



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

## **POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

INSTITUTO DE BIOLOGÍA

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**EFFECTO DEL NITRÓGENO EN LA PRODUCCIÓN DE ALCALOIDES EN *Annona diversifolia***

**Saff.**

# **TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**JOSÉ AGUSTIN OROZCO CASTILLO**

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. ALMA ROSA GONZÁLEZ ESQUINCA**  
INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNICACH

**COTUTORA DE TESIS: DRA. MARIA DEL ROCÍO CRUZ ORTEGA**  
INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNAM

**COMITÉ TUTOR: DR. MARIANO MARTÍNEZ VÁZQUEZ**  
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM

**MÉXICO, CIUDAD DE MÉXICO OCTUBRE, 2016.**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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



Lic. Ivonne Ramírez Wence  
Directora General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión del Subcomité por Campo de Conocimiento de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 20 de junio de 2016, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de DOCTOR EN CIENCIAS del alumno OROZCO CASTILLO JOSÉ AGUSTÍN con número de cuenta 510020761 con la tesis titulada: "Efecto del nitrógeno en la producción de alcaloides de *Annona diversifolia* Saff", realizada bajo la dirección de la DRA. ALMA ROSA GONZÁLEZ ESQUINCA:

Presidente: DRA. ALMA DELFINA LUCÍA OROZCO SEGOVIA  
Vocal: DRA. CLARA LEONOR TINOCO OJANGUREN  
Secretario: DR. MARIANO MARTÍNEZ VÁZQUEZ  
Suplente: DRA. MARÍA MARGARITA CANALES MARTÍNEZ  
Suplente DR. RICARDO REYES CHILPA

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

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cd. Universitaria, Cd. Mx, a 30 de agosto de 2016.

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 por darme la oportunidad de seguir preparándome profesionalmente.

Mi agradecimiento al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por las facilidades económicas prestadas durante mi formación académica, la cuál me otorgó la beca 325262 y CVU 239795.

También expreso mi agradecimiento a la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas por las facilidades otorgadas para el desarrollo de éste trabajo.

Mi sincero agradecimiento a mi comité tutor: Dra. Alma Rosa González Esquinca, Dra. Rocío Cruz Ortega y al Dra. Mariano Martínez Vázquez quienes me guiaron en éste proceso y aportaron valiosos conocimientos para mi formación académica.

## **AGRADECIMIENTOS PERSONALES**

Agradezco a la Dra. Alma Rosa González Esquinca quien ha sido y será mi mentora, ha formado parte fundamental en mi desarrollo profesional y personal. Le agradezco infinitamente su apoyo y amistad, y por haber creído y compartido mis locuras.

Mi agradecimiento a los sinodales: Dra. Alma Orozco Segovia, Dr. Mariano Martínez Vázquez, Dra. Clara Tinoco Ojanguren, Dra. Margarita Canales Martínez y al Dr. Ricardo Reyes Chilpa, por todo su apoyo y gentileza.

Al Dr. Iván de la Cruz Chacón quien también es parte importante en mi formación académica, agradezco haberlo encontrado en el camino y de haberme contagiado de su pasión por la investigación.

A la Dra. Lorena Luna Cazares por su amistad y los jalones de oreja que me forjaron responsabilidad.

A mis compañeros que forman parte del equipo de laboratorio Marisol, Christian, Cecilia, Claudia, Alfredo, Xocoyotzin y todos los que alguna vez pasaron por el lab. Mi aprecio para ellos y gracias por compartir los buenos momentos.

Agradezco a David Castañón por su apoyo incondicional en los experimentales y en los trámites de titulación. Gracias por tu amistad sincera y por los momentos de charla y debate que hicieron más ameno el trabajo duro.

A mi amigo, carnal, consejero, charolastra y hermano Mario Enrique Hernández Maza. Te agradezco tu hermandad, tus palabras de aliento y apoyo. Te aprecio y te quiero. Ya tú sabes.

Agradezco a mis padres Ing. José Orozco Vivanco y María Elena Castillo Ballinas por haberme fomentado los buenos valores de familia, por inculcarme la responsabilidad que me permitieron salir adelante y por todas las cosas que me inculcaron en casa. Sin ustedes no habría llegado hasta aquí. A mis hermanas Lorena Lila Orozco Castillo y María Elena Orozco Castillo, gracias por todo su apoyo incondicional las quiero muchísimo.

En especial agradezco a mi esposa M.Sc. Liliana Gamboa Hernández que ha compartido el entusiasmo por la investigación, por su apoyo incondicional, por los días y noches agrídulces en los que estuvo junto a mí. Te amo. A mis hijos Amelie Orozco y José Emiliano Orozco que son los dos ventrículos de mi corazón que me hacen vivir con alegría todos los días.

## ÍNDICE

	PAG.
<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>2</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	
<b>1.1 La importancia del nitrógeno en el metabolismo de las plantas</b>	<b>3</b>
<b>1.2 Absorción y asimilación del nitrógeno</b>	<b>4</b>
<b>1.3 El papel clave de la nitrato reductasa en la asimilación de nitrógeno</b>	<b>4</b>
<b>1.4 El ciclo GS/GOGAT y su función en la distribución del nitrógeno en el metabolismo</b>	<b>6</b>
<b>1.5 Incorporación del nitrógeno hacia a la biosíntesis de aminoácidos aromáticos tirosina y fenilalanina</b>	<b>9</b>
<b>1.6 Los alcaloides bencilisoquinolínicos y su origen biosintético</b>	<b>14</b>
<b>1.7 Norcoclaurina sintasa</b>	<b>16</b>
<b>1.8 Monofenol oxigenasa (tirosinasa o fenolasa)</b>	<b>17</b>
<b>1.9 Efecto del nitrógeno en los alcaloides bencilisoquinolínicos</b>	<b>18</b>
<b>1.10 Distribución taxonómica y diversidad de alcaloides bencilisoquinolínicos</b>	<b>24</b>
<b>1.11 La familia Annonaceae</b>	<b>26</b>
<b>1.12 Alcaloides bencilisoquinolínicos en la familia Annonaceae</b>	<b>26</b>

<b>II.</b>	<b>ANTECEDENTES</b>	
2.1	<i>Annona diversifolia</i> Saff	28
2.2	Estudios de los alcaloides bencilisoquinolínicos en <i>Annona diversifolia</i>	29
<b>III.</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>31</b>
<b>IV.</b>	<b>MÉTODO</b>	
4.1	Ensayo del efecto de diferentes concentraciones de nitrógeno en <i>A. diversifolia</i>	32
4.2	Selección de la etapa de desarrollo	32
4.3	Estudio experimental para determinar el efecto del nitrógeno	
4.3.1	Condiciones de crecimiento y obtención del material vegetal	33
4.3.2	Extracción y determinación de alcaloides	34
4.3.3	Cuantificación de alcaloides	39
4.3.4	Método de evaluación de la enzima monofenol monooxigenasa (MFO)	40
4.3.5	Método de evaluación de la enzima norcoclaurina sintasa (NCS)	40
4.4	Análisis estadístico	41
<b>V.</b>	<b>RESULTADOS</b>	
5.1	Ensayos previos	
5.1.1	Ensayo del efecto de diferentes concentraciones de nitrógeno en <i>A. diversifolia</i>	42
5.1.1	Selección de la etapa de desarrollo	42

<b>5.2</b>	<b>Estudio experimental para determinar el efecto del nitrógeno</b>	
<b>5.2.1</b>	<b>Efecto de los tratamientos en el contenido de liriodenina, lisicamina, aterospermidina y alcaloides totales</b>	<b>48</b>
<b>5.2.2</b>	<b>Variación diurna de los alcaloides aporfínicos</b>	<b>48</b>
<b>5.2.3</b>	<b>Efecto órgano-específico del nitrógeno en el contenido de alcaloides</b>	<b>50</b>
<b>5.2.4</b>	<b>Efecto del nitrógeno en la actividad de la MFO y NCS</b>	
	<b>5.2.4.1 Monofenol monooxigenasa (MFO)</b>	<b>53</b>
	<b>5.2.4.2 Norcoclaurina sintasa (NCS)</b>	<b>53</b>
<b>VI.</b>	<b>DISCUSIÓN</b>	<b>57</b>
<b>VII.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>63</b>
<b>VIII.</b>	<b>LITERATURA CITADA</b>	<b>65</b>
<b>IX.</b>	<b>ANEXOS</b>	<b>82</b>



## RESUMEN

Los alcaloides aporfínicos son metabolitos secundarios que se obtienen en bajas concentraciones en especies de plantas de la familia Annonaceae. Se sabe que el contenido de alcaloides en las plantas incrementa o disminuye debido al suministro de nitrógeno. No obstante, los estudios publicados no consideran que el nitrógeno disponible en la planta modifica el contenido de alcaloides a lo largo del día. En este estudio se propuso investigar el efecto del suministro de nitrógeno en la concentración de los alcaloides aporfínicos en las raíces, tallos y hojas de plántulas de *A. diversifolia* durante el periodo diurno. Para ello, las plántulas de 60 días de edad fueron cultivadas con tres niveles de nitrógeno (0, 30 y 60 mM) posteriormente los alcaloides fueron determinados mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC por su designación en inglés, *High Performance Liquid Chromatography*). Los resultados demostraron que la concentración de los alcaloides aporfínicos se incrementó con el tratamiento de 30 mM N. La liriodenina, lisicamina y aterospermidina incrementaron su concentración con los tratamientos de 0 y 30 mM N en las raíces y en los tallos y con 60 mM N en las hojas. La principal variación diurna en el contenido de los tres alcaloides se registró durante las primeras 6 horas después de suministrar el nitrógeno y los cambios observados pueden deberse a la translocación de los alcaloides o a su interconversión. También se observó que los alcaloides son biosintetizados principalmente en las hojas y almacenados en las raíces. Los resultados muestran que la biosíntesis de alcaloides aporfínicos incrementa con el suministro moderado de nitrógeno y su concentración cambia durante el día.

## ABSTRACT

Aporphine alkaloids are secondary metabolites produced in low amounts in species of the Annonaceae family. It is known that alkaloids content in plants either increases or decreases when plants are supplied with nitrogen. Though, reported studies did not consider that nitrogen could change the alkaloid content throughout the day. However, this behavior has not been described in the aporphine alkaloids. The aim of this study was to investigate the effect of nitrogen supply on aporphine alkaloid content measuring in roots, stems and leaves of *Annona diversifolia* Saff. seedlings during diurnal periods. The 60-days-old seedlings were grown on three nitrogen levels (0, 30 and 60 mM) and the alkaloid extracts were analyzed by HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*). Results showed that the aporphine alkaloid biosynthesis increased mainly in the 30 mM N treatment. The liriodenine, lysicamine and atherospermidine content increased with 0 and 30 mM N treatments in roots and stems and with 60 mM N treatments in leaves. The main diurnal variation in the three alkaloids content was recorded during the first 6 hours after nitrogen supply; the diurnal changes observed may be due to alkaloid translocation or their interconversion. In addition, the benzyloquinoline alkaloids are biosynthesized mainly in leaves and store in the roots. We conclude that aporphine alkaloid biosynthesis increase by nitrogen supply, increase with moderate nitrogen supply and show intra-day variation.

# I. INTRODUCCIÓN

## 1.1 La importancia del nitrógeno en el metabolismo de las plantas

El nitrógeno después del carbono, hidrógeno y oxígeno es el elemento más común encontrado en las plantas (Kraiser *et al.*, 2011). Su inclusión es esencial en la formación de enzimas y proteínas estructurales, ácidos nucleicos, polisacáridos, pigmentos, hormonas y metabolitos secundarios, especialmente de los alcaloides (Williams y Miller, 2001; Arias *et al.*, 2009), también interviene en aspectos fisiológicos como elemento de equilibrio osmótico y señalización en procesos celulares (Raven y Smith, 1976; Glass *et al.*, 2002). Se sabe que la falta de la disponibilidad del nitrógeno en el suelo no pone en riesgo la sobrevivencia de la planta, aunque limita su crecimiento y desarrollo (Van Oijen y Levy, 2004).

Debido a las múltiples funciones en las que interviene, la concepción del nitrógeno como elemento exclusivamente nutricional ha quedado en el pasado. Se ha demostrado que en forma de nitrato, amonio y glutamina, puede cumplir funciones que alteran el metabolismo de la planta a nivel metabólico, proteómico y molecular. Por ejemplo, el nitrato *per se* puede modificar las funciones celulares actuando como una vía de señalización primaria que modifica la expresión de aproximadamente 5500 genes en las hojas y 700 en las raíces (Kissen *et al.*, 2010). En *Arabidopsis thaliana* se ha comprobado su intervención como vía de señalización secundaria a través de la estimulación de la expresión de la enzima adenosin fosfato isopentenil transferasa (IPT) codificada por el gene *IPT3*-dependiente de nitrato en el floema, que tiene la función de catalizar citocininas altamente activas como la *trans* zeatina (Sakakibara *et al.*, 2006). Por lo tanto, el nitrógeno tiene la capacidad de reprogramar tanto el metabolismo primario a través de una compleja red de interacciones coordinadas con el ciclo de Calvin-Benson, glucólisis, ciclo de Krebs, la cadena de transporte de electrones, así como el metabolismo secundario de manera directa con la biosíntesis de fenilpropanoides, flavonoides, terpenos, glucosinolatos y alcaloides; la mayoría de ellos biosintetizados a partir de la fenilalanina y tirosina (Stitt *et al.*, 2010; Kusano *et al.*, 2011; Rubio-Wilhelmi *et al.*, 2012a).

El nitrógeno se encuentra disponible para las plantas en forma de amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) y nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) (Pate, 1973), por lo que depende de cada especie la habilidad para absorberlo en cualquiera de las dos formas (Stock y Lewis, 1984). Aunque, cuando ambos iones se encuentran presentes, el amonio es preferentemente absorbido debido al escaso gasto energético para incorporarlo al metabolismo (Wirén *et al.*, 2000). No obstante, el nitrato es el recurso dominante de nitrógeno disponible para la planta (Sakakibara *et al.*, 2006; Wickert *et al.*, 2007), principalmente cuando se encuentra en suelos con un pH alto y buen aporte de oxígeno, mientras que en suelos con bajos niveles de oxígeno y acidificados el amonio se convierte en el principal recurso (Mendelssohn, 1979; Wickert *et al.*, 2007; Arias *et al.*, 2009). De acuerdo a las condiciones de su disponibilidad, las plantas han adoptado estrategias para su obtención como cambios morfológicos en raíces y hojas (Schatchman y Shin, 2007), la fijación del nitrógeno atmosférico, por medio de bacterias (Beevers y Hageman, 1969), las asociaciones micorrizales (Valverde y Wall, 2003), la “carnivoría” (Chapin III *et al.*, 1987) y principalmente la

adaptación de la absorción de nitrógeno en las raíces en dos formas: nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) y amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) (Crawford, 1995; Van Oijen y Levy, 2004; Arias *et al.*, 2009).

## 1.2 Absorción y asimilación del nitrógeno

El proceso de absorción tanto del nitrato como del amonio se lleva a cabo en las células epidérmicas y corticales de la raíz (Chapin III, 1980; Crawford, 1995). En estos sitios múltiples sistemas de transporte molecular contribuyen a la absorción del nitrógeno (Maathuis, 2009).

Las plantas regulan la concentración intracelular de nitrógeno desde la membrana a través de permeasas ubicadas en las células corticales de la raíz. La absorción de nitrato se lleva a cabo por tres sistemas de transporte, uno constitutivo de alta afinidad (CHATS) que regula cantidades de 100-200  $\mu\text{M}$  y se caracteriza por valores bajos de  $K_m$  y  $V_{\max}$  (6 -20  $\mu\text{M}$  y de 0.3-0.82  $\mu\text{mol g}\cdot\text{h}^{-1}$ , respectivamente); el segundo transportador es inducible de alta afinidad (IHATS) con valores altos de  $K_m$  y  $V_{\max}$  (20-100  $\mu\text{M}$  y de 3-8  $\mu\text{mol g}\cdot\text{h}^{-1}$ , respectivamente) y el tercero es un transportador constitutivo de baja afinidad (LATS), que contribuye significativamente a la absorción de nitrato en concentraciones mayores a 200  $\mu\text{M}$  (Crawford y Glass, 1998). La actividad de los transportadores estimula la familia de genes que codifican a las enzimas encargadas de la absorción y transporte de este ion (*NRT1* y *NRT2*), de la reducción del nitrato (*NIA* y *NII*) y de la síntesis de cofactores para el proceso de reducción (*CNX* y *UPM*), asimilación de amonio y producción de equivalentes reductores (FD y FNR). Mientras que la absorción de amonio es controlada por dos sistemas, uno de alta afinidad (<1 mM) y otro de baja afinidad (> 1 mM) (Wirén *et al.*, 2000), contribuyendo a la estimulación del grupo de genes AMT que codifican la biosíntesis de sus transportadores hacia el interior de la célula (Amtmann y Blatt, 2009; Maathuis, 2009).

Los sistemas constitutivos (CHATS y LATS) se inactivan para regular el flujo de nitrógeno hacia el interior de la planta equilibrando el balance catión/anión y mantener las cantidades óptimas de este elemento en las células. Es decir que la absorción y asimilación puede regularse por mecanismos enzimáticos de retroalimentación negativa (feedback) (Wirén *et al.*, 1997; Miller *et al.*, 2007). Estos sistemas se encuentran acoplados con la ruta oxidativa de las pentosas fosfato, glucólisis, ciclo de ácidos tricarboxílicos, así como el metabolismo de ácidos orgánicos que proveen los esqueletos carbonados para su incorporación al metabolismo de la planta ( Sakakibara *et al.*, 2006; Wickert *et al.*, 2007; Maathuis, 2009).

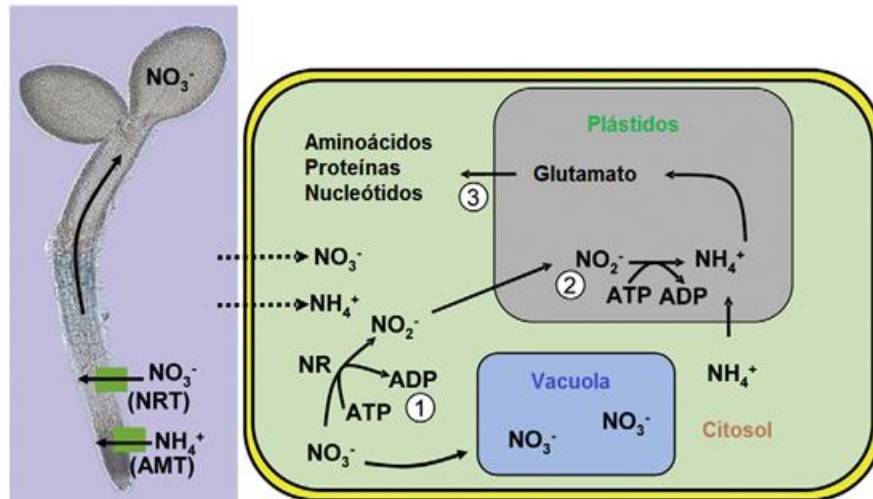
## 1.3 El papel clave de la nitrato reductasa en la asimilación de nitrógeno

El nitrato es reducido a amonio para que la planta pueda asimilarlo rápidamente debido a que en esta forma es tóxico. En contraste, el nitrato puede ser almacenado en la vacuola. La asimilación del nitrato se lleva a cabo con la ayuda de dos enzimas clave que actúan de manera coordinada: la nitrato reductasa (NR, EC 1.6.6.1-2) y la

nitrito reductasa (NiR, EC 1.7.1.4); la primera cataliza la liberación de dos electrones para convertir el nitrato en nitrito, posteriormente la segunda enzima convierte al nitrito en amonio a través de la liberación de seis electrones (Crawford, 1995; Wickert *et al.*, 2007).

La enzima nitrato reductasa es una de las más importantes para el flujo de nitrógeno hacia el metabolismo de las plantas y se considera fundamental en el proceso de asimilación de este elemento (Schrader y Hageman, 1967; Heidari *et al.*, 2011). Su función es catalizar el primer paso de la reducción del nitrato a amonio en el citosol de las células corticales y epidérmicas de la raíz; aunque también se encuentra en las células del mesófilo de las hojas (Schrader y Hageman, 1967; Shaner y Boyer, 1976; Campbell, 1999). Para ello, utiliza NAD(P)H como donador de electrones en una proporción de 4 mol de NAD(P)H por 1 mol de  $\text{NO}_3^-$  (Kaiser y Huber, 1994; Lillo, 1994) (Figura 1).

La nitrato reductasa de plantas superiores se encuentra en dos isoformas, una de ellas inducible y la otra constitutiva. La forma inducible es regulada por factores como el nitrato y la luz, principalmente (Lillo, 1994; Campbell, 1999; Kaiser y Huber, 2001). Por ejemplo, la actividad de la nitrato reductasa y los factores de transcripción que regulan la expresión genética de esta enzima son inducidos por el nitrato, que tiene la función de señal primaria para regular la asimilación del nitrógeno, actuando esencialmente como una hormona (Kaiser y Huber, 2001; Miller *et al.*, 2007). Tal inducción ocurre en minutos y puede responder a muy bajas concentraciones de nitrato (menores a  $10 \mu\text{M NO}_3^-$ ), mientras que la luz absorbida por fitocromos generalmente provoca un incremento de su transcrito y su actividad enzimática en plantas etioladas (Lillo, 2004). Esta enzima responde a los factores metabólicos como los bajos niveles de glutamina y la disponibilidad de nitrato, aumentando su capacidad reductora. En contraste, los altos niveles de glutamina inhiben la actividad de la enzima (Campbell, 1999). Inclusive la glutamina ejerce una regulación negativa en la expresión de los genes *NIA* (Lillo, 2004). Esto sugiere que el “pool” interno de aminoácidos de las plantas provee una señal que puede regular la absorción y asimilación del nitrógeno (Miller *et al.*, 2007).



**Figura 1.** Esquema de la absorción de nitrato y amonio en las plantas. Adaptado de Maathuis, 2009.  
*Transportador de nitrato (NRT), transportador de amonio (AMT), nitrato reductasa (NR).*

La regulación ejercida por factores ambientales (la intensidad de luz, la disponibilidad de nitrógeno y cantidad de agua) y metabólicos (el equilibrio de glutamato/glutamina, la concentración de carbohidratos, la tasa fotosintética de la planta, entre otros) se debe a que las secuencias genéticas reguladoras (cajas reguladoras) se superponen con las regiones promotoras de los genes que expresan a la nitrato reductasa (Campbell, 1999; Unni *et al.*, 2006).

#### 1.4 El ciclo GS/GOGAT y su función en la distribución del nitrógeno en el metabolismo

El ciclo GS/GOGAT es la vía principal por la cual el amonio intracelular obtenido de la absorción y/o por la reducción del nitrato es incorporado a los esqueletos carbonados (Valverde y Wall, 2003). Es un proceso del metabolismo del nitrógeno en las plantas que podría considerarse como un “sensor” del nitrógeno intracelular. Mismo que regula su absorción, asimilación y reasimilación en órganos como raíces y hojas, mediante isoformas de las enzimas que son tejido-específicas (Deng *et al.*, 2011; Lu *et al.*, 2011). En este ciclo se llevan a cabo reacciones tanto de reducción como de translocación mediante reacciones irreversibles catalizadas por dos enzimas. La primera de ellas es la glutamina sintetasa (GS, L-glutamato:amonio ligasa EC 6.3.1.2) que incorpora el amonio al glutamato y biosintetiza glutamina (Gln) (primer metabolito generado de la asimilación del nitrógeno) (Foyer *et al.*, 2011; Betti *et al.*, 2012). La segunda es la GS-glutamato sintasa:2-oxoglutarato aminotransferasa (Fd-GOGAT, EC 1.4.1.7; NADH-GOGAT, EC 1.4.1.14) que transfiere el grupo amino de la glutamina a una molécula de 2-oxoglutarato para producir dos moléculas de glutamato (Glu) (Forde y Lea., 2007; Wickert *et al.*, 2007; Foyer *et al.*, 2011). Ambos aminoácidos son los principales donadores de nitrógeno

para la formación de biomoléculas, entre ellas los aminoácidos esenciales (Deng *et al.* 2011; Rubio-Wilhelmi *et al.*, 2012b).

