temporal dependiente del desarrollo de la planta.

La liriodenina puede ser considerada un metabolito secundario constitutivo de defensa y clasificarse como una fitoanticipina. Además como una molécula

representativa de los alcaloides bencilisoquinolínicos y una molécula típica de Magnoliidae.

La presencia de metabolitos secundarios en etapas tempranas de las plantas parece ser una constante en el reino vegetal, aun cuando todavía los estudios al respecto son escasos.

El desarrollo temprano de las especies constituye un modelo de estudio para profundizar en las investigaciones relacionadas con el metabolismo secundario, ya que el entendimiento de la importancia de la ontogenia en la biosíntesis de metabolitos secundarios, podría contribuir a conocer de mejor manera el papel que desempeñan los MS en las plantas y la forma en que su producción esta regulada.

Bibliografía

- Aasen AJ, Culvenor CCJ, Finnie EP, Kellock AW, Smith LW. 1969. Alkaloids as a possible cause of ryegrass staggers in grazing livestock. *Australian Journal of Agricultural Research* 20(1) 71 - 86
- Abdel-Hady M.S., Okasha E.M., Soliman S.A. and Talaat M. 2008. Effect of Gamma Radiation and Gibberellic Acid on Germination and Alkaloid Production in *Atropa belladonna*. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 2(3): 401-405.
- Abdelrahman SM, Elmaki HB, Idris WH, Hassan AB, Babiker EE, El Tinay AH. 2007. Antinutritional factor content and hydrochloric acid extractability of minerals in pearl millet cultivars as affected by germination. *Int J Food Sci Nutr.* 58(1):6-17
- Acuña Castro W, De la Cruz Chacón I, González Esquinca AR. 2010. Actividad insecticida de *Annona diversifolia* Saff. frente a *Atta mexicana*. IV Congreso Internacional de Anonáceas. Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. Del 3 al 5 de Noviembre de 2010. Chiapas. México
- Adler LS, Wink M, Dist M, Lentz AJ. 2006. Leaf herbivory and nutrients increase nectar alkaloids. *Ecology Letters.* 9 (8): 960-967
- Aerts R, Gisi D, De Carolis E, De Luca V, Baumann TW. 1994. Methyl jasmonate vapor increases the developmentally controlled synthesis of alkaloids in *Catharanthus* and *Cinchona* seedlings. *Plant J.* 5, 635–643.
- Aerts RJ, Baumann TW. 1994. Distribution and utilization of chlorogenic acid in *Coffea* seedlings *J. Exp. Bot.* 45: 497-503.
- Aerts RJ, Schäfer A, Hesseb M, Baumann T, Slusarenko A. 1996. Signalling molecules and the synthesis of alkaloids in *Catharanthus roseus* seedlings *Phytochemistry.* 42 (2): 417-422
- Aerts RJ, Snoeijer W, Aerts-Teerlink O, Van Der Meijden E, Verpoorte R. 1991. Control and biological implications of alkaloid synthesis in *Cinchona* seedlings. *Phytochemistry.* 30 (11): 3571-3578
- Aerts RJ, Van der Leer T, Van der Heijden R, Verpoorte R. 1990. Developmental regulation of alkaloid production in *Cinchona* seedlings. *Journal of Plant Physiology.* 136 (1): 86-91.
- Åhman I, Tuveesson S, Johansson M. 2000. Does indole alkaloid gramine confer resistance in barley to aphid *Rhopalosiphum padi*? *J. Chem. Ecol.* 26 (1): 233–255.
- Alali F Q and Liu X X and McLaughlin J L 1999 Annonaceous acetogenins: recent progress; *J. Nat. Prod.* 62 504–540
- Alcantara J, Bird D A, Franceschi VR, Facchini PJ. 2005. Sanguinarine biosynthesis is associated with the endoplasmic reticulum in cultured opium poppy cells after elicitor treatment. *Plant Physiology*, 138: 173–183.
- Alfaro Romero T. de J. 2005. Producción de acetogeninas y alcaloides durante la germinación y las primeras etapas del desarrollo de *Annona lutescens* Saff. (Annonaceae). Tesis de Licenciatura en Biología. Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. Pp. 90.
- Amusa NA, Ashaye OA, Oladapo MO, Kafaru OO. 2003. Pre-harvest deterioration of Soursop (*Annona muricata*) at Ibadan Southwestern Nigeria and its effect on nutrient composition. *African Journal of Biotechnology.* 2 (1): 23–25.
- Andarwulan N, Fardiaz D, Wattimena GA, Shetty K. 1999. Antioxidant activity associated with lipid and phenolic mobilization during seed germination of *Pangium edule* Reinw. *J Agric Food Chem.* 47(8):3158-63

- Aniszewski T. 2007. Alkaloids-Secrets of life. Alkaloid chemistry, biological significance, applications and ecological role. Elsevier. 335 páginas.
- Anke S, Niemuller D, Moll S, Hansch R, Ober D. 2004. Polyphyletic origin of pyrrolizidine alkaloids within the Asteraceae. Evidence from differential tissue expression of homospermine synthase. *Plant Physiol.* 136, 4037–4047.
- APG II. 2003 An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. *Botanical Journal of the Linnean Society* 141: 399-436.
- APG III, THE ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP. 2009. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Bot. J. Linn. Soc.*, 161: 105–121.
- Appendino G. 2008. Capsaicin and Capsaicinoids. En *Modern Alkaloids. Structure, Isolation, Synthesis and Biology*. Edited by Fattorusso E. y Orazio Tagliatela-Scafati O. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim Págs. 73-77.
- Argandoña VH, Luza JG, Niemeyer HM & Corcuera LJ. 1980. Role of hydroxamic acids in the resistance of cereals to aphids. *Phytochemistry* 19: 1665-1668.
- Argandoña VH, Niemeyer HM, Corcuera LJ. 1981. Effect of content and distribution of hydroxamic acids in wheat on infestation by *Schizaphis graminum*. *Phytochemistry* 20: 673-676.
- Ashihara H. 2006. Metabolism of alkaloids in coffee plants. *Braz. J. Plant Physiol.*, 18(1):1-8
- Assabgui RA, Arnason JT, Hamilton RI. 1995. Hydroxamic acid content and plant development of maize (*Zea mays* L.) in relation to damage by the western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte. *Canadian Journal of Plant Science.* 75:(4) 851-856.
- Baisted DJ. 1971. Sterol and Triterpene Synthesis in the Developing and Germinating Pea Seed. *Biochem. J.* 124, 375-383 375
- Balažová A, Bilka F, Bilková A. 2007. Characterization of polyphenolase oxidase from corm and leaves of *Colchicum autumnale* L. *Acta facultatis pharmaceuticae universitatis comeniana.* Tomus LIV: 40-47.
- Baldisserotto C, Ferroni L, Anfuso E, Pagnoni A, Fasulo MP, Pancaldi S. 2007. Responses of *Trapa natans* L. floating laminae to high concentrations of manganese. *Protoplasma* 231: 65–82
- Ballesteros Patrón G, Zavala Hernández F, Rodríguez Paez LA, Urieta Pérez M, Cortéz Sarabia J, Torres Edgard J, de la Paz Reynoso J. 2010. Banco de germoplasma de ilamas (*Annona diversifolia*) en Ciudad Altamirano, Guerrero, México. *Memorias del IV congreso internacional de Anonáceas.* Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. Pág. 47.
- Balsevich J, Hogge LR, Berry AJ, Games DE, Mylchreest IC. 1988. Analysis of indole alkaloids from leaves of *Catharanthus roseus* by means of supercritical fluid chromatography/ mass spectrometry. *J. Nat. Prod.* 51 (6), 1173-1177.
- Bartolome B, Estrella I, Hernández T, 1997. Changes in phenolic compounds in lentils (*Lens culinaris*) during germination and fermentation. *Z Lebensm Unters Forsch A.* 205: 290-294.
- Barton KE, Koricheva J. 2010. The ontogeny of plant defense and herbivory: characterizing general patterns using meta-analysis. *Am Nat.* 175(4):481-93.
- Barton KE. 2007. Early ontogenetic patterns in chemical defense in *Plantago* (Plantaginaceae): genetic variation and trade-offs. *Am J Bot.* 94(1):56-66.
- Baskin CC, Baskin JM. 1998. *Seeds, Ecology, biogeography and evolution of dormancy and germination.* Academic Press, 666 pp.

- Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. *Am. J. Clin. Pathol.* 45, 493 – 496.
- Baumann TW, Gabriel H. 1984. Metabolism and excretion of caffeine during germination of *Coffea arabica* L. *Plant Cell Physiol.* 25: 1431-1436
- Bednarek P, Fraski R, Kerhoas L, Einhorn J, Wojtaszek P, Stobiecki M. 2001. Profiling changes in metabolism of isoflavonoids and their conjugates in *Lupinus albus* treated with biotic elicitor. *Phytochemistry* 56 (1): 77-85.
- Bennett RN, Wallsgrave RM. 1994. Secondary metabolites in plant defence mechanisms. *New Phytol.* 127: 617-633.
- Bentley K. W. 1997. B- Phenylethylamines and the isoquinoline alkaloids. *Nat. Prod. Rep.* 387-411.
- Bentley K. W. 1998. B- Phenylethylamines and the isoquinoline alkaloids. *Nat. Prod. Rep.* 15, 341-364.
- Bentley K. W. 1999. B- Phenylethylamines and the isoquinoline alkaloids. *Nat. Prod. Rep.* 16, 367-388.
- Bentley K. W. 2001. B- Phenylethylamines and the isoquinoline alkaloids. *Nat. Prod. Rep.* 18, 148-170.
- Bentley K.W. 2002. β -Phenylethylamines and the isoquinoline alkaloids. *Nat. Prod. Rep.* 19, 332-356.
- Bentley K.W. 2003. β -Phenylethylamines and the isoquinoline alkaloids. *Nat. Prod. Rep.* 20, 342-365.
- Bentley K.W. 2004. β -Phenylethylamines and the isoquinoline alkaloids. *Nat. Prod. Rep.* 21, 395-424.
- Bentley K.W. 2005. β -Phenylethylamines and the isoquinoline alkaloids. *Nat. Prod. Rep.* 22, 249-268.
- Bentley K.W. 2006. β -Phenylethylamines and the isoquinoline alkaloids. *Nat. Prod. Rep.* 23, 444-463.
- Bentley KW. 2007. B- Phenylethylamines and the isoquinoline alkaloids. *Nat. Prod. Rep.* 24, 395-424
- Berenbaum MR. 1995. The chemistry of defense: Theory and practice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92: 2-8,
- Bermejo A, Figadère B, Zafra-Polo MC, Barrachina I, Estornell E, Cortes D. 2005. Acetogenins from annonaceae: recent progress in isolation, synthesis and mechanisms of action. *Nat Prod Rep* 22(3):269-303.
- Bero J, Frédéric M, Quetin-Leclercq J. 2009. Antimalarial compounds isolated from plants used in traditional medicine. *Journal of Pharmacy and Pharmacology.* 61: 1401-1433.
- Bewley JD, Black M. 1994. Seeds: physiology of development germination. New York: Plenum. P. 445.
- Bewley JD. 1997. Seed germination and dormancy. *Plant Cell.* 9:1055–1066
- Bhattacharyya MK, Ward EWB. 1985. Differential sensitivity of *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* to glyceollin isomers. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 27:299–310
- Bhonwong A, Stout MJ, Attajarusit J, Tantasawat P. 2009. Defensive role of tomato polyphenol oxidases against cotton bollworm (*Helicoverpa armigera*) and beet armyworm (*Spodoptera exigua*). *J Chem Ecol.* 35:28–38.
- Bilka F, Balazova A, Bilková A, Subr Z, Psenak M. 2003. Characterization of polyphenol oxidase from the latex of opium poppy. Brief communication. *Biologia Plantarum* 47 (1): 111-115.
- Bilková A, BilkaF, Bezákova L. 2004. Characterization of *Papaver somniferum* L. Amine oxidase. *Acta Facult. Pharm. Univ. Comenianae* 51: 51-59.
- Bilková A, Ková A, Bezakova A, Bilka F, Psenak M. 2005. An amine oxidase in seedlings of *Papaver somniferum* L. *Biol. Plant.* 49 (3): 389-394. doi: 10.1007/s10535-005-0013-x
- Bird AD, Franceschi VR, Facchini PJ. 2003. A tales of three cell types: Alkaloid Biosynthesis is localized to sieve elements in opium poppy. *The Plant Cell.* 5:2626-2635.
- Bock A, Wanner G, Zenk MH. 2002. Immunocytological localization of two enzymes involved in berberine biosynthesis. *Planta.* 216. 57-63.
- Boege K, Marquis RJ. 2005. Facing herbivory as you grow up: the ontogeny of resistance in plants. *Trends in Ecology & Evolution* 20:441–448

- Boege K. 2005. Herbivore attack in *Casearia nitida* influenced by plant ontogenetic variation in foliage quality and plant architecture. *Oecologia* 143: 117-125.
- Bohidar K, Wratten SD, Niemeyer HM. 1986. Effects of hydroxamic acids on the resistance of wheat to the aphid *Sitobion avenae*. *Annals of Applied Biology*, 109: 193–198.
- Bonzom MP, Gargadennec A, Andary C, Roussel JL, Gueiffier A. 1998. Alkaloid repartition and DMSO effects on alkaloid accumulation in *Catharanthus* seedlings- *Journal of Plant Physiology*. 153 (5–6): 534-538.
- Boustie J, Stigliani JL, Montanha J, Amoros M, Payard M, Girre L. 1998. Antipoliovirus structure-activity relationships of some aporphine alkaloids. *J Nat Prod*. 61(4):480-4.
- Bove J, Jullien M, Grappin P. 2001. Functional genomics in the study of seed germination. *Genome Biology* 2001, 3(1):reviews 1002.1–1002.5
- Bovy A, de Vos R, Kemper M, Schijlen E, Almenar Pertejo M, Muir S, Collins G, Robinson S, Verhoeven M, Hughes S, Santos-Buelga C, van Tunen A. 2002. High-flavonoid tomatoes resulting from heterologous expression of the maize transcription factor gene LC and C1. *Plant Cell*, 14, 2509–2526.
- Bradford K, Nonogaki H. 2007. Seed development, dormancy, and germination. *Annual Plant Reviews*, Volume 27. Blackwell Publishing Ltd. 367 pp.
- Bradford KJ, Bewley JD. 2002. Seeds: Biology, Technology and Role in Agriculture. Chapter 9 in M.J. Chrispeels and D.E. Sadava, eds., *Plants, Genes and Crop Biotechnology*, 2nd Edition, Jones and Bartlett, Boston. Pp. 210-239
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilising the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*. 72: 248-254. doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3
- BRENDA, BRaunschweig ENzyme Database. 2011. Isoquinoline alkaloid biosynthesis. http://www.brenda-enzymes.org/index.php?page=/php/search_result.php4?a=137
- Brenes-Arguedas T, Horton MW, Coley PD, Lokvam J, Waddell RA, Meizoso-O'Meara BE, Kursar TA. 2006. Contrasting mechanisms of secondary metabolite accumulation during leaf development in two tropical tree species with different leaf expansion strategies. *Oecologia*. 49 (1) 91-100.
- Brückner H, Westhauser T. 2003. Chromatographic determination of L- and D-amino acids in plants. *Amino Acids*. 24: 43–55.
- Bush PB, Grunwald C. 1972. Sterol changes during germination of *Nicotiana tabacum* seeds. *Plant Physiol*. 50, 69-72
- Camacho-Corona MR, Favela-Hernández JMJ, González-Santiago O, Garza-González E, Molina-Salinas GM, Said-Fernández S, Delgado G, Luna-Herrera J. 2009. Evaluation of some plant-derived secondary metabolites against sensitive and multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Mex. Chem. Soc*. 53(2): 71-75.
- Campbell CW, Popenoe I. 1962. Effect of gibberellic acid on seed dormancy of *Annona diversifolia* Saff. *Estacion de experimentos subtropicales en la Universidad de Florida. Florida and FairChild tropical garden en la Universidad de Florida. Florida and Fairchild tropical Garden. Miami, Florida. USA*. 33-36 pág.
- Caroprese Araque JF, Parra Garcés MI, Arrieta Prieto D, & Stashenko E. 2011. Anatomía microscópica y metabolitos secundarios volátiles en tres estadios del desarrollo de las inflorescencias de *Lantana camara* (Verbenaceae). *Rev. Biol. Trop. (Int. J. Trop. Biol. ISSN-0034-7744)*. 59 (1): 473-486.
- Castro Moreno M. 2005. Efecto del estrés hídrico en la producción de liriodenina en *Annona lutescens* Saff. Tesis de Licenciatura en Biología. Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. Pp. 90.