La glutamina sintetasa (GS) en plantas superiores se encuentra en dos isoformas GS1 y GS2 (Wickert *et al.*, 2007; Bindu, 2009; Duca *et al.*, 2011). La enzima GS1 (citoplasmática, 39 kDa) se ubica principalmente en las raíces y en el tejido conductivo (células acompañante del floema), que junto con la enzima GOGAT-NADH dependiente están implicadas en la biosíntesis de aminoácidos designados para el transporte a otras partes de la planta incluyendo a hojas etioladas (Wickert *et al.*, 2007; Duca *et al.*, 2011); también está involucrada en el catabolismo de aminoácidos y en el metabolismo de fenilpropanoides (Bindu, 2009). El mecanismo de regulación de esta enzima en plantas superiores no se conoce completamente (Cren y Hirel, 1999) y la presencia de múltiples isoenzimas GS1 complican la total comprensión de sus funciones fisiológicas, aunque se sabe son reguladas transcripcionalmente y por un mecanismo de retroalimentación negativa como respuesta a la disponibilidad de nitrógeno, en particular de amonio y de glutamina (Miao *et al.*, 1991; Ishiyama *et al.*, 2004; Duca *et al.*, 2011). En bacterias está regulada por un mecanismo feedback acumulativo de glutamina y de otros metabolitos nitrogenados (Standman, 1990).

La isoenzima GS2 (44 kDa) está localizada en el estroma de los cloroplastos y es la principal forma de la GS. Tiene la función de asimilar el amonio producido por la reducción del nitrato y la fotorespiración y es por ello que se relaciona estrechamente con la actividad de la GOGAT-ferredoxina dependiente (GOGAT-Fd) (Wickert *et al.*, 2007; Duca *et al.*, 2011). La isoenzima GS2 esta codificada por un solo gen que se expresa en células fotosintéticas (Miao *et al.*, 1991; Duca *et al.*, 2011) y su regulación depende de la fotosíntesis, debido a que responde a la intensidad luminosa para coordinar la asimilación de nitrógeno mediante esqueletos carbonados disponibles (fotoasimilados) y atrapar el amonio liberado por la fotorrespiración (Lillo, 2004; Simonovic y Anderson, 2008). La luz puede modular directamente la expresión de los genes, mediante la activación de fitocromos y criptocromos e indirectamente por la fotosíntesis incrementando los niveles de metabolitos carbonados, debido a ello esta enzima se regula a nivel transcripcional (Lillo, 2004; Simonovic y Anderson, 2008; Bindu, 2009). También los azúcares como la sacarosa, fructosa y glucosa pueden tener un efecto similar al de la luz, estimulando la expresión genética de la GS2 en la oscuridad (Lillo, 2004). Así como algunos aminoácidos tales como: aspartato, asparagina, glutamato y glutamina, tienen efectos antagónicos a los azúcares y pueden inhibir la actividad de la GS (Yang *et al.*, 2011). La regulación transcripcional de la GS2 ha sido observada en especies como *Pisum sativum* L. (Tjaden *et al.*, 1995), *Pinus sylvestris* L. (Elmliger *et al.*, 1994) y *Arabidopsis thaliana* L. (Oliveira y Coruzzi, 1999).

El ciclo GS/GOGAT es influenciado de forma directa por la biosíntesis de compuestos estructurales fotosintéticos como la clorofila y la ribulosa bifosfato carboxilasa (rubisco), que son moléculas primordiales para la generación de equivalentes reductores en la fotosíntesis y de esqueletos carbonados, debido a ello existe una estrecha relación entre la absorción del nitrógeno con el metabolismo del carbono (Chapin III *et al.*, 1987;

Delgado *et al.*, 1994; Wickert *et al.*, 2007). De esta relación ha surgido el postulado de la *hipótesis del balance del carbono-nutrientes*, la cual es una hipótesis predictiva que explica que los niveles de compuestos nitrogenados dependen de la cantidad de carbono y nitrógeno para satisfacer las necesidades primarias de crecimiento de la planta o para asignarlas a las necesidades secundarias (Bryant *et al.*, 1983; Lerda, 2002). No obstante, es una hipótesis controvertida debido a que es propiamente predictiva, por lo que no se cumple en todos los *taxa* y carece de generalidad, así mismo no considera aspectos químicos-fisiológicos que permitan una mejor comprensión de la asignación de los recursos (Koricheva *et al.*, 1998; Nitao *et al.*, 2002).

En las raíces y hojas de las plantas el nitrógeno se reduce para su rápida incorporación al metabolismo y se moviliza para la biosíntesis de compuestos nitrogenados por medio de los acarreadores como la glutamina, glutamato, aspartato y asparagina, que son biosintetizados a partir del ciclo GS/GOGAT (Crawford, 1995; Cánovas *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2011). El glutamato (Glu) se considera como la molécula central en la biosíntesis de aminoácidos en plantas superiores y el control en el mecanismo regulatorio en la asimilación de amonio (Stitt *et al.*, 2002; Forde y Lea, 2007). Este aminoácido es el precursor del aspartato que se forma a través de la enzima aspartato:2-oxoglutarato aminotransferasa (ATT, EC, 2.6.1.1). Esta enzima forma parte de la familia de aminotransferasas que son activadas en condiciones de estrés abiótico, además de tener otras funciones en el metabolismo energético de las plantas y en la regulación del metabolismo del carbono y nitrógeno en todos los organismos (Forde y Lea, 2007; Galili, 2011; de la Torre *et al.*, 2014).

El glutamato y el aspartato juegan un papel importante en la biosíntesis de compuestos aromáticos, debido a que son los donadores específicos del grupo amino para su incorporación a los precursores provenientes del ácido shikímico para formar los aminoácidos tirosina y fenilalanina (Graindorge *et al.*, 2010; Maeda *et al.*, 2010a). Las evidencias más claras sobre el efecto del nitrógeno en el contenido de glutamato y aspartato en plantas, han sido aportadas por estudios *in vivo* realizados en *Arabidopsis thaliana* y *Nicotiana tabacum* en los que se ha reportado la variación de estos compuestos cuando las plantas son expuestas a diferentes niveles de nitrato y amonio en condiciones de luz y oscuridad. Los estudios señalan que el glutamato no responde de manera significativa a los niveles de nitrógeno suministrado y no hay correlación con el fotoperiodo, por lo que el glutamato permanece relativamente estable (Matt *et al.*, 2001; Masclaux-Daubresse *et al.*, 2002; Nunes-Nesi *et al.*, 2010; Foyer *et al.*, 2011). Sin embargo, autores como Stitt *et al.* (2002), Foyer *et al.* (2003) y Forde *et al.* (2007) sugieren que la concentración constante del glutamato podría deberse a la acción de las enzimas glutamato deshidrogenasa e isocitrato deshidrogenasa que intervienen en el mantenimiento de su concentración intracelular. En cambio el aspartato incrementa su concentración cuando el nitrato y amonio se suministran en altas concentraciones; también responde con un incremento progresivo durante la primera fase del periodo diurno, alcanzando su máximo contenido a la mitad del periodo nocturno (Geiger *et al.*, 1999; Scheible *et al.*, 2000; Fritz *et al.*, 2006). Estos datos parecen sugerir que el escaso cambio en la concentración de glutamato, obedece al constante movimiento del nitrógeno hacia la biosíntesis de otros aminoácidos, especialmente de



aspartato (de la Torre *et al.*, 2014), por lo tanto podría ser el principal donador de nitrógeno para la biosíntesis de tirosina y fenilalanina en plantas no sometidas al estrés.

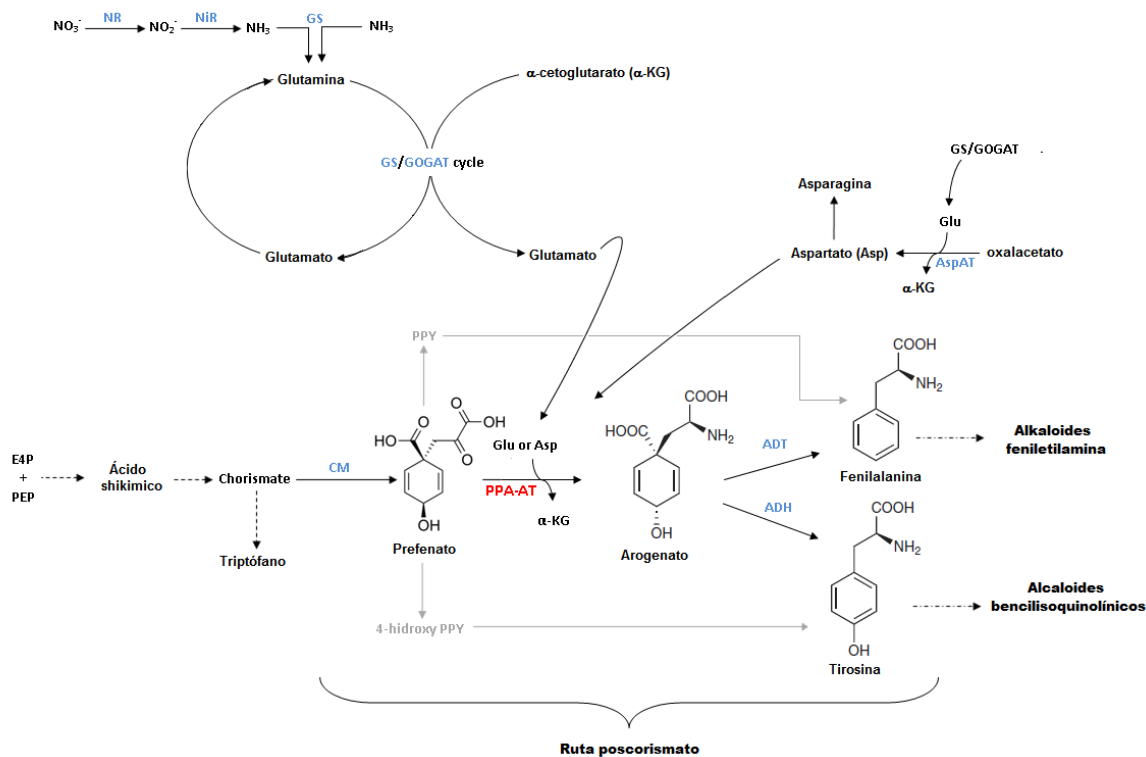
El incremento de aspartato sugiere que podría estar implicado en un mecanismo de detoxificación del exceso de nitrógeno intracelular, como el señalado para la asparagina que se ha propuesto como una molécula tanto de transporte como de almacenamiento de nitrógeno para evitar la toxicidad (Lam *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 2011). Sin embargo, los niveles de nitrógeno considerados como “exceso” pueden variar entre las diferentes especies e incluso, como es ampliamente conocido en las diferentes etapas fenológicas, debido a que la demanda de nitrógeno es mayor en las etapas de crecimiento en comparación con las etapas reproductivas de las especies.

Para comprender el papel del nitrógeno en la biogénesis de los alcaloides bencilisoquinolínicos, es necesario conocer el efecto del suministro de este elemento en el contenido de glutamato y aspartato, así como su relación con la ruta del ácido shikímico. Esta última origina los aminoácidos aromáticos precursores de los alcaloides bencilisoquinolínicos.

## **1.5 Incorporación del nitrógeno hacia a la biosíntesis de aminoácidos aromáticos tirosina y fenilalanina**

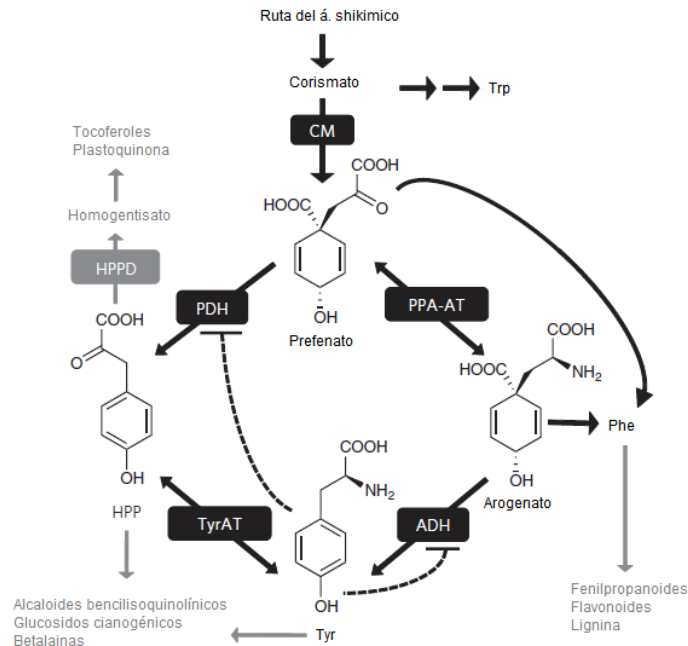
La biogénesis de los aminoácidos fenilalanina y tirosina se lleva a cabo a partir de precursores alifáticos por la vía del ácido shikímico. La biosíntesis de su principal precursor el ácido shikímico, se inicia con la condensación de fosfoenol piruvato (PEP) y 4-eritrosa fosfato (E4P) y es modificado en siete pasos posteriores en los que se involucran reacciones de descarboxilación, reducción, oxidación y fosforilación que llevan a la formación del corismato. Este compuesto es el punto de partida para la biosíntesis del triptófano, fenilalanina y tirosina (Srinivasan *et al.*, 1956; Herrmann, 1996,1999) (Figura 2).

La vía poscorismato se podría considerar clave en la regulación de los recursos asignados a la biosíntesis de los aminoácidos aromáticos en todos los organismos (Figura 2). Debido a que es un paso obligado hacia la formación de fenilalanina y tirosina en bacterias, hongos y plantas, y se origina de la transformación del corismato a prefenato por medio de la enzima corismato mutasa (CM, EC 5.4.99.5) (Gilchrist *et al.*, 1972; Tohge *et al.*, 2013). Esta enzima ha sido detectada en especies como *A. thaliana*, *N. sylvestris* y *Papaver somniferum* (Benesova y Bode, 1992; D’Amato *et al.*, 1992; Eberhard *et al.*, 1996). Tiene una función regulatoria en la biosíntesis de ambos aminoácidos y se ha confirmado por estudios moleculares su presencia en plantas por la detección de tres isoenzimas (CM1, CM2 Y CM3) en *A. thaliana*, cuyo ADNc complementa las secuencias encontradas en *E. coli* y levaduras (Eberhard *et al.*, 1996; Mobley *et al.*, 1999) indicando que esta vía es funcional en plantas. Las tres isoenzimas son reguladas por un mecanismo de inhibición alostérica *feedback*; la CM1 y CM3 son inhibidas por la tirosina y fenilalanina, en tanto que el triptófano incrementa su actividad, y la CM2 es insensible a los tres aminoácidos (Gilchrist *et al.*, 1972; Voll *et al.*, 2004; Hu *et al.*, 2009).



**Figura 2.** Incorporación del nitrógeno a la biosíntesis de aminoácidos aromáticos. *Nitrato reductasa* (NR), *Nitrito reductasa* (NiR), *glutamina sintetasa* (GS), *GS-glutamato sintasa: 2-oxoglutarato aminotransferasa* (GOGAT), *aspartato aminotransferasa* (AspAT), *corismato mutasa* (CM), *fenilpiruvato aminotransferasa* (PPY), *prefenato aminotransferasa* (PPA-AT), *arogenato deshidratasa* (ADT), *arogenato deshidrogenasa* (ADH), *eritrosa-4-fosfato* (E4P), *fosfoenolpiruvato* (PEP), *glutamato* (Glu), *aspartato* (Asp). Wickert *et al.*, 2007; Graindorge *et al.* 2010; Maeda y Dudareva, 2012

Con los avances en la investigación en los últimos años se completó esta ruta con la caracterización molecular de la enzima prefenato aminotransferasa (PPA-AT, EC 2.6.1.79) y se ha demostrado que participa en la conversión de prefenato a arogenato, que es la vía funcional y más activa en plantas. Su función es incorporar el nitrógeno proveniente del glutamato o aspartato para biosintetizar arogenato en una reacción reversible utilizando al prefenato como aceptor del grupo amino y  $\alpha$ -cetoglutarato como cosustrato. No obstante, esta enzima también tiene la capacidad de utilizar al  $\alpha$ -cetoglutarato como sustrato potencial, sin embargo se desconoce el papel fisiológico de esta función (Siehl *et al.*, 1986; Maeda *et al.*, 2010a, 2010b; Maeda y Dudareva, 2012). En el último paso de la ruta poscorismato, el arogenato es reducido a través de la arogenato deshidrogenasa (ADH, EC 1.3.1.12) para formar tirosina (Rippert y Mantringe, 2002), o deshidratado por medio de la arogenato deshidratasa (ADT, EC 4.2.1.91) que origina a la fenilalanina (Yamada *et al.*, 2008) (Figura 3).



**Figura 3.** Biosíntesis de tirosina en plantas. *Adaptado de Scheck et al., 2015.* Corismato mutasa (CM), prefenato aminotransferasa (PPA-AT), prefenato dedeshidrogenasa (PDH), arogenato deshidrogenasa (ADH), tirosina aminotransferasa (TyrAT).

La importancia de la prefenato aminotransferasa radica en vincular el metabolismo del nitrógeno con el metabolismo de los aminoácidos aromáticos (de la Torre *et al.*, 2014).

Por ello esta enzima puede considerarse como clave para regular la asignación del nitrógeno del metabolismo en la biosíntesis de los metabolitos secundarios derivados de la fenilalanina y tirosina, así como para conocer el flujo de nitrógeno por esta vía y por ende el costo de su biosíntesis. Sin embargo, la evaluación de esta enzima con un enfoque de regulación del metabolismo secundario a partir del suministro de nitrógeno no ha sido motivo de atención y el estudio de su actividad esta reducido a unas cuantas especies como *Nicotiana silvestris* (Bonner y Jensen, 1985), *Sorghum bicolor* (Sielh *et al.*, 1986) en forma de extracto enzimático, mientras que en *Anchusa officinalis* (De-Eknamkul y Ellis, 1988), *Panicum miliaceum* (Taniguchi *et al.*, 1995), *Pinus pinaster* (de la Torre *et al.*, 2007), *Arabidopsis thaliana* (Maeda *et al.*, 2010a) y *Petunia hybrida* (Maeda *et al.*, 2010a) con la enzima purificada, no obstante estas especies han sido evaluadas bajo diferentes condiciones (Cuadro1).

**Cuadro 1.** Estudios de los parámetros cinéticos de la enzima prefenato aminotransferasa

Especie	Sustrato	Km ( $\mu\text{M}$ )	Vmax ( $\text{nmol s}^{-1} \text{mg}$ )	kcat ( $\text{S}^{-1}$ )	kcat/Km ( $\text{mM}^{-1}\text{S}^{-1}$ )	Cosustratos	Referencias	Condiciones
<i>Nicotiana sylvestris</i>	Prefenato (1 mM)	-	-	-	2.22*	2 mM de glutamato	Bonner y Jensen (1985)	37 $\mu\text{g}$ de extracto enzimático Epps (50 mM, pH 8.6) a 70 °C
		-	-	-	4.37*	20 mM de glutamato		
	Prefenato (2 mM)	-	-	-	1.78*	2 mM de glutamato		
		-	-	-	3.86*	20 mM de glutamato		
	Prefenato (20 mM)	-	-	-	0.86*	2 mM de glutamato		
		-	-	-	3.05*	20 mM de glutamato		
<i>P. hybrida</i>	(0-3.75 mM)						Maeda <i>et al.</i> 2010.	0.08 $\mu\text{g}$ PhPPA-AT y 0.1 $\mu\text{g}$ de AtPPA-AT. $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (50 mM pH 8) 200 $\mu\text{M}$ de PLP a 37 °C
	Glutamato	3328 $\pm$ 237	85.1 $\pm$ 2.3	4.5 $\pm$ 0.1	1.4 $\pm$ 0.1	3 mM de prefenato		
Aspartato	3238 $\pm$ 143	81.5 $\pm$ 4.2	4.3 $\pm$ 0.2	1.3 $\pm$ 0.1				
<i>A. thaliana</i>	Glutamato	2695 $\pm$ 198	90.7 $\pm$ 8.9	4.7 $\pm$ 0.5	1.7 $\pm$ 0.1			
	Aspartato	2840 $\pm$ 188	70.1 $\pm$ 9.9	3.6 $\pm$ 0.5	1.3 $\pm$ 0.1			
<i>P. hybrida</i>	Prefenato	317 $\pm$ 19	115.6 $\pm$ 3.8	6.1 $\pm$ 0.2	19.5 $\pm$ 1.7	20 mM de aspartato		
		478 $\pm$ 81	253.7 $\pm$ 41.4	13.4 $\pm$ 2.2	28.2 $\pm$ 1.2	20 mM de glutamato		
<i>A. thaliana</i>	Prefenato	355 $\pm$ 21	88.6 $\pm$ 7.5	4.6 $\pm$ 0.4	13.1 $\pm$ 1.8	20 mM de aspartato		
		684 $\pm$ 36	173.4 $\pm$ 17.3	9 $\pm$ 0.9	13 $\pm$ 0.8	20 mM de glutamato		
<i>A. thaliana</i>	Prefenato (0-500 $\mu\text{M}$ )	13	-	95	7.3	20 mM de glutamato		
		14	-	28	2	10 mM de aspartato		
<i>N. sylvestris</i>	Prefenato (0-500 $\mu\text{M}$ )	17	-	100	5.88	20 mM de glutamato	Graindorge <i>et al.</i> 2010	5 nM de At2g22250 HEPES (50 mM, pH 8) a 24 °C
		13	-	31	2.3	10 mM de aspartato		
	glutamato (0-20 mM)	1.3 mM	-	101	ND	200 $\mu\text{M}$ de prefenato		
	aspartato (0-40 mM)	2.5 mM	-	27	ND			
<i>L. esculentum</i> (SGN-U567172)	Prefenato (0-0.8 mM)	0.8 $\pm$ 0.01	-	11.35 $\pm$ 0.53	141.9	20 mM de aspartato	Dal Cin <i>et al.</i> 2011	Ensayo acoplado a GDH, buffer PBS (pH 7.5) a 24 °C
		0.1 $\pm$ 0.03	-	11.47 $\pm$ 1.73	114.7	20 mM de glutamato		

\* $\text{nM min}^{-1}$

Los estudios realizados con la pefenato aminotransferasa indican que su actividad es variable de acuerdo a la especie y también puede alterarse con diferentes condiciones de temperatura y pH. Además los parámetros cinéticos de esta enzima son modificados principalmente por el tipo y concentración de aminodonadores, así como la cantidad de esqueletos carbonados disponibles que son suministrados a través del pefenato. También se ha demostrado que bajo las mismas condiciones la pefenato aminotransferasa de *A. thaliana* y *P. hybrida* es capaz de utilizar el glutamato y el aspartato de manera similar, no obstante cuando los aminoácido se suministran en concentraciones de saturación *A. thaliana* y *P. hybrida* tienen mayor preferencia hacia al aspartato; *P. hybrida* es más eficiente utilizando glutamato mientras que *A. thaliana* utiliza ambos con la misma eficiencia, es decir, que la pefenato aminotransferasa puede realizar la función de glutamato/aspartato-pefenato aminotranferasa (PAT; EC 2.6.1.78, EC 2.6.1.79)(Graindorge *et al.*, 2010; Maeda *et al.*, 2011; de la Torre *et al.*, 2014). De manera similar en *Lycopersicum esculentum* la enzima tiene mayor afinidad por el glutamato y mejor eficiencia con el aspartato en condiciones deficientes de esqueletos carbonados y saturación de aminodonadores. Las diferencias en la afinidad por el sustrato utilizando aspartato o glutamato también fueron observados en *A. officinalis* en comparación con *Sorghum bicolor*, debido a que en *A. officinalis* utiliza preferentemente aspartato ( $K_m$  0.08 mM) como aminodonador, en tanto que *S. bicolor* tiene mayor afinidad por el glutamato ( $K_m$  1.7 mM) (Siehl *et al.*, 1986; De-Eknamkul y Ellis, 1988). En *N. silvestris* se demostró que cuando existe escasa disponibilidad de esqueletos carbonados la eficiencia de la enzima es mayor, mientras que en condiciones contrarias la enzima es inhibida. Bajo esta perspectiva de la Torre *et al.* (2014) sugiere que de acuerdo a los parámetros cinéticos de la enzima bajo condiciones de alta concentración de glutamato la enzima puede saturarse contribuyendo a la biosíntesis de aspartato, sin embargo, cuando la concentración de glutamato es baja privilegia la biosíntesis de aminoácidos esenciales.

La función de la pefenato aminotransferasa toma sentido cuando se revisan las condiciones fisiológicas reportadas de plantas con disponibilidad de nitrógeno. En el estudio realizado por Geiger *et al.* (1999) en hojas de *Nicotiana tabacum* L. cv. Samsun para determinar el efecto del nitrato (1, 3 y 10 mM de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) y amonio (2, 6 y 20 mM de  $\text{KNO}_3$ ) con suministro de  $\text{CO}_2$  en la acumulación de carbohidratos y metabolitos nitrogenados, reportaron que el glutamato incrementó de dos a tres veces su contenido ( $2.5\text{-}10 \mu\text{mol g}^{-1}$  FW y  $2\text{-}5 \mu\text{mol g}^{-1}$  FW ) cuando se suministró nitrógeno de un nivel bajo a intermedio (1-3 mM de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  y 2-6 mM  $\text{KNO}_3$ , respectivamente), mientras que el contenido de aspartato se incrementó considerablemente ( $0.5\text{-}2 \mu\text{mol g}^{-1}$  FW y  $0.2\text{-}2 \mu\text{mol g}^{-1}$  FW) con el suministro de altas concentraciones de nitrógeno (10 mM de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  y 20 mM de  $\text{KNO}_3$ , respectivamente). En otro estudio Matt *et al.* (2001) evaluaron el suministro de 2 mM  $\text{KNO}_3$  en la acumulación de metabolitos nitrogenados y carbohidratos durante el periodo diurno y nocturno en hojas de *N. tabacum* cv. Gatersleben. Los resultados indicaron que el glutamato no presentó cambios durante los periodos evaluados ( $4\text{-}5 \mu\text{mol g}^{-1}$  FW) y el aspartato no fue determinado en este estudio. Fritz *et al.* (2006) estudió plantas silvestres de *N. tabacum* y transgénicas Nia30(145) deficientes de la enzima nitrato reductasa, evaluaron el

efecto del suministro de nitrato (0.2 y 12 mM de nitrato) durante el periodo diurno y nocturno. En estas condiciones los niveles de glutamato se mantuvieron constantes en plantas silvestres (2-3  $\mu\text{mol g}^{-1}\text{FW}^{-1}$ ) y Nia30(145) (1-2  $\mu\text{mol g}^{-1}\text{FW}$ ) indicando que posiblemente no responde a la acumulación de nitrato intracelular. Mientras que los niveles de aspartato se incrementaron gradualmente (1-5  $\mu\text{mol g}^{-1}\text{FW}$ ) en plantas silvestres debido probablemente al nitrato asimilado a través de la nitrato reductasa y el ciclo GS/GOGAT, a diferencia del genotipo Nia30(145) en el cual la acumulación de nitrato se mantuvo en concentraciones estables ( $<1 \mu\text{mol g}^{-1}\text{FW}$ ). Guo *et al.* (2012) evaluaron la respuesta fisiológica del metabolismo de carbono y nitrógeno en *Catharantus roseus* con diferentes tipos de suministro de 6 mM de nitrógeno ( $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ , N1 1:0, N2 1:1, N3 0:3) durante 21 días. En los resultados de este estudio el glutamato respondió a las altas concentraciones de amonio durante los primeros 7 días en el tratamiento N3 (3.4  $\mu\text{mol g}^{-1}\text{PS}$ ) que posteriormente disminuyó considerablemente a los 21 días (1.5  $\mu\text{mol g}^{-1}\text{PS}$ ), mientras que el aspartato respondió al suministro de ambas formas de nitrógeno en el tratamiento N2 principalmente en los primeros 7 días (6  $\mu\text{mol g}^{-1}\text{PS}$ ) disminuyendo a los 21 días con el mismo tratamiento (3  $\mu\text{mol g}^{-1}\text{PS}$ ). Estos autores sugieren que el tratamiento con ambas formas de nitrógeno (nitrato y amonio) tiene un efecto sinérgico en la acumulación de metabolitos nitrogenados, debido a que podrían promover el incremento interno de amonio y estimular la biosíntesis de carbohidratos y energía requeridos para la asimilación del exceso de amonio.

Con el análisis anterior, está por demás mencionar que el nitrógeno afecta la biosíntesis de los precursores de los alcaloides bencilisoquinolínicos a través de esta vía de la cual la enzima pefenato aminotransferasa juega un papel preponderante. Sin embargo, existe aún una brecha de conocimiento sobre el impacto del nitrógeno en la tirosina y con ello en la biosíntesis de alcaloides derivados de este aminoácido, como es el caso de los alcaloides bencilisoquinolínicos.

## **1.6 Los alcaloides bencilisoquinolínicos y su origen biosintético**

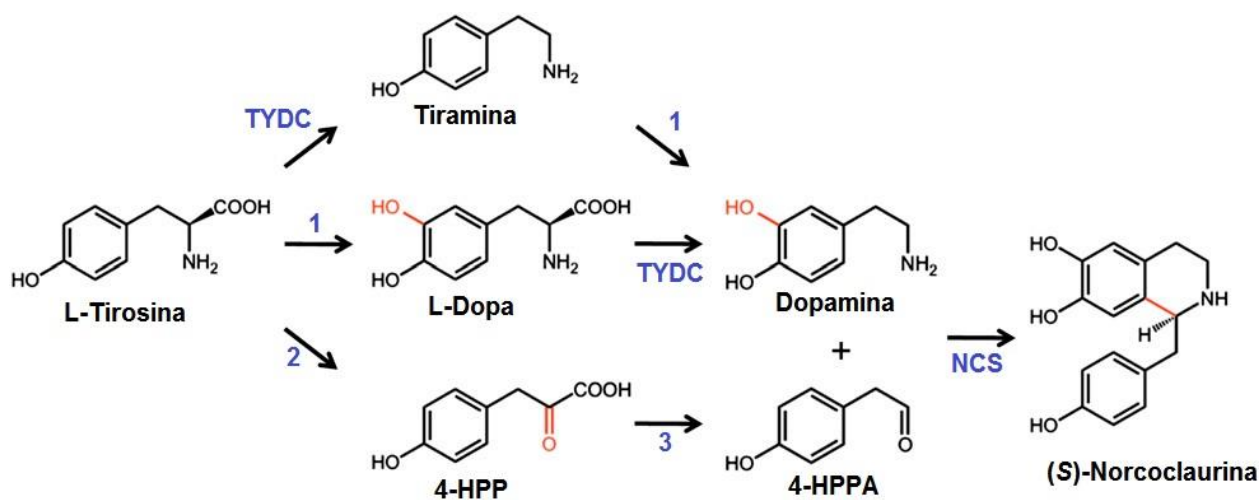
Los alcaloides se definen de una manera sencilla y común como moléculas alcalinas de bajo peso molecular que son producto de la descarboxilación de los aminoácidos y se caracterizan por la presencia de uno o más átomos de nitrógeno en forma de amina dentro de una estructura heterocíclica, con algunas excepciones con aminas fuera del anillo heterocíclico, sin embargo, la definición de estos compuestos no es completamente estricta debido a que existen aminas complejas o compuestos que carecen de una o más propiedades de un alcaloide y tienen un origen biosintético o actividades biológicas similares (Evans *et al.*, 2009). Se calcula que existen alrededor de 12,000 alcaloides distribuidos en plantas, animales, hongos y bacterias (Facchini, 2001).

Los alcaloides de origen aromático (proviene del triptófano, fenilalanina y tirosina) son considerados como el grupo más grande y diverso entre los distintos grupos de alcaloides (Evans *et al.*, 2009). Entre ellos destacan los alcaloides bencilisoquinolínicos, compuestos que ha sido motivo de atención por su actividad

biológica, su origen evolutivo, propiedades farmacológicas, el uso etnobotánico, así como el impacto social, político y económico de su uso (Hagel y Facchini, 2013).

Los alcaloides bencilisoquinolínicos tienen un origen biosintético común debido a que se forman a través de una misma ruta, esta característica los hace interesantes para ser utilizados como modelo de estudio. Se derivan de dos moléculas de tirosina que son transformadas a través de una serie de reacciones de descarboxilación, *ortho*-hidroxilaciones y desaminaciones para dar origen a la dopamina y 4-hidroxifenilacetaldehído (4-HPPA) (Beaudoin y Facchini, 2014), moléculas que constituyen la estructura principal de este grupo de alcaloides, la dopamina se incorpora como la parte tetrahydroisoquinolina en tanto que el 4-HPPA forma el anillo bencil; ambos compuestos son condensados para formar el esqueleto característico 1-bencilisoquinolina de la (S)-norcoclaurina que es el primer alcaloide biosintetizado por esta ruta y también el precursor de la variedad de estructuras de este grupo de alcaloides (Stadler *et al.*, 1989; Hagel y Facchini, 2013).

Las reacciones de conversión de la tirosina a dopamina son catalizadas por las enzimas tirosina dopa-decarboxilasa (TYDC; EC 4.1.1.25), monofenol monooxigenasa (también llamada tirosinasa o fenolasa) (MFO; EC 1.4.18.1) y la formación del 4-HPPA a partir de la tirosina es catalizada por la tirosina aminotransferasa (TyrAT; EC 2.6.1.5) y 4-hidroxifenil piruvato descarboxilasa (4HPPDC; EC 4.1.1.80) (Beaudoin y Facchini, 2014). El alcaloide precursor de los bencilisoquinolínicos se forma a través de la reacción de condensación tipo Pictet-Spengler catalizada por la norcoclaurina sintasa (NCS; EC 4.2.1.78) con la cual se forma el esqueleto 1-bencilisoquinolina (Samanani *et al.*, 2004; Luk *et al.*, 2007; Ilari *et al.*, 2009) (Figura 4). Posteriormente el alcaloide norcoclaurina es transformado por una 3'-hidroxilación, así como una serie de *O*- y *N*-metilaciones con lo que se forma el alcaloide (S)-reticulina, que es el alcaloide base para la diversificación estructural de los alcaloides bencilisoquinolínicos (Hagel y Facchini, 2013).



**Figura 4.** Primeras reacciones de la ruta biosintética de los alcaloides bencilisoquinolínicos. Adaptado de Lee y Facchini, 2011. *Tirosina dopa desacarboxilasa* (TYDC), *monofenol monooxigenasa* (MFO), *norcoclaurina sintasa* (NCS), *4-hidroxifenil piruvato* (4-HPP), *4-Hidroxifenil acetaldehído* (4-HPPA). Las enzimas implicadas en la 3-hidroxilación de la tirosina (1), transaminación de la tirosina (2) y la descarboxilación de 4-HPP (3) aún no han sido identificadas.

## 1.7 Norcoclaurina sintasa

La (*S*)-Norcoclaurina sintasa (NCS; EC 4.2.1.78) es una enzima que condensa a la dopamina y 4-HPAA derivados de la tirosina para formar (*S*)-norcoclaurina por medio de una reacción asimétrica Pictet-Spengler (Luk *et al.*, 2007; Ilari *et al.*, 2009; Bonamore *et al.*, 2010), precursor central de los alcaloides bencilisoquinolínicos (Stadler *et al.*, 1989).

Esta enzima también tiene la habilidad de utilizar a la dopamina y 3,4-HPAA como sustrato para producir el alcaloide (*S*)-norlaudanosolina que era considerado como el principal precursor de los alcaloides bencilisoquinolínicos (Battersby y Bink, 1960; Rueffer *et al.*, 1981). Esta propiedad de la NCS generó una controversia sobre la ruta de biosíntesis de los alcaloides bencilisoquinolínicos. Esta controversia fue resuelta en un principio por los estudios de Stadler *et al.* (1989) realizados en *Papaver somniferum* en el que se estableció al alcaloide (*S*)-norcoclaurina como el precursor universal de este grupo de alcaloides y posteriormente fue confirmado con la purificación y caracterización de la NCS en hojas de *Thalictrum flavum ssp. Glaucum* por Samanani y Facchini (2002).

La enzima NCS ha sido caracterizada en raíces, tallos y hojas de *T. flavum*, *P. somniferum* y *E californica*. Los parámetros cinéticos indican que su actividad óptima está a un pH entre 6.5-7.0 y en un rango de 37-55 °C, aunque también se ha reportado su máxima actividad hasta los 25 °C. Una característica interesante es que la enzima no pierde su actividad si es almacenada a -80 °C y en condiciones de almacenamiento a 4°C durante 7 días pierde el 75 % de su capacidad catalítica (Samanani y Facchini, 2001; Samanani *et al.*, 2004).

La NCS tiene una cinética de saturación sigmoideal variando la concentración de dopamina de 55 a 280 μM y con niveles de saturación de 2 mM de 4-HPAA, lo que indica la cooperación positiva de la unión de dopamina con la NCS. En tanto que variando la concentración de 4-HPAA de 0.2 a 1.3 mM con niveles de saturación de dopamina (280 μM), produce una cinética de saturación hiperbólica lo cual indica la carencia de cooperación de la unión de 4-HPAA con la NCS (Samanani y Facchini, 2002; Samanani *et al.*, 2004; Ilari *et al.*, 2009). Estos estudios demuestran que la norcoclaurina sintasa tiene afinidad a ambos sustratos aunque preferente hacia la dopamina y solamente se encuentra activa cuando ambos sustratos están presentes.



## 1.8 Monofenol oxigenasa (tirosinasa o fenolasa)

La enzima monofenol monooxigenasa (EC 1.4.18.1) también llamada tirosinasa, fenolasa o polifenoloxidasas, forma parte de una diversa familia de proteínas distribuidas filogenéticamente entre los organismos (bacterias, hongos, artrópodos, animales y plantas) con características y funciones similares (Mayer, 2006). En mamíferos se le atribuye la función de melanización de los ojos, el oído interno y de la piel (Fenoll *et al.*, 2004). En las plantas se encuentra presente en la mayoría de los órganos (Mayer, 2006) por lo que se considera una enzima ubicua y es responsable del pardeamiento enzimático (Vámos-Vigyázó, 1995; Walker, 1995; Whitaker y Lee, 1995). La MFO relacionada con la transformación de la tirosina se localiza particularmente en los cloroplastos (Araji *et al.*, 2014). Existe una variedad de isoformas de esta enzima y varían con respecto a su secuencia génica, tamaño, glicosilación y en la activación (Jaenicke y Decker, 2003), no obstante, la homología de esta enzima en los organismos es alta (Wichers *et al.*, 2003).

Se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza y pertenece al grupo de enzimas que contienen cobre en su estructura y que exhibe actividad catalítica como monooxigenasa y *O*-difenol oxidasa (Daquinag *et al.*, 1995; Steiner *et al.*, 1999). Su doble núcleo de cobre le permite la oxidación de compuestos mono- y difenólicos a través de la inserción del oxígeno en una posición *ortho*- para dar lugar a la formación de un grupo hidroxil en el anillo aromático, de esta manera la tirosinasa transforma al aminoácido *p*-monofenólico (L-tirosina) a un aminoácido *o*-difenólico produciendo una *o*-dopaquinona (L-DOPA), que posteriormente es convertida en dopamina; la característica de esta reacción es el oscurecimiento de la solución en tonalidades café (Espin y Wichers, 2001; Mayer 2006).

Se ha demostrado en estudios realizados en plantas, hongos y animales que la monofenol oxigenasa se encuentra preferentemente en un estado latente y es posible activarla con detergentes (SDS, dodecilsulfato de sodio), shock ácido (ácido clorhídrico 1N), agentes desnaturizantes (etanol) o por proteólisis empleando enzimas como la tripsina. No obstante, se ha demostrado que el SDS es un agente más efectivo en la activación de este enzima comparado con la tripsina (Tolbert, 1973; Golbeck y Cammarata, 1981; Moore y Flurkey, 1990; Spin y Wichers, 1999; Mayer, 2006)

En estudios previos en *Spinacea oleracea* L., *Vicia faba* L. y *Agaricus bisporus* (Lange) Sing., se reportó que la monofenol monooxigenasa (MFO; EC 1.14.18.1) puede variar su actividad máxima de acuerdo al tejido, sustrato, activador y temperatura (Tolbert, 1973; Spin y Wichers, 1999; Mayer, 2006). Generalmente la enzima es activa en un rango de pH entre 5.0-8.5, sin embargo en presencia de tripsina tiene una actividad máxima en un rango de pH de 7.0-7.5 (Tolbert, 1973, Rueffer y Zenk, 1987; Steiner *et al.*, 1999), mientras que con SDS su actividad óptima se registró con pH de 6.0 con 4 mM de SDS (Spin y Wichers, 1999), que coincide con lo reportado por Loeffler y Zenk (1990). No obstante, Moore y Furkey (1990) reportaron un incremento rápido en su actividad a pH de 6.5. Los valores cinéticos de la MFO ( $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) para la conversión de tiramina a dopamina (actividad monofenolasa) activada por proteólisis fueron una  $V_{\text{max}} = 5 \text{ mM min}^{-1}$  y  $K_m = 7 \text{ mM}$ ,

mientras que la enzima activada con SDS registró valores de  $V_{\max} = 0.8 \text{ mM min}^{-1}$  y  $K_m = 5 \text{ mM}$  (Spin y Witchers, 1999). La MFO obtenida a partir de cloroplastos de *S. oleracea* demostró que su actividad fue estable en condiciones de almacenamiento por un semana a 4 °C e indefinidamente cuando se congela (Tolbert, 1973; Golbeck y Cammarata, 1981).

Se considera que la monofenol oxigenasa participa en funciones de defensa en las plantas, ya que interviene en la hidroxilación de metabolitos secundarios durante su biosíntesis y puede ser estimulada por señales implicadas en la respuesta hipersensible como el metil-jasmonato y sistemina (Constabel y Barbehenn, 2008). Las evidencias de su participación en los mecanismos de defensa contra herbívoros y patógenos han sido aportadas por los estudios realizados en los géneros *Populus* (Constabel *et al.*, 2000; Haruta *et al.*, 2001), *Lycopersicon* (Felton *et al.*, 1989; Constabel *et al.*, 1995; Thipyapong *et al.* 1995; Ryan *et al.*, 2000; Li y Steffens, 2002), *Solanum* (Kowalski *et al.*, 1992), *Nicotiana* (Constabel y Ryan 1998; Ren y Lu, 2006) por mencionar solo algunos. También se ha documentado que está involucrada en la resistencia al estrés abiótico y en el estrés oxidativo en plantas (Sakihama *et al.*, 2002; Vranová *et al.*, 2002; Thipyapong *et al.*, 2004; Ali *et al.*, 2006), por lo que es posible que esta enzima tenga un papel importante en la biosíntesis de metabolitos secundarios, sin embargo, poco se ha hecho para comprender su función en la biosíntesis de estos compuestos, únicamente se han realizado estudios para comprender su papel en la biosíntesis de flavonoides (Pourcel *et al.*, 2007), betalainas (Steiner *et al.*, 1999), fenilpropanoides (Ali *et al.*, 2006) y alcaloides bencilisoquinolínicos (Rueffer y Zenk, 1987).

Esta enzima se encuentra implicada en la transformación de la tirosina al inicio de la biosíntesis de los alcaloides bencilisoquinolínicos. Rueffer y Zenk (1987) reportaron que la polifenoloxidasas (tirosinasa o monofenol monoxigenasa) es responsable de la hidroxilación en posición *meta* del anillo aromático en la dopamina y que forma parte de la porción superior del núcleo isoquinolínico que constituyen a los alcaloides bencilisoquinolínicos. Sin embargo, Beaudoin y Facchini (2014) sugieren que la enzima responsable de la *meta*-hidroxilación de la L-tirosina o tiramina no ha sido caracterizada. No obstante, la monofenol monoxigenasa (MFO; EC 1.14.18.1) ha sido utilizada para la producción de alcaloides bencilisoquinolínicos de manera exitosa en bacterias (Nakagawa *et al.*, 2011; Minami, 2013; Sato y Kumagai, 2013), aunque quedan dudas acerca de la identidad de la enzima, debido a que las monoxigenasas pueden aceptar un amplio rango de sustratos y carecen de especificidad (Constabel y Barbehenn, 2008).

## **1.9 Efecto del nitrógeno en los alcaloides bencilisoquinolínicos**

El nitrógeno en los alcaloides es esencial, debido a que le confiere la naturaleza básica y la característica estructural propia de estos compuestos. Sin embargo, los estudios de la influencia del nitrógeno sobre los alcaloides en plantas son escasos y han sido motivados principalmente por el uso del nitrógeno como fertilizante

para incrementar la producción de estos compuestos, ya sea por su importancia comercial o farmacológica. La mayor parte de las evaluaciones del efecto del nitrógeno se han llevado a cabo en un grupo reducido de plantas con importancia comercial como *Capsicum frutescens* (Lindsey, 1985), *C. annum* (Johnson y Decoteau, 1996) y *C. chinense* (Medina-Lara *et al.*, 2008) que biosintetizan los alcaloides capsaicina y dihidrocapsaicina, también en *N. tabacum* (Sims *et al.*, 1975; Farrokh *et al.*, 2012) productora del alcaloide nicotina. Así mismo el efecto del nitrógeno ha sido evaluado en especies que biosintetizan alcaloides con interés farmacológico como *Datura stramonium* (Demeyer y Dejaegere, 1992; Sikuli y Demeyer, 1997) y *Atropa belladonna* (Baricevic *et al.*, 1999; Bensadek *et al.*, 2001) que producen los alcaloides hiosciamina, escopolamina y atropina, en *Catharantus roseus* que biosintetiza los alcaloides vincristina y vinblastina (Sreevalli *et al.*, 2004; Misra y Gupta, 2006; Abdolzadeh *et al.*, 2006; Gholamhosseinpour *et al.*, 2011; Zhonghua *et al.*, 2011; Guo *et al.*, 2012) y en *P. somniferum* (Costes *et al.*, 1976; Khlapsev, 1978; Yadav *et al.*, 1984; Laughlin 1982, 1987; Losak y Ritcher, 2004; Losak *et al.*, 2009) que es el principal recurso para la obtención de morfina.