- Cavé A, Figadère B, Laurens A, Cortes D. 1997. Acetogenins from Annonaceae. *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products* 70: 81-288.
- Cavé A, Leboeuf M y Waterman PG. 1987. The Aporphinoid Alkaloids of the Annonaceae. En: *Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives* Vol. 5: 133-270. Editado por S. William Pelletier. Editorial. John Wiley and Sons.USA.
- Ceballos L, Hossaert-McKey M, McKey D, Andary C. 1998. Rapid deployment of allelochemicals in exudates of germinating seeds of *Sesbania* (Fabaceae): roles of seed anatomy and histolocalization of polyphenolic compounds in anti-pathogen defense of seedlings. *Chemoecology* 8:141-151.
- Chang HC, Chang FR, Wu YC, Lai YH. 2004. Anti-cancer effect of liriodenine on human lung cancer cells. *Kaohsiung J. Med. Sci.* 20, 365-371.
- Chatrou LW, Pirie MD, Erkens RHJ, Couvreur TLP, Neubig KM, Abbott JR, Mols J.B, Maas JW, Saunders RMK, Chase MW. 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.
- Chávez Primitivo EM, Marroquín Andrade L, Cedillo Portugal E, Cervera Backhauss E. 1999. Estudio etnobotánico de la ilama (*Annona diversifolia* Saff) en Tejupilco, Estado de México. *Memorias del II congreso nacional de Anonáceas*. Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. 73
- Chen KS, Wu YC, Teng CM, Ko FN, Wu TS. 1997. Bioactive Alkaloids from *Illigera luzonensis*. *J. Nat. Prod.* 60, 645-647.
- Cho Y, Turnipseed EB, Lightfoot DA, Wood AJ. 2008. Trigonelline in mature seeds and developing seedlings of *Glycine max*. *Biologia Plantarum.* 52 (2): 370-372
- Choi I, Seog H, Park Y, Kim Y, Choi H. 2007. Suppressive effects of germinated buckwheat on development of fatty liver in mice fed with high-fat diet. *Phytomedicine.* 14, (7): 563-567
- Christensen CM, Meronuck RA, Sauer DB. 1990. Moisture content, invasion by *Aspergillus glaucus*, and germ discoloration in blends of corn of different initial moisture contents. *Plant Dis.* 74, 985-988.
- Clark A, Hufford CD. 1992. Antifungal Alkaloids. En: *The Alkaloids: Chemistry and Pharmacology*. Vol. 42. Academic Press Inc. Chapter 2. 117-124.
- Clark AM, Jurgens TM, Hufford CD. 1990. Antimicrobial activity of juglone. *Phytotherapy Research*, 4: 11–14.
- Clark AM, Watson ES, Ashfaq MK, Hufford CD. 1987. In vivo efficacy of antifungal oxoaporphines alkaloids in experimental disseminated candidiasis. *Pharmacological Research.* 4: 495–498.
- Coley PD, Bryant JP, Chapin FS. 1985. Resource availability and plant antiherbivore defense. *Science.* 230 (4278) :895–899.
- Coley PD, Kursar TA. 2001. Herbivoría, Defensas vegetales y enemigos naturales en bosques tropicales. En: *Relaciones químicas entre organismos: aspectos básicos y perspectivas de su aplicación* (Eds. Anaya AL, Espinosa-García F, Cruz-Ortega R). Editorila Plaza y Valdes & UNAM. 10: 401-424
- Collantes H, Gianoli E, Niemeye H. 1998. Changes in growth and chemical defences upon defoliation in maize. *Phytochemistry.* 49 (7): 1921-1923
- Cona A, Rea G, Angelini R, Federico R, Tavladoraki P. 2006. Functions of amine oxidases in plant development and defence. *Trends Plant Sci* 11 (2): 80-88.
- Conserva LM, de Araújo B Pereira C, Barbosa-Filho JM. 2005. Alkaloids of the Hernandiaceae: occurrence and a compilation of their biological activities. *Alkaloids Chem Biol.* 62 :175-243.

- Constabel CP, Bergey DR, Ryan CA. 1996. Polyphenol oxidase as a component of the inducible defense response in tomato against herbivores. In: Romeo JT et al (eds) Chapter nine, Phytochemical diversity and redundancy in ecological interactions, Plenum Press, New York. 231-251.
- Cordell G. 1981. Introduction to Alkaloids: A Biogenetic Approach. Wiley and Sons, New York.
- Correa EJ, Ríos CH, Castillo AR, Romero LI, Ortega-Barría E, Coley PD, Kursar TA, Heller MV, Gerwick WH, Cubilla Rios L. 2006. Minor alkaloids from *Guatteria dumetorum* with antileishmanial activity. *Planta Medica*. 72: 270-272
- Costa EV, Marques FA, Pinheiro MLC, Braga RM, Delarmelina C, Duarte MCT, Ruiz ALTG, de Carvalho JE, Maia BH LNS. 2011. Chemical Constituents Isolated from the Bark of *Guatteria blepharophylla* (Annonaceae), and their Antiproliferative and Antimicrobial Activities. *J. Braz. Chem. Soc.* 22 (6): 1111-1117.
- Costa EV, Pinheiro ML, Barison A, Campos FR, Salvador MJ, Maia BH, Cabral EC, Eberlin MN. 2010. Alkaloids from the bark of *Guatteria hispida* and their evaluation as antioxidant and antimicrobial agents. *J Nat Prod*. 73(6):1180-3.
- Costa EV, Pinheiro MLC, Marques AF, Braga RM, Maia BHLNS. 2009. First report of alkaloids in the genus *Guatteria* (Annonaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 37 (2009) 43–45
- Cronquist A. 1981. An integrated system of classification of flowering plants. Columbia University Press. 1262 pp. New York:
- Cronquist A. 1988. The Evolution and Classification of Flowering Plants. Londres: Nelson and Sons. New York Botanical Garden. 555 pp.
- Croteau R, Kutchan TM, Lewis NG. 2000. Natural Products (Secondary Metabolites)". En: Buchanan, Grissem, Jones (editores). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists. Rockville, Maryland, Estados Unidos. Capítulo 24
- Cruz Pineda E, Guerrero M. 2010. Manejo fitosanitario para el control de la antracnosis en Anona (*Annona diversifolia* Saff). Memorias del IV congreso internacional de Anonáceas. Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. Pág. 26
- Cseke LJ, Lu CR, Kornfeld A, Kaufman PB, Kirakosyan A. 2006. How and why these compounds are synthesized by plants. En: *Natural products from plants / Leland J. Cseke .et al..2nd ed.* Taylor & Francis Group.
- Dang TTT, Facchini PJ. Characterization of three O-methyltransferases involved in noscapine biosynthesis in opium poppy. *Plant Physiology* 2012; 159 (2): 618-631.
- Davies KM, Schwinn KE. 2003. Transcriptional regulation of secondary metabolism. *Funct Plant Biol* 30 (9): 913 – 925.
- Davis CS, Nia X, Quisenberry SS, Foster JE. 2000. Identification and quantification of hydroxamic acids in maize seedling root tissue and impact on western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae) larval development. *Journal of Economic Entomology* 93(3):989-992.
- de Cortes Sánchez M, Altares P, Pedrosa MM, Burbano C, Cuadrado C, Goyoaga C, Muzquiz M, Jiménez-Martínez C, & Dávila-Ortiz G. 2005. Alkaloid variation during germination in different lupin species. *Food Chemistry*. 90 (3): 347-355.
- de la Cruz I. 2001. Acetogeninas bioactivas de *Annona diversifolia* Safford. Tesis de Licenciatura en Ingeniería Bioquímica. Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutierrez. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. México.
- de la Cuadra C, Muzquiz M, Burbano C, Ayet G, Calvo R, Osagie A, Cuadrado CJ. 1994. *Science Food Agrícola*.66 (3): 357-364.

- De Luca V, Balsevich J, Tyler RT, Eilert U, Panchuk BD, Kurz WGW. 1986. Biosynthesis of indole alkaloids: Developmental regulation of the biosynthetic pathway from tabersonine to vindoline in *Catharanthus roseus*. *J. Plant Physiol.* 125, 147–156.
- De Vogel EF. 1980. Seedlings of dicotyledons. Structure, development, types. Agricultural Publishing and Documentation (PUDOC), Wageningen, Holanda. p. 168-181.
- del Rayo Camacho M, Kirby GC, Warhurst DC, Croft SL, Phillipson JD. 2000. Oxoaporphine alkaloids and quinones from *Stephania dinklagei* and evaluation of their antiprotozoal activities. *Planta Medica* 66:478-480.
- Deus-Neumann B, Zenk MH. 1986. Accumulation of alkaloids in plant vacuoles does not involve an ion-trap mechanism". *Planta*, 167 (1): 44–53.
- Devi MCh, Reddy MN. 2002. Phenolic acid metabolism of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) plants inoculated with VAM fungus and Rhizobium. *Plant Growth Regulation* 37: 151–156
- Dewick PM. 2002. Medicinal Natural Products. A biosynthetic approach. 2nd Edition. Wiley. Chichester, England
- Dexter RJ, Verdonk JC, Underwood BA, Shibuya K, Schmeltz EA, Clark DG. 2008. Tissue-specific PhBPBT expression is differentially regulated in response to endogenous ethylene. *Journal of Experimental Botany.* 59 (3): 609–618.
- Díaz Chávez ML, Rolf M, Gesell A, Kutchan TM. 2011. Characterization of two methylenedioxy bridge-forming cytochrome P450-dependent enzymes of alkaloid formation in the Mexican prickly poppy *Argemone mexicana*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 507 (1):186-193.
- Díaz J, Barceló AR, De Cáceres FM. 1997. Changes in shikimate dehydrogenase and the end products of the shikimate pathway, chlorogenic acid and lignins, during the early development of seedlings of *Capsicum annuum*. *New Phytologist*, 136: 183–188.
- Digenis G, Faraj BA, Abou-Chaar CI. 1966. The Biotransformation of Gramine into Tryptophan in Barley Shoots. *Biochem. J.* 101, 27-29c
- Dixon RA & Sumner LW. 2003. Legume Natural Products: Understanding and manipulating complex pathways for human and animal health. *Plant Physiol.* 131: 878-885
- Dixon RA, Harrison MJ, Lamb CJ. 1994. Early events in the activation of plant defense responses. *Annu. Rev. Phytopathol.* 32:479–501
- Dixon RA, Steele CL. 1999. Flavonoids and isoflavonoids—a gold mine for metabolic engineering. *Trends Plant Sci* 4: 394–400
- Dixon RA, Xie DY, Sharma SB. 2005. Proanthocyanidins—a final frontier in flavonoid research? *New Phytol* 165: 9–28
- Dixon RA. 2001. Natural products and plant disease resistance. *Nature*, 411, 843-847.
- Domínguez Gutú L.M., González Esquinca A.R. y De la Cruz Chacón I. 2010. Estudios de germinación de *Annona diversifolia* Safford. IV Congreso Internacional de Anonáceas. Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. Del 3 al 5 de Noviembre de 2010. Chiapas. México.
- Doyle JA, Le Thomas A. 1994. Cladistic Analysis and Pollen Evolution in Annonaceae. Mencionado en: JA Doyle, A Le Thomas 1996. Phylogenetic Analysis and Character Evolution in Annonaceae. *Bull. Mus. Natl. Hist. Nat.*, París, 4e sér., 18, sectionB, Adansonia, 3 y 4: 279-334.
- Doyle JA, Sauquet H, Scharaschkin T, Thomas AL. 2004. Phylogeny, molecular and fossil dating, and biogeographic history of Annonaceae and Myristicaceae (Magnoliales). *International Journal of Plant Sciences* 165:(Suppl.). S55–S67

- Dubeck M, Kirkwood S. 1952. The origin of the O- and N-methyl groups of the alkaloid ricinine. *J Biol Chem.* 1952 199 (1):307-12.
- Duke JA. 1969. On tropical tree seedlings. I. Seeds, seedlings, systems and systematic. *Ann. Missouri Bot. Garden* 56 (2): 154-161.
- Duke SO, Naylor AW. 1976. Light control of anthocyanin biosynthesis in *Zea* Seedlings *Physiologia Plantarum.* 37(1): 62-68.
- Dumortier FM, Vendrig JC. 1982a. Anthocyanin synthesis in seedlings of *Vigna radiata* (L.) Wilczek: Interaction between Hypocotyl and Cotyledons. *Plant Cell Physiol.* 23(5): 759-765
- Dumortier FM, Vendrig JC. 1982b. The Role of phytochrome in anthocyanin synthesis in seedlings of *Vigna radiata* (L.) Wilczek. *Plant Cell Physiol.* 23(5): 923-927
- Dybkaer R. 2001. Unit "katal" for catalytic activity (IUPAC Technical report). *Pure Appl. Chem.* 73: 927–931.
- Ehmann B, Ocker B, Schidfer E. 1991. Development and light-dependent regulation of the expression of two different chalcone synthase transcripts in mustard cotyledons. *Planta* 183 416-422.
- El-Araby MM, Moustafa MA, Ismail AI, Hegazi AZA. 2006. Hormone and phenol levels during germination and osmopriming of tomato seeds, and associated variations in protein patterns and anatomical seed features. *J. Plant Res.* 110: 141-149.
- Elger ADG, Lemoine M, Fenner, Hanley ME. 2009. Plant ontogeny and chemical defence: older seedlings are better defended. *Oikos* 118:767–773.
- Eliert U, Kurz WGW, Constabel F. 1985. Stimulation of sanguinerine accumulation in *Papaver somniferum* cell cultures by fungal elicitors. *Journal of Plant Physiology.* 119. 65-76.
- Endress PK. 2010. The evolution of floral biology in basal angiosperms. *Review. Phil. Trans. R. Soc. B.* 365, 411–421.
- Escribano J, Cabanes J, Chazzara S, García-Carmona F. 1997. Characterization of monophenolase activity of table beet polyphenol oxidase. Determination of kinetic parameters on the tyramine-dopamine
- Espinosa-García FJ. 2001. La diversidad de los metabolitos secundarios y la teoría de la defensa vegetal. En: Anaya AL, Espinosa-García F, Cruz-Ortega R. *Relaciones químicas entre organismos: aspectos básicos y perspectivas de su aplicación.* Plaza y Valdes, México. 6: 231-250.
- Evans LS, Almeida MS, Lynn DG, Nakanishi K. 1979. Chemical characterization of a hormone that promotes cell arrest in G2 in complex tissues. *Science* 203, 1122–1123.
- Evans LS, Tramontano WA. 1984. Trigonelline and promotion of cell arrest in G2 of various legumes. *Phytochemistry* 23, 1837–1840.
- Facchini P, de Luca V. 1994. Differential and tissue-specific expression of a gene family for tyrosine/dopa decarboxylase in opium poppy. *J. Biol. Chem.* 269 (43): 26684-26690.
- Facchini P, de Luca V. 1995. Phloem-Specific Expression of Tyrosine/Dopa decarboxylase genes and the biosynthesis of isoquinoline alkaloids in opium poppy. *Plant Cell.* 7(11): 1811–1821.
- Facchini P, de Luca V. 2008. Opium poppy and Madagascar periwinkle: model non-model systems to investigate alkaloid biosynthesis in plants. *The Plant Journal,* 54: pp. 763–784.
- Facchini PJ, Bird DA. 1998. Developmental regulation of benzyloisoquinoline alkaloid biosynthesis in opium poppy plants and tissue cultures. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 34:69–79
- Facchini PJ, Hagel JM, Liscombe DK, Loukanina N, MacLeod BP; Samanani N, Zulak KG. 2007. Opium poppy: blueprint for an alkaloid factory. *Phytochem Rev.* 6:97–124

- Facchini PJ, Jhonson AG, Bird DA. 1997. Regulation of alkaloids biosynthesis in opium poppy and related species: prospects for pathway engineering. *AgBiotech News and Information*. 9 (6): 131N-138N.
- Facchini PJ, Johnson AG, Poupart J, de Luca V. 1996. Uncoupled defense gene expression and antimicrobial alkaloid accumulation in elicited opium poppy cell cultures. *Plant Physiol*. 111(3):687-97.
- Facchini PJ, Penzes C, Johnson AG, Bull D. 1996. Molecular characterization of berberine bridge enzyme genes from opium poppy. *Plant Physiol* 112: 1669–1677
- Facchini PJ. 2001. Alkaloid biosynthesis in plants: biochemistry, cell biology, molecular regulation, and metabolic engineering applications. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52:29–66
- Facchini PJ. 2006. Regulation of alkaloid in Plants. The alkaloids 63: 1-35 en Cordell Geoffrey I. *The Alkaloids*. Academic Press-Elsevier, USA, 2006.. *The Alkaloids*. Academic Press-Elsevier.
- Fait A, Angelovici R, Less H, Ohad I, Urbanczyk-Wochniak E, Fernie AR, Galili G. 2006. Arabidopsis seed development and germination is associated with temporally distinct metabolic switches. *Plant Physiology*. 142 (3): 839-854.
- Février A, Ferreira ME, Fournet A, Valu G, Inchausti A, De Arias AR, Hocquemiller R, Waechter AI. 1999. Acetogenins and other compounds from *Rollinia emarginata* and their antiprotozoal activities. *PlantaMed*. 65: 47-49.
- Finch-Savage WE, Leubner-Metzger. 2006. Seed dormancy and the control of germination. *New Phytol* 171: 501–523
- Font Quer P. 1985. *Diccionario de Botánica*. Labor, Barcelona, España.
- Friedman J, Waller GR. 1983. Caffeine hazards and their prevention in germination seeds of coffee (*Coffea arabica* L.) *Journal of Chemical Ecology*. 9(8):1099-1105.
- Frölich C, Oberb D, Hartmann T. 2007. Tissue distribution, core biosynthesis and diversification of pyrrolizidine alkaloids of the lycopsamine type in three Boraginaceae species. *Phytochemistry*. 68 (7): 1026–1037
- Gerardy R, Zenk MH. 1993. Formation of salutaridine from (R)-reticuline by a membrane-bound cytochrome P-450 enzyme from *Papaver somniferum*. *Phytochemistry*. 32:79–86
- Gianoli E, Niemeyer HM. 1997. Environmental effects on the accumulation of hydroxamic acids in wheat seedlings: the importance of plant growth rate. *Journal of Chemical Ecology* 23: 543-551
- González Esquinca AR. 2001. Contribución al estudio del género *Annona* (Annonaceae). Análisis fitoquímico de tres especies del estado de Chiapas. Tesis Doctoral, Universidad Nacional Autónoma de México, México
- González Esquinca AR, Luna Cazáres LM, Álvarez Martínez JG, de la Paz Vázquez Y. 1997a. Estudios sobre el letargo de *Annona diversifolia* Saff (Annonaceae). En: *Memorias del 1º Congreso Internacional de Annonáceas*. Chapingo, Estado de México. México. Pp. 229-239.
- González Esquinca AR, Luna Cazáres LM, Álvarez Martínez JG, Porras Pérez GM. 1997b. Duración de la latencia e importancia de la cubierta dura y de la inmadurez anatómica, en la inhibición de la germinación de la papausa blanca (*Annona diversifolia* Saff, Magnoliidae, Annonaceae). *Revista ICACH Nueva Época*, 1(3): 37-46.
- González-Esquinca AR, Luna-Cazáres LM, Schlie-Guzman MA. 2007. Los alcaloides de Annonaceae en el complejo Ranaleano. *Lacandonia* 1 (1): 19-27
- González-Esquinca, Luna-Cazáres LM, Schlie-Guzman MA, Ramos Hernández SG, Sánchez Cortés MS, Pérez Farrera MA. 2008. La Familia Annonaceae y sus géneros: relaciones taxonómicas (1817-1996). En: Schlie-Guzman MA & Luna-Cazáres LM (Coord.), *Recursos Fitogenéticos y Sustentabilidad en Chiapas*. 59-77.

- Goossens A, Hakkinen ST, Laakso I, Seppanen-Laakso T, Biondi S, De Sutter V, Lammertyn F, Nuutila AM, Soderlund H, Zabeau M et al. 2003. A functional genomics approach toward the understanding of secondary metabolism in plant cells. *PNAS* 100: 8595–8600.
- Graham TL, Kim JE, Graham MY. 1990. Role of constitutive isoflavone conjugates in the accumulation of glyceollin in soybean infected with *Phytophthora megasperma*. *Mol Plant Microbe Interact* 3: 157-166
- Graham TL. 1991. Flavonoid and isoflavonoid distribution in developing soybean seedling tissues and in seed and root exudates. *Plant Physiol.* 95, 594-603.
- Gregianini ST, Porto DG, Do Nascimento T, Palma FJ, Henriques AT, Fett Netto AG. 2004. Environmental and Ontogenetic Control of Accumulation of Brachycerine, a Bioactive Indole Alkaloid from *Psychotria brachycera*. *Journal of Chemical Ecology.* 30 (10): 2023-2036.
- Grove MD, Spencer GF, Wakeman MV, Tookey HL. 1976. Morphine and codeine in poppy seed. *J. Agric. Food Chem.* 4 (4): 896-897
- Guerreiro Filho O, Mazzafera P. 2000. Caffeine does not protect coffee against the leaf miner *Perileucoptera coffeella*. *Journal of Chemical Ecology.* 26 (6). 1447-1464.
- Guinaudeau H, Leboeuf M, Cavé A. 1975. Aporphine Alkaloids. *Lloydia* 38 (3): 275- 339.
- Guinaudeau H, Leboeuf M, Cavé A. 1979. Aporphine Alkaloids II. *J. Nat. Prod.* 42 (3): 325-361.
- Guinaudeau H, Leboeuf M, Cavé A. 1983. Aporphine Alkaloids III. *J. Nat. Prod.* 46 (6): 761-835.
- Guinaudeau H, Leboeuf M, Cavé A. 1988. Aporphine Alkaloids IV. *J. Nat. Prod.* 51 (2): 389-474.
- Guinaudeau H, Leboeuf M.,Cavé A. 1994. Aporphine Alkaloids V. *J. Nat. Prod.* 57 (8): 1033-1135
- Guo J, Wang MH. 2010. Ultraviolet A-specific induction of anthocyanin biosynthesis and PAL expression in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Plant Growth Regulation.* 62: 1-8.
- Guo XR, Yang L, Yu JH, Tang ZH, Zu YG. 2007. Alkaloid variations in *Catharanthus roseus* seedlings treated by different temperatures in short term and long term. *Journal of Forestry Research.* 18(4): 313-315
- Hagel JM, Facchini PJ. 2008. Plant metabolomics: analytical platforms and integration with functional genomics. *Phytochemistry Reviews.* 7 (3): 479-497
- Han X, Lamshöft M, Grobe N, Ren X; Fist AJ, Kutchan TM, Spiteller M, Zenk MH. 2010. The biosynthesis of papaverine proceeds via (s)-reticuline". *Phytochemistry,* 71 (11-12): 1305–1312.
- Hancock RD, McRae D, Haupt S, Viola R. 2003. Synthesis of l-ascorbic acid in the phloem. *BMC Plant Biol.* 3:7
- Hao DC, Ge G, Xiao P, Zhang Y, Yang L. 2011. The first insight into the tissue specific *Taxus* transcriptome via Illumina second generation sequencing. *PLoS ONE* 6(6): 1-15. e21220. doi:10.1371/journal.pone.0021220
- Harborne JB. 1994. Introduction to ecological biochemistry, 4th ed. Academic Press, New York.
- Hartmann T. 2007. From waste products to ecochemicals: fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochem.*68:2831–2846.
- Hartmann T. 2008. The lost origin of chemical ecology in the late 19th century. *PNAS* 105 (12): 4541–4546
- Hartwig VE, Joseph CM, Phillips DA. 1991. Flavonoids released naturally from alfalfa seeds enhance growth rate of *Rhizobium meliloti*. *Plant Physiol.* 95:797-803.
- Hashimoto T, Yamada Y. 1994. Alkaloid biogenesis: molecular aspects. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 45:257–85
- Hayat M, Canright J. 1965. The developmental anatomy of the Anonáceas. I. Embryo and early seedling structure. *Amer. J. Botany* 52: 228-237.
- Henry TA. 1949. The plant alkaloids. 4 edición. The Blakiston Company. London.

- Herbert RB. 2003. The biosynthesis of plant alkaloids and nitrogenous microbial metabolites. *Nat Prod Rep* 20: 494–508.
- Hermes DA, Mattson WJ. 1992. The dilemma of plants: to grow or defend. *Quarterly Review of Biology*. 67:283–335
- Hess M, Barralis G, Bleiholder H, Buhr L, Eggers T, Hack H, Stauss R. 1997: Use of the extended BBCH scale – general for the descriptions of the growth stages of mono- and dicotyledonous weed species. *Weed Research* 37, 433-441.
- Hesse M. 2002. Alkaloids. Nature's Curse or Blessing? Wiley-VCH, Weinheim, pp. 1–5.
- Heusden EV. 1992. Flowers of Annonaceae: Morphology, Classification, and Evolution. *Blumea Suppl.* 7: 1-218. Holanda.
- Holdsworth MJ, Bentsink L, Soppe WJJ. 2008. Molecular networks regulating Arabidopsis seed maturation, afterripening, dormancy and germination. *Tansley review. New Phytologist*. 179: 33–54
- Holme PC Woods KA. 2002. Measurement of plasma tyrosine by HPLC-UV or LC-MS-MS for assessing chemically induced tyrosinaemia. *Chromatographia*. 55 (1): S193-S194.
- Hosoi K, Yoshida S, Hasegawa M. 1970. L-Tyrosine carboxylase of barley roots. *Plant Cell Physiol* 11: 899–906
- Hsieh TJ, Liu TZ, Chern ChL, Tsao DA, Lu FJ, Syu YH, Hsieh PY, Hu HS, Chang TT, Chen ChH. 2005. Liriodenine inhibits the proliferation of human hepatoma cell lines by blocking cell cycle progression and nitric oxide-mediated activation of p53 expression. *Food and Chemical Toxicology*. 43, (7): 1117-1126
- http://www.ipni.org/ipni/advPlantNameSearch.do?find_family=Annonaceae&find_genus=&find_species=&find_infrfamily=&find_infragenus=&find_infraspecies=&find_authorAbbrev=&find_includePublicationAuthors=on&find_includePublicationAuthors=off&find_includeBasionymAuthors=on&find_includeBasionymAuthors=off&find_publicationTitle=&find_isAPNIRRecord=on&find_isAPNIRRecord=false&find_isGCIRRecord=on&find_isGCIRRecord=false&find_isIKRecord=on&find_isIKRecord=false&find_rankToReturn=all&output_format=normal&find_sortByFamily=on&find_sortByFamily=off&query_type=by_query&back_page=plantsearch.
- Huang FC, Kutchan T.M. 2000. Distribution of morphinan and benzo(c)phenanthridine alkaloid gene transcript accumulation in *Papaver somniferum*. *Phytochemistry*. 53, (5): 555-564.
- Huang LD, Backhouse D. 2005. Induction of defence responses in roots and mesocotyls of Sorghum seedlings by inoculation with fusarium thapsinum and F. proliferatum, wounding and light. *Journal of Phytopathology*. 153 (9): 522 – 529.
- Huang RL, Chen CC, Huang YL, Ou JC, Hu CP, Chen CF, Chang C. 1998. Anti-tumor effects of d-dicentrine from the root of *Lindera megaphylla*. *Planta Med*. 64, 212-215.
- Hufford C D, Sharma AS, Oguntimein BO. 1980. Antibacterial and antifungal activity of liriodenine and related oxoaporphine alkaloids. *J.Pharm. Sci.* 69 (10): 1180-1183.
- Hufford CD, Funderburk MJ, Morgan JM, Robertson L. W. 1975. Two antimicrobial alkaloids from heartwood of *Liriodendron tulipifera* L. *J. Pharm. Sci.* 64, 789-792.
- Hui YH, Rupprecht JK, Liu YM, Anderson JE, Smith D. L, Chang CJ, and McLaughlin JL. 1989. Bullatacin and bullatacinone: two highly potent bioactive acetogenins from Annona bullata. *J Nat Prod*. 52, 463-77.
- Hummel GM, Naumann M, Schurr U, Walter A. 2007. Root growth dynamics of Nicotiana attenuata seedlings are affected by simulated herbivore attack. *Plant Cell Environ.* (10):1326-36.
- Hunter RE, Halloin JM, Veech JA. 1978. Terpenoid accumulation in hypocotyls of cotton seedlings during aging and after infection by *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology*. 68 (3): 347-350.
- Hutchinson J. 1964. The Genera of Flowering Plants. Dicotyledones, I. Oxford: Clarendon Press. xiii + 516 págs.

- Huub L, Kerckhoffs J, Kendrick RE. 1997. Photocontrol of anthocyanin biosynthesis in tomato. *J. Plant Res.* 110: 141-149.
- Ikezawa N, Iwasa K, Sato F. Molecular cloning and characterization of CYP80G2, a cytochrome P450 that catalyzes an intramolecular C–C Phenol coupling of (S)- reticuline in magnoflorine biosynthesis, from cultured *Coptis japonica* cells. *The Journal of Biological Chemistry* 2008; 283 (14): 8810-8821
- International Society for Molecular Plant-Microbe Interactions. 2011. Search Common Names of Plant Diseases <http://www.ismpminet.org/resources/common/search.asp>
- Israilov IA, Karimova SU, Yunusov MS, Yunusov SY. 1980. Aphorphine alkaloids. *Chemistry of Natural Compounds.* 16 (3): 197-225
- Jenke-Kodama H, Müller R, Dittmann E. 2008. Evolutionary mechanisms underlying secondary metabolite diversity. *Prog Drug Res.* 65:119: 121-40.
- Jensen U. 1995. Secondary compounds of the Ranunculiflorae. *Plant Syst. Evol.(Suppl.)* 9, 89–97
- Jeong SW, Das PK, Jeoung SC, Song JY, Lee HK, Kim YK, Kim WJ, Park YI, Yoo SD, Choi SB, Choi G, Park YI. 2010. Ethylene suppression of sugar-induced anthocyanin pigmentation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 154(3):1514-31
- Jin CM, Lee JJ, Yang YJ, Kim YM, Kim YK, Ryu SY, Lee MK. 2007. Liriodenine inhibits dopamine biosynthesis and L-DOPA-induced dopamine content in PC12 cells. *Arch Pharm Res.* 30(8):984-90.
- Jolad SD, Hoffmann JJ, Schram KH, Cole JR, Tempesta MS, Kriek GR, Bates RB. 1982 Uvaricin, a new antitumor agent from *Uvaria accuminata* (Annonaceae). *J. Org. Chem.* 47 3151–3153
- Jones AS, Lamont BB, Fairbanks M, Rafferty CM. 2003. Kangaroos avoid eating seedlings with or near others with volatile essential oils. *Journal of chemical ecology.* 29 (12): 2621-2635.
- Julián-Loeza AP, Santos-Sánchez NF, Valadez-Blanco R, Balbina Senorina Sánchez-Guzmán BS, Salas-Coronado R. 2011. Chemical composition, color, and antioxidant activity of three varieties of *Annona diversifolia* Safford fruits. *Industrial Crops and Products.* 34 (2): 1262–1268
- Jurado E, Moles A. 2003. Germination deferment strategies. In: Nicolás G, Bradford KJ, Côme D, Pritchard HW (eds). *The biology of seeds: recent research advances: proceedings of the Seventh International Workshop on Seeds, Salamanca, Spain 2002 / CAB International.* Part IV, Chapter: 41: 381-388
- Justus M, Witte L, Hartmann T. 1997. Levels and tissue distribution of loline alkaloids in endophyte-infected *Festuca pratensis*. *Phytochemistry* vol. 44, no1, pp. 51-57
- Kaplan I, Halitschke R, A. Kessler A, Sardanelli S, Denno RF. 2008. Constitutive and induced defenses to herbivory in above- and belowground plant tissues. *Ecology,* 89 (2): 392–406
- Katagiri Y, Hashidoko Y, Tahara S. 2002. Localization of flavonoids in the yellow lupin seedlings and their UV-B-absorbing potential. *Z Naturforsch C.* 57 (9-10):811-6.
- Katsui N, Sato K. 1966. Alkaloids of *Lysichiton camtschaticense* Schott var. *Japonicum* Makino. *Tet. Lett.* 50, 6257–6261.
- Kawalleck P, Keller H, Hahlbrock K, Scheel D, Somssich IE (1993) A pathogen-responsive gene of parsley encodes tyrosine decarboxylase. *J Biol Chem* 268 (3): 2189–2194
- KEGG GENOME 2011. Isoquinoline alkaloid biosynthesis - Reference pathway. http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?map00950. Fecha de actualización- 10/5/2011.
- KEGG, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. 2011b. Monophenol monooxygenase, Enzyme 1.14.18.1. http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?K00505+1.14.18.1+R00731

- KEGG, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. 2011c. L-amino-acid oxidase, Enzyme 1.4.3.2
http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?K03334+1.4.3.2+R00729
- Kemp RJ, Goad LJ, Mercer EI. 1967. Changes in the levels and composition of the esterified and unesterified sterols of maize seedlings during germination. *Phytochemistry*. 6 (12):1609-1615.
- Keski-Saari S, Flack M, Heinonen J, Zon J, Julkunen-Tiitto R. 2007. Phenolics during early development of *Betula pubescens* seedlings: inhibition of phenylalanine ammonia lyase *Trees - Structure and Function* 21: 263-272.
- Keski-Saari S, Julkunen-Tiitto R. 2003. Early developmental responses of mountain birch (*Betula pubescens* subsp. *czerepanovii*) seedlings to different concentrations of phosphorus. *Tree Physiol*. 23(17):1201-8.
- Kessler PJA. 1993. Annonaceae. En: Kubitzki, K., Rohwer, J.G. & Bittrich, V. (Editores). *The Families and Genera of Vascular Plants. II. Flowering Plants - Dicotyledons*. Springer-Verlag
- Khan MR, Kihara M, Omoloso AD. 2002. Antimicrobial activity of *Michelia champaca*. *Fitoterapia*. 73, 744-748.
- Khan RI, Onodera R, Amin MR, Mohammed N. 1999. Production of tyrosine and other aromatic compounds from phenylalanine by rumen microorganisms. *Amino Acids*. 17 (4): 335-346
- Khogali A, Barakat S, Abou-Zeid H. 1993. Effect of various light treatments on the accumulation of flavonoids and anthocyanins during germination of *Ricinus communis* L. *Alexandria Journal of Agricultural Research*. 38(1): 373-386.
- Kim SL, Kim SK, Park Ch. 2004. Introduction and nutritional evaluation of buckwheat sprouts as a new vegetable. *Food Research International*. 37 (4) :319-327
- Kimand YK, Ryu SY. 1999. Cytotoxic components from stem bark of *Magnolia obovata*. *Planta Med*. 65 (3): 291-292.
- Kliebenstein DJ. 2004. Secondary metabolites and plant/environment interactions: a view through *Arabidopsis thaliana* tinted glasses. *Plant, Cell & Environment*, 27: 675–684
- Klun JA, Robinson JF. 1969. Concentration of Two 1, 4-Benzoxazinones in Dent Corn at Various Stages of Development of the Plant and Its Relation to Resistance of the Host Plant to the European Corn Borer. *Journal of Economic Entomology*. 62 (1): 214-220.
- Koek-Noorman J, Westra LYT, Maas PJM. 1990. Studies in Annonaceae. XIII. The Role of morphological characters in subsequent classifications of Annonacea: A comparative Survey. *Taxon* 39 (1): 16-39.
- Koller D, Mayer AM, Poljakoff-Mayber A, Klein S. 1962. Seed germination. *Annu. Rev. Plant. Physiol*. 13:437-464
- Koornneef M, Bentsink L, Hilhorst H. 2002. Seed dormancy and germination. *Curr Opin Plant Biol* 5: 33–36.
- Kraus PFX, Kutchan TM 1995. Molecular cloning and heterologous expression of a cDNA encoding berbaminine synthase, a C-O phenol-coupling cytochrome P450 from the higher plant *Berberis stolonifera*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 92: 2071-207
- Kubasek W, Ausubel FM, Shirley BW. 1998. A light independent developmental mechanism potentiates flavonoid gene expression in *Arabidopsis* seedlings *Plant Molecular Biology* 37: 217–223
- Kubasek WL, Shirley B, McKillop A, Goodman HM, Briggs W, Ausubel F. 1992. Regulation of Flavonoid Biosynthetic Genes in Germinating *Arabidopsis* Seedlings. *The Plant Cell*. 4: 1229-1236.
- Kucera B, Cohn M, and Leubner-Metzger G. 2005. Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination *Seed Science Research*. 15, 281–307.
- Kumar MB, Martin RC, Nonogaki H. 2011. Isolation of microRNAs that regulate seed dormancy and germination. *Methods Mol Biol*. 773:199-213