Como se sabe, la tirosina es uno de los principales precursores de alcaloides de tipo isoquinolínico (tetrahidroisoquinolínicos, bencilisoquinolínicos, aporfínicos, morfinaos, etc.). La ruta biosintética de los alcaloides bencilisoquinolínicos es atractiva para el estudio del nitrógeno, debido a que forma una vía reducida con un solo alcaloide precursor, por lo que es posible evaluar el impacto del nitrógeno sobre una amplia variedad de alcaloides de este grupo. Uno de los modelos más utilizados para estudiar el efecto del nitrógeno sobre los alcaloides bencilisoquinolínicos ha sido la morfina, debido a su utilidad farmacológica como potente analgésico. Los estudios del nitrógeno sobre los alcaloides bencilisoquinolínicos son escasos y se han realizado casi exclusivamente en *P. somniferum*, que es por excelencia la especie en la que se obtiene la morfina. Costes *et al.* (1976) evaluaron el efecto del suministro de 2 mM de nitrato, amonio, nitrato de amonio y urea en el contenido relativo de morfina en plantas en etapa de floración de *P. somniferum*, así mismo compararon el efecto del calcio, fósforo, cloro y magnesio en la producción de este alcaloide. Los resultados indicaron que el nitrógeno fue el principal elemento que incrementó la producción de morfina, aunque la forma en la que el nitrógeno se suministra influyó en su rendimiento, siendo el nitrato el ión más efectivo para incrementar el contenido de morfina, en tanto que con el amonio se inhibe la producción de morfina. Los autores sugieren un desacoplamiento de la fosforilación oxidativa por el amonio y la inhibición de los sistemas enzimáticos implicados en la biosíntesis de la morfina.

Yadav *et al.* (1984) estudiaron el efecto de la aplicación de nitrógeno (50, 100, 150 y 200 kg ha<sup>-1</sup>) en la producción de biomasa y morfina de *P. somniferum*, encontrando que todas las concentraciones de nitrógeno evaluadas incrementaron el contenido de morfina con respecto al control. La máxima concentración de morfina fue obtenida con el suministro de 100 kg ha<sup>-1</sup>, sin embargo, la concentración de morfina disminuyó cuando se excedió esa dosis.

En una serie de experimentos Laughlin (1982) evaluó el efecto del tiempo de aplicación y diferentes tipos de suministro de nitrógeno en el contenido de morfina en *P. somniferum*. En el primer ensayo suministró sulfato de amonio (50, 100, 150 y 200 kg ha<sup>-1</sup>) y obtuvo el mejor resultado con 100 kg ha<sup>-1</sup> con un incremento de 10-20 % del contenido de morfina, comparado con las cantidades de nitrógeno aplicadas comercialmente (20 kg ha<sup>-1</sup>). En el segundo ensayo aplicó por separado nitrato de amonio, sulfato de amonio, nitrato de potasio, nitrato de calcio y urea a diferentes concentraciones (0, 40 y 80 kg ha<sup>-1</sup>). En este ensayo observó que la forma y concentración de nitrógeno aplicado tuvieron un efecto similar en el contenido de morfina, sin embargo la máxima concentración fue obtenida con altas tasas de irrigación. También en 1987 Laughlin evaluó el efecto del nitrato de amonio (0, 40 y 80 kg ha<sup>-1</sup>) con diferentes densidades de plantas de *P. somniferum* (25, 50, 100 y 200 plantas/m<sup>2</sup>). Los resultados indicaron que el nitrógeno incrementó el contenido de morfina (7 %) y la tendencia de incremento disminuyó cuando la población de plántulas fue mayor.

Losak y Ritchter (2004) suministraron nitrato de amonio (0.6 y 0.9 g de N) a plantas de *P. somniferum*, en las cuales se incrementó el contenido de morfina con el suministro de nitrógeno particularmente con 0.9 g (aprox. 60 kg ha<sup>-1</sup>), demostrando una alta correlación ( $r^2=0.85$ ) entre la concentración de nitrógeno aplicada con el contenido de morfina.

En otro estudio, Losak *et al.* (2009) evaluaron el efecto combinado del suministro de nitrato de amonio (0.9 y 1.5 g de N) y potasio en forma de cloruro de potasio y sulfato de potasio (0.845 y 1.69 g) en plantas de *P. somniferum* var. Buddha. Los resultados indicaron que el potasio en ambas formas no interviene en la acumulación de morfina, mientras que con la aplicación de 0.9 g de nitrógeno en forma de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> el contenido de morfina se incrementó 2.11-2.21 % y con el suministro de 1.5 g de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (que equivale a 100 kg ha<sup>-1</sup>) obtuvieron aumentos de 2.04-2.4 % de morfina, por lo que consideraron que el nitrógeno es el elemento que afecta la concentración de morfina. De acuerdo a los resultados de los estudios descritos, el nitrógeno tiene un papel importante en el incremento en el contenido de morfina en *P. somniferum*, con efectos positivos en concentraciones ≤100 kg ha<sup>-1</sup> (equivalente a 1.5 g) y negativos cuando se supera esta concentración. Sin embargo, ninguno de los estudios anteriormente citados explica la manera en que este elemento influye sobre los alcaloides (Cuadro 2).

**Cuadro 2.** Efecto del nitrógeno en alcaloides derivados de la tirosina y fenilalanina.

Alcaloides bencilisquinolínicos				
Alcaloide	Especie	Suministro de N	Efecto en el contenido de alcaloides	Referencia
Morfina	<i>Papaver somniferum</i>	(2mM)	↑	ND.
		NO <sub>3</sub>	↓	

Costes *et al.*(1976)

		NH <sub>4</sub>	↓		
		NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	↓		
		Urea			
		1X NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	↑		
Alcaloides Totales	<i>Papaver somniferum</i>	2X NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	↑	<b>240 %</b>	Khlapstev (1978)
		3X NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	↑		
		4X NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	↑		
		(NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> kg ha <sup>-1</sup> )			
		50	↑		
Morfina	<i>Papaver somniferum</i>	100	↑		Yadav <i>et al.</i> (1983)
		150	↓	<b>ND.</b>	
		200	↓		
		(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> kg ha <sup>-1</sup> )			
		50	↑		
Morfina	<i>Papaver somniferum</i>	100	↑	<b>10-20 %</b>	Laughlin (1982)
		150	↓		
		200	↓		
		(NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> kg ha <sup>-1</sup> )			
		0	↑		
Morfina	<i>Papaver somniferum</i>	40	↑	<b>7 %</b>	Laughlin (1987)
		80	↑		
		(NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> kg ha <sup>-1</sup> )			
Morfina	<i>Papaver somniferum</i>	40	↑	<b>0.85-</b>	Losak y Ritchter (2004)
		60	↑	<b>1.01 %</b>	
		(NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> kg ha <sup>-1</sup> )			
Morfina	<i>Papaver somniferum</i>	60	↑	<b>2.21 %</b>	Losak <i>et al.</i> (2009)
		100	↑	<b>2.40 %</b>	
		(Nitrógeno mg L <sup>-1</sup> )			
Chelindolina	<i>Chelidonium majus</i>	200 1.5:1, NH <sub>4</sub> / NO <sub>3</sub>	↑	<b>1.40 %</b>	Manukyan (2005)

168 NO <sub>3</sub>	↑	
154 NO <sub>3</sub>	↑	
140 3:1, NH <sub>4</sub> / NO <sub>3</sub>	↑	<b>1.32 %</b>

---

### Alcaloides de tipo alquilamida

		(mM NO <sub>3</sub> +74 kBq of L-[U- <sup>14</sup> C]Phe)		
Capsaicina	<i>Capsicum frutescens</i>	0	↓	
		5	↑	Lindsey (1985)
		10	↓	
		25	↓	<b>15 %</b>
		50	↓	
		NaNO <sub>3</sub> mM		
Capsaicina	<i>Capsicum annum</i>	1	↑	
		7.5	↑	
		15	↑	
		22.5	↓	<b>133 %</b>
		30		Johnson y Decoteau (1996)
		NaNO <sub>3</sub> mM		
Dihidrocapsaicina	<i>Capsicum annum</i>	1	↑	
		7.5	↑	
		15	↑	
		22.5	↑	
		30	↑	<b>200 %</b>
		Urea (mM)		
Capsaicina	<i>Capsicum chinense</i>	0	↑	Medina-Lara <i>et al.</i> (2008)
		1	↑	
		7.5	↑	

---

15	↑	<b>750 %</b>
22	↑	
30	↑	

#### Alcaloides de Amarillydaceae (Benzapenina)

Galantamina	<i>Narcissus pseudonarcissus</i>	NO <sub>3</sub> / NH <sub>4</sub> (14:1)			Lubbe <i>et al.</i> (2011)
		110 kg ha <sup>-1</sup> N	↑		
		220 kg ha <sup>-1</sup> N	=	<b>16.6 %</b>	

#### Alcaloides de tipo fenetilisquinolina

Colchicina	<i>Colchicum autumnale</i>	0 -60 mM N (NH <sub>4</sub> /NO <sub>3</sub> )			Hayashi <i>et al.</i> (1988)
		60 mM(20:40 mM NH <sub>4</sub> /NO <sub>3</sub> )	↑	<b>200 %</b>	

- ↑ Mayor incremento de alcaloides
- ↑ Incremento de la concentración de alcaloides
- ↓ Disminución de la concentración de alcaloides
- = La concentración permanece sin cambios
- ND.** No disponible

Los anteriores estudios demuestran que el nitrógeno puede afectar el contenido de los alcaloides bencilisoquinolínicos. También señalan que existe un rango en el cual el nitrógeno puede incrementar o disminuir los niveles de los alcaloides; por ejemplo, en *P.somniferum* los niveles de morfina se incrementaron con el suministro de nitrógeno en concentraciones  $\leq 100$  kg ha<sup>-1</sup>. Sin embargo, se desconoce si el incremento o disminución de los alcaloides se debe a que la disponibilidad de nitrógeno altera la actividad de las enzimas involucradas en la biosíntesis de los alcaloides derivados de estas rutas o si estos metabolitos secundarios se acumulan solamente y se translocan de un órgano a otro. Por otra parte ninguno de los estudios realizados con respecto a este elemento considera que el metabolismo del nitrógeno es dinámico durante el día, en consecuencia el impacto del nitrógeno en los alcaloides también podría ser distinto. En este trabajo se aportan algunas evidencias sobre estos fenómenos y se aportan evidencias más claras sobre como el nitrógeno influye en el contenido de los alcaloides bencilisoquinolínicos.

## 1.10 Distribución taxonómica y diversidad de alcaloides bencilisoquinolínicos

Los alcaloides bencilisoquinolínicos constituyen uno de los grupos más amplio y diverso de alcaloides con aproximadamente 2500 estructuras identificadas, las que a su vez podrían clasificarse en diferentes grupos estructurales como protoberberinas, benzofenantridinas, ftalideisoquinolinas, aporfinas, pavinas, rhoeadinas, protopinas y morfinaños (Hagel y Facchini, 2013). La presencia de este tipo de alcaloides obtenidos de diferentes *taxa*, ha motivado el establecimiento de una probable relación entre la distribución de los ABI con las familias de angiospermas que los contienen, sugiriendo que son abundantes en las familias Magnoliaceae, Eumagnoliidae Ranunculaceae, Berberideaceae, Menispermaceae y Papaveraceae (Liscombe *et al.*, 2005; Beaudoin y Facchini, 2013) aunque también se han encontrado en familias más distantes como Rutaceae, Lauraceae, Cornaceae, Nelumbonaceae y en algunos casos en el orden Piperales (Liscombe *et al.*, 2005). Se cree que los alcaloides bencilisoquinolínicos de las diferentes familias que los biosintetizan tuvieron un origen monofilético a partir de angiospermas basales y de la evolución de las proteínas alergénicas PR10 y Bet v1 de un ancestro común que originó a la enzima norcoclaurina sintasa; las evidencias son su similitud estructural con la proteínas PR10 y Bet v1 y su utilidad como marcador bioquímico clave por su función catalítica en la primera reacción biosintética del precursor central de los alcaloides bencilisoquinolínicos (Samanani *et al.*, 2004). Esta hipótesis respondería en parte el porqué los alcaloides bencilisoquinolínicos pueden encontrarse en un grupo reducido de plantas y también porqué se encuentra en otras familias filogenéticamente más lejanas.

Las monoxigenasas dependientes del citocromo P450 cumplen un papel importante en la biosíntesis y diversificación de este grupo de alcaloides, ya que se encargan de modificar la estructura del esqueleto carbonado de los alcaloides bencilisoquinolínicos mediante la metilación, reducción, oxidación así como en la formación de puentes metilendioxi, en algunos casos intervienen en la desalogenación, desalquilación, desaminación y epoxidación de los alcaloides (Schuler, 1996; Chou y Kutchan, 1998; De Luca y Laflamme, 2001, Liscombe y Facchini, 2008). Sin embargo, estas enzimas no son exclusivas de la ruta biosintética de los alcaloides bencilisoquinolínicos, ya que se han documentado monoxigenasas-P450 dependientes que participan en la diversificación de metabolitos secundarios entre ellos los flavonoides, cumarinas, furanocumarina, terpenoides y glucósidos cianogenicos, y también en la biosíntesis de otro tipo de alcaloides como los indol monoterpénicos, tropánicos y derivados de la nicotina (Schuler, 1996). Sin embargo, existen monooxigenasas-P450 como la subfamilia CYP709 que son exclusivas de la ruta biosintética de los alcaloides bencilisoquinolínicos (Takemura *et al.*, 2010).

El alcaloide reticulina es el punto de diversificación de la ruta biosintética de los alcaloides bencilisoquinolínicos, para su formación una serie de enzimas monoxigenasas dependientes del citocromo P450 (norcoclaurina 6-*O*-metiltransferasa (6OMT), coclaurina N-metiltransferasa (CNMT), (*S*)-*N*-metilcoclaurina-3-hidroxilasa (NMCH) y 3-hidroxi-*N*-metilcoclaurina-4'-*O*-metiltransferasa (4ÓMT)), son las encargadas de modificar la estructura de su precursor norcoclaurina y posteriormente esta familia de enzimas modifican la



estructura de la reticulina para formar los subgrupos de estos alcaloides que constituyen a los alcaloides bencilisoquinilínicos (Liscombe y Facchini, 2008; Pienkny *et al.*, 2009; Onoyovwe *et al.*, 2013).

Algunas enzimas monoxigenasas-P450 involucradas en la biosíntesis de los alcaloides bencilisoquinolínicos tienen la capacidad de participar en rutas distintas de formación de alcaloides, es decir, una enzima puede participar en dos o más ramas de la biosíntesis de los alcaloides bencilisoquinolínicos; por ejemplo, en *Coptis japonica* la enzima sculerina-9-O-metil transferasa (CjSMT) está involucrada en la producción de tetrahydrocolumbamina y su actividad no se encuentra en *Eschscholzia californica*, sin embargo la expresión ectópica de CjSMT en *E. californica* indujo la acumulación de columbamina además de obtener un perfil más rico de alcaloides en comparación con la especie silvestre (Sato *et al.*, 2001). Posiblemente se deba a que esta familia de enzimas carece de estricta especificidad sobre el sustrato y la homología estructural de sus secuencias que se encuentran filogenéticamente conservadas les permite catalizar sustratos similares (De Luca y Laflamme, 2001; Liscombe *et al.*, 2005; Liscombe y Facchini, 2008).

Otro aspecto interesante de este estudio es que las monoxigenasas-P450 son capaces de convertir un alcaloide en otro a través de su oxidación o epoxidación. En alcaloides bencilisoquinolínicos por ejemplo la enzima CjSMT en *E. californica* produjo el alcaloide bencilisoquinoltetrahydrocolumbamina, que es la forma oxidada de la columbamina. Esta actividad ha sido documentada en diferentes tipos de alcaloides como los indol monoterpénicos y los tropánicos (Chou y Kutchan, 1998). En alcaloides tropánicos, el ejemplo más representativo es la conversión de la hiosciamina a escopolamina. La conversión se le ha atribuido a la actividad de la enzima 6 $\beta$ -hidroxihiosciamina, una enzima que pertenece a la familia de dioxigenasas oxoglutarato-dependientes que cataliza la hidroxilación en la posición 6 $\beta$  en la hiosciamina y posteriormente su epoxidación (formación de un puente 6,7-epoxi) de manera consecutiva para formar escopolamina (Hashimoto *et al.*, 1993). Esta familia de enzimas se encuentra presente en la biosíntesis de alcaloides bencilisoquinolínicos (Onoyovwe *et al.*, 2013; Beaudoin y Facchini, 2014). Por ejemplo, la tebaína-6-O-desmetilasa (T6OMD) cataliza la 6-O-desmetilación de la tebaína y oripavina para formar codeinona y morfina respectivamente, así mismo la codeína-O-desmetilasa (COMD) convierte mediante una reacción de 3-O-desmetilación a la codeína y tebaína en morfina y oripavina respectivamente (Hagel y Facchini, 2010). Es posible que las monoxigenasas P450 contribuyan a la interconversión de los alcaloides aporfínicos en anonáceas particularmente entre los alcaloides lisicamina, lirioidenina y aterospermidina. Orozco-Castillo (2009) sugiere una posible interconversión entre la lirioidenina y la aterospermidina provocado por el efecto en el suministro de nitrógeno en *Annona diversifolia*, de manera similar a lo reportado por Demeyer y Dejaegere (1992) en los alcaloides tropánicos hiosciamina y escopolamina de *Datura stramonium*. Sin embargo, la ruta biosintética de los alcaloides aporfínicos en anonáceas no ha sido elucidada, por lo tanto se desconocen las enzimas involucradas en la biosíntesis de estos alcaloides.

### 1.11 La familia Annonaceae

La familia Annonaceae es un grupo ancestral de plantas considerada como la más diversa del orden Magnoliales debido a su riqueza y abundancia de individuos (Mass *et al.*, 2011, Chatrou *et al.*, 2014). Está formada por 2400 especies agrupadas en 108 géneros (Chatrou *et al.*, 2014) y se encuentran clasificados en 4 subfamilias: Anaxagoreoideae, Ambavioideae, Annonoideae y Malmeoideae (Rainer, 2013). Los análisis filogenéticos de esta familia indican dos principales clados originados monofíleticamente: la subfamilia Malmeoideae que incluye el 35 % de las especies y la subfamilia Annonoideae que representa el 60 % de las especies de la familia Annonaceae e incluye al género *Annona* (Chatrou *et al.*, 2014).

Generalmente las Anonáceas son árboles, arbustos y lianas, que se caracterizan por tener flores con el perianto diferenciado en sépalos y pétalos dispuestos en la parte axilar de los tallos, o bien como inflorescencias terminales; presentan hojas simples y alternadas, así como el endospermo ruminado (Standley y Steyermark, 1946; Cronquist, 1988). Se distribuyen en los trópicos de América, África y Asia, particularmente son encontradas en los bosques lluviosos (Burnham y Johnson, 2004). El origen de su distribución ha sido inferido a través de análisis moleculares, filogenéticos, palinológicos y por el registro fósil de endospermo y polen. Estos estudios sugieren que el centro de origen de esta familia se encuentra en América del Sur o África y su dispersión se originó después de la ruptura de Gondwana a través del agua, con la migración de especies a distancias cortas antes de la divergencia de los continentes. Su distribución en Asia se cree se debió a eventos cronológicamente más recientes y es explicado por el intercambio de especies a través de las rutas de migración (Richardson *et al.*, 2004).

En México se encuentran 16 géneros y 63 especies distribuidas en la región sureste del país (Andrés-Agustín y Andrés-Hernández, 2011). El género *Annona* es el más representativo y conocido en México debido a que especies como *A. diversifolia* Saff., *A. muricata* L., *A. cherimola* Mill., *A. squamosa* L., *A. reticulata* L. y *A. purpurea* L. son apreciadas por su valor comercial (Andrés-Agustín y Ledesma, 2014), cultural y medicinal (Martínez-Vázquez y Estrada-Reyes, 2014).

### 1.12 Alcaloides bencilisoquinolínicos en la familia Annonaceae

Los alcaloides son uno de los dos grupos más importantes de metabolitos secundarios presentes en la familia Annonaceae. De acuerdo a Cavé (1985) la mayoría de los alcaloides de esta familia son de tipo isoquinolínico o tienen su origen en ésta estructura, y son derivados principalmente de los aminoácidos tirosina y fenilalanina. También se ha señalado la presencia de alcaloides de tipo  $\beta$ -carbolina e indol sesquiterpénicos derivados del triptófano.

En Annonaceae se ha documentado la presencia de alcaloides de tipo isoquinolina simple, cularinas (isoquinolinas con un esqueleto tetracíclico incorporado a un sistema oxepina), morfandienona, fenantrenos,

berberinas, tetrahidroprotoberberinas, oxoprotoberberinas, bencilisoquinolinas, bisbencilisoquinolinas, benciltetrahidroisoquinolinas, dibenzopirrocólinas (producto de la oxidación de la tetrahidrobencilisoquinolina laudanosolina), proaporfinas, aporfinoideas (*N*-metoxicarbonil) y aporfinas (Shamma, 1972; Leboeuf *et al.*, 1982; Chen *et al.*, 1996). Algunos casos excepcionales como los alcaloides pirimidina- $\beta$ -carbolina como anomontina, metoxianomontina y *N*-hidroxianomontina fueron reportados en *Annona montana* (Leboeuf *et al.*, 1982), *A. foetida* (Costa *et al.*, 2009) y *A. purpurea* (Rejón-Orantes *et al.*, 2011), así mismo el alcaloide indol sesquiterpénico polisina aislado de *Polyalthia suaveolens* (Ngantchou *et al.*, 2010).

Los alcaloides aporfínicos son los más abundantes en la familia Annonaceae. Su estructura se basa en cuatro anillos aromáticos (A, B, C y D), los anillos A, B y D biogénicamente provienen de la condensación de dos moléculas de tirosina y caracterizan la estructura de la 1-bencilisoquinolina, en tanto que el anillo C aporfínico se forma por la ciclación de los anillos B y D mediante un acoplamiento oxidativo (Kametani y Fukumoto, 1971; Shamma 1972; Hagel y Facchini, 2013). La diversificación de los alcaloides aporfínicos depende del tipo y número de sustituciones en su estructura, ya sea di-, tri-, tetra-, penta- y hexa- sustituidos y los grupos funcionales sustituyentes frecuentemente son hidroxil, metoxil, metilendioxil, carbonilo y en algunos casos se encuentran *N*-óxido sustituidos. Las sustituciones en las aporfinas pueden encontrarse en los cuatro anillos aromáticos, sin embargo, es más común en la naturaleza encontrar aporfinas tetra sustituidas en las posiciones 1, 2, 9, 10- así como 1,2 10, 11 (excepto el grupo metilendioxil en los anillos A y D) (Israilov *et al.*, 1980). Se ha establecido que las aporfinas de Annonaceae tienen patrones característicos en la sustitución, ya sea que se encuentren oxigenadas en la posición C-7 lo que produce una configuración de tipo C-6a R, también es frecuente encontrar la aporfinas oxigenadas en C-4 y C-7, así mismo solamente en Annonaceae se ha encontrado el C-7 metoxilado (Israilov *et al.*, 1980, Guinaudeau y Shamma, 1982; Tantisewie y Ruchirawat, 1992). En la familia Annonaceae se ha documentado el aislamiento de aporfinas de tipo 7-hidroxil-7-metilaporfinas, 7,7-dimetilaporfinas, oxoaporfinas, 4,5- y 4,7-dioxoaporfinas, dehidroaporfinas, diaporfinas, 10,11-dihidroxil-,1,2-dimetoxinoraporfinas, 7-dehidroaporfinas, secoaporfinas, por mencionar algunas (Leboeuf *et al.*, 1982; Guinaudeau y Shamma, 1982; Guinaudeau *et al.*, 1988; Protais *et al.*, 1992; Guinaudeau *et al.*, 1994; Bentley, 1998; Chang *et al.*, 2000; Bentley, 2006; Nishiyama *et al.*, 2006).