- Kus JV, Zaton K, Sarkar R, Cameron RK. 2002. Age-related resistance in *Arabidopsis* is a developmentally regulated defense response to *Pseudomonas syringae*. *Plant Cell*. 14 (2): 479-90.
- Kutchan TM, Rush M, Coscia CJ. 1986. Subcellular localization of alkaloids and dopamine in different vacuolar compartments of *Papaver bracteatum*. *Plant Physiology*, 81 (1): pp. 161–166.
- Kutchan TM, Zenk MH. 1993. Enzymology and molecular biology of benzophenanthridine alkaloid biosynthesis. *J. Plant Res.* 3:165–73.
- Kutchan TM. 1995. Alkaloid Biosynthesis. The Basis for Metabolic Engineering of Medicinal Plants. *Plant Cell*. 7(7): 1059–1070.
- Kutchan TM. 2001. Ecological arsenal and developmental dispatcher. The paradigm of secondary metabolism plant physiology. *Plant Physiol.* 125: 58–60. doi: 10.1104/pp.125.1.58
- Kutchan TM. 2005. A role for intra- and intercellular translocation in natural product biosynthesis. *Curr Opin Plant Biol* 8: 292–300. doi: 10.1016/j.pbi.2005.03.009
- Laitinen ML, Julkunen-Tiitto R, Tahvanainen J, Heinonen J, Rousi M (2005). Variation in birch (*Betula pendula*) shoot secondary chemistry due to genotype, environment, and ontogeny. *J. Chem. Ecol.* 31: 697–717
- Langenheim J H. 2001. Contribuciones de los estudios de largo plazo a la teoría de la defensa química: perspectivas con árboles resinosos de zonas templadas y tropicales. En: Anaya AL, Espinosa-García F, Cruz-Ortega R. Relaciones químicas entre organismos: aspectos básicos y perspectivas de su aplicación. Plaza y Valdes, México. 7: 251-304.
- Leboeuf M, Cavé A, Bhaumik PK, Mukherjee BR. 1982. The Phytochemistry of the Annonaceae. *Phytochemistry* 21 (12): 2783-2813. doi: 10.1016/0031-9422(80)85046-1
- Lee JJ, Jin CM, Kim YK, Ryu SY, Lim SC, Lee MK. 2008. Molecules. Effects of anonaine on dopamine biosynthesis and L-DOPA-induced cytotoxicity in PC12 cells. 13(2):475-87.
- Leete E, Marion L. 1954. The biogenesis of alkaloids. X. The origin of the N-methyl groups of the alkaloids of barley. *Canadian Journal of Chemistry*. 32 (7): 646-649.
- Leete E. 1975. Biosynthesis and metabolism of gramine in *Lupinus hartwegii*. *Phytochemistry*. 14 (2): 471-474,
- Li RK, Elie CM, Clayton GE, Ciblak MA. 2000. Comparison of a new colorimetric assay with the NCCLS Broth Microdilution Method (M-27A) for antifungal drug MIC determination. *J. Clin. Microbiol.* 38, 2334 – 2338.
- Lillehoj EB. 1992. Aflatoxin: genetic mobilization agent. In: *Mycotoxins in Ecological Systems, Handbook of Applied Mycology*. Vol. 5. Bhatnagar D, Lillehoj EB, Arora DK, eds. Marcel Dekker, New York, 1-22
- Liscombe DK, MacLeod BJ, Loukanina N, Nandi OI, Facchini PJ. 2005. Evidence for the monophyletic evolution of benzyloquinoline alkaloid biosynthesis in angiosperms. *Phytochemistry* 66: 1374–1393. doi: 10.1016/j.phytochem.2005.04.029
- Liu CY, Chen YW, Cheng MJ, Leel SJ, Abd El-Razek, MH, Chang WH, Chen YJ, Chen, IS. 2008. Cytotoxic constituents from the root wood of formosan *Michelia compressa*. *J. Chil. Chem. Soc.* 53 (2): 1523-1524 .
- Liu DL, Lovett JV. 1993. Biologically active secondary metabolites of barley II. Phytotoxicity of barley allelochemicals. *Journal of Chemical Ecology*. 19 (10): 2231-2244.
- Liu Z, Carpenter SB, Bourgeois WJ, Yu Y, Constantin RJ, Falcon MJ, Adams JC. 1998. Variations in the secondary metabolite camptothecin in relation to tissue age and season in *Camptotheca acuminata*. *Tree Physiol.* 18(4):265-270.
- López-Amorós MLT, Hernández T, Estrella I. 2006. Effect of germination on legume phenolic compounds and their antioxidant activity. *Journal of Food Composition and Analysis*. 19 (4): 277-283

- López-Meyer M, Nessler CL. 1997. Tryptophan decarboxylase is encoded by two autonomously regulated genes in *Camptotheca acuminata* which are differentially expressed during development and stress. *The Plant Journal*, 11: 1167–1175.
- Lorence A, Nessler CL. 2004. Camptothecin, over four decades of surprising findings. *Phytochemistry* 65, 2735–2749.
- Loyola Vargas VM, Sánchez Iturbe P, Canto Canché B, Gutiérrez Pacheco LC, Galaz Ávalos RM, Moreno Valenzuela O. 2004. Biosíntesis de los alcaloides indólicos. Una revisión crítica. *Journal of the Mexican Chemical Society*, 67-94.
- Loyola-Vargas V, Galaz-Ávalos R, Kú-Cauich R. 2007. Catharanthus biosynthetic enzymes: the road ahead” *Phytochem Rev* 6, 307-339
- Lozovaya VV, Lygin AV, Li S, Hartman GL, Widholm JM. 2004. Biochemical Response of Soybean Roots to *Fusarium solani* f. sp. *glycines* *Infection Crop Sci.* 44: 819-826
- Lu J, Zhao H, Chen J, Fan W, Dong J, Kong W, Sun J, Cao Y, Cai G. 2007. Evolution of phenolic compounds and antioxidant activity during malting. *J Agric Food Chem.* 55 (26):10994-1001.
- Luk LY, Bunn S, Liscombe DK, Facchini PJ, Tanner ME. 2007. Mechanistic studies on norcoclaurine synthase of benzyloisoquinoline alkaloid biosynthesis: an enzymatic Pictet-Spengler reaction. *Biochemistry* 46:10153–61.
- Luna-Cazáres LM, De la Cruz Chacón I, González-Esquinca AR. 2003. Actividad insecticida de *Annona diversifolia* Safford sobre *Culex pipiens quinquefasciatus*. *Memorias del V Congreso Mexicano de Etnobiología*. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Estado de México. Pág. 99.
- Luna-Cazáres LM, González-Esquinca AR. 2008. Actividad antibacteriana de extractos de *Annona diversifolia* Safford y *Annona purpurea* Mociño & Sessé ex Dunal. *Polibotánica* (25): 121-125.
- Luna-Cazares LM, Gonzalez-Esquinca AR. 2010. Susceptibility of complete bacteria and spheroplasts of *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella typhi* to rolliniastatin-2. *24* (12): 1139-1145
- Macías-Rubalcava ML, Hernández-Bautista BE, Anaya AL. 2008. Production of allelopathic glycosidic resins in seeds and early development stages of *Ipomoea tricolor* L. (Convolvulaceae). *Allelopathy Journal.* 21 (1): 107-118.
- Magnotta M, Murata J, Chen J, De Luca V. 2006. Identification of a low vindoline accumulating cultivar of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don by alkaloid and enzymatic profiling. *Phytochemistry.* 67(16):1758-64.
- Mann JD, Steinhart CE, Mudd HS. 1963. The distribution and formation of tyramine methyltransferase during germination of barley. *J. Biol. Chem.* 238 (2) 676-681.
- Mann JR, Davidson S, Hobbs JB, Banthorpe DV, Harborne JB. 1994. *Natural Products: Their Chemistry and Biological Significance*
- Marques IA, Brodelius P. 1988. Elicitor-induced L-tyrosine decarboxylase from plant cell suspension cultures. II. Partial characterization. *Plant Physiol* 88: 52–55
- Martin RC, Liu PP, Goloviznina NA, Nonogaki H. 2010. microRNA, seeds, and Darwin?: diverse function of miRNA in seed biology and plant responses to stress. *Journal of Experimental Botany.* 61 (9): 2229–2234.
- Martin T, Oswald O, Graham IA. 2002 Arabidopsis Seedling Growth, Storage Lipid Mobilization, and Photosynthetic Gene Expression Are Regulated by Carbon:Nitrogen Availability. *Plant Physiology.* 128 (2): 472-481
- Martínez AV. 1990 La Papaua. Yashté. Instituto de Historia Natural. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. Mexico. 5: 1-5.
- Matile P. 1984. Das toxische Kompartiment der Pflanzenzelle. *Naturwissenschaften*, 71: pp.18–24.

- Matsuda F, Hirai MY, Sasaki E, Akiyama K, Yonekura-Sakakibara K, Provart NJ, Sakurai T, Shimada Y, Saito K. 2010. AtMetExpress development: a phytochemical atlas of *Arabidopsis* development. *Plant Physiology*. 152, 566–578
- Matsuda K, Kikuta Y, Haba A, Nakayama K, Katsuda Y, Hatanaka A, Komai K. 2005. Biosynthesis of pyrethrin I in seedlings of *Chrysanthemum cinerariaefolium*. *Phytochemistry* 66(13):1529-35
- Matsuo H, Taniguchi K, Hiramoto T, Yamada T, Ichinose Y, Toyoda K, Takeda K, Shiraishi T. 2001. Gramine increase associated with rapid and transient systemic resistance in barley seedlings induced by mechanical and biological stresses. *Plant Cell Physiol*. 42 (10): 1103-11.
- Maxwell CA, Hartwig U, Joseph C, Phillips DA. 1989. Chalcone and two related flavonoids released from alfalfa roots induce nod genes of *Rhizobium meliloti*. *Plant Physiol*. 91: 842-847.
- McArthur C, Loney PE, Davies NW, Jordan GJ. 2010. Early ontogenetic trajectories vary among defence chemicals in seedlings of a fast-growing eucalypt. *Austral Ecology* 35, 157-166
- McCall PJ, Turlings TCJ, Loughrin J, Proveaux AT, Tumlinson JH. 1994. Herbivore-induced volatile emissions from cotton (*Gossypium hirsutum* L.) seedlings. *J Chem Ecol* 20: 3039-3050
- McKey D. 1974. Adaptive patterns in alkaloid physiology. *American Naturalist* 108:305–320.
- Menachery MD. 1996. The Alkaloids of South American Menispermaceae. En: *The Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives*. Editado por Pelletier W.S. Pergamon. Vol. 11. 297-298.
- Minami H, Dubouzet E, Iwasa K, Sato F. 2007. Functional analysis of norcoclaurine synthase in *Coptis japonica*. *The Journal of Biological Chemistry*. 282 (09): 6274–6282
- Ministerio de Agricultura. 1976. Reglas Internacionales para Ensayos de Semillas. Instituto. Nacional de Semillas y plantas de vivero. Dirección General de la Producción Agraria, reimpresso por la SARH, México.
- Minorsky PV. 2002. Trigonelline: a diverse regulator in plants. *Plant Physiology*. 128: 7–8.
- Miranda-Ham M, Islas-Flores I, Vazquez-Flota F. 2008. Alkaloids in periwinkle seedlings ("*Catharanthus roseus*") as a model for the study of plant-environment interactions biochemistry andm biology education. 35 (3): 206-210
- Mithöfer A, Boland W. 2012. Plant defense against herbivores: chemical aspects. *Annual Review of Plant Biology*. 63:431-50.
- Mohr PG, Cahill DM. 2001. Relative roles of glyceollin, lignin and the hypersensitive response and the influence of ABA in compatible and incompatible interactions of soybeans with *Phytophthora sojae*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 58 (1): 31-41.
- Mondranonda IO, Che C.T., Rimando A.M., Vajrodaya S., Fong H. H.S., & Farnsworth N.R. 1990. Sesquiterpene lactones and other constituents from a cytotoxic extract of *Michelia floribunda*. *Pharmaceut.Res.* 7, 1269-1275.
- Montanha JA, Amoros M, Boustie J, Girre L. 1995. Anti-herpes virus activity of aporphine alkaloids. *PlantaMed.* 61, 419-424.
- Monteiro MCM, Leptokarydis IH, Silva GH, da Silva VC, Bolzani VS, Young M. C. M., Lopes MN. 2007. Constituintes químicos isolados dos caules de *Michelia champaca*. L. (Magnoliaceae). *Eclat. Quím.* 32, 13-18
- Montenegro H, Gutiérrez M, Romero LI, Ortega-Barría E, Capson TL, Cubilla L. 2003. Aporphine alkaloids from *Guatteria* spp. with lesihmanicidal activity. *Planta Medica*. 60: 677-679.
- Mooney BP, Miernyk JA, Randall DD. 2002. The complex fate of alpha-ketoacids. *Annu Rev Plant Biol.* 2002;53:357-75.

- Moreira DL, Leitão GG. 2001. Quantitative determination of liriodenine and moupinamide in five species of *Mollinedia* by high performance liquid chromatography. *Phytochem Anal.* 12 (4): 223-225.
- Morita M, Shitan N, Sawada K, Van Montagu MC, Inzé D, Rischer H, Goossens A, Oksman-Caldentey KM, Moriyama Y, Yazaki K. 2009. Vacuolar transport of nicotine is mediated by a multidrug and toxic compound extrusion (MATE) transporter in *Nicotiana tabacum*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106(7):2447-52. doi: 10.1073/pnas.0812512106
- Morris PF, Savard ME, Ward EWB. 1991. Identification and accumulation of isoflavonoids and isoflavone glucosides in soybean leaves and hypocotyls in resistance responses to *Phytophthora megasperma* f sp glycinea. *Physiol Mol Plant Pathol.* 39:229–234.
- Müeller MJ, Zenk MH. 1992. The norcoclaurine pathway is operative in berberine biosynthesis in *Coptis japonica*. *Planta Medica.* 58, 524-527.
- Mukherjee KS, Bhattacharya P, Mukherjee RK. 1986. Chemical examination of *Nymphaea stellata* Willd. *J. Ind. Chem. Soc.* 63, 538.
- Müntz K, Belozersky MA, Dunaevsky YE, Schlereth A, Tiedemann J. 2001. Stored proteinases and the initiation of storage protein mobilisation in seeds during germination and seedling growth. *Journal Experimental Botany.* 2 (52) 1741–1752.
- Müntz K. 1998. Deposition of storage proteins. *Plant Molecular Biology.* 38: 77–99
- Murphy A, Peer WA, Taiz L. 2000. Regulation of auxin transport by aminopeptidases and endogenous flavonoids. *Planta.* 211:315–324.
- Narukawa M, Kanbara K, Tominaga Y, Aitani Y, Fukuda K, Kodama T, Murayama N, Nara Y, Arai T, Konno M, Kamisuki S, Sugawara F, Iwai M, Inoue Y. 2009. Chlorogenic Acid Facilitates Root Hair Formation in Lettuce Seedlings. *Plant Cell Physiol.* 50: 504-514.
- NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) 1997. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard, NCCLS document M27-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA, USA.
- NC-IUB, Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry (1979) Units of Enzyme Activity. Recommendations 1978. *Eur. J. Biochem.* 97 (2): 319-320. doi: 10.1111/j.1432-1033.1979.tb13116.x.
- Nicholson RL, Kollipara SS, Vincent JR, Lyons Philip C, Cadena-Gomez G. 1987. Phytoalexin synthesis by the sorghum mesocotyl in response to infection by pathogenic and nonpathogenic fungi. *PNAS.* 84 (16): 5520-5524
- Niembro RA. 1988. Semillas de árboles y arbustos: ontogenia y estructura. Edición Limusa. México pp, 38-163.
- Niemeyer HM 1988. Hydroxamic acids (4-hydroxy-1,4-benzoxazin-3-ones): defence chemicals in the Gramineae. *Phytochemistry.* 27, 3349-3358
- Niemeyer HM, Pesel E, Copaja SV, Bravo HR, Franke S, Francke W. 1989b. Changes in hydroxamic acid levels of wheat plants induced by aphid feeding. *Phytochemistry* 28: 447-449.
- Niemeyer HM, Pesel E, Franke S, Francke W. 1989a. Ingestion of the benzoxazinone DIMBOA from wheat plants by aphids. *Phytochemistry* 28: 2307-2310.
- Niemeyer HM. 1988. Hydroxamic acids (4-hydroxy-1,4-benzoxazin-3-ones): defence chemicals in the Gramineae. *Phytochemistry* 27: 3349-3358.
- Nissanka AP, Karunaratne V, Bandara BM, Kumar V, Nakanishi T, Nishi M, Inada A, Tillekeratne LM, Wijesundara DS, Gunatilaka AA. 2001. Antimicrobial alkaloids from *Zanthoxylum tetraspermum* and *caudatum*. *Phytochemistry.* 56, 857-61.

- Nonogaki H, Chen F, Bradford KJ. 2007. Mechanisms and genes involved in germination sensu stricto. Capítulo 11, en Seed Development, Dormancy and Germination. Annual plant reviews vol. 27. .Editado por Kent Bradford and Hiroyuki Nonogaki. Blackwell Publishing Ltd
- Nonogaki H. 2008. Seed germination and reserve mobilization. In: eLS. John Wiley & Sons Ltd, Chichester. <http://www.els.net> [doi: 10.1002/9780470015902.a0002047.pub2]
- Nonogaki H. 2010. MicroRNA gene regulation cascades during early stages of plant development. *Plant Cell Physiol.* 51(11): 1840–1846
- Ober D, Hartmann T, 2000. Phylogenetic origin of a secondary pathway: the case of pyrrolizidine alkaloids. *Plant Mol. Biol.* 44,445–450
- Ochse J, Soule MT, Disman MJ, Wehlburrec C. 1986. Annonas. En: Cultivo y mejoramiento de plantas tropicales y subtropicales. Editoria Limusa. México pp: 616-634.
- Oksman-Caldentey KM, Häkkinen ST, Rischer H. 2007. Metabolic engineering of the alkaloid biosynthesis in plants: functional genomics approaches. Chapter 4. R. Verpoorte et al. (eds.). *Applications of Plant Metabolic Engineering*, 109–127. Springer.
- Oldroyd GED. 2001. Dissecting Symbiosis: Developments in *nod* factor signal transduction. *Annals of Botany* 87: 709-718.
- Ono E, Nakai M, Fukui Y, Tomimori N, Fukuchi-Mizutani M, Saito M, Satake H, Tanaka T, Katsuta M, Umezawa T, and Tanaka Y. 2006. Formation of two methylenedioxy bridges by a *Sesamum* CYP81Q protein yielding a furofuran lignan, (+)-sesamin. *PNAS.* 103(26):10116-21.
- Opitz S, Kunert G, Gershenzon J. 2008. Increased terpenoid accumulation in cotton (*Gossypium hirsutum*) foliage is a general wound response. *Journal of chemical ecology* 34(4):508-22.
- Osorio EJD, Montoya GLP, Muñoz D, Arango GJA. 2006. Antiplasmodial activity of aporphine alkaloids from *Rollinia pittieri* and *Pseudomalmea boyacana* (Annonaceae).
- Otani M, Shitan N, Sakai K, Martinoia E, Sato F, Yazaki K. 2005. Characterization of vacuolar transport of the endogenous alkaloid berberine in *Coptis japonica*. *Plant Physiol* 138: 1939–1946. doi: 10.1104/pp.105.064352.
- Park JM, Yoona SY, Gilesb KL, Songstadb DD, Eppsteinb D, Novakovskib D, Laurie Friesenb L, Roewer I. 1992. Production of sanguinarine by suspension culture of *Papayer somniferum* in bioreactors. *Journal of Fermentation and Bioengineering.* 74 (5): 292-296
- Parra-Garcés MI, Caroprese-Araque JF, Arrieta-Prieto D, Stashenko E. 2010. Morfología, anatomía, ontogenia y composición química de metabolitos secundarios en inflorescencias de *Lippia alba* (Verbenaceae). *Rev. Biol. Trop.* 58 (4): 1533-1548.
- Peer WA, Brown DE, Tague BW, Muday GK, Taiz L, Murphy AS. 2001. Flavonoid accumulation patterns of transparent testa mutants of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 126 (2): 536-48
- Pelletier SW. 1983. The nature and definition of an alkaloid. In: *Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives.* Vol.1. Ed: Pelletier, S.W, Wiley, NY. 1-31.
- Pérez Amador MC, García Argaez A, González Esquinca AR, Bratoeff E, Labastida C. 1999. Analisis del aceite de semillas de tres especies de *Annona*. Memorias del I congreso nacional de Anonáceas. Universidad Autónoma Chapingo. 27-29
- Pérez-Amador MC, González-Esquinca A, Garcia-Argaez A., Bratoeff E., Labastida C. 1997. Oil Composition and Flavonoid Profiles of the Seeds of Three *Annona* Species. *Phyton* 61: 77-80.

- Pérez-Amador MC, González-Esquinca A, Morales MC, Toriz F. 2004. Oxoaporphine alkaloids in *Guatteria diospyroides* Baill. and *Annona squamosa* L. (Annonaceae) *Phyton* 2004: 53-55.
- Periasamy K. 1962. The ruminant endospem: development and types of rumination. In: *Plant embryology. A symposium*. New Delhi. pp 62-74.
- Perkin Elmer 2007. *Catálogo de métodos. Aromatic Amino Acids on C18 (Fast Analysis)*. LC_307.
- Petri G. 1982. Biosynthesis of tropane alkaloids: the influence of precursors to intact plants and tissue cultures. *ISHS Acta Horticulturae* 306: International Symposium on Medicinal and Aromatic Plants, XXIII IHC.
- Phan APH, Ngo TT, Lenhoff HM. 1983. Tyrosine decarboxylase. Spectrophotometric assay and application in determining pyridoxal-5-phosphate. *Appl Biochem Biotechnol*. 8: 127-133. doi: 10.1007/BF02778093
- Pichersky E, Lewinsohn E. 2011. Convergent evolution in plant specialized metabolism. *Annu. Rev. Plant Biol.* 62:549–66.
- Pienkny S, Brandt W, Schmidt J, Kramell R, Ziegler J. Functional characterization of a novel benzylisoquinoline O-methyltransferase suggests its involvement in papaverine biosynthesis in opium poppy (*Papaver somniferum* L). *The Plant Journal* 2009; 60 (1): 56-67.
- Piñol MT, Javier Palazón P, Cusidó RM. 2008. Introducción al metabolismo secundario. Capítulo 17: En: *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. Editores Joaquín Azcón Bieto y Manuel Talón. Mc GrawHill Interamericana. p. 261-283.
- Pinto ACQ, Cordeiro MCR, de Andrade SRM, Ferreira FR, Filgueiras H, Alves RE, Kinpara D.I. 2005. *Annona* species. Taxonomy and Botany. In: Williams, J, T. (Chief editor). *International Centre Underutilised for Crops*. University of Southampton. Southampton, UK. Pp 3-16.
- Pirie MD, Doyle JA. 2012- Dating clades with fossils and molecules: the case of Annonaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 169: 84–116. doi: 10.1111/j.1095-8339.2012.01234.x
- Porras PGM. 1992. Estudio Preliminar sobre el letargo y germinación en *Annona diversifolia* Saff. Var. blanca. Tesis de Licenciatura. ICACH. Tuxtla, Gutiérrez, Chiapas. Pp. 19-21, 26-28, 52, 53, 65 y 68-70.
- Potter DA, Kimmerer TW. 1989. Inhibition of herbivory on young holly leaves: evidence for the defensive role of saponins. *Oecologia*. 78 (3): 322-329. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00379105>
- Poulin MJ, Bel-Rhliid R, Piché Y, Chênevert R. 1993. Flavonoids released by carrot (*Daucus carota*) seedlings stimulate hyphal development of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in the presence of optimal CO₂ enrichment. *J. Chem. Ecol*, 19, 2317-2327.
- Poustka F, Irani NG, Feller A, Lu Y, Pourcel L, Frame K, Grotewold E. 2007. A trafficking pathway for anthocyanins overlaps with the endoplasmic reticulum-to-vacuole protein-sorting route in *Arabidopsis* and contributes to the formation of vacuolar inclusions. *Plant Physiol.* 145(4):1323-35.
- Pung T. 2000. The isolation of natural products from plant extracts. Tesis de Maestría. Master of Science in Chemistry Virginia Polytechnic Institute and State University.
- Queiroz EF, Roblot F, Cavé A, Paulo MQ, Fournet A. 1996. Pseudoephedrine and spinosine, two catecholic berbines from *Annona spinescens*. *J Nat Prod*. 59(4):438-40.
- Rahman MM, Loppa SS, Sadik G, Harun Or Rashid, Islam R, Khondkar P, Alam AH, Rashid MA. 2005. Antibacterial and cytotoxic compounds from the bark of *Cananga odorata*. *Fitoterapia* 76, 758-761.
- Ramakrishna V, Jhansi Rani, Ramakrishna Rao. 2006. Anti-Nutritional factors during germination in Indian bean (*Dolichos lablab* L.) seeds. *World Journal of Dairy & Food Sciences* 1 (1): 06-11
- Raven PH, Ever RF, Eichorn S. 1999. *Biology of plants*. Sexta edición. W.H. Freeman
- Reinouts Van Haga P. 1954. Alkaloids in Germinating Seeds of *Atropa belladonna*. *Nature* 173, 692.

- Rengel Z, Kordan. HA. 1988. Photosensitivity of anthocyanin production in dark-grown and light-pretreated *Zea mays* seedlings. *Canadian Journal of Botany*. 66:(6) 1021-1027
- Reyes Trejo B, Coeto Juárez LP, Peralta Montero J, Marroquín Andrade L, Navarrete Castro A., Joseph Nathan P. 2000. Estudio fitoquímico biodirigido de las semillas de *Annona diversifolia* (Saff). Memorias del II congreso internacional de Anonáceas. Universidad Autónoma Chapingo. 89
- Reyes Trejo B, Marroquín Andrade L, Peralta MJ, Navarrete CA, Joseph-Nathan P. 1997. Laherradura: acetogenia activa de *Annona diversifolia* Saff. (llama). Memorias del I congreso internacional de Anonáceas. Universidad Autónoma Chapingo. 27-29
- Rezende CMA da M., Gottlieb OR, MC Marx. 1975. *Biological Systematics and Ecology*, 3 (63)
- Rhoades DF. 1979. Evolution of plant chemical defense against herbivores. Pages 4–54 in G. A. Rosenthal and D. H. Janzen, editors. *Herbivores: their interaction with secondary plant metabolites*. Academic Press, New York, New York, USA.
- Riesselman MH, Hazen KC, Cutler JE. 2000. Determination of antifungal MICs by a rapid susceptibility assay. *J. Clin. Microbiol.* 38, 333 – 340.
- Riley Saldaña CA. 2007. Actividad citotóxica y antimicrobiana de *Annona diversifolia* Safford. Tesis de Licenciatura en Biología. Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. México. Págs. 4-20.
- Roberts MF, Wink M. 1998. Introduction. In: *Alkaloids: Biochemistry, Ecology, and Medicinal Applications*. Eds: Roberts, M F. and Wink M. Plenum Press. NY and London, 1-7.
- Rohloff J, Bones A 2005. Volatile profiling of *Arabidopsis thaliana* – putative olfactory compounds in plant communication. *Phytochemistry* 66: 1941–1955.
- Rother A, Schwarting AE. 1975. The phenylquinolizidines of the seedlings of *Heimia salicifolia*. *Lloydia*. 38(6):477-88.
- Rout MK, Chrunoo NK. 1999. Mobilization of reserve proteins during early stages of seed germination in *Fagopyrum esculentum*. *Biologia Plantarum* 42 (1): 81-87.
- Roytrakul S, Verpoorte R. 2007. Role of vacuolar transporter proteins in plant secondary metabolism: *Catharanthus roseus* cell culture. *Phytochemistry Review*, 6: 383–396.
- Rozan P, Kuo YH, Lambein F. 2000. Free amino acids present in commercially available seedlings sold for human consumption. A potential hazard for consumers. *J. Agric. Food Chem.* 48, 716-723
- Rueda Pérez M. 2007. Actividad insecticida de *Annona diversifolia* Safford sobre *Anastrepha ludens* Loew. Tesis de Licenciatura en Biología. Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. México. Págs. 9-32.
- Rueffer M, Zenk MH. 1987. Distant precursors of benzylisoquinoline alkaloids and their enzymatic formation. *Z. Naturforsch., A: Phys.Sci.*, 1987, vol. C42, no. 4, pp. 319–332
- Rueffer M, Zenk MH. 1987. Enzymatic formation of protopines by a microsomal cytochrome P-450 system of *Corydalis vaginans*. *Tetrahedron Lett.* 28:5307–10.
- Rush MD, Kutchan TM, Coscia C. 1985. Correlation of the appearance of morphinan alkaloids and laticifer cells in germinating *Papaver bracteatum* seedlings. *Plant Cell Rep.* 4, 237 240.
- Saito K, Suzuki H, Yamashita Y, Murakoshi I. 1994. Isolation and enzymatic synthesis of an ester alkaloid, (-)-3 β -hydroxy-13 α -tigloyloxylupanine, from *Cytisus scoparius*. *Phytochemistry*. 36(2):309-311.
- Sakai K, Shitan N, Sato F, Ueda K, Yazaki K. 2002. Characterization of berberina transport into *Coptis japonica* cells and the involvement of ABC protein. *J. Exp. Bot.* 53: 1879–1886. doi:10.1093/jxb/erf052

- Samanani N, Alcantara J, Bourgault R, Zulak KG, Facchini PJ. 2006. The role of phloem sieve elements and laticifers in the biosynthesis and accumulation of alkaloids in opium poppy. *Plant J.* 47:547–63
- Samanani N, Facchini PJ. 2001. Isolation and partial characterization of norcoclaurine synthase, the first committed step in benzyloisoquinoline alkaloid biosynthesis, from opium poppy. *Planta.* 213(6):898-906. doi: 10.1007/s004250100581
- Samanani N, Facchini PJ. 2002. Purification and characterization of norcoclaurine synthase. The first committed enzyme in benzyloisoquinoline alkaloid biosynthesis in plants. *J. Biol. Chem.* 277:33878–83. doi: 10.1074/jbc.M203051200
- Samanani N, Liscombe DK, Facchini PJ. 2004. Molecular cloning and characterization of norcoclaurine synthase, an enzyme catalyzing the first committed step in benzyloisoquinoline alkaloid biosynthesis. *Plant Journal.* 40(2):302-13.
- Samanani N, Park SU, Facchini PJ. 2005. Cell type-specific localization of transcripts encoding nine consecutive enzymes involved in protoberberine alkaloid biosynthesis. *Plant Cell* 17:915–26
- Samanani N, Yeung EC, Facchini PJ. 2002. Cell typespecific protoberberine alkaloid accumulation in *Thalictrum flavum*. *J. Plant Physiol.* 139, 1189–1196.
- Schaffner U, Vrieling K, Meijden Van der E. 2003. Pyrrolizidine alkaloid content in *Senecio*: ontogeny and developmental constraints. *Chemoecology* 13 (1): 39-46.
- Scheible WR, Morcuende R, Czechowski T, Fritz Ch, Osuna D, Palacio Rojas N, Schindelasch D, Thimm O, Udvardi MK, Stitt M. 2004. Genome-Wide reprogramming of primary and secondary metabolism, protein synthesis, cellular growth processes, and the regulatory infrastructure of *Arabidopsis* in response to nitrogen. *Plant Physiol.* 136: 2483-2499
- Schiff PL. 1996. The *Thalictrum* Alkaloids: Chemistry and Pharmacology (1985-1995). En: *The Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives*. Editado por Pelletier W.S. Pergamon. Vol. 11. Chapter 1. 118-174.
- 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.
- Schmeller T, Latz-Brüning B, Wink M, 1997. Biochemical activities of berberine, palmatine and sanguinarine mediating chemical defence against microorganisms and herbivores. *Phytochemistry.* 44, 257–266
- Segura S, Lefebvre C, Carmona A, Medellín J, Marroquín L. 2010. Manejo fitosanitario para el control de la antracnosis en Anona (*Annona diversifolia* Saff). *Memorias del IV congreso internacional de Anonáceas.* Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. Pág. 9.
- Seigler DS. 1998. *Plant secondary metabolism*. Dordrecht-London, Kluwer Academic Publishers.
- Sempruch C, Leszczyński B, Wójcicka A, Makosz M, Chrzanowski G, Matok H. 2009. Changes in activity of triticale tyrosine decarboxylase caused by grain aphid feeding. *Polish J. of Environ. Stud.* 18 (5): 901-906.
- Shama M. 1967. Edited by. Manske R.H.F. The aporphine alkaloids. *The Alkaloids. Chemistry and Physiology.* Vol. IX. 1-39.
- Shama M. 1972. *The Isoquinoline Alkaloids*, Academic Press, New York.
- Shamma M, Castenson RL. 1973. The oxoaporphine alkaloids. Chapter 6. *The Alkaloids Chemistry and Physiology.* Volume XIV. Editor: Manske R.H.F. Academic Press Inc. 226-262
- Shen B, Zheng Z, Dooner HK. 2000. A maize sesquiterpene cyclase gene induced by insect herbivory and volicitin: Characterization of wild-type and mutant alleles. *PNAS.* 97 (26) : 14807–14812.
- Shimizu MM, Mazzafera P. 2000. A role for trigonelline during imbibition and germination of coffee seeds. *Plant Biology* 2, 605–611.