Los alcaloides bencilisoquinolínicos de la familia Annonaceae se consideran un recurso importante para la creación de nuevos fármacos derivado de sus propiedades biológicas y farmacológicas. Entre las actividades biológicas más importantes se encuentra la antimicrobiana, antitumoral, dopaminérgica, antiprotozoaria, nematocida, antiviral, entre otras; por lo tanto, los alcaloides bencilisoquinolínicos pueden llegar a utilizarse directamente o ser considerados como fuente de inspiración en la preparación de nuevos medicamentos de síntesis para enfrentar la problemática de salud que existe actualmente en el mundo (Cortes *et al.*, 2014). Por ejemplo, Camacho-Corona *et al.* (2009) reportó que la liriodenina tiene una actividad alta (CMI 3.125  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) contra cepas de *Mycobacterium tuberculosis* sensibles y presentó moderada actividad (CMI 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) contra

cepas multiresistentes a fármacos. Así mismo la liriodenina ha demostrado ser un agente antiproliferativo contra carcinomas hepatocelulares (Hep G2 and SK-Hep-1) (Hsieh *et al.*, 2005). Además se han llevado a cabo ensayos con alcaloides bencilisoquinolínicos para tratar desórdenes neurológicos como la enfermedad de Huntington, la esquizofrenia y el Parkinson; como ejemplo, se ha modificado la estructura base de la isoquinolina a través de alquilaciones (1-alkilisoquinolina), hidroxilaciones (6-hidroxiisoquinolina) y halogenaciones (7-cloroisoquinolina), los cuales mostraron afinidad por los receptores dopaminérgicos tipo D2 y actividad antidepresora antagonizada por el haloperidol (Cortes *et al.*, 2014). Los anteriores ejemplos solo son algunas evidencias de las propiedades farmacológicas que los alcaloides bencilisoquinolínicos tienen, no obstante, aún existe un gran número de alcaloides de este tipo que aún no se conoce su potencial farmacológico.

## II. ANTECEDENTES

### 2.1 *Annona diversifolia* Saff.

La papausa o ilama (*A. diversifolia* Saff. sin. *A. macrophyllata* Donn sm.) es un árbol pequeño con una altura promedio de 7.5 m. Se caracteriza por tener ramas glaucas (regularmente alternadas) con hojas redondeadas o subacutadas en el ápice con tamaños entre 4-6 cm de ancho y con peciolo entre 8-18 mm de largo; las hojas inferiores de los brotes florales son orbiculares y cordado-ceñidas de 2-4 cm de longitud. Presenta flores solitarias con características particulares; están minuciosamente bracteoladas debajo de la mitad, los sépalos son redondeados a triangulares, ferruginoso-pilosos y miden entre 2 a 3 mm de longitud, también presenta tres pétalos exteriores y tres interiores; los exteriores son linear-oblongos, obtusos, minuciosamente pubescentes por fuera y miden aprox. 2.5 cm de longitud, cerca de 6 mm de ancho en la base y los internos son rudimentarios. Los frutos son ovoides generalmente de 13 a 15 cm de longitud y entre 12-15 cm de ancho, cubiertos por protuberancias ligeramente redondeadas. Las semillas presentan coloración café-cobrizo, tienen la testa dura y lustrosa, su tamaño oscila entre los 2 cm de largo y 1 cm de ancho, y se caracterizan por tener el endospermo ruminado (Standley y Steyemark, 1946; Gentry, 1995).

Esta especie se encuentra distribuida en zonas tropicales entre los 250 a 600 msnm, particularmente en México se encuentra en los estados de Michoacán, Colima, Guerrero, Oaxaca y Chiapas. La papausa es una planta que no es cultivada de manera extensiva, se ha documentado que el cultivo de *A. diversifolia* se limita a huertos y a traspatio, sin embargo, también es posible encontrarla de manera silvestre (Otero-Sánchez *et al.*, 2006; Andrés-Agustín y Segura-Ledesma, 2014).

## 2.2 Estudios de los alcaloides bencilisoquinolínicos en *Annona diversifolia*

Los trabajos de investigación sobre esta especie en general son escasos en cuanto alcaloides se refiere. Los primeros trabajos para el conocimiento del perfil fitoquímico de *A. diversifolia* fueron realizados por González-Esquinca (2001) que estableció la presencia de aceites esenciales y de alcaloides oxoaporfínicos en árboles adultos y juveniles y su relación fitoquímica con otras especies del género *Annona*. En este trabajo se reportó la presencia de las aporfinas anolobina y liriodenina en las raíces de *A. diversifolia*. De la Cruz (2001) estudió la abundancia y bioactividad de acetogeninas en esta especie destacando la obtención de las acetogeninas como rolliniastatina-2 y laherradurina.

Además del perfil fitoquímico, los alcaloides de *A. diversifolia* han sido estudiados por su actividad biológica. Los estudios previos sugieren que los alcaloides y extractos alcaloidales presentan diversos tipos de actividad biológica. La actividad antimicrobiana de la liriodenina y de algunos extractos orgánicos de *A. diversifolia* fue reportado por Riley-Saldaña (2007) que demostró el efecto inhibitorio de la liriodenina en el crecimiento de cepas de *Staphylococcus epidermidis* y *Candida albicans*, mientras que los extractos alcaloidales de tallos y raíces de esta especie presentaron actividad antimicrobiana sobre cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* y *Bacillus subtilis*. La actividad larvicida fue reportada por González-Esquinca *et al.* (2012) a través del ensayo con larvas de mosca de la fruta (*Anastrepha ludens*) expuestas durante 72 h a concentraciones de 100, 1000 y 2000 mg ml<sup>-1</sup> de extractos etanólicos y acuosos obtenidos de tallos y hojas de *A. diversifolia*. Los resultados indicaron que los extractos más efectivos como larvicida fueron el extracto etanólico de tallos, el extracto acuoso de tallos y hojas, con porcentajes de mortalidad de larvas de 89.3, 74.3 y 74.0 %, respectivamente. También se ha documentado la propiedad insecticida de los extractos orgánicos de ésta especie, Asencio-Alvarado (2012) evaluó su efectividad como insecticida y repelente de extractos etanólicos de semilla de *A. diversifolia* a concentraciones de 50, 150 y 300 ppm para el control del gorgojo común del frijol (*Zabrotes subfasciatus*); encontrando la propiedad disuasoria e insecticida con las tres concentraciones evaluadas del extracto etanólico, siendo más efectivo el extracto con 300 ppm. Rueda-Pérez (2007) evaluó la actividad insecticida de extractos acuosos y etanólicos obtenidos de los tallos y hojas de *A. diversifolia* que fueron aplicados a larvas y a ejemplares adultos de la mosca de la fruta (*Anastrepha ludens*), de los cuales los extractos etanólicos fueron más efectivos contra las larvas y los extractos acuosos contra las moscas adultas.

Se ha demostrado que los alcaloides y extractos alcaloidales de *A. diversifolia* tienen actividad farmacológica importante, ya que pueden modificar la actividad del sistema nervioso central. Aguilar *et al.* (2011) reportaron que los extractos alcaloidales de raíz de *A. diversifolia* presentan actividad ansiogénica en ratonas Balb/C cuando se aplica a una concentración de 30 mg/k/día, dado que las ratonas desarrollaron signos de ansiedad como calvicie e hiperactividad. En contraste, González-Trujano *et al.* (2006, 2009) demostraron que

los extractos etanólico de hojas de *A. diversifolia* tienen propiedades anticonvulsivas y antiepilépticas en ratones Wistar con epilepsia inducida. Los extractos disminuyeron tanto la frecuencia de los ataques como la duración de los mismos, lo cuál es atribuído a la disminución de la actividad paroxística en la neurotransmisión gabaminérgica. De manera similar, Rejón-Orantes et al. (2010) determinó que la administración sistémica del alcaloide liriódenina a ratones Balb/C provoca los efectos cataleptogénicos de corta duración, ansiolítico, hipnótico y una disminución de la actividad motora; todos ellos atribuíbles a la inhibición de la actividad dopaminérgica del sistema nervioso central.

Desde el punto de vista fisiológico, destacan los estudios de De la Cruz-Chacón y González-Esquinca (2012) que determinaron la importancia de los alcaloides aporfínicos como mecanismo de defensa de *A. diversifolia* durante la etapa de germinación. En el estudio demostraron la relación entre la presencia de liriódenina biosintetizada en la imbibición de la semilla y su actividad fungicida sobre *Aspergillus glaucus* y *Rhizopus stolonifer*, los cuales están implicados en la putrefacción de la semilla durante la germinación. También ha sido evaluada la biosíntesis de los alcaloides bencilisoquinolínicos durante la etapa de germinación y las primeras etapas de desarrollo, en la cuál De la Cruz-Chacón y González-Esquinca (2013) evaluaron la actividad de las enzimas polifenol oxidasa (PPO, EC 1.14.18.1), amina oxidasa (AO, EC 1.4.3.4), tirosina descarboxilasa (TYDC, EC 4.1.1.25) y norcoclaurina sintasa (NCS, EC 4.2.1.78) en 4 etapas de desarrollo de *A. diversifolia*, partiendo de la imbibición de la semilla hasta el desarrollo de dos hojas verdaderas. Los resultados mostraron que las 4 enzimas implicadas en la biosíntesis de alcaloides bencilisoquinolínicos se encuentra ubicadas y activas en el embrión durante la fase de imbibición de la semilla; posteriormente durante las etapas de primordio foliar y 2 hojas verdaderas, las enzimas PPO, AO y TYDC se encontraron activas en todos los órganos de la planta, excepto la NCS que solamente se detectó en tallos y raíces.

Por último, solamente existe un antecedente sobre el estudio del efecto del nitrógeno en los alcaloides bencilisoquinolínicos de *A. diversifolia*. En el estudio Orozco-Castillo (2009) evaluó el suministro de la solución Murashige y Skoog (1962) en su formulación basal y con las modificaciones de 0 y 150 % de nitrógeno en plántulas de *A. diversifolia* bajo condiciones ambientales. Los resultados reportaron que el mayor contenido de alcaloides totales en los órganos de *A. diversifolia* fue registrado con el suministro moderado de nitrógeno (formulación nutritiva basal). Orozco-Castillo (op. cit.) demostró que el impacto del nitrógeno fue mayor en las raíces y que la mayor concentración de los alcaloides bencilisoquinolínicos se encuentran en éste órgano, particularmente el del alcaloide liriódenina; además la liriódenina fue afectada de manera negativa cuando se incrementa la concentración de nitrógeno.

Debido a la relevancia de la actividad biológica y farmacológica de los alcaloides bencilisoquinolínicos, los estudios sobre la biosíntesis y los factores que la regulan son de gran importancia. Se sabe que el contenido de alcaloides en las plantas se modifica cuando se suministra nitrógeno a través de la fertilización, sin embargo se desconoce el efecto del suministro de nitrógeno en la regulación de la biosíntesis de estos compuestos. En

estudios recientes se señala que *A. diversifolia* Saff. biosintetiza alcaloides bencilisoquinolínicos de tipo aporfina durante las primeras etapas de crecimiento, es por ello que en este trabajo se pretende conocer la importancia del nitrógeno como un posible factor modulador de la biosíntesis de los alcaloides bencilisoquinolínicos.

### **III. OBJETIVOS**

#### **General**

- ✓ Evaluar el efecto de diferentes concentraciones de nitrógeno en la biosíntesis de alcaloides en plántulas de *A. diversifolia*.

#### **Particulares**

- I. Obtener los perfiles cualitativos y cuantitativos de alcaloides en raíces y tallos de plántulas en etapa de dos a cinco hojas.
- II. Obtener los alcaloides mayoritarios detectados en etapa de plántulas de tres hojas a partir de plantas adultas.
- III. Determinar cuantitativamente los alcaloides mayoritarios en plántulas de tres hojas en tres concentraciones de nitrógeno durante siete periodos de tiempo.
- IV. Determinar la actividad de las enzimas monofenol monooxigenasa (MFO; EC 1.4.18.1) y (S)-norcoclaurina sintasa (NCS; EC 4.2.1.78) bajo tres concentraciones de nitrógeno y dos periodos de tiempo.

## IV. MÉTODO

### 4.1 Ensayo del efecto de diferentes concentraciones de nitrógeno en *A. diversifolia*

Este estudio previo se realizó con el fin de conocer si las plántulas eran capaces de tolerar las concentraciones de sales en la solución nutritiva Murashige y Skoog (1962) y de evaluar los efectos morfológicos provocados por cinco concentraciones de la solución nutritiva. Así mismo se llevó a cabo para asegurar la sobrevivencia de las plántulas y posteriormente escalar estas condiciones experimentales a nivel de cultivo hidropónico.

Para ello se colocaron 75 plántulas en etapa de primordio foliar en cultivo hidropónico en una solución Murashige y Skoog (1962) con la concentración de nitrógeno modificada (0, 15, 30, 45 y 60 mM de nitrógeno) (Cuadro I, Anexo 1) y el testigo con agua destilada. Las plántulas se mantuvieron durante 30 días con oxigenación y se desarrollaron dentro de una cámara de crecimiento (Convicon CMP4030) bajo condiciones controladas de humedad relativa (70-80 %), temperatura ( $30 \pm 2$  °C) y fotoperiodo de 12 h bajo la luz ( $24.5 \pm 10.5 \mu\text{mol m}^{-2}$ ). Para conocer las variaciones de la solución, se monitorearon los parámetros de oxígeno disuelto ( $\text{O}_2$ ), conductividad eléctrica (CE) y pH iniciales, a la mitad (15 días) y al final del experimento con un medidor de conductividad (85 YSI Incorporated) y un potenciómetro (Thermo Scientific mod. Orion 3-star).

### 4.2 Selección de la etapa de desarrollo

La selección de la etapa de desarrollo de la planta se realizó mediante un análisis fitoquímico cualitativo en plántulas cultivadas en condiciones hidropónicas sin la presencia de nitrógeno en la solución nutritiva. Este ensayo previo proporcionó datos sobre los perfiles de alcaloides (cantidad de alcaloides y abundancia relativa) durante las primeras etapas de crecimiento de *A. diversifolia*.

Para este ensayo se utilizaron 75 plántulas en una etapa previa (primordio foliar), a las cuales se les retiró el endospermo quedando únicamente con hojas cotiledonarias. Se introdujeron al sistema hidropónico con la solución Murashige y Skoog (1962) modificada eliminando el aporte de nitrógeno de la solución nutritiva (0 mM N) (Anexo 1, Cuadro I) y permanecieron en ésta solución durante aproximadamente 30 días. Las plántulas se desarrollaron dentro de una cámara de crecimiento (Convicon CMP4030) bajo condiciones controladas de humedad relativa (70-80 %), temperatura ( $30 \pm 2$  °C) y fotoperiodo de 12 h bajo la luz ( $24.5 \pm 10.5 \mu\text{mol m}^{-2}$ ). Para conocer las variaciones de la solución, se monitorearon diariamente los parámetros de oxígeno disuelto ( $\text{O}_2$ ), conductividad eléctrica (CE) y pH con un medidor de conductividad (85 YSI Incorporated) y potenciómetro (Thermo Scientific mod. Orion 3-star).

Las plántulas fueron cosechadas de acuerdo con su desarrollo y se clasificaron de manera artificial en 2  $\frac{1}{4}$  hojas, 2  $\frac{1}{2}$  hojas, 3 hojas, 3  $\frac{1}{4}$  hojas, 3  $\frac{1}{2}$  hojas, 3  $\frac{3}{4}$  hojas, 4  $\frac{1}{4}$  hojas, 4  $\frac{3}{4}$  hojas y 5 hojas, considerando el desarrollo de la hoja más pequeña. Las plántulas cosechadas se diseccionaron en raíces, tallos y hojas. Posteriormente el material vegetal seco se molió e impregnó con carbonato de sodio y se dejó secar durante tres



días en condiciones de sombra y temperatura ambiente. La extracción de alcaloides se llevó a cabo por el método ácido base de acuerdo al método de De la Cruz y González-Esquinca (2012). La detección de alcaloides se realizó por cromatografía líquida de alta resolución (Perkin Elmer® HPLC-UV/Vis, Series NCI 900) y una columna (Spheri-5 amino Perkin Elmer®, 100 × 4.6 mm; 5 µm). Se utilizó una fase móvil de cloroformo/metanol (96:4, isocrático) con flujo de 0.3 mL min<sup>-1</sup>; la temperatura de la columna se mantuvo a 30 °C. La detección UV se realizó a 300 nm. El número de alcaloides se determinó mediante cromatografía en capa fina contabilizando los compuestos que resultaron positivos con el revelado con el reactivo de Dragendorff. Sin embargo, la abundancia relativa se determinó solamente para los alcaloides liriodenina, lisicamina y aterospermidina a través de la siguiente fórmula:

$$\text{Abundancia relativa} = \frac{\% \text{ Área} \times \text{rendimiento del extracto (mg)}}{\text{Peso seco del material vegetal (mg)}}$$

### 4.3 Estudio experimental para determinar el efecto del nitrógeno

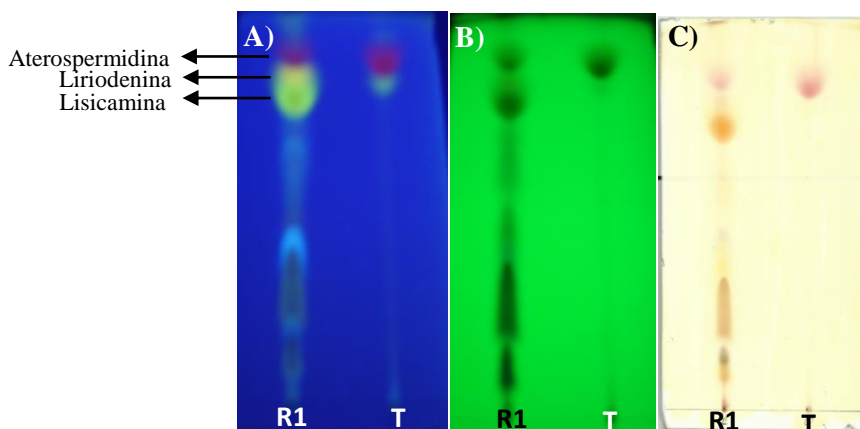
#### 4.3.1 Condiciones de crecimiento y obtención del material vegetal

Después de seleccionar la etapa de crecimiento, las plántulas con primordio foliar (25-30 días, n = 50) se cultivaron en una cámara de crecimiento (Convicon CMP4030) bajo condiciones controladas de humedad relativa (70-80 %), temperatura (30 ± 2 °C) y fotoperiodo de 12 h bajo la luz (24.5 ± 10.5 µmol m<sup>-2</sup>) suministrados por lámparas Sylvania Octron T8 y medido con un sensor de luz LI-COR modelo LI-250. Las plántulas con primordio foliar se introdujeron al cultivo hidropónico con agua destilada durante aproximadamente 15 días hasta alcanzar la etapa de 3 hojas, en ese momento se añadió la solución de nutrientes (15 L) Murashige y Skoog (1962). Las soluciones nutritivas para los tratamientos consistieron en una solución basal Murashige y Skoog (1962) de 60 mM N (41.2 mM NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> y 18.7 mM KNO<sub>3</sub>), así como la solución modificada a 30 mM N (20.4 mM y 9.6 mM NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> KNO<sub>3</sub>) y 0 mM N (0 mM NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> y 0 mM KNO<sub>3</sub> (Anexo 2, Cuadro II). El pH de las tres soluciones nutritivas se ajustó a 6.0 y la disminución de potasio aportado por el KNO<sub>3</sub> en soluciones modificadas 0 y 30 mM N fue compensada proporcionalmente con KOH.

Las plántulas se mantuvieron en estas condiciones durante los períodos 0, 2, 4, 6, 8, 12 y 24 h, en cada periodo se cosechó una muestra compuesta (n = 5 plántulas) para la extracción de alcaloides y otras 5 plántulas de los periodos 2, 4 y 6 h se congelaron en nitrógeno líquido para la evaluación de la actividad enzimática. Las soluciones nutritivas fueron monitoreadas en cada tiempo de muestreo con un medidor de conductividad (85 YSI Incorporated) y potenciómetro (Thermo Scientific mod. Orion 3-star). El material vegetal recolectado fue diseccionado en raíces, tallo y las hojas para la extracción de alcaloides.

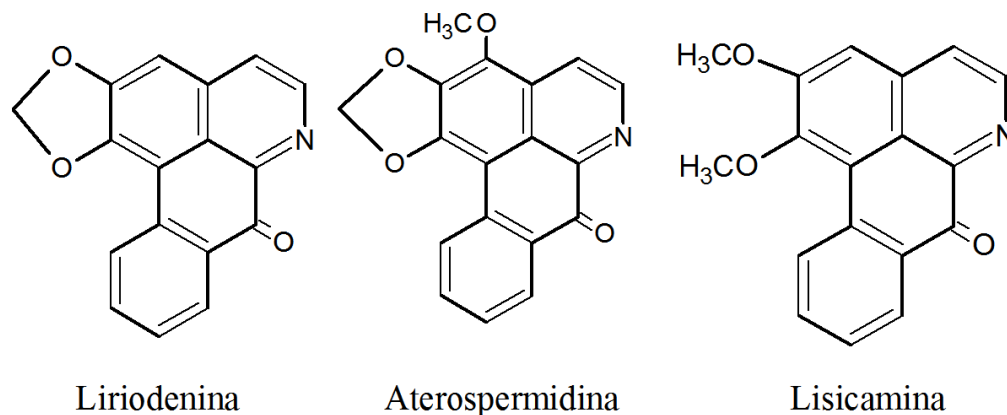
### 4.3.2 Extracción y determinación de alcaloides

En agosto de 2010, se recogieron las raíces de las plantas adultas de *A. diversifolia* en la localidad Úrsulo Galván, Chiapas. La extracción de alcaloides totales se realizó con la técnica descrita por De la Cruz y González-Esquinca (2012). Para el proceso de extracción, las raíces (1495 g) se secaron a temperatura ambiente y después se molieron hasta obtener un polvo fino. El material vegetal fue desgrasado con hexano por 24 h y posteriormente se impregnó con una solución saturada de carbonato de sodio y se dejó a sequedad. Los alcaloides se extrajeron con 2 L de cloroformo. El extracto de cloroformo se lavó con agua destilada (500 ml por 3 veces) y se acidificó con 2000 mL de HCl 1N. La fase ácida resultante se alcalinizó (pH 9.5) con una solución saturada de carbonato de sodio y se extrajo de nuevo con 1500 mL de cloroformo. Por último, la fase de cloroformo se evaporó bajo presión reducida y después se obtuvo el extracto alcaloidal (2.3 g) (Figura 5).



**Figura 5.** Perfil de alcaloides en cromatografía en capa fina de las raíces de un ejemplar adulto de *A. diversifolia* (R1) comparado con un testigo formado por la mezcla de atrospermidina y liriodenina. A) UV onda larga (365 nm), B) onda corta (254 nm) y C) revelado con Dragendorff).