- Shimura H, Matsuura M, Takada N, Koda Y. 2007. An antifungal compound involved in symbiotic germination of *Cypripedium macranthos* var. *rebutense* (Orchidaceae) *Phytochemistry*. 68(10):1442-7.
- Shirley BW, Kubasek WL, Gisela Storz G, Bruggemann E, Koornneef M, Ausubel FM, Goodman HM. 1995. Analysis of Arabidopsis mutants deficient in flavonoid biosynthesis. *The Plant Journal*. 8(5): 659–671
- Shitan N, Bazin I, Dan K, Obata K, Kigawa K, Ueda K, Sato F, Forestier C, Yazaki K. 2003. Involvement of CjMDR1, a plant multidrug-resistance-type ATP-binding cassette protein, in alkaloid transport in *Coptis japonica*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 100,751–756.
- Shukla A, Shasany A, Gupta M, Khanuja S. 2006. Transcriptome analysis in *Catharanthus roseus* leaves and roots for comparative terpenoid indole alkaloid profiles. *Journal of Experimental Botany*. 57 (14): 3921–3932
- Shulgin AT, Perry WE. 2002. *The Simple Plant Isoquinolines*. Transform Press, Berkeley.
- Siegelman HW, Hendricks SB. 1957. Photocontrol of anthocyanin formation in turnip and red cabbage seedlings. *Plant Physiol*. 32(5):393–398
- Sigma 1995. Enzymatic assay of tyramine oxidase. Revised 02/28/95. http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/General_Information/tyramine_oxidase.Par.0001.File.tmp/tyramine_oxidase.pdf
- Silveira Zuanazzi JA, Clergeot PH, Quirion JC, Husson HP, Kondorosi A, Ratet P. 1998 Production of Sinorhizobium meliloti nod Gene Activator and Repressor Flavonoids from Medicago sativa Roots. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 11:8, 784-794
- Simas N. K., Ferrari S.F., Pereyra S. N. y Leitão G. G. 2001. Chemical Ecological Characteristics of Herbivory of Siparuna guianensis Seeds by Buffy-Headed Marmosets (Callithrix flaviceps) in the Atlantic Forest of Southeastern Brazil. *Journal of Chemical Ecology* 27(1):93-107.
- Simeon S, Rios JL and Villar A.1990. Antimicrobial activity of *Annona cherimola* Stem Bark alkaloids. *Pharmazie* 45: 442-443.
- Simões KJ, Du FS, Kretzshmar CD, Broeckling, Sterniz FS, et al. (2008) Phytotoxic catechin leached by seeds of the tropical weed *Sesbania virgata*. *J Chem Ecol* 34: 681–687.
- Singh, 1999. *Plant Aminoacids. Biochemistry and Biotechnology*. Marcel Dekker, New York. 518 págs.
- Singla D, Sharma A, Kaur J, Panwar B, Raghava GPS. 2010. BIADB: A curated database of benzylisoquinoline alkaloids. *BMC Pharmacol*. 10: 4
- Sitton D, West CA, 1975. Casbene: An anti-fungal diterpene produced in cell-free extracts of *Ricinus communis* seedlings. *Phytochemistry*. 14 (9):1921-1925.
- Sonnet PE, Jacobson M. 1971. Tumor inhibitors II: Cytotoxic alkaloids from *Annona purpurea*. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 60: 1254–1256.
- Southwell IA, Russell MF. 2003. The Sequential Onset of Terpenoid Biogenesis in Seedlings: Implications for *Melaleuca alternifolia* Chemotype Identification Prior to Plantation. *Acta Hort. (ISHS)* 597:31-47
- Stadler R, Zenk MH. 1993. The purification and characterization of a unique cytochrome P-450 enzyme from *Berberis stolonifera* plant cell cultures. *The Journal of Biological Chemistry* 1993; 268: 823-831.
- Stadler R; Kutchan TM; Zenk MH. 1989. Norcoclaurine is the central intermediate in benzylisoquinoline alkaloid biosynthesis. *Phytochemistry*. 28:1083-1086.
- Stamp N. 2003. Out of the quagmire of plant defense hypotheses. *Q Rev Biol*. 78(1):23-55.
- Standley PC, Steyermark JA. 1946. *Annonaceae. Flora de Guatemala. Fieldiana: Botany* 24 (Part IV) Chicago History Museum. 271 p.

- Steffens P, Nagakura N, Zenk MH. 1985. Purification and characterization of the berberine bridge enzyme from *Berberis beaniana* cell cultures. *Phytochemistry* 24:2577–83
- Stevens PF. 2011. Angiosperm Phylogeny Website. Version 9, June 2008. <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb>. Accessed 05 March 2011.
- Stévigny C, Bailly C, Quetin-Leclercq J. 2005. Cytotoxic and antitumor potentialities of aporphinoid alkaloids. *Curr. Med. Chem. Anti-Cancer Agents*. 5, 173-182.
- Suffness M, Cordell G. 1985. Antitumor Alkaloids. Chapter 1. En: *The Alkaloids Vol. XXV*. Editado por Brossi A. Academic Press Inc. Págs. 219-220.
- Suzuki H, Sasaki R, Ogata Y, Nakamura Y, Sakurai N, Kitajima M, Takayama H, Kanaya S, Aoki K, Shibata D, Saito K. 2008. Metabolic profiling of flavonoids in *Lotus japonicus* using liquid chromatography Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Phytochemistry*. 69(1):99-111.
- Suzuki T, Waller G. 1987. Allelopathy due to purine alkaloids in tea seeds during germination. *Plant and Soil* 98, 131-136.
- Taiz L, Zeiger E. 2006 . *Plant Physiology*. 3ª Edición. Editorial Sinauer Associates, Inc., Publishers. USA. 339-519.
- Taiz L, Zeiger E. 2010. Secondary metabolites and plant defense. Capítulo 13. *Plant Physiology*. Fifth Edition
- Takamatsu S, Saito K, Murakoshi I, Ohmiya S. 1991. New lupine alkaloids from the seedlings of of *Lupinus hirsutus* and change of alkaloid pattern with germination. *J.Nat.Prod.* 54 (2): 477-482.
- Takemura T, Ikezawa N, Iwasa K, Sato F. Molecular cloning and characterization of a cytochrome P450 in sanguinarine biosynthesis from *Eschscholzia californica* cells. *Phytochemistry* 2012; En prensa.
- Tawara JN, Stermitz FR, Blokhin A.V. 1995. Alkaloids of young ponderosa pine seedlings and late stpes in the biosynthesis of pinidine. *Phytochemistry*. 39 (3) 705-708
- Tegelberg R, Julkunen-Tiitto R, Aphalo P.J. 2004. Red:far-red light ratio and UV-B radiation: their effects on leaf phenolics and growth of silver birch seedlings. *Plant, Cell and Environment* 27, 1005-1013
- Terasaka K, Sakai K, Sato F, Yamamoto H, Yazaki K 2003. *Thalictrum minus* cell cultures and ABC-like transporter. *Phytochemistry* 62:483–489
- Thackray DJ, Wratten PJ, Edwards PJ, Niemeyer HM. 1990. Resistance to the aphids *Sitobion avenae* and *Rhopalosiphum padi* in Graminae in relation to hydroxamic levels. *Ann. Appl. Biol.* 116: 573-582.
- Thomas TL. 1993. Gene Expression during Plant Embryogenesis and Germination: An Overview *Plant Cell* 5: 1401-1410.
- Tian S, Nakamura K, and Kayahara H. 2004. Analysis of phenolic compounds in white rice, brown rice, and germinated brown rice. *J. Agric. Food Chem.*, 52(15):4808–4813,
- Toppel G, Witte L, Hartmann T. 1988. N-oxidation and degradation of pyrrolizidine alkaloids during germination of *Crotalaria scassellatii*. *Phytochemistry* Volume 27, Issue 12, Pages 3757-3761
- Trewavas A. 2003. Aspects of plant intelligence. *Annals of Botany*. 92: 1-20.
- Tso TC, Jeffrey RN. 1956. Studies on tobacco alkaloids. I. Changes in nicotine and nornicotine content in *Nicotiana*. *Plant Phvsiol.* 31(6): 433-440.
- Turlings TCJ, Lengwiler UB, Bernasconi ML, Wechsler D. 1998. Timing of induced volatile emissions in maize seedlings. *Planta*. 207 (1): 146-152
- Tyler VE. 1958. The ontogenesis of gramine in barley seedlings. *J. Pharm. Sci.*, 47: 97–98. doi: 10.1002/jps.3030470207

- Unterlinner B, Lenz R, Kutchan TM. 1999. Molecular cloning and functional expression of codeinone reductase: the penultimate enzyme in morphine biosynthesis in the opium poppy *Papaver somniferum*. *Plant J.* 18:465–75
- Valletta A, Santamaria AR, Pasqua G. 2007. CPT accumulation in the fruit and during early phases of plant development in *Camptotheca acuminata* Decaisne (Nyssaceae). *Nat Prod Res.* (14):1248-55.
- van der Fits LV, and Memelink J. 2000. ORCA3, a Jasmonate-Responsive transcriptional regulator of Plant primary and secondary metabolism. *Science*: 289 (5477): 295-297. doi: 10.1126/science.289.5477.295
- VanEtten HD, Mansfield JW, Bailey JA, Farmer EE. 1994. Two Classes of Plant Antibiotics: Phytoalexins versus "Phytoanticipins". *Plant Cell.* 6(9): 1191–1192.
- Vázquez-Flota F, Carrillo-Pech M, Minero-García Y, De Lourdes Miranda-Ham M. 2004. Alkaloid metabolism in wounded *Catharanthus roseus* seedlings. *Plant Physiol Biochem.* 42(7-8):623-8.
- Vázquez-Flota FA, St-Pierre B, De Luca V. 2000. Light activation of vindoline biosynthesis does not require cytomorphogenesis in *Catharanthus roseus* seedlings. *Phytochemistry.* 55(6):531-6.
- Velázquez-del Valle MG; Bautista-Baños S, Hernández-Lauzardo AN, Guerra-Sánchez MG, Amora-Lazcano E. 2008. Estrategias de control de *Rhizopus stolonifer* Ehrenb. (Ex Fr.) Lind, Agente Causal de Pudriciones Postcosecha en Productos Agrícolas. *Revista Mexicana de Fitopatología.* 26 (1): 49-55
- Verpoorte R. 2000. Secondary metabolites. In: Verpoorte R, Alfermann AW (eds) *Metabolic engineering of plant secondary metabolism.* Kluwer Academic Publ, Dordrecht, pp 1–29
- Villar A, Mares M, Rios JL, Canton E, Gobernado M. 1987. Antimicrobial activity of benzyloquinoline alkaloids. *Pharmazie.* 42, 248-50.
- Vrieling K, van Wijk CA . 1994. Cost assessment of the production of pyrrolizidine alkaloids in ragwort (*Senecio jacobaea* L.). *Oecologia* 97:541–546.
- Waechter AI, Cavé A, Hocquemiller R, Bories C, Muñoz V, Fournet A. 1999. Antiprotozoal activity of aporphine alkaloids isolated from *Unonopsis buchtienii* (Annonaceae). *Phytother Res.* 13, 175 -177.
- Wang W., Alché J.D., Castro A.J. y Rodríguez García M.I. 2001. Characterization of seed storage proteins and their synthesis during development in *Olea europaea*. *Int. J. Dev. Biol.* 45 (s1): 63-64
- Warthen D, Gooden EL, Jacobson M. 1969. Tumor inhibitors: liriodenine, a cytotoxic alkaloid from *Annona glabra*. 1969. *J Pharm Sci.* 58(5):637-8.
- Waterman PG. 1985. The Indolosesquiterpene Alkaloids of the Annonaceae. *Alkaloids: chemical and biological perspectives.* John Wiley & Sons Inc. Vol. 3. 91-112.
- Waterman PG. 1998. *Alkaloid Chemosystematics.* Chapter 14. *The Alkaloids: Chemistry and Biology* Vol. 50. Editado por Geoffrey A. Cordell. Academic Press. 533-567
- Weeks W, Bush LP. 1974. Alkaloid changes in tobacco seeds during germination. *Plant Physiol.* 53, 73–75.
- Weid M, Ziegler J, Kutchan TM. 2004. The roles of latex and the vascular bundle in morphine biosynthesis in the opium poppy, *Papaver somniferum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101:13957–62
- Weidner S, Karamac M, Amarowicz R, Szypulska E, Golewska AC 2007. Changes in composition of phenolic compounds and antioxidant properties of *Vitis amurensis* seeds germinated under osmotic stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, vol: 29, number: 3, pages: 283-290.
- Weiergang I, Hipskind JD, Nicholson RL. 1996. Synthesis of 3-deoxyanthocyanidin phytoalexins in sorghum occurs independent of light. *Physiol Mol Plant Pathol* 49: 377-388

- Weir TL, Bais HP, Vivanco JM. 2003 Intraspecific and interspecific interactions mediated by a phytotoxin, (-)-catechin, secreted by the roots of *Centaurea maculosa* (spotted knapweed). *Journal of Chemical Ecology*. 29 (11): 2397-2412.
- Weitbrecht K, Müller K & Leubner-Metzger G. 2011. First off the mark: early seed germination. *Darwin Review. Journal of Experimental Botany*. 62 (10): 3289–3309.
- William RD, Ellis BE. 1989. Age and tissue distribution of alkaloids in *Papaver somniferum*. *Phytochemistry*. 28 (8): 2085-2088.
- Wink M, Botschen F, Gosmann Ch, Schäfer H, Waterman PG. 2010. Chemotaxonomy seen from a phylogenetic perspective and evolution of secondary metabolism. In Wink M (ed) *Biochemistry of plant secondary metabolism*, Second edition Annual Plant Reviews. Wiley-Blackwell, Oxford, UK. 40: 364-433
- Wink M, Roberts MF. 1998. Compartmentation of alkaloids synthesis, transport and storage. Chapter 10. In Roberts MF & Wink M (eds) *Alkaloids: biochemistry, ecology, and medicinal applications*, Plenum Press, New York. pp. 239-262.
- Wink M, Schmeller, Lantz-Bruning B. 1998. Modes of action of allelochemical alkaloids: interaction with neuroreceptors, DNA, and other molecular targets. *Journal of Chemical Ecology*, Vol. 24, No. 11
- Wink M, Witte L. 1985. Quinolizidine alkaloids as nitrogen source for lupin seedlings and cell suspension cultures. *Zeitschrift für Naturforschung* 40c, 767–775.
- Wink M. 1983. Inhibition of seed germination by quinolizidine alkaloids. *Aspects of allelopathy in Lupinus albus L.* *Planta*158:365-368
- Wink M. 1987. Site of lupanine and sparteine biosynthesis in intact plant and in vitro organ cultures. *Zeitschrift für Naturforschung, C: Journal of Biosciences* 42 868–872
- Wink M. 1998. Chemical ecology of alkaloids. Chapter 11. *Alkaloids: Biochemistry, Ecology and medicinal applications*. Edited by Roberts and Wink. Plenum Press. New York. 265-300.
- Wink M. 2003. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry* 64, 3–19.
- Wink M. 2006. Importance of plant secondary metabolites for protection against insects and microbial infections. Chapter 11. In: *Naturally Occurring Bioactive Compounds*. Edited by Rai and Carpinella. Elsevier B.V. Págs 251-267
- Wink M. 2008a. Ecological Rol Alkaloids. *Modern Alkaloids: Structure, Isolation, Synthesis and Biology*. Edited by E. Fattorusso, Tagliatela-Scafati O. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim
- Wink M. 2008a. Plant secondary metabolism: diversity, function and its evolution. *Nat. Prod. Commun.* 3 (8): 1205–16.
- Wink M. 2008b. Ecological Roles of Alkaloids. En *Modern Alkaloids. Structure, Isolation, Synthesis and Biology*. Edited by Fattorusso E. y Orazio Tagliatela-Scafati O. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim Págs. 3-24.
- Wink M. 2010. Introduction: Biochemistry, physiology and ecological functions of secondary metabolites. In Wink M (ed) *Biochemistry of plant secondary metabolism*, Second edition Annual Plant Reviews. Wiley-Blackwell, Oxford, UK. 40: 1-19.
- Winkel-Shirley B. 2002. Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Curr Opin Plant Biol* 5: 218–223.
- Wirasathien L, Boonarkart Ch, Pengsuparp T, Suttisri R. 2006. Biological activities of alkaloids from *Pseuderaria setosa*. *Pharm Biol.* 44, 274- 278.

- Woo SH, Reynolds M.C.; Sun N.J.; Cassady J.M., and Snapka R.M. 1997. Inhibition of topoisomerase II by lirioidenine. *Biochem Pharmacol.* 54, 467-473.
- Woo SH, Sun N.J., Cassady J.M., and Snapka R.M. 1999. Topoisomerase II inhibition by aporphine alkaloids. *Biochem Pharmacol.* 57, 1141 -1145.
- Wratten SD, Thackray DJ, Edwards PJ, Niemeyer HM. 1988. Effects of hydroxamic acids on the resistance of wheat to the aphid *Sitobion avenae*. In: *Integrated Crop Protection in Cereals*. Cavalloro, R. & Sunderland, K.D., eds., A.A. Balkema, Rotterdam, C.E.C. 57-60.
- Wronka M, Lewak S, Tykarska T, Kuras M, Zobel AM. 1994 Localization of phenolic compounds in the root cap columella of six-year-old dry seeds of *Brassica napus* during imbibition and germination. *Ann. Bot.* 74. 321-326.
- Wu C. C. 2006. Study on antifungal compounds of *Michelia formosana*. Master Thesis: School of Forestry and Resource Conversion, National Taiwan University, Taipei, Taiwan.
- Wu CC, Wu CL, Huang SL, Chang HT. 2011. Antifungal activity of Lirioidenine from *Michelia formosana* heartwood against wood-rotting fungi. *Wood Science and Technology*. DOI: 10.1007/s00226-011-0428-9
- Wu YC, Chang GY, Duh CY, Wang SK. 1993. Cytotoxic alkaloids of *Annona Montana*. *Phytochemistry* 33 (2): 497-500.
- Wu YC, Liou YF, Lu ST, Chen CH, Chang JJ, Lee KH. 1989. Cytotoxicity of isoquinoline alkaloids and their N-oxides *Planta Med.* 55 (2): 163-165.
- Wu YC, Lu ST, Chang JJ; Lee KH. 1988. Cytotoxic aporphinoid alkaloids from *Thalictrum sessile*. *Phytochemistry.* 27, 1563-1564.
- Wu YC, Lu ST, Wu TS, Lee KH. 1987. Kuafumine, a novel cytotoxic oxoaporphine alkaloid from *Fissistigma glaucescens*. *Heterocycles.* 26: 9-12.
- Wu Z, Song L, Huang D. 2011. Food grade fungal stress on germinating peanut seeds induced phytoalexins and enhanced polyphenolic antioxidants. *J Agric Food Chem.* 59 (11): 5993-6003.
- Xie YS, Arnason JT, Philogène BJR, Atkinson J, Morand P. 1991. Distribution and variation of hydroxamic acids and related compounds in maize (*Zea mays*) root system. *Canadian Journal of Botany.* 69 (3): 677-681.
- Yang CH, Cheng MJ, Lee SJ, Yang CW, Chang HS, Chen IS. 2009. Secondary metabolites and cytotoxic activities from the stem bark of *Zanthoxylum nitidum*. *Chem Biodivers.* 6(6):846-57.
- Yazaki K, Sugiyama A, Morita M, Shitan N. 2008. Secondary transport as an efficient membrane transport mechanism for plant secondary metabolites. *Phytochemistry Review* 7: 513–524.
- Yazaki K. 2005. Transporters of secondary metabolites. *Current Opinion Plant Biology.* 8: 301–307.
- Yazaki K. 2006. ABC transporters involved in the transport of plant secondary metabolites. *FEBS Letters,* 580 (4):1183-1191
- Yokoyama S, Hiramatsu J.I. 2003. A modified ninhydrin reagent using ascorbic acid instead of potassium cyanide. *Journal of Bioscience and Bioengineering.* 95 (2) 204-205.
- Zabala G, Zou J, Tuteja J, Gonzalez DO, Clough SJ, Vodkin LO. 2006. Transcriptome changes in the phenylpropanoid pathway of *Glycine max* in response to *Pseudomonas syringae* infection. *BMC Plant Biology* 6:26
- Zadoks JC, Chang TT, Konzak CF. 1974. A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed Research.* 14: 415-21
- Zafra-Polo MC, Figadere B, Gallardo T, Tormo JR, Cortes D. 1998. Natural acetogenins from Annonaceae, synthesis and mechanisms of action; *Phytochemistry* 48 1087–1117

- Zafra-Polo MC, González MC, Estornell E, Sahpaz S, Cortes D. 1996. Acetogenins from Annonaceae, inhibitors of mitochondrial complex I. *Phytochemistry*. 42(2):253-71.
- Zangerl AR, Bazzaz FA. 1992. Theory and pattern in plant defense allocation. Pages 363–391 in R. S. Fritz and E. L. Simms, editors. *Plant resistance to herbivores and pathogens: ecology, evolution, and genetics*. University of Chicago Press, Chicago, Illinois, USA.
- Zavala Hernández F, Ballesteros Patrón G. 2000. Perspectivas de las anonáceas en México: Caso de la ilama (*Annona diversifolia* Saff). *Memorias del I congreso nacional de Anonáceas*. Universidad Autónoma Chapingo. 27-29.
- Zenk M, Rueffer M, Amann M, Deus-Neumann B, Nagakura N. 1985. Benzylisoquinoline biosynthesis by cultivated plant cells and isolated enzymes. *Journal of Natural Products*. 48 (5): 725-738.
- Zenk MH, Juenger M. 2007. Evolution and current status of the phytochemistry of nitrogenous compounds. *Phytochemistry* 68: 2757–2772
- Zenk MH, Rueffer M, Amann M, Deus-Neumann, Nagakura N. 1985. Benzylisoquinoline biosynthesis by cultivated plant cells and isolated enzymes. *J. Nat. Prod.* 48 (5): 725-738. doi: 10.1021/np50041a003
- Zenk MH. 1994. The formation of benzophenthridine alkaloids. *Pure and Applied Chemistry*. 66 (10-11): 2023-2028.
- Zenner K, Bopp M. 1987. Anthocyanin turnover in *Sinapsis alba* L. *Journal of Plant Physiology*. 126 (4-5): 475-482.
- Zhang DX, Nagabhyru P, Schardl CL. 2009. Regulation of a chemical defense against herbivory produced by symbiotic fungi in grass plants. *Plant Physiol.*150 (2):1072-82.
- Zhang Z, ElSohly HN, Jacob MR, Pasco DS, Walker LA, Clark AM. 2002. New sesquiterpenoids from the root of *Guatteria multivenia*. *J Nat Prod.* 65(6):856-9.
- Zheng XQ, Ashihara H. 2004. Distribution, biosynthesis and function of purine and pyridine alkaloids in *Coffea arabica* seedlings. *Plant Science* 166, 807–813.
- Zheng XQ, Hayashibe E, Ashihara H. 2005. Changes in trigonelline (N-methylnicotinic acid) content and nicotinic acid metabolism during germination of mungbean (*Phaseolus aureus*) seeds. *Journal of Experimental Botany*. 56 (416): 1615–1623
- Zheng XQ, Matsui A, Ashihara H. 2008. Biosynthesis of trigonelline from nicotinate mononucleotide in mungbean seedlings. *Phytochemistry*. 69 (2): 390-395
- Zhou B, Li Y, Xu Z, Yan H, Homma S, Kawabata S. 2007. Ultraviolet A-specific induction of anthocyanin biosynthesis in the swollen hypocotyls of turnip (*Brassica rapa*). *J Exp Bot.*58 (7):1771-81.
- Ziegler J, Facchini PJ, Geißler R, Schmidt J, Ammera C, Kramell R, Voigtländer S, Gesell A, Pienkny S, Brandt W. 2009. Evolution of morphine biosynthesis in opium poppy. *Phytochemistry* 70: 1696–1707.
- Ziegler J, Facchini PJ. 2008. Alkaloid biosynthesis: metabolism and trafficking. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59:735–69. doi: 10.1146/annurev.arplant.59.032607.092730.
- Zobel AM, Schnug E, Wronka M, Tykarska T, Kuras M, Lewak S. 1994. Localization of phenolic compounds in aging seeds of *Brassica napus* and during their imbibition. *Acta Hort. (ISHS)* 381:104-108
- Zu Y, Tang Z, Yu J, Liu S, Wang W, Guo X. 2003. Different responses of camptothecin and 10-hydroxycamptothecin to heat shock in *Camptotheca acuminata* seedlings. *Acta Botanica Sinica*. 45 (7): 809-814

Anexos

Publicaciones derivadas de la tesis

Liriodenine alkaloid in *Annona diversifolia* during early development

I. de la Cruz Chacón and A.R. González-Esquinca*

Laboratorio de Fisiología y Química Vegetal, Facultad de Ciencias Biológicas,
Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas, Chiapas, México

(Received 24 May 2010; final version received 30 August 2010)

Plants of the Annonaceae family produce a series of alkaloids, including liriodenine oxoaporphine. Its distribution in these primitive angiosperms suggests that it plays an important role, but very little is known about which plant organs it accumulates in, or in which developmental stages it is synthesised. Accordingly, liriodenine production was studied during the early stages of germination and seedling development in *Annona diversifolia* Saff. Liriodenine samples were obtained from the roots and were characterised on the basis of spectroscopic data. Quantification was done by HPLC in the organs and tissues of newly collected seeds, seeds following 1-, 2-, 5- and 10-day imbibitions, upon emergence of the radicle and at the seedling stage. According to our results, liriodenine could not have originated from the parent plant, nor during embryogenesis because it appears for the first time in the endosperm approximately 5 days after the start of imbibition. Therefore, its synthesis does not depend directly on photosynthesis. During the seedling stage it is found in the root and the stem but it is absent from the cotyledonary leaves and the first true leaves. Liriodenine biosynthesis begins during the early stages of development in the endosperm and seed radicles.

Keywords: oxoaporphine alkaloid; *Annona*; seedling development; seed germination; endosperm; imbibition; radicle

1. Introduction

Amongst the metabolites most frequently found in the Annonaceae are the aporphinic alkaloids. These include liriodenine (Guinaudeau, Leboeuf, & Cavé, 1975, 1979, 1983, 1988, 1994), which is perhaps the most abundant oxoaporphinic discovered so far, having been identified in 44 genera and in 111 species (Bentley, 1997, 2000, 2002, 2003, 2004, 2005, 2006; González, 2001). It has also been isolated in the Araceae, Lauraceae, Magnoliaceae, Menispermaceae, Monimiaceae, Papaveraceae, Rhamnaceae and Ranunculaceae. It is particularly abundant in *Annona diversifolia* (up to 0.2% dry weight) and we infer that genetic expression for the synthesis of this molecule is enhanced in this species.

Liriodenine is a yellow needle oxoaporphine, fluorescent, plain with an oxo group in position 7 (Figure 1) (Cohen, Langenthal, & Taylor, 1961; Taylor, 1961).

*Corresponding author. Emails: aesquinca@unicach.mx; alesquinca@hotmail.com

Liriodenine, Early Antimicrobial Defence in *Annona diversifolia*

Iván De la Cruz-Chacón^a, Alma Rosa González-Esquinca^{a,*},
Patricia Guevara Fefer^b, and Luis Felipe Jiménez García^c

^a Laboratorio de Fisiología y Química Vegetal, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas, Libramiento Norte Poniente s/n. Col. Lajas Maciel, C. P. 29032, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México. Fax: +52-961-10-12-894. E-mail: aesquinca@unicach.mx

^b Departamento de Ecología y Recursos Naturales, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Cd. de México, Distrito Federal, México

^c Departamento de Biología Celular, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Cd. de México, Distrito Federal, México

* Author for correspondence and reprint requests

Z. Naturforsch. **66c**, 377–384 (2011); received November 25, 2010/March 26, 2011

Annonaceae aporphine alkaloids, of which liriodenine is the most abundant, have not been extensively studied from a biological standpoint. The goal of this study was to investigate the role of liriodenine in antimicrobial defense during early developmental stages in *Annona diversifolia*. The fungi *Rhizopus stolonifer* and *Aspergillus glaucus*, which are responsible for seed deterioration, were isolated during imbibition, and their antifungal activity was determined by diffusion, macrodilution, and metabolic inhibition assays using purified liriodenine and alkaloid extracts obtained from embryos, radicles, and roots at early developmental stages. The presence of liriodenine in extracts was quantified by high-performance liquid chromatography. Purified liriodenine and alkaloidal extracts inhibited both fungi, and there was a positive relationship between extract activity and amount of liriodenine contained therein. The quantity of liriodenine present in extracts suggests its importance in controlling other phytopathogens.

Key words: Alkaloid, Annonaceae, Early Development

Introduction

Plants are not able to move in search of a more suitable environment for growth and development. As such, they are often subjected to environmental stress caused by biotic or abiotic factors. This fact is probably one of the reasons why plants have acquired and perfected over thousands of years of evolution defense mechanisms that allow them to respond to external attacks, and therefore live in very different environments (Dixon, 2001; Hartmann, 2007).

Damage caused to plants by invading pathogens (bacteria, fungi, viruses, and viroids) or by herbivory frequently leads to metabolic responses aimed at the survival of the species. Such responses require the allocation of energy resources to build up stores of defense substances, involving a complete biosynthetic machinery based on a process of differentiation (Luckner, 1980; Wink, 2010). For example, *Manduca sexta* herbivory of *Nicotiana* leaves and flowers increases the amount of alkaloids in new leaves and flower nectar (Baldwin, 1999; Adler *et al.*, 2006).

Liriodenine (Fig. 1) is a benzylisoquinoline alkaloid (oxoaporphine) that has antibacterial (Hufford *et al.*, 1975, 1980; Villar *et al.*, 1987; Nissanka *et al.*, 2001; Rahman *et al.*, 2005; Wirasathien *et al.*, 2006), antifungal (Hufford *et al.*, 1980; Nissanka *et al.*, 2001; Rahman *et al.*, 2005), antiprotozoal (Waechter *et al.*, 1999; Wirasathien *et al.*, 2006), and cytotoxic (Chen *et al.*, 1997; De Siqueira *et al.*, 1998; Chang *et al.*, 2004; Wirasathien *et al.*, 2006) properties. To date, liriodenine has demonstrated activity against 22 phytopathogenic agents, mostly *in vitro* and seven *in situ* (Table I), which suggests

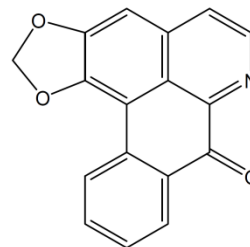


Fig. 1. Chemical structure of liriodenine.

Secondary metabolites during early development in plants

Iván De-la-Cruz Chacón · Christian Anabi Riley-Saldaña ·
Alma Rosa González-Esquinca



Received: 10 March 2012 / Accepted: 28 July 2012
© Springer Science+Business Media B.V. 2012

Abstract Early development is a critical stage in a plant's life, as the plant must establish itself in the ecosystem during this period. The secondary metabolites (SM) during this phase is a strategy that contributes to the survival of plant species. Through a review of the literature, a number of reports were found that investigated the presence of SM during germination and early plant development (phases 0 and 1 according to the Zadoks and BBCH scales). A total of 250 reports were found that investigated 99 species and nearly 200 SM that accumulate during this period of the plant life cycle. A large portion of the SM are biosynthesised *de novo*, whereas the remainder are derived in part or in total from the mother plant. In many cases, the resources for biosynthesis are supplied only by the reserve material of the endosperm or cotyledons, which

allows for independent photosynthesis. The presence of SM at these stages confers characteristics of more advanced stages, such as tissue-specific distribution, spatio-temporal regulation, and the individual regulation of all of the biosynthesised SM. The amount and diversity of SM are not universally related to the progress of plant development, but it is a widespread phenomenon. The early production of SM has ecological implications that involve defence mechanisms, relationships with microorganisms, and the role of these compounds as nitrogen reserves. This review contributes to the systematisation of studies on SM in the early stages of development.

Keywords Natural products · Early metabolism · Early defence · Germination · Seedling development

I. De-la-Cruz Chacón · C. A. Riley-Saldaña ·
A. R. González-Esquinca (✉)
Laboratorio de Fisiología y Química Vegetal, Facultad de
Ciencias Biológicas, Universidad de Ciencias y Artes de
Chiapas, Libramiento Norte Poniente 1150. Col. Lajas
Maciel, C. P. 29039 Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, Mexico
e-mail: aesquinca@unicach.mx

I. De-la-Cruz Chacón
e-mail: ivan.cruz@unicach.mx

C. A. Riley-Saldaña
e-mail: anabi_riley@hotmail.com

I. De-la-Cruz Chacón · C. A. Riley-Saldaña
Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional
Autónoma de México, Av. Ciudad Universitaria 3000,
C.P. 04360 Coyoacán, D.F., Mexico

Introduction

Germination and subsequent plant development are the initial stages for establishing a new individual of any plant species. The germination process begins with the consumption of water by the seed (imbibition) and ends in the *strict sense* according to Nonogaki et al. (2007) and Weitbrecht et al. (2011) when a part of the embryonic axis (usually the radicle) extends and crosses the seed coat (emergence). This emergence is the first evidence of seedling growth, and this initial development depends on the energy reserves of the endosperm and cotyledons (Bewley and Black 1994). These processes

Biosíntesis de alcaloides bencilisoquinolínicos

Iván De-La-Cruz Chacón^{1,2}, Alma Rosa González-Esquinca¹, Christian Anabí Riley-Saldaña^{1,2}

¹Laboratorio de Fisiología y Química Vegetal, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas, Chiapas, México.
²Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México; Distrito Federal, México.