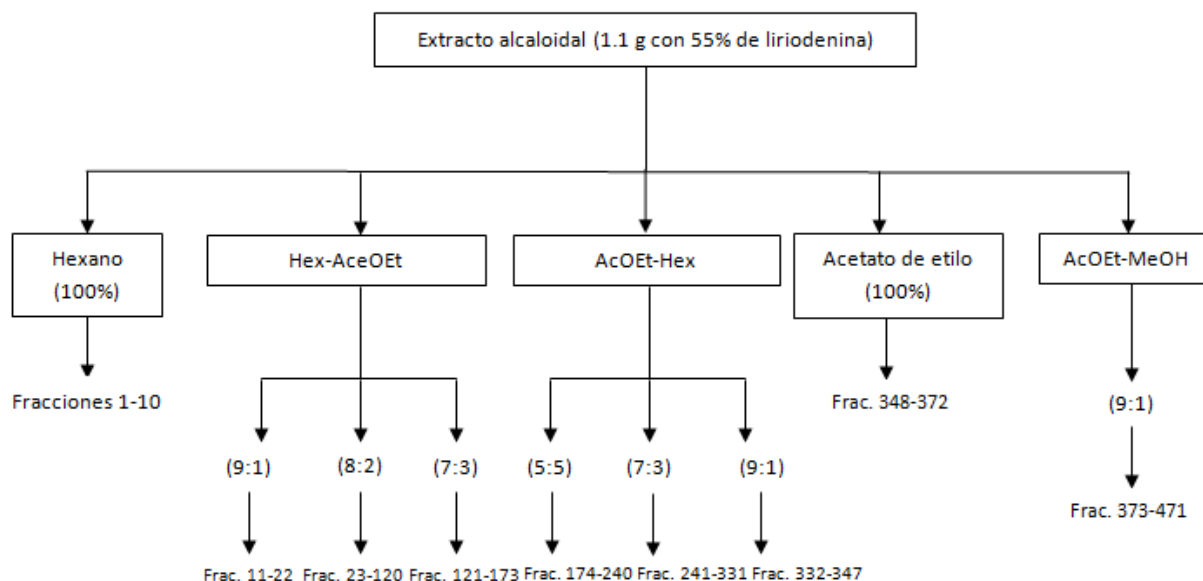
Bajo estas condiciones, la liriodenina se obtuvo en forma de precipitado. Finalmente, la liriodenina se purificó por filtración y cristalización sucesiva con cloroformo. La liriodenina (1.1698 g) se obtuvo como agujas de color amarillo (PF 280-282 °C, UV  $\lambda$  max (CHCl<sub>3</sub>): 248, 272, 310, 414), <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 Mhz):  $\delta$  8.90 (d, J = 5.4 Hz, H5),  $\delta$  8.66 (dt, J = 7.95 Hz, H11),  $\delta$  8.59 (dd, J = 7.95, 0.9 Hz, H8),  $\delta$  7.79 (d, J = 5.19 Hz, H4),  $\delta$  7.58 (dt, J = 7.8, 0.9 Hz, H10),  $\delta$  7.52 (dt, 7.94, 1.22 Hz, H9),  $\delta$  7.20 (s, H3),  $\delta$  6.39 (s, 2H) (Figura 6). El alcaloide fue identificado por el doctor Mariano Martínez Vázquez en el Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.



**Figura 6.** Alcaloides aporfínicos aislados de *A. diversifolia*.

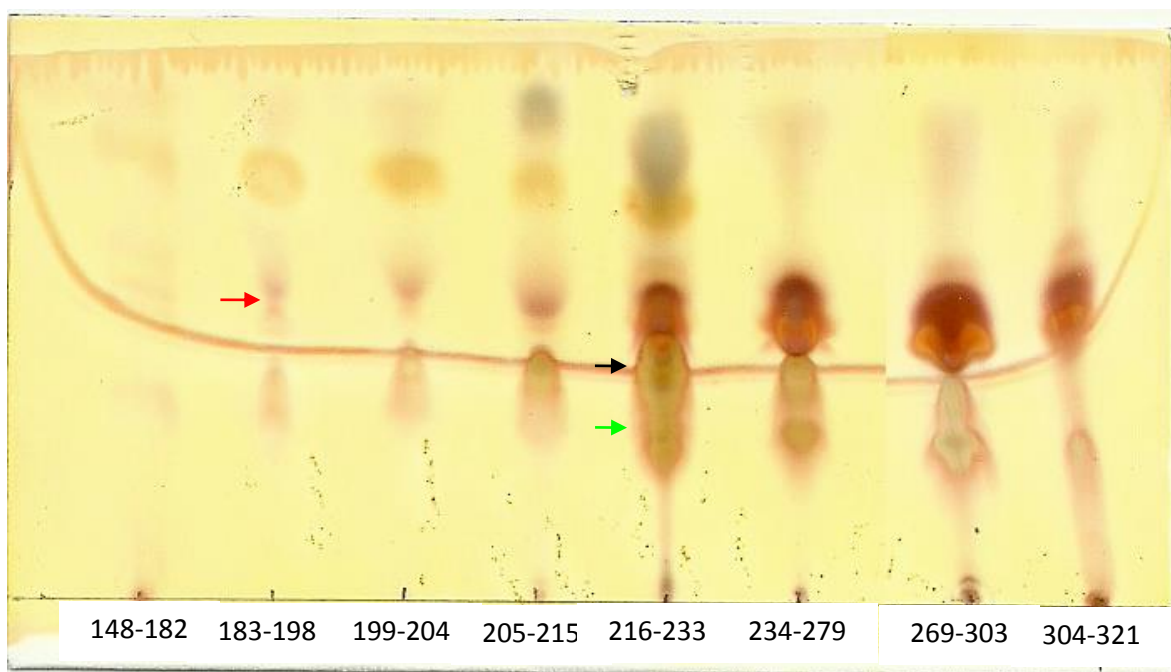
#### Separación del alcaloide aterospermidina

Otros alcaloides se obtuvieron del extracto restante (1.1 g) y fueron separados mediante una columna cromatográfica empaquetada con gel de sílice 60 HF254 (Merck, 2 × 40 cm de 0.063-0.2 mm). La columna se eluyó por etapas con los sistemas de eluyentes de polaridad creciente n-hexano: acetato de etilo: metanol (Diagrama 1).



**Diagrama 1.** Obtención de fracciones de la cromatografía de columna abierta.

Durante el procedimiento de elución, se obtuvieron 471 fracciones de 100 mL de volumen. La presencia de alcaloides en las fracciones durante la elución de la columna se monitorizó por TLC y Dragendorff reactivo (Sigma-Aldrich). Se obtuvo una mezcla de alcaloides (120 mg) a partir de las fracciones 148-321 (acetato de etilo hexano 5: 5, 7: 3, v/v) (Figura 7).



**Figura 7.** Perfil alcaloidal de las fracciones 148-321. *Aterospermidina* (flecha roja), *liriodenina* (flecha negra) y *lisicamina* (flecha verde). ( $\text{CHCl}_3\text{-MeOH}$  9:1, revelado con Dragendorff).

La aterospermidina y la liriodenina, son los alcaloides mayoritarios de las raíces de *A. diversifolia*. El primero fue denominado de esa manera en este trabajo debido a su color característico y a que se desconocía su estructura, en tanto que el segundo se identificó en estudios previos realizados por González-Esquinca (2001) y De la Cruz y González-Esquinca (2012).

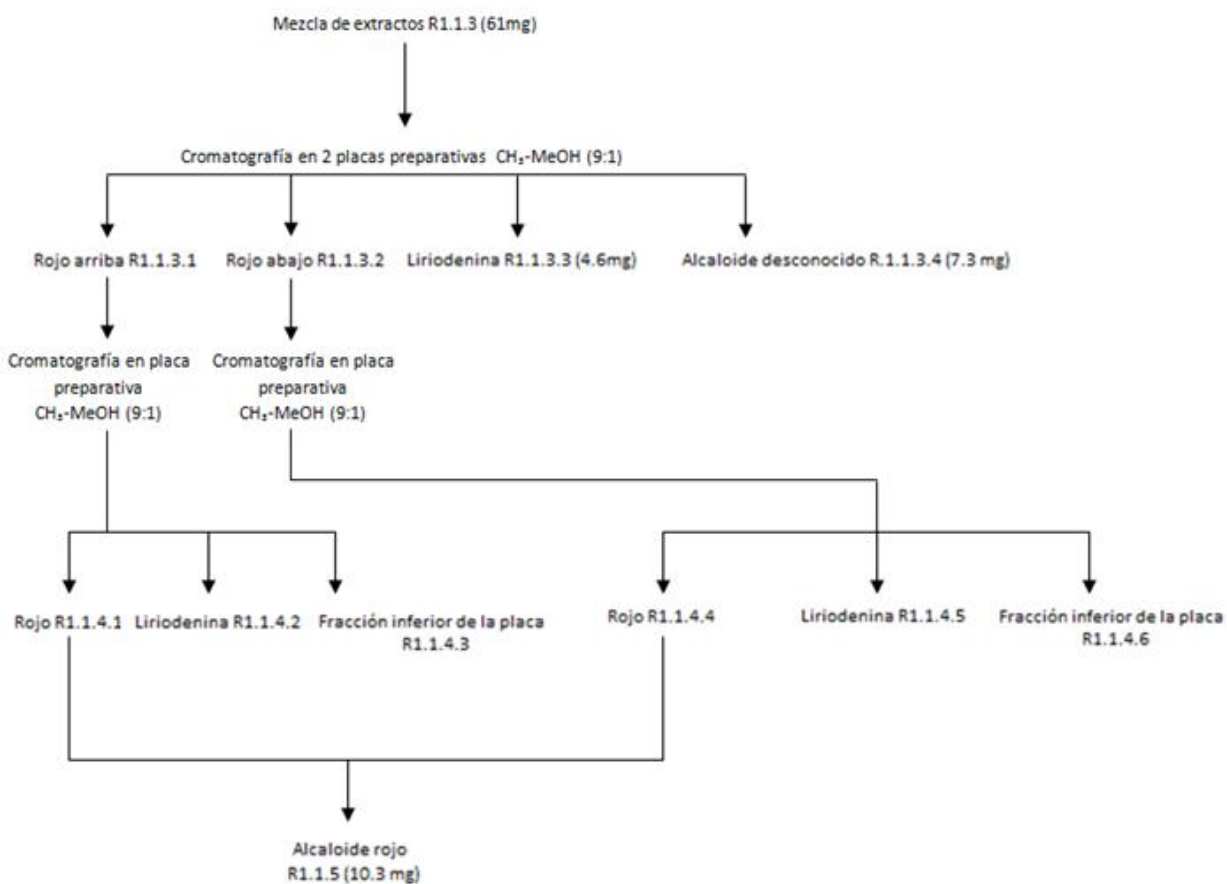
Durante el proceso de separación se observó un comportamiento similar de ambos alcaloides en los diversos sistemas de eluyentes (cloroformo, metanol, metanol-agua y cloroformo-metanol), lo que dificultó su separación debido a su similitud en la solubilidad (Cuadro 3).

**Cuadro 3.** Prueba de solubilidad de los alcaloides liriodenina y aterospermidina.

Solvente	Solubilidad de Liriodenina	Solubilidad de aterospermidina
Agua	<i>Parcial</i>	<i>Escasa</i>
Metanol	<i>Soluble</i>	<i>Soluble</i>
Cloroformo	<i>Soluble</i>	<i>Parcial</i>

No obstante, la diferencia en la solubilidad entre estos dos compuestos en cloroformo y metanol, permitió su separación. Es por ello que se utilizó la mezcla cloroformo-metanol (9:1) para la separación de la fracción R1.1.3 (61 mg).

La mezcla de aterspermidina y liriodenina (61 mg), se sometió a un proceso de recristalización inicial con cloroformo y filtraciones sucesivas al vacío, antes de aplicarse en dos placas preparativas con el objetivo de agotar en la mayor medida posible a la liriodenina. La recristalización aplicada previa a la cromatografía, también dió buenos resultados con los extractos que presentaron concentraciones altas de liriodenina y puede considerarse un paso previo antes de ser separados con placas preparativas. La mezcla de alcaloides se separó mediante placas preparativas (Sigma-Aldrich HF<sub>254</sub>, 20 × 20 cm, 1 mm de espesor) y de TLC (papel de aluminio copias de Sigma-Aldrich 20 × 20, 25 mm) impregnadas con una mezcla de etanol-ácido oxálico 8 % y se eluyó con cloroformo metanol 9:1 (v/v). En la placa preparativa se obtuvieron dos bandas entremezcladas, por lo que cada banda fue dividida a la mitad, obteniendo cuatro fracciones: fracción roja superior R1.1.1.3.1, fracción roja inferior R1.1.1.3.2, liriodenina R1.1.1.3.3 (4.6 mg) y alcaloide desconocido R.1.1.3.4 (7.3 mg) (Diagrama 2).



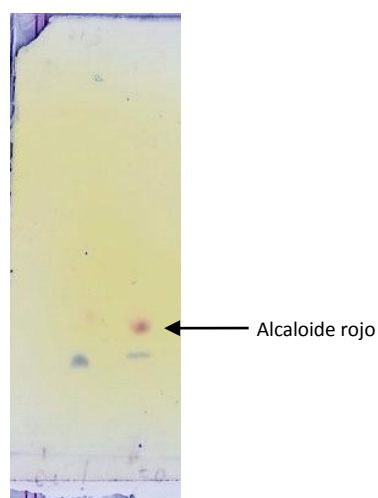
**Diagrama 2.** Proceso de separación del alcaloide aterspermidina.

Posteriormente las fracciones R1.1.1.3.1 y R1.1.1.3.2, se separaron en una placa preparativa respectivamente. Nuevamente las muestras con aterospermidina fueron reunidas para incrementar su rendimiento resultando la fracción R1.1.5 (10.5 mg). Se determinó el punto de fusión de las muestras del aterospermidina (R1.1.5), liriodenina (R1.1.2.6), compuesto morado (R1.1.2.1), alcaloide azul (R1.1.2.7), compuesto desconocido 1 (R1.1.2.2) (Cuadro 4).

**Cuadro 4.** Resultados de las pruebas de punto de fusión.

Compuestos obtenidos	Punto de Fusión	Rendimiento (%)
Aterospermidina	≈216-220°C	0.909
Liriodenina (R1.1.2.6)	≈ 280-282°C	16.09
Compuesto morado (R1.1.2.1)	≈ 235°C	0.727
Alcaloide azul (R1.1.2.7)	≈ 155-190°C	0.909
Compuesto desconocido 1 (R1.1.2.2)	≈ 235-240°C	0.09

La fracción R1.1.5 (10.5 mg) fue separada por CCF en placas de sílica impregnada con ácido oxálico al 8 % y se utilizó como fase móvil una mezcla de cloroformo-metanol 80:20 (v/v) (Figura 8).



**Figura 8.** Cromatografía en capa fina de la muestra (R1.1.5), a la izquierda el residuo de las filtraciones sucesivas y a la derecha la muestra resultante. (CHCl<sub>3</sub>-MeOH, 9:1, revelado con Dragendorff).

Como resultado de la separación cromatográfica se obtuvieron agujas rojas (4 mg) que fueron purificadas por cristalizaciones sucesivas con metanol (PF 216-220 °C, UV λ<sub>max</sub> (CHCl<sub>3</sub>): 246, 280, 312, 440, <sup>1</sup>H NMR

(CDCl<sub>3</sub>, 300 Mhz): δ 8.876 (d, J=5.1 Hz, 1H), δ 8.55 (dd, J=7.5, 1.2 Hz, 1H), δ 8.53 (d, J=7.8 Hz, 1H), δ 8.131 (d, J=5.1 Hz, 1H), δ 7.71 (dt, J=7.5, 1.2 Hz, 1H), δ 7.49 (dt, J=8.2, 1.0 Hz, 1H), δ 6.28 (s, 2H), δ 4.258 (s, 3H). El compuesto fue identificado como aterospermidina (Figura 5) por el Dr. Mariano Martínez Vázquez del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Debido al escaso rendimiento obtenido, el alcaloide lisicamina (Figura 6) que se utilizó como referencia en los análisis por cromatografía líquida (HPLC) fue amablemente proporcionado por el Dr. Diego Cortés de la Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia, España.

### 4.3.3 Cuantificación de alcaloides

La liriodenina, lisicamina y aterospermidina se cuantificaron por cromatografía líquida de alta resolución (Perkin Elmer® HPLC-UV/Vis, Series NCI 900) y una columna (Spheri-5 amino Perkin Elmer®, 100×4.6 mm; 5 μm). Se utilizó una fase móvil de cloroformo/metanol (96:4, isocrático) con flujo de 0.3 mL min<sup>-1</sup>; la temperatura de la columna se mantuvo a 30 °C. La detección UV se realizó a 300 nm. Los espectros de absorción de los alcaloides se obtuvieron con un espectrofotómetro Thermo Electron Corporation® model Genesys 10 UV. La liriodenina, lisicamina y aterospermidina presentaron los tiempos de retención de 4.7±1.0, 4.0±0.2 y 3.5±0.1 mL.min<sup>-1</sup>, respectivamente. Las curvas de calibración se construyeron con el análisis de soluciones stock de los alcaloides puros con gradientes de concentración de 1000, 875, 750, 625, 500, 250, 125, 62.5, 31.3, 15.6, 7.8 y 3.9 mg mL<sup>-1</sup> usando el programa Turbochrom Work station® (Perkin Elmer). Las curvas de liriodenina, lisicamina y aterospermidina fueron lineales, con valores r<sup>2</sup> de 0.99, 0.97 y 0.94, respectivamente. Los extractos alcaloidales de cada órgano se disolvieron a una concentración de 1 mg mL<sup>-1</sup> y posteriormente 20 μL fueron analizados en HPLC. El contenido de alcaloides se cuantificó con la conversión de los datos obtenidos del HPLC a concentración en μg utilizando las curvas de calibración y posteriormente con la siguiente ecuación:

$$[A] = \frac{(mg\ alcaloide \times FD / RE)}{MV}$$

Donde:

[A]= concentración del alcaloide aporfínico.

mg alcaloide= concentración del alcaloide obtenido de la curva de calibración.

FD= Factor de dilución.

RE= Rendimiento del extracto en gramos.

MV=Peso en g del material vegetal

#### 4.3.4 Método de evaluación de la actividad de la enzima Monofenol monooxigenasa (MFO)

La evaluación de la actividad de la monofenol monooxigenasa se realizó de acuerdo al método de Duckworth y Coleman (1970) tomando en cuenta la modificación propuesta por Espin y Wichers (1999) que indica la adición de docecilsulfato de sodio (SDS). Para ello el sobrenadante de la extracción de proteínas fue utilizado como extracto crudo de enzimas. La actividad se evaluó a partir de una alícuota ( $90 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) del extracto proteico, 1 mL de una solución de tiramina 10 mM y se ajustó el volumen a 3 mL con la solución amortiguadora de fosfato de potasio 50 mM a pH 6.5 y 0.4 mM de SDS. Se agitó e inmediatamente se registró el incremento de la absorbancia ( $A_{280\text{nm}}$ ) en 3 minutos. El cálculo de la actividad se realizó a través de las siguientes fórmulas:

$$\text{Unidades/mL enzima} = \frac{(\Delta A_{280\text{min}^{-1}} \text{ del tubo muestra} - \Delta A_{280\text{min}^{-1}} \text{ del tubo testigo}) \times FD}{(0.001 \times V)}$$

**FD**= Factor de dilución

**0.001**= El cambio de la absorbancia/min por unidad de tirosinasa a pH 6.5 a 25 °C en un volumen de reacción de 3 mL.

**V**= volumen en mililitros de la enzima usada.

$$\text{Unidades/mg proteína} = \frac{\text{unidades/mL de enzima}}{\text{mg de proteína/mL de enzima}}$$

Una unidad se asume causa el incremento de la absorbancia ( $A_{280\text{nm}}$ ) de 0.001 por minuto a pH 6.5 a 25 °C en la mezcla de reacción de 3 mL que contiene tiramina. Es decir se detecta la aparición de dopamina.

#### 4.3.5 Método de evaluación de la enzima Norcoclorina sintasa (NCS)

El extracto crudo enzimático para evaluar la actividad de la norcoclorina sintasa (NCS) fue obtenido de manera similar a la descrita para la evaluación de MFO. La actividad se evaluó en una mezcla de reacción con volumen de 4 mL que contiene solución amortiguadora de Tris-HCl 50 mM a pH 7.4, 10 % glicerol y 5 mM de 2-mercaptoetanol,  $90 \mu\text{g mL}^{-1}$  de extracto crudo de proteínas y 1 mL de dopamina 4 mM. La mezcla se incubó a 30 °C por 24 horas en la oscuridad y la reacción se detuvo añadiendo HCl 1 N. Con este método se asumió que el sustrato 4-hidroxifenilacetaldehído necesario para la reacción, era extraído de la muestra por lo que se obvió su producción. Los resultados de este método fueron positivos debido a que se observó la producción de alcaloides a través de un CCF revelada con Dragendorff.

Los alcaloides obtenidos como producto de la reacción, se extrajeron con el método ácido-base descrito anteriormente. El extracto alcaloidal se concentró al vacío, se redisolvió en metanol y cuantificó a 300 nm



empleando una curva patrón de lirioidenina (el alcaloide más abundante de esta especie). La concentración se obtuvo a través de la ecuación:

$$A_E = 0.020[A] - 0.021 \quad (r^2 = 0.998)$$

Donde:

$A_E$ =Actividad de la enzima

[A]=Concentración de alcaloides totales

Dado que el producto de la reacción es el alcaloide norcoclaurina y/o sus derivados como los alcaloides aporfínicos, la actividad de la enzima se determinó cuantificando la presencia de alcaloides totales.

#### **4.4 Análisis estadístico**

El efecto del nitrógeno en el contenido de los alcaloides totales se calculó con la sumatoria de los promedios de los tres alcaloides aporfínicos en los tres órganos de la planta y se evaluaron con ANOVA (Tukey-HSD,  $P \leq 0.05$ ). Para determinar el efecto del nitrógeno en los órganos de la planta y su variación diurna se utilizaron las medias de la concentración de los alcaloides aporfínicos ( $n = 3$ ) y se evaluó con ANOVA (prueba de Tukey-HSD,  $P \leq 0.05$ ). Además se llevaron a cabo análisis de correlación para determinar la relación entre el contenido de los alcaloides aporfínicos en cada órgano, tratamientos de nitrógeno y variación de alcaloides durante el periodo diurno.

Para determinar el efecto de los tratamientos en la actividad enzimática de la MFO y NCS se utilizó la media de cinco determinaciones y se evaluó por medio de ANOVA (Tukey-HSD,  $P \leq 0.05$ ). También se realizaron análisis de correlación entre la actividad enzimática y la concentración de alcaloides. Las evaluaciones estadísticas se llevaron a cabo con el programa Statgraphics Centurion XV.

## V. RESULTADOS

### 5.1 Ensayo de efecto de diferentes concentraciones de nitrógeno en *A. diversifolia*

Se observaron mayores cambios morfológicos como el tamaño de las hojas y raíces de las plántulas en los tratamientos de 0 a 60 mM N de la solución nutritiva que las observadas en las plántulas testigo con agua destilada. No obstante, durante los primeros 15 días cuando las plántulas presentaron 3 hojas se observaron escasos síntomas de deficiencia nutrimental. Durante ese periodo de tiempo se presentó un desarrollo más acelerado y una coloración verde intensa en las hojas de las plántulas, particularmente con los tratamientos de 45 mM y 60 mM de nitrógeno. El tallo fue el órgano menos afectado por los tratamientos debido a que no se observaron cambios significativos, aunque las plántulas desarrollaron lenticelas en la base del tallo. Las raíces adventicias presentaron necrosis, debido probablemente a la renovación periódica de las mismas, tal y como lo señala Lee (1993) “las raíces permanecen funcionales solo por un periodo corto de tiempo de pocos días, después mueren”.

A partir del día 20 se presentaron los primeros síntomas de clorosis principalmente en las plántulas de los tratamiento con 45 y 60 mM N, que se acentuó a los 30 días cuando las plántulas se encontraban en etapa de 5 hojas. Algunos de los síntomas fueron manchas necróticas y necrosis intervenal en las hojas, así como necrosis radicular. No obstante, las plántulas se mantuvieron vivas incluyendo las plántulas del tratamiento testigo. A diferencia de las plántulas con los tratamientos con 0 y 30 mM N que permanecieron sanas hasta el final del ensayo.

Estos resultados comprobaron que las plántulas de *A. diversifolia* en etapa de primordio foliar fueron capaces de crecer y desarrollarse sin deficiencias en todos los tratamientos durante 15 días hasta alcanzar la etapa de 3 hojas verdaderas. Así como sobrevivir durante 30 días aproximadamente hasta alcanzar 5 hojas. Las plántulas toleraron todas las concentraciones de sales de la solución nutritiva probadas (0, 15, 30, 45 y 60 mM N) por lo menos durante 20 días. Las plántulas también demostraron que pueden sobrevivir inclusive en la concentración más alta de la solución nutritiva (60 mM N). Los datos obtenidos en este ensayo previo, permitieron evaluar el efecto del nitrógeno en plántulas en etapa de 3 hojas bajo condiciones hidropónicas durante 15 días.