*ivan.cruz@unicach.mx; aesquinca@unicach.mx; christian.riley@unicach.mx

Recibido: 14-07-2012; Aceptado: 05-08-2012

Resumen

Los alcaloides bencilisoquinolínicos (ABI) son metabolitos especializados con una distribución filogenética antigua pero conservada todavía en clados modernos. Varios de ellos, como la morfina, sanguinerina y berberina tienen importancia en la medicina moderna. En esta revisión se analizan los aspectos más sobresalientes del estado actual de la biosíntesis de ABI. Se han realizado estudios que han permitido conocer la biosíntesis de 22 de estos metabolitos nitrogenados. En su formación participan 43 enzimas agrupadas en oxidoreductasas, transferasas y liasas, que en algunos casos representan ejemplos atípicos de la forma en la que se originó la diversificación del metabolismo secundario, entre ellos proteínas citocromo P450 (CYP450) con actividades catalíticas para la ruta de los ABI, o la enzima norcoclaurina sintasa (NCS) que están emparentada con proteínas alergénicas de defensa. Así mismo, hay avances genéticos en los que se ha podido caracterizar 30 enzimas, permitiendo conocer procesos de regulación. Otro aspecto interesante es la compartimentación de los sitios de biosíntesis y acumulación de ABI ya que en varios casos están separados espacialmente y en distintas especies o en la misma pueden participar varios tipos de células. Ello ha sugerido el transporte intra e intercelular de los alcaloides, los precursores y de las enzimas, se ha documentado el transporte de berberina entre el citoplasma y las vacuolas del almacenamiento. El panorama de la biosíntesis de ABI se ha construido con los estudios de ejemplares de importancia farmacológica.

Palabras clave: metabolismo especializado, metabolismo secundario, transporte celular, compartimentación celular, regulación tejido-específica.

Abstract

Benzylisoquinoline alkaloid biosynthesis. The benzylisoquinoline alkaloids (BIA) are specialized metabolites with an ancient phylogenetic distribution, but still preserved in modern clades. Some of them, such as morphine, sanguinerine or berberine, are important for modern medicine. This review discusses the highlights of the current state of the biosynthesis of BIA. There have been studies that show the biosynthesis of 22 of these nitrogenous metabolites. In their formation there are 43 enzymes grouped into oxidoreductases, transferases and lyases, which in some cases represent atypical examples of the manner in which the secondary metabolism diversification was originated. Two of these examples are the cytochrome proteins P450 (P450), with catalytic activities for ABI route, or the norcoclaurine synthase enzyme (NCS), which share substantial identity with defense allergenic proteins. Likewise, there are genetic advances that have produced the characterization of 30 enzymes, allowing knowledge of regulatory processes. Another interesting aspect is the compartmentation of the biosynthesis sites and accumulation of BIA, since in several cases they are spatially separated and in different species, or in the same species several types of cells may be involved. This has suggested intra and intercellular transport of alkaloids, precursors and enzymes, and it has been documented berberine transport between the cytoplasm and the vacuoles of storage. The picture for the biosynthesis of BIA has been constructed with exemplary studies of alkaloids with pharmacological importance.

Key words: specialized metabolism, secondary metabolism, cellular transport, cell compartment, tissue-specific regulation.

De la Cruz-Chacón I. & AR González-Esquinca. 2010. Evaluación enzimática de la biosíntesis de alcaloides bencilisoquinolínicos en etapas tempranas de *A. diversifolia*. Memoria de resúmenes del IV congreso internacional Pág. 4.

EVALUACIÓN ENZIMÁTICA DE LA BIOSÍNTESIS DE ALCALOIDES EN ETAPAS TEMPRANAS DE *Annona diversifolia* Saff.

Enzymatic evaluation of alkaloid biosynthesis in early development of *Annona diversifolia* Saff.

de la Cruz Chacón Iván*, González-Esquinca Alma Rosa

Laboratorio de Fisiología y Química Vegetal. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. Libramiento Norte Poniente #1150. Col. Lajas Maciel. C.P. 29032. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México.

*delacruz277@hotmail.com

Oxoaporphine alkaloid; seedling development; secondary metabolism

En Annonaceae, los alcaloides bencilisoquinolínicos (ABI) parecen contribuir en el mecanismo de defensa contra fitopatógenos¹. Las enzimas Monofenol oxidasa (MFO EC 1.14.18.1), Amino oxidasa (AO EC: 1.4.3.4), Tirosina decarboxilasa (TyDC EC 4.1.1.25) y Norcoclaurina sintasa (NCS: EC 4.2.1.78) son las responsables de desviar los aminoácidos tirosina y fenilalanina hacia la biosíntesis de ABI². Nosotros hemos caracterizado la dinámica de producción de ABI y en particular del alcaloide liriodenina durante el desarrollo temprano de *Annona diversifolia*, lo que sugiere una asignación de recursos y la existencia del material enzimático para su generación. Para conocer algunos aspectos sobre la biosíntesis de ABI en *A. diversifolia* se plantea la determinación de la actividad de 4 enzimas que participan en la ruta bioquímica común a todos los ABIS, durante la germinación de esta especie.

Las actividades enzimáticas se midieron en diferentes órganos en 3 etapas durante el desarrollo temprano de plántulas (semillas con 5 días en imbibición, con 3 días de germinación y plántulas con primordio foliar y con 2 hojas), las evaluaciones se realizaron siguiendo protocolos modificados particulares a cada una de ellas^{3, 4, 5, 6}.

En las etapas de imbibición y germinación se detectó la actividad de las 4 enzimas solo en los embriones y no en los endospermos. Mientras que en plántulas con primordio foliar y con 6 hojas se determinó la actividad de TYDC, MFO, y AO en todos los tejidos mientras que la de NCS solo en tallos y raíces pero no en hojas.



La actividad exclusiva de las 4 enzimas en el embrión es una evidencia firme de que la biosíntesis de alcaloides en etapas tempranas esta controlada por el embrión y que por lo tanto las cantidades de liriodenina detectadas en el endospermo son llevadas ahí desde su lugar de producción. La actividad de NCS solo en raíces y tallos en plántulas señalarían a estos tejidos como sitios de biosíntesis y acumulación, así mismo la mayor actividad de NCS y la mayor acumulación de alcaloides en raíces pueden indicar que es el principal tejido productor de ABI en *A. diversifolia*.

Se concluye que los embriones en desarrollo y los tejidos de plántulas de *A. diversifolia* tienen la maquinaria biosintética capaz de producir alcaloides desde etapas tempranas. Y que esta biosíntesis no depende de la fotosíntesis.

1 Hufford, C.D., Sharma, A.S., & Oguntimein, B.O. (1980). Antibacterial and antifungal activity of liriodenine and related oxoaporphine alkaloids. *J Pharm Sci.* 69: 1180–1183. 2. Ziegler J. and. Facchini P.J. (2008). Alkaloid Biosynthesis: Metabolism and Trafficking. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59: 735–69. 3. Phan A.P.H., Ngo T.T. and Lenhoff H.M. (1983). Tyrosine decarboxilase. Spectrophotometric assay and application in determining pyridoxal-5-phosphate. *Applied biochemistry and biotechnology.* 8: 127-133. 4. Bilka F., Balazova A., Bilková A., Subr Z., Psenak M. (2003). Characterization of polyphenol oxidase from the latex of opium poppy. Brief communication. *Biologia Plantarum.* 47 (1): 111-115, 2003/4. 5. Bilková, A., Ková A., Bezakova A., Bilka F., Psenak M. (2005). An amine oxidase in seedlings of *Papaver somniferum* L. *Biologia Plantarum.* 49 (3): 389-394. 6. Minami H, Dubouzet E, Iwasa K, Sato F. 2007. Functional analysis of norcoclaurine synthase in *Coptis japonica*. *The Journal of Biological Chemistry.* 282 (09): 6274–6282.

Agradecimientos al Doctorado en Ciencias Biológicas de la UNAM y al CONACYT.

Algunos detalles experimentales

 Centro de Investigación Científica de Yucatán, AC.  Grupo de Estudios Microbiológicos Asociados a la Botánica

CVG-FA-16-A
Página 1 de 1

INFORME DE PRUEBAS

No. de Informe: 200904-08 Emisión: 2009-04-08

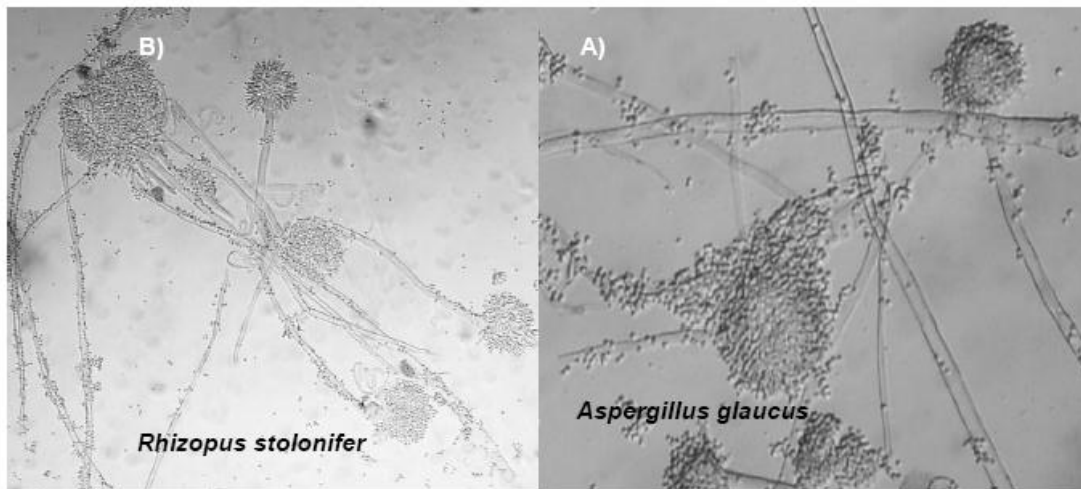
Datos de la Muestra:
Entidad Federativa: Chiapas
Municipio: Tuxtla Gutiérrez
Huerta / vivero: NA
Nombre Común: NA
No. de Muestras: 2
Tipo de Muestra: Cultivos fúngicos en PDA
Clave de Registro: NACF0010 y NACF0011
Fecha de Recepción: 2009-02-27

Cliente:
Nombre o Razón Social: Universidad de Ciencias y Artes
Chiapas
Dirección: 1a Sur Poniente #1460, Tuxtla Gutiérrez Chi
RFC: UCA-950202-3J3
Tel/Fax/e-mail: (961) 1210894

Tipo de Análisis y Metodología:
Análisis de: Hongos
Técnica: Medio de cultivo en PDA, claves morfométricas
Fecha de Análisis: 2009-04-08

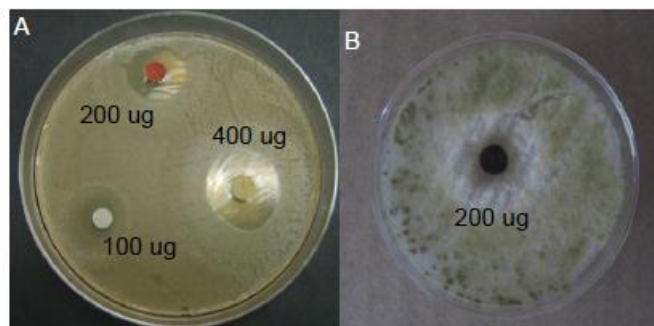
Resultados

Clave Planta	Clave GeMBio	Aislamientos fúngicos
H1	NACF0010	<i>Aspergillus glaucus</i>
H2	NACF0011	<i>Rhizopus stolonifer</i>

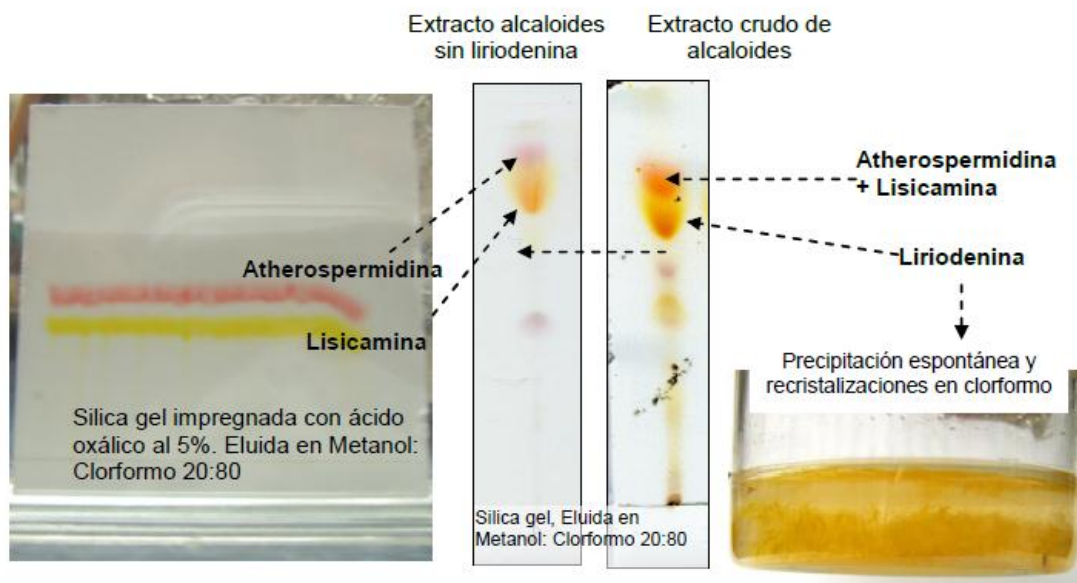


Aislamiento e Identificación de *Rhizopus stolonifer* y de *Aspergillus glaucus*

Actividad antifúngica de extractos y alcaloides



Halos de inhibición provocados por liriodenina sobre (a) *R. stolonifer* y (B) de extractos de raíces de plántula de 6 hojas sobre *R. stolonifer*.



Aislamiento de ABI de raíces de plántulas de seis hojas.

Índice de Cuadros y Figuras

Cuadros

Cuadro 1. Alcaloides bencilisoquinolínicos de interés farmacológico	9
Cuadro 2. Alcaloides y otros MS nitrogenados en el desarrollo temprano de las plantas	36
Cuadro 3. Fenoles en el desarrollo temprano de las plantas.	37
Cuadro 4. Terpenos en el desarrollo temprano de las plantas.	39
Cuadro 5. Etapas y fases del desarrollo estudiadas en <i>A. diversifolia</i>	59
Cuadro 6. Parámetros de la germinación de semillas <i>A. diversifolia</i>	77
Cuadro 7. Caracterización del desarrollo temprano de <i>A. diversifolia</i>	78
Cuadro 8. Producción de alcaloides totales (mg g ⁻¹ de mat. seca) en el desarrollo temprano de <i>A. diversifolia</i>	82
Cuadro 9. Relación de la producción de alcaloides en el desarrollo temprano de <i>A. diversifolia</i>	83
Cuadro 10. Comparación de algunos parámetros físicos de los alcaloides aislados en <i>A. diversifolia</i> con otros estudios	84
Cuadro 11. Distribución de liriodenina, lisicamina y atherospermidina	86
Cuadro 12. Liriodenina (nmol. g ⁻¹ de mat. seca) en el desarrollo temprano de <i>A. diversifolia</i>	90
Cuadro 13. Modelación matemática de la presencia de liriodenina (μmol. mg ⁻¹ x día ⁻¹ ms)	90
Cuadro 14. Lisicamina? (área en mv. mg ⁻¹ de mat. seca) en el desarrollo temprano de <i>Annona diversifolia</i>	91
Cuadro 15. Atherospermidina? (μmol. mg ⁻¹ de mat. seca) en el desarrollo temprano de <i>Annona diversifolia</i>	92
Cuadro 16. Actividad biológica de alcaloides identificados	112
Cuadro 17. Actividad antimicrobiana de alcaloides identificados	113
Cuadro 18. Actividad de alcaloides identificados sobre fitopatógenos	114
Cuadro 19. Actividad antifúngica de liriodenina con diferentes ensayos	115
Cuadro 20. Actividad antifúngica de extractos alcaloidales.	116
Cuadro 21. Presencia de liriodenina en los extractos alcaloidales	117

Figuras

Fig. 1. Rutas de biosíntesis de los principales grupos de alcaloides (Wink, 2010).	8
Fig. 2. Tipos estructurales de alcaloides bencilisoquinolínicos (Liscombe et al, 2005).	9
Fig. 3. Distribución de ABI en Angiospermas de acuerdo a APG III (Wink 2010).	12
Fig. 4. Biosíntesis de alcaloides bencilisoquinolínicos (Facchini & De Luca, 2008).	15
Fig. 5. Compartimentación de la biosíntesis y acumulación de alcaloides (Facchini & De Luca, 2008).	20
Fig. 6. Compartimentación intracelular de la biosíntesis y acumulación de ABI	21
Fig. 7. Distribución de Annonaceae (Tomado de Stevens, 2011)	27
Fig. 8. Variedad de estructuras aporfínicas en Annonaceae (Ceve et al, 1987).	29
Fig. 9. Germinación y desarrollo temprano de las plantas (Bove et al, 2001).	33
Fig. 10. <i>Annona diversifolia</i> Safford (Annonaceae)	52
Fig. 11. Proceso de germinación y desarrollo de <i>Annona diversifolia</i>	79
Fig. 12. Alcaloides aislados e identificados en raíces de plántulas de <i>A. diversifolia</i>	84
Fig. 13. Distribución filogenética de liriodenina en angiospermas. Árbol filogenético según APG III 2009.	87
Fig. 14. Dinámicas órgano-específicas de ABI en el desarrollo temprano de <i>A. diversifolia</i> .	95
Fig. 15. Relación de proteínas totales y aminoácidos libres en la germinación.	101
Fig. 16. Relación de tirosina-fenilalanina y liriodenina en la germinación.	102
Fig. 17. Cantidad asignada de aminoácidos para la biosíntesis de la liriodenina.	103
Fig. 18. Actividad de enzimas involucradas en la biosíntesis de ABI en el desarrollo temprano de <i>A. diversifolia</i> .	107
Fig. 19. Relaciones de la biosíntesis de ABI en el desarrollo temprano de <i>A. diversifolia</i>	126