### 5.1 Selección de la etapa de desarrollo

Las plántulas se desarrollaron hasta la etapa de 5 hojas aproximadamente en 25- 30 días bajo las condiciones del cultivo hidropónico con 0 mM N (Cuadro 5).

**Cuadro 5.** Condiciones de la solución nutritiva del sistema hidropónico. O<sub>2</sub>= oxígeno disuelto, CE= conductividad eléctrica, TDS= solutos totales disueltos.

Parámetros evaluados	Valores	Desviación estándar
O <sub>2</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	5.95	1.64
CE (mS cm <sup>-1</sup> )	1.391	0.435
pH	6.11	1.06
TSD (ppm)	1391	229.57

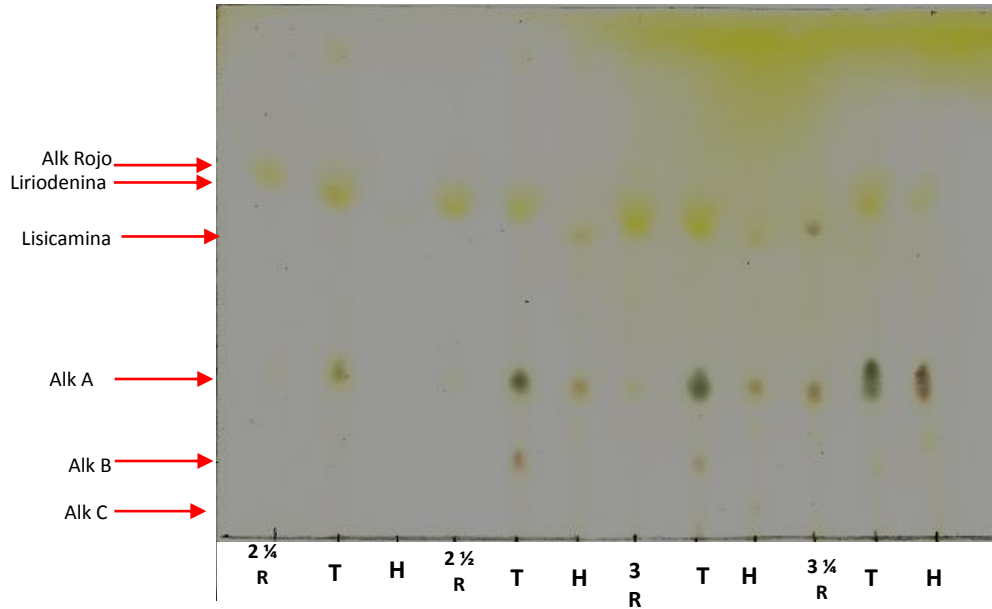
En el análisis cromatográfico (CPF) de las plántulas se detectaron 6 alcaloides durante las primeras etapas de crecimiento 2 ½ -5 hojas (Figuras 9 y 10). En la Cuadro 6 se describen los alcaloides detectados en cada etapa y órgano de la planta.

**Cuadro 6.** Distribución de los alcaloides de plántulas en las etapas evaluadas; **X** = presente.

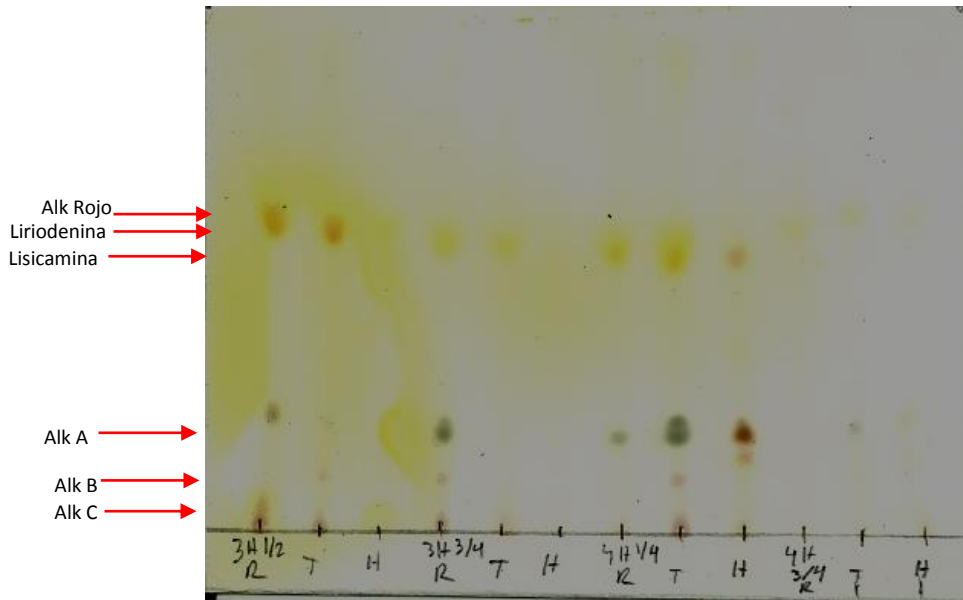
Alcaloides	Etapas (Hojas)	Órganos		
		Raíces	Tallos	Hojas
<b>Liriodenina</b>	2.25	X	X	-
	2.5	X	X	-
	3	X	X	-
	3.25	X	X	-
	3.5	X	X	-
	3.75	X	X	X
	4.25	X	X	-
	5	X	X	-
<b>Alcaloide Rojo</b>	2.25	X	X	X
	2.5	X	X	X
	3	X	X	X
	3.25	-	X	X
	3.5	-	-	X
	3.75	X	X	X
	4.25	X	X	X

	5	-	X	X
	2.25	-	-	-
	2.5	-	X	-
	3	-	-	X
<b>Lisicamina</b>	3.25	X	-	X
	3.5	X	X	X
	3.75	-	-	-
	4.25	-	X	X
	5	-	X	X
	2.25	-	X	-
	2.5	X	X	-
	3	X	X	X
<b>Alcaloide A</b>	3.25	X	X	X
	3.5	-	X	-
	3.75	X	-	-
	4.25	-	X	-
	5	-	-	-
	2.25	-	X	-
	2.5	X	X	-
	3	-	X	-
	3.25	-	-	-
<b>Alcaloide B</b>	3.5	X	X	-
	3.75	X	-	-
	4.25	X	-	-
	5	-	-	-
	2.25	-	-	-
	2.5	-	-	-
	3	-	-	-
<b>Alcaloide C</b>	3.25	-	X	-
	3.5	X	X	-
	3.75	X	X	-

4.25	-	X	-
5	X	X	X



**Figura 9.** Perfil cromatográfico de alcaloides en raíz (**R**), tallo (**T**) y hojas (**H**) de plántulas en etapa de 2 ¼ - 3 ¼ hojas en CCF revelado con Dragendorff.



**Figura 10.** Perfil cromatográfico de alcaloides en raíz (**R**), tallo (**T**) y hojas (**H**) de plántulas en etapa 3 ½ - 4 ¾ hojas en CCF revelado con Dragendorff.

*Abundancia de los alcaloides de A. diversifolia*

De los 6 alcaloides detectados, únicamente liriodenina, lisicamina y aterospermidina se encontraron presentes y con mayor abundancia en la mayoría de las etapas de crecimiento evaluadas (Cuadro 7).

**Cuadro 7.** Abundancia de liriodenina, aterospermidina y lisicamina en plántulas de *A. diversifolia* en diferentes etapas de desarrollo.

Alcaloide	Etapa de desarrollo (# hojas)	Abundancia (%)		
		Raíz	Tallo	Hojas
<i>Liriodenina</i>	2 ¼	21.82	0.50	0
	2 ½	81.7	10.31	0.55
	3	74.76	24.87	0
	3 ¼	0.014	0	0.011
	3 ½	21.3	3.83	0
	3 ¾	2.9	0.03	0
	4 ¼	3.88	0.017	0.02
	5	38.32	2.66	4.95
<i>Aterospermidina</i>		Raíz	Tallo	Hojas
	2 ¼	0	0	0.133
	2 ½	0	0	0
	3	0.02	0.4	0.3
	3 ¼	0	0.3	0
	3 ½	0	0	0.06
	3 ¾	1.39	0.32	0.8
	4 ¼	0.01	0.005	0.009
5	0	0.1	0.02	

		<b>Raíz</b>	<b>Tallo</b>	<b>Hojas</b>
	2 ¼	0	0	0
	2 ½	0	4.79	0
	3	0	0	46.08
	3 ¼	27.44	0	11.95
<i>Lisicamina</i>	3 ½	6.61	2.16	7.39
	3 ¾	0	0	0
	4 ¼	0	0.01	0.01
	5	33.5	0.07	0.14

En las primeras etapas de desarrollo, la concentración de la liriodenina fue significativamente diferente ( $P = 0.0111$ ,  $F = 5.63$ ), demostrando una abundancia variable entre las etapas (2-3 hojas vs 3 ¼ -5 hojas). La raíz es el órgano con mayor contenido de liriodenina principalmente entre las etapas 2 ¼ y 3 hojas, comparado con tallos y hojas (cuadro 5). También la liriodenina tuvo una correlación positiva ( $P = 0.0115$ ,  $r^2 = 68.26$ ) referida a su abundancia entre raíces y tallos, lo que parece indicar que este alcaloide se incrementa de manera simultánea en ambos órganos aunque con valores muy distintos. Por lo tanto los resultados sugirieron que las etapas de 2 ¼, 2 ½ y 3 hojas son las ideales para evaluar la liriodenina en las raíces. Por otro lado, la lisicamina no presentó diferencias significativas ( $P = 0.3903$ ,  $F = 0.98$ ) en cuanto a su abundancia entre los órganos. No obstante, la mayor cantidad de este alcaloide se detectó en la etapa de 3 hojas en raíces y tallos en 3 ¼ hojas (Gráfica 12).

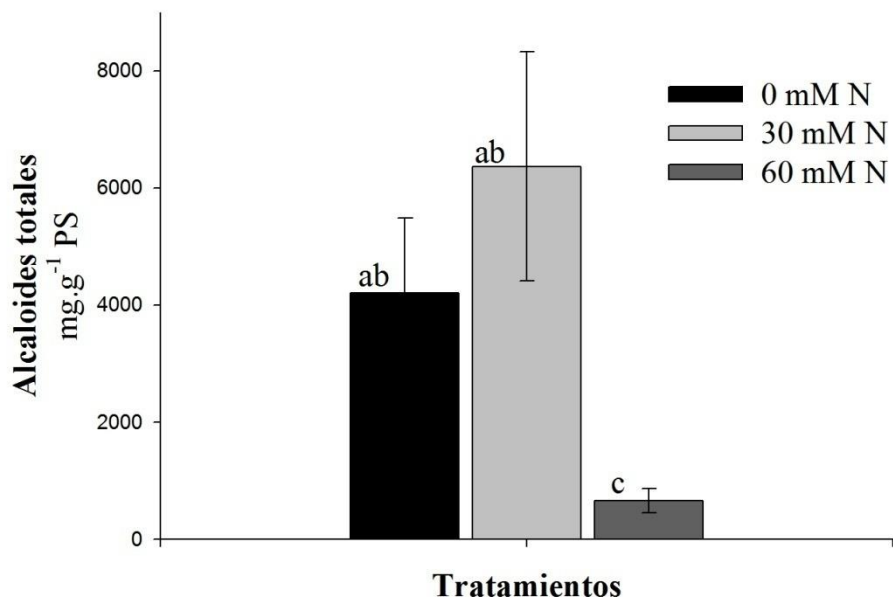
A diferencia de la lisicamina, la aterospermidina se encontró en mayor cantidad en las raíces comparada con los tallos y hojas ( $P = 0.0006$ ,  $F = 7.06$ ). La mayor abundancia de este alcaloide en los tres órganos se detectó en la etapa de 3 ¾ hojas (Cuadro 5). El análisis de la abundancia relativa de la aterospermidina en los tres órganos presentó una correlación positiva ( $P = 0.001$ ,  $0.001$  y  $0.000$ ,  $r^2 = 99.23$ ), es decir cuando se incrementa la concentración de la aterospermidina en raíces, se incrementará también en el tallo y las hojas.

Los resultados obtenidos con el análisis de los alcaloides durante las etapas de desarrollo y en cada órgano, permitió decidir que la mejor etapa para evaluar a los alcaloides liriodenina, lisicamina y la aterospermidina era la etapa de plántula de 3 hojas.

## 5.2 Estudio experimental para determinar el efecto del nitrógeno

### 5.2.1 Efecto de los tratamientos en el contenido de liriodenina, lisicamina, aterospermidina y alcaloides totales.

La mayor concentración de alcaloides totales se obtuvo con el suministro de 30 mM N. En contraste, la menor concentración se detectó con el tratamiento de 60 mM N, el cual indujo a sintetizar 9.6 veces menos cantidad de alcaloides que el registrado con el tratamiento de 30 mM N y 6.4 veces menos que con el tratamiento de 0 mM N. Aunque el tratamiento 60 mM N disminuyó la concentración de alcaloides totales, la biosíntesis de los alcaloides no fue completamente inhibida (Figura 11).

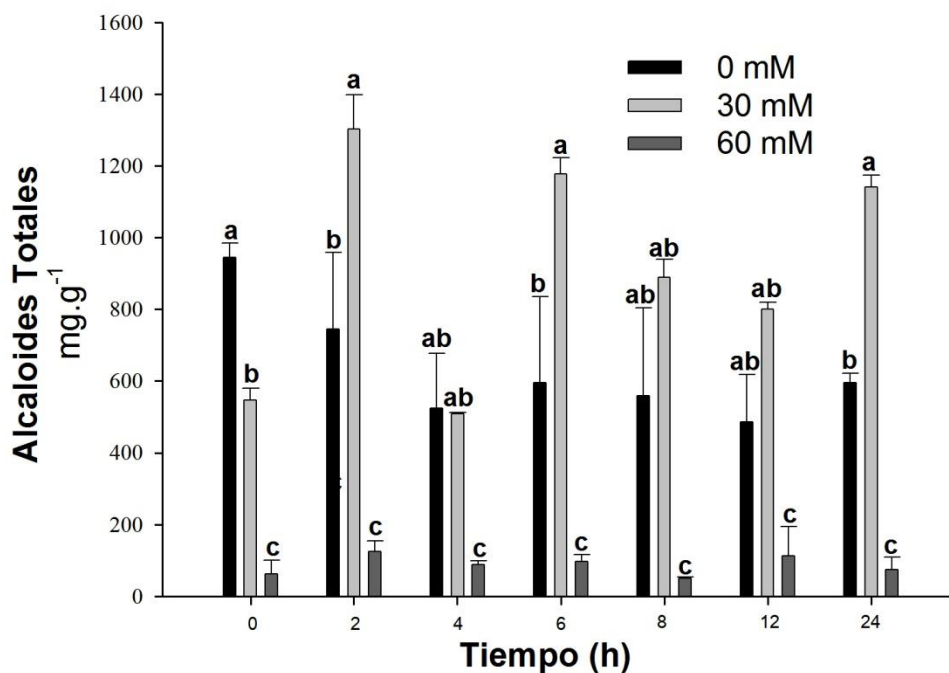


**Figura 11.** Efecto de los tratamientos en el contenido de alcaloides totales de *Annona diversifolia*. Las letras distintas sobre las columnas indican diferencias significativas (Tukey HSDt,  $P \leq 0.05$ ).

### 5.2.2 Variación diurna de los alcaloides aporfínicos

La concentración de los alcaloides aporfínicos totales de *A. diversifolia* varió durante el periodo diurno con los tres tratamientos. El contenido de los alcaloides totales fue mayor con el tratamiento de 30 mM N en la mayor parte de los periodos evaluados (Figura 12).



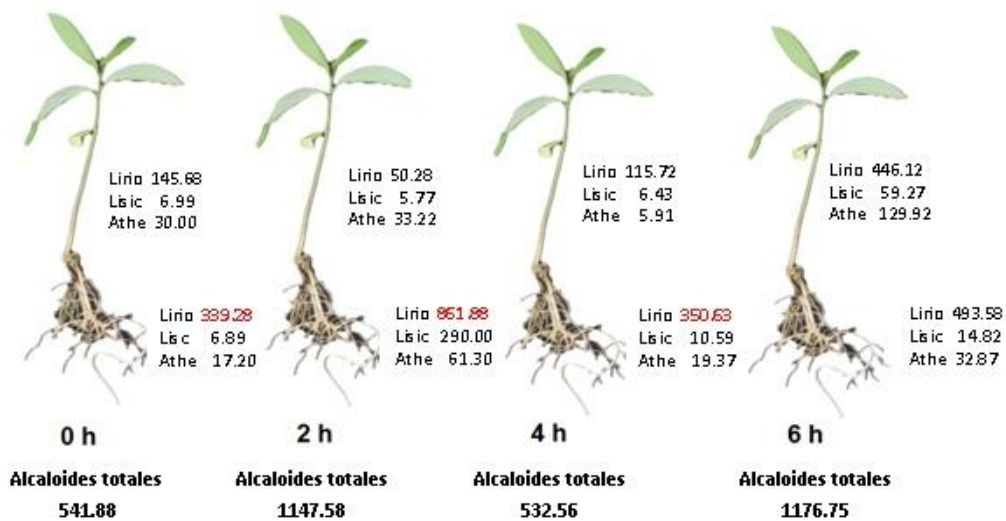


**Figura 12.** Contenido de alcaloides totales en *Annona diversifolia* durante el día con tres suministros de N. Las letras distintas sobre las columnas indican diferencias significativas (Tukey HSD,  $P \leq 0.05$ ).

Durante las primeras 12 h, la concentración tanto de la liriodenina como de la aterospermidina en raíces tendió a disminuir con el incremento del suministro de nitrógeno ( $r = -0.615$ ,  $P = 0.0030$  y  $r = -0.7681$ ,  $P = 0.0001$ , respectivamente). En el caso de liscamina los resultados no fueron claros debido a que no se detectó este alcaloide en los periodos de 0, 12 y 24 h. En los tallos el incremento en la concentración de nitrógeno tuvo una tendencia negativa para liriodenina ( $r = -0.669$ ,  $P = 0.0009$ ), liscamina ( $r = -0.522$ ,  $P = 0.0151$ ) y aterospermidina ( $r = -0.447$ ,  $P = 0.0417$ ). Mientras que en las hojas, se observó que los contenidos de liriodenina y liscamina se incrementaron con el tratamiento de 60 mM N ( $r = 0.614$ ,  $P = 0.0030$ ), contrastando con los contenidos de ambos alcaloides obtenidos en las raíces y los tallos con el mismo tratamiento. El contenido de aterospermidina fue la excepción debido a que no cambió con ninguno de los tratamientos ( $F = 2.28$ ,  $P = 0.1310$ ).

La liriodenina presentó cambios en su concentración durante el periodo diurno que fueron coincidentes y notables dado que la liriodenina fue el alcaloide más abundante en *A. diversifolia*. Por ejemplo, el contenido de liriodenina en las raíces a las 0 h fue de 339.28 mg g<sup>-1</sup>PS con el tratamiento de 30 mM N, mientras que a las 2 h la concentración de liriodenina fue de 861.88 mg g<sup>-1</sup>PS; registrándose un incremento de 522.59 mg g<sup>-1</sup>PS de liriodenina de un periodo a otro. Así mismo una cantidad similar de liriodenina disminuyó durante el periodo de 4 h (511.24 mg g<sup>-1</sup>PS) (Figura 13).

En algunos casos fue notable que la disminución de un alcaloide coincidiera con el incremento del otro, ya sea en el mismo órgano y/o en órganos distintos. Por ejemplo, la disminución de la concentración de liriodenina (511.24 mg g<sup>-1</sup>PS) en las raíces entre los periodos de 2 a 4 h, coincidió con el incremento del contenido de los alcaloides totales en la planta (644.19 mg g<sup>-1</sup>PS) del periodo posterior, es decir entre los periodos de 4 a 6 h (Figura 13).



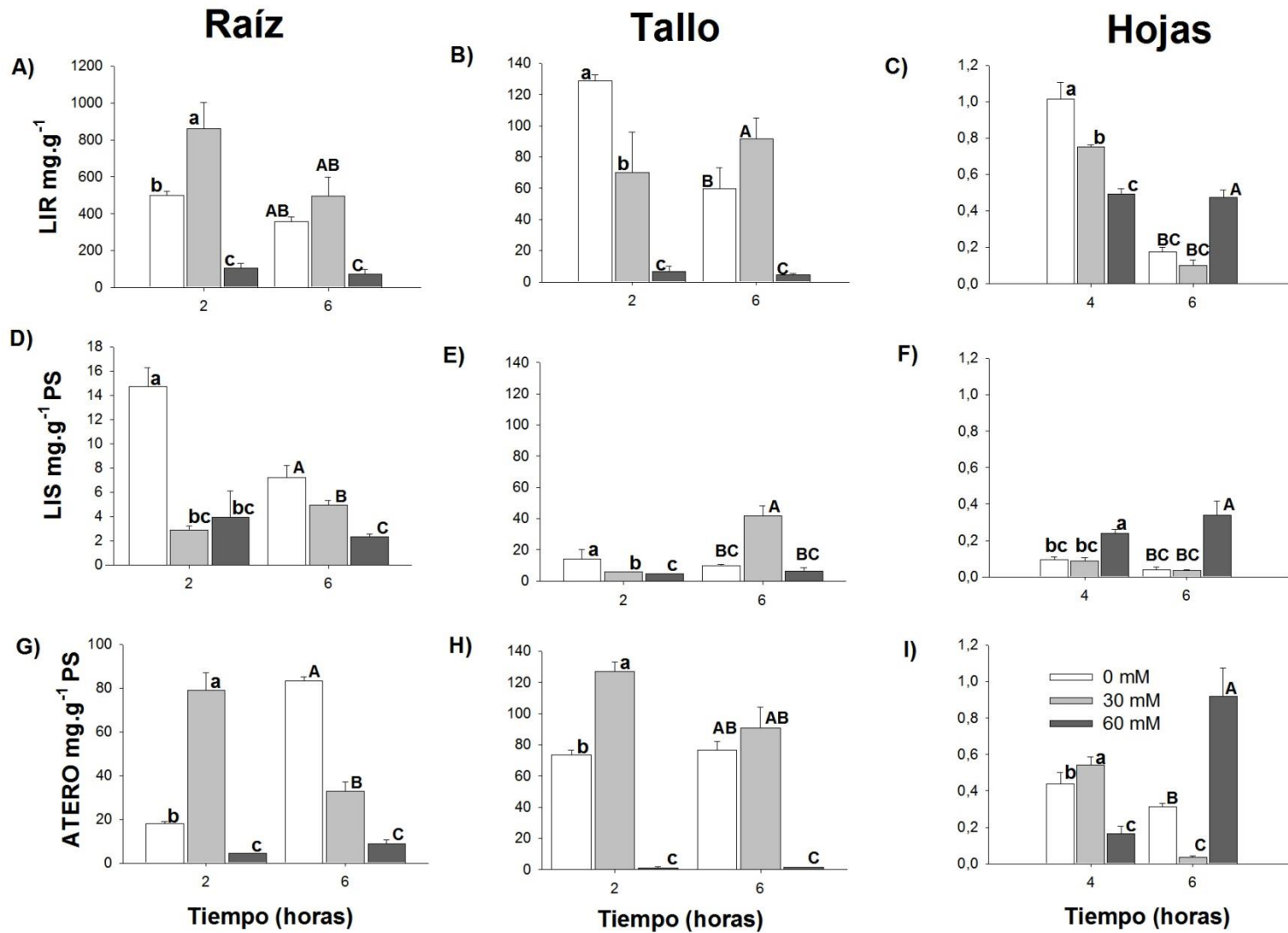
**Figura 13.** Dinámica de la variación de los alcaloides en el tratamiento de 30 mM N durante la primera mitad del periodo diurno. Los valores representan los mg g<sup>-1</sup>PS de liriodenina (Lirio), lisicamina (Lisic) y aterspermidina (Athe).

### 6.3 Efecto órgano-específico del nitrógeno en la concentración de los alcaloides aporfínicos.

La concentración de los alcaloides aporfínicos fue variable durante el periodo diurno y los principales cambios con el suministro de los tres tratamientos ocurrieron durante las primeras 6 h del periodo diurno. Sin embargo, en las raíces y los tallos la principal variación de los alcaloides fue registrada a las 2 y 6 h (09:00 y 13:00 h del día, respectivamente) en los tres tratamientos; mientras que en las hojas, el efecto del nitrógeno en el contenido de los alcaloides aporfínicos se observó a las 4 h y 6 h (11:00 y 13:00 h, respectivamente).

En particular, los contenidos de liriodenina, lisicamina y aterspermidina en las raíces fueron más altos a las 2 y 6 h con los tratamientos de 0 y 30 mM N, comparado con el tratamiento de 60 mM N (Figura 14 A, D, G). Los contenidos de los tres alcaloides en los tallos exhibieron patrones de respuesta similar que en las raíces durante los mismos periodos de tiempo. El contenido de los alcaloides en los tallos fue menor con el tratamiento de 60 mM N (Figura 14 B, E, H) de la misma manera que en las raíces (Figura 14 A, D, G).

El mayor contenido de liriodenina y atospermidina en las hojas se detectó a las 4 h con el suministro de 0 mM N y 30 mM N, respectivamente (Figura 14 C, I); en contraste, la mayor concentración de lisicamina se obtuvo con el tratamiento de 60 mM N durante ese periodo de tiempo (Figura 14 F). Sorprendentemente, las concentraciones de liriodenina, lisicamina y atospermidina fueron significativamente mayores con el tratamiento de 60 mM N a las 6 h (Figura 14 C, F, I).



**Figura 14.** Influencia del suministro de los niveles de nitrógeno en los alcaloides aporfínicos en raíces, tallos y hojas de *A. diversifolia*. Liriodenina (A, B y C), Lisicamina (D, E y F) y Aterospermidina (G, H y I). Los valores representan medias  $\pm$  SD de tres determinaciones y las diferentes letras arriba de la columna indican diferencias significativas (Tukey HSD,  $P < 0.05$ ).

## 5.2.4 Efecto del nitrógeno en la actividad de la MFO y NCS

### 5.2.4.1 Monofenol monooxigenasa (MFO)

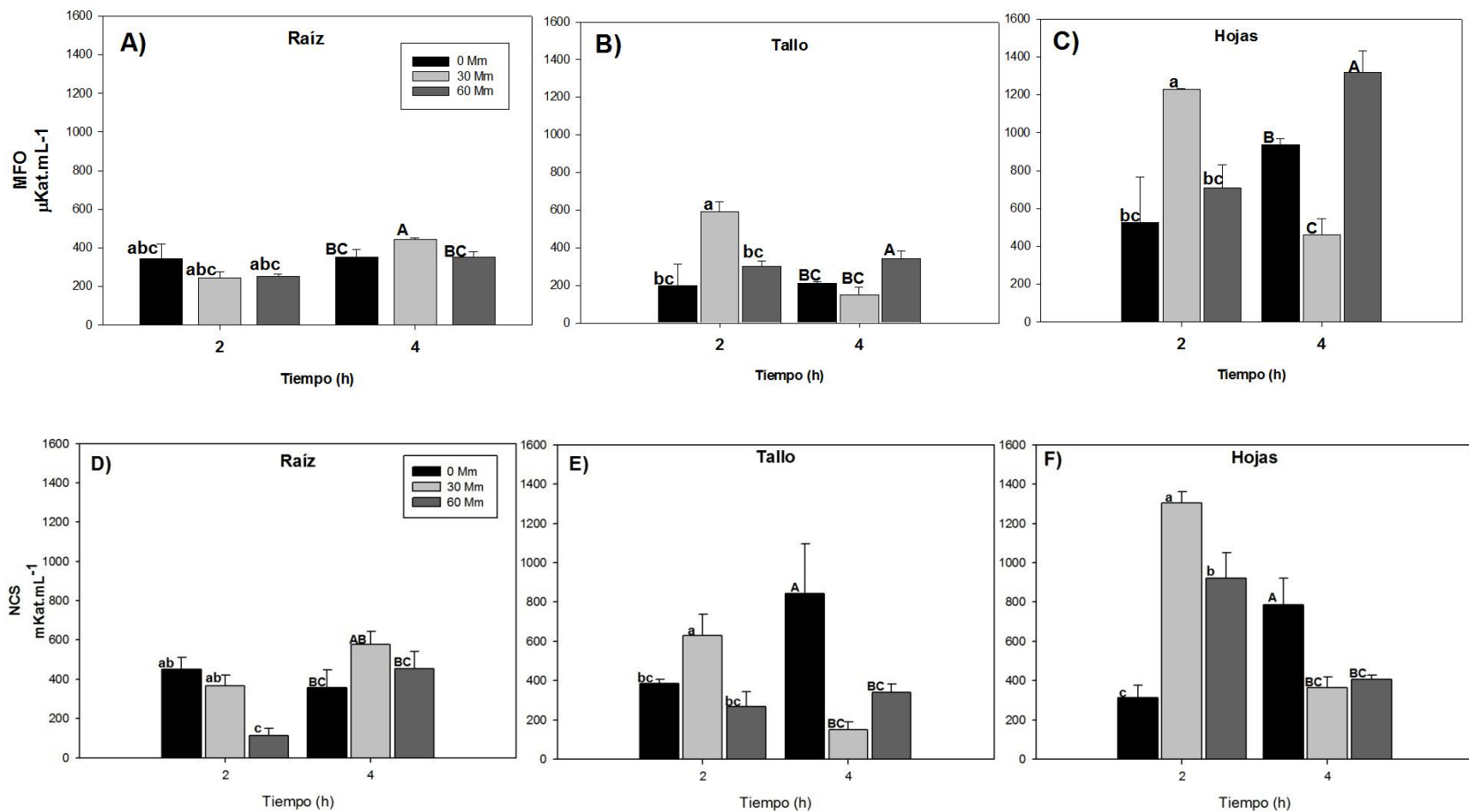
La actividad de la enzima monofenol monooxigenada (MFO) fue distinta en cada órgano de *A. diversifolia*. La mayor actividad se registró en las hojas, seguido de los tallos y raíces (Figura 15 A, B, C). La actividad de la MFO en las raíces no presentó diferencias significativas con el suministro de los tres tratamientos durante el periodo de 2 h. En contraste con el periodo de 4 h, en el que su actividad fue mayor con el tratamiento de 30 mM N, y las diferencias fueron significativas (Figura 15 A).

Con el suministro de nitrógeno, la enzima presentó un patrón de actividad similar en los tallos y en las hojas (tejido fotosintético) durante el periodo de 2 h (Figura 15 B, C). Se observó que la actividad de la MFO en ambos órganos fue significativamente mayor con el tratamiento de 30 mM de N y a las 4 h con el tratamiento de 60 mM N (Figura 15 B, C). Es importante destacar que el patrón de la actividad de la MFO registrado en el tejido fotosintético fue inverso a lo observado en raíces en los periodos de 2 y 4 h, aunque con diferentes intensidades en cada órgano.

### 5.2.4.2 Norcoclaurina sintasa (NCS)

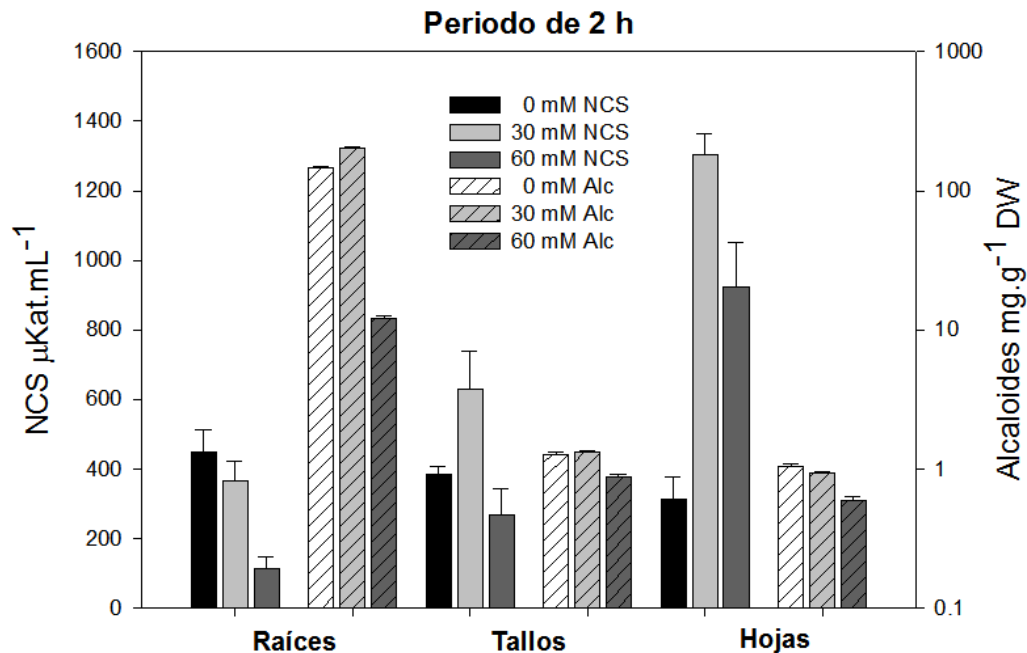
La mayor actividad de la NCS fue detectada en las hojas, seguida de los tallos y raíces (Figura 16 D, E, F), también el principal efecto del nitrógeno en la enzima se observó en el tejido fotosintético; durante las primeras 2 h se registró una mayor actividad enzimática con el tratamiento de 30 mM N en los tallos y en las hojas (Figura 15 E, F), lo cual fue consistente con el mayor contenido de alcaloides totales en la planta durante las primeras 2 h con el mismo tratamiento (Figura 12).

Los tratamientos suministrados a las plántulas de *A. diversifolia* también influyeron en la velocidad de respuesta de la NCS en cada órgano. La actividad de la NCS con el tratamiento de 0 mM de nitrógeno fue más tardía, debido a que no registró cambios en la actividad enzimática en los tres órganos durante el periodo de 2 h y la mayor actividad fue detectada en el periodo de 4 h (Figura 15 D, E, F), particularmente en el tejido fotosintético (Figura 15 F). En contraste, la respuesta de la NCS a los tratamientos con aporte de nitrógeno fue más rápida, debido a que su actividad fue mayor en las hojas con el suministro de 30 y 60 mM N en las primeras 2 h (Figura 15 F).



**Figura 15.** Actividad de las enzimas monofenol monooxigenasa (A, B, C) y norcoclaurina sintasa (D, E, F) en los órganos de *A. diversifolia* en los periodos de 2 y 4 horas con tres tratamientos de nitrógeno (0, 30 y 60 mM). Los valores representan medias  $\pm$  SD de cinco determinaciones y las diferentes letras sobre las columnas indican diferencias significativas (Tukey HSD,  $P < 0.05$ ).

La ruta biosintética de los alcaloides bencilisoquinolínicos está presente en todos los órganos de las plántulas y los tratamientos con nitrógeno incrementaron la biosíntesis de éstos alcaloides durante el periodo de 2 h en el tejido fotosintético, particularmente en las hojas (Figura 15 F). Lo cual es discrepante con la concentración de alcaloides totales obtenidos en este órgano en el mismo periodo de tiempo, debido a que el menor contenido de alcaloides totales se obtuvo en las hojas y el mayor contenido en las raíces (Figura 16). Por lo tanto, estos resultados pudieran deberse a la translocación de alcaloides bencilisoquinolínicos precursores y/o de los alcaloides aporfínicos de las hojas a las raíces.

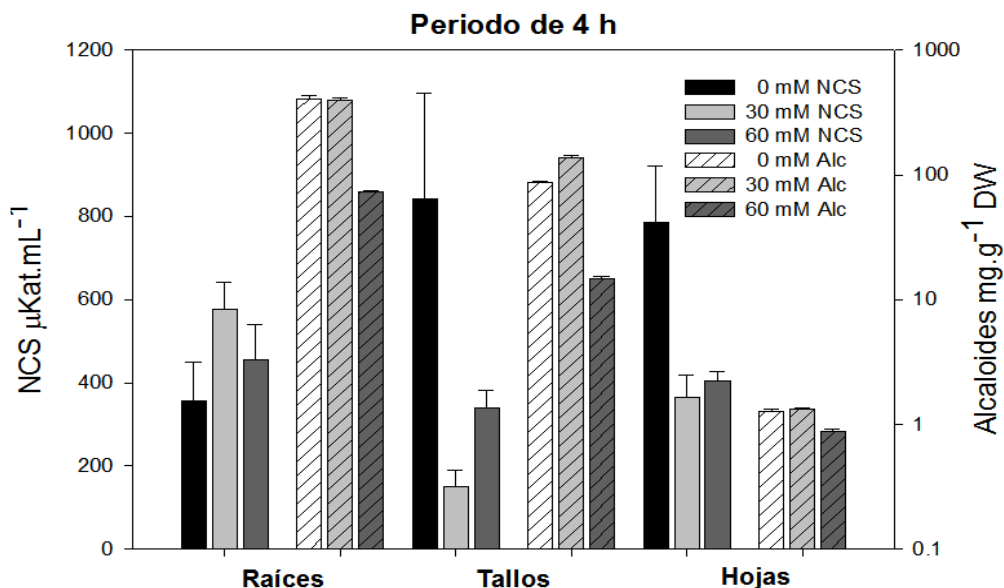


**Figura 16.** Comparación del efecto del nitrógeno en la actividad de la NCS y la concentración de los alcaloides totales en los órganos de *A. diversifolia* en el periodo de 2 horas. Prueba de rango múltiple de Duncan,  $p < 0.05$ .

En contraste con el periodo de 2 h, la actividad enzimática de la NCS durante el periodo de 4 h fue significativamente más relevante en el tejido fotosintético (tallos y hojas) con el tratamiento de 0 mM N que con los tratamientos de 30 y 60 mM N. No obstante, la mayor cantidad de alcaloides totales con los tres tratamientos se registró en las raíces (Figura 16), lo que sugiere que la raíz no es el principal sitio de biosíntesis de los alcaloides y su principal función es el almacenamiento de los alcaloides bencilisoquinolínicos en *A. diversifolia*.

Aunque la actividad de la NCS a las 4 h fue mayor en tallos y hojas con el tratamiento de 0 mM N, no se registró correlación alguna con la concentración de alcaloides totales en cada órgano ( $r = -0.660$ ,  $P = 0.1536$  y  $r = -0.245$ ,  $P = 0.6391$ , respectivamente) (Figura 17). Sin embargo, la concentración de alcaloides totales de la planta disminuyó  $220.96 \text{ mg g}^{-1}\text{PS}$  con el tratamiento de 0 mM N durante el periodo de 4 h (Figura 12). Lo que sugiere que la ausencia de nitrógeno condujo a un incremento de la cantidad de norcoclaurina sintasa en el

extracto proteico, aunque no necesariamente se biosintetizaron más alcaloides en los tallos y en las hojas de *A. diversifolia*.



**Figura 17.** Comparación del efecto del nitrógeno en la actividad de la NCS y la concentración de los alcaloides totales en los órganos de *A. diversifolia* en el periodo de 4 horas. Prueba de rango múltiple de Duncan,  $P < 0.05$ .

Durante el periodo de 4 h, la actividad de la norcoclaurina sintasa no presentó diferencias significativas entre los tratamientos de 30 y 60 mM N ( $F = 0.12$ ,  $P = 0.7514$ ) en los tres órganos y los valores de la actividad enzimática durante este periodo de tiempo fueron menores en comparación con los registros obtenidos a las 2 h. Lo cual es una evidencia de que el suministro de nitrógeno es capaz de modificar la biosíntesis de alcaloides bencilisoquinolínicos en un lapso de tiempo de 2 horas.

Particularmente en las hojas, la actividad de la NCS tendió a disminuir entre las 2 y las 4 h con los tratamientos de 30 y 60 mM N ( $r = -0.943$ ,  $P = 0.0047$  y  $r = -0.958$ ,  $P = 0.0026$ , respectivamente). Si consideramos que en las hojas se lleva a cabo la biosíntesis de los alcaloides bencilisoquinolínicos, la disminución de la actividad de la NSC podrían deberse a que con el nitrógeno disminuyó la cantidad de enzimas presentes a las 4 h, o bien la enzima fué regulada por la cantidad de alcaloides biosintetizados durante el periodo de 2 h.



## VI. DISCUSIÓN

### **Efecto del los tratamientos de nitrógeno en el contenido de liriodenina, lisicamina, aterospermidina y alcaloides totales.**

El objetivo principal de este trabajo fue evaluar la concentración de los alcaloides en función de la disponibilidad del nitrógeno exógeno. Los resultados obtenidos demostraron que el contenido de los alcaloides totales en *A. diversifolia* fueron claramente afectados por la variación en el suministro de nitrógeno (Figura 8). Se observó que la mayor concentración de alcaloides totales se obtuvo con el suministro moderado de nitrógeno (30 mM), mientras que la menor concentración de alcaloides aporfínicos se registró con el suministro de 60 mM N. Aunque no hay evidencia en la literatura científica de este fenómeno en los alcaloides aporfínicos, existen estudios previos sobre el efecto del nitrógeno en la biosíntesis de la morfina un alcaloide bencilisoquinolínico que comparte los primeros pasos de la ruta biosintética de los alcaloides aporfínicos. Los trabajos previos realizados con *P. somniferum* en condiciones de campo demostraron que en condiciones deficientes de nitrógeno (0 kg h<sup>-1</sup>) y de suministro moderado de nitrógeno (40-100 kg h<sup>-1</sup>) la concentración de la morfina se incrementa, en tanto que con un suministro alto de nitrógeno la concentración de este alcaloide disminuye (>100 kg h<sup>-1</sup>) (Costes *et al.* 1976; Khlapsev 1978; Laughlin 1987; Yadav *et al.* 1984). Otras evidencia similares han sido observadas en los estudios realizados con alcaloides de tipo feniletilamina del género *Capsicum*, en los cuales se ha reportado que la concentración del alcaloide capsaicina se incrementa con el suministro moderado de nitrógeno (5-30 mM) y disminuye cuando se supera los 30 mM de N (Johnson and Decoteau 1996; Lindsey 1985; Medina-Lara *et al.* 2008). Nuestros resultados son similares a lo reportado con ambos tipos de alcaloides, debido a que la mayor concentración se obtiene con el suministro moderado de nitrógeno

### **Variación diurna de los alcaloides aporfínicos**

Los alcaloides aporfínicos presentaron variaciones en su concentración con los tres tratamientos durante la primera parte del periodo diurno, principalmente durante las primeras 6 h del experimento. En trabajos previos ha sido reportado que la concentración de los alcaloides varía naturalmente durante las primeras 6 h del periodo diurno; por ejemplo, se ha reportado este fenómeno en especies como *Datura stramonium* (Hemberg y Flück, 1953), *Lupinus alba* y *Lupinus luteus* (Birecka y Zebrowska, 1960; Wink y Witte, 1984), *Conium maculatum* (Fairbairn y Suwal, 1961), *Atropa belladonna* (Fairbairn *et al.* 1964; Sporer *et al.* 1993), *Nicotiana tabacum* (Tso *et al.* 1970) and *Papaver somniferum* (Itenov *et al.* 1999) por mencionar solo algunos.

Existen distintas opiniones acerca de la variación de los alcaloides durante el periodo diurno. Una de ellas es la de Itenov *et al.* (1999) que propusieron la “hipótesis de dilución”, que sugiere que los alcaloides de *P. somniferum* son diluidos por el transporte de agua en el tejido vascular de la planta que está controlado por la tasa de transpiración. Por lo que la variación de los alcaloides durante el periodo diurno puede deberse más a un

efecto de dilución que por los procesos enzimáticos involucrados en su biosíntesis. Sin embargo esta explicación es poco convincente, debido a que nuestros resultados fueron obtenidos bajo condiciones controladas de luz, humedad relativa y suministro de agua demostrando resultados similares. Por lo tanto, es poco probable que el efecto de dilución sea el principal factor que influya en la variación de los alcaloides durante el día, aunque no se descarta que el transporte de agua y la tasa de transpiración coadyuven en el transporte de alcaloides o precursores de un órgano a otro durante el periodo diurno. También Drøhse y Mølgaard (2000) estudiaron la variación estacional y diurna de los iridioides en *Antirrhinus majus*, determinando que la variación de este tipo de alcaloides no estuvo relacionada con los patrones de temperatura y el contenido de agua, aunque no ofrecen una explicación de la variación de los iridioides.

Este fenómeno también ha sido reportado por Sporer *et al.* (1993) en la variación diurna de los alcaloides tropánicos de *A. belladonna*. Ellos propusieron que la variación diurna de los alcaloides tropánicos se debe a una adaptación evolutiva de la planta para la defensa contra herbívoros, de tal manera que L-hiosciamina (el alcaloide más abundante en ésta especie) se puede convertir fácilmente en D-hiosciamina que es su forma racémica inactiva, o bien convertirse fácilmente en atropina. Por lo tanto, la defensa contra herbívoros es más versátil cuando la conversión de hiosciamina influye en el contenido de alcaloides durante el día y con ello se evita la biosíntesis de *novo* durante los periodos de tiempo en los que la planta es atacada por herbívoros, aunque también sugieren que la variación se debe en parte a que la D-hiosciamina es continuamente degradada.

Consideramos que las posturas anteriores explican en parte los factores subyacentes que también pueden influir en la concentración de los alcaloides durante el periodo diurno. Sin embargo, los principales factores que originan la variación en la concentración de estos compuestos podrían ser controlados por la actividad metabólica tanto primaria como secundaria, debido a que también son dinámicas durante el periodo diurno. Bajo éste argumento los niveles de nitrógeno que se suministra durante éstos periodos de tiempo alteran la actividad metabólica de la planta.

Los trabajos realizados en especies como *L. esculentum* (Galangau *et al.* 1988), *A. thaliana* (Lea *et al.* 2006) y principalmente en *N. tabacum* por el equipo de Scheible y Stitt del Intituto Max Planck, han demostrado que la expresión y la actividad de las enzimas relacionadas con la asimilación del nitrógeno se lleva a cabo durante las primeras 6 h del periodo diurno. En las raíces y hojas de *N. tabacum* la asimilación de nitrógeno se lleva a cabo principalmente entre las 2-4 h después de la iluminación y los niveles de nitrógeno provocan cambios importantes en el metabolismo primario; por ejemplo, la escasa disponibilidad de nitrógeno entre las 2-4 h conduce a un incremento en la expresión y actividad de las enzimas nitrato reductasa, nitrito reductasa y glutamina sintetasa implicadas en la asimilación de nitrógeno y también incrementan la biosíntesis y disponibilidad de esqueletos carbonados. En contraste estos cambios en el metabolismo primario se invierten en condiciones con altas concentraciones de este elemento (Scheible *et al.*, 1997; Matt *et al.*, 2001; Scheible *et al.*, 2004; Fritz *et al.*, 2006). De acuerdo a estos trabajos se sabe que las enzimas implicadas en el ciclo GS-GOGAT

cambian de acuerdo con el estatus de nitrógeno suministrado y los productos del ciclo GS-GOGAT influyen directamente en la incorporación del nitrógeno en los precursores de los alcaloides.

En el caso de los alcaloides bencilisoquinolínicos no existen estudios que demuestren que la alteración del ciclo GS-GOGAT influya en su biosíntesis, aunque podríamos sugerir que el ciclo GS-GOGAT altera la incorporación de nitrógeno a los precursores en la vía poscorismato (Cuadro 1) para la biosíntesis de tirosina y en consecuencia la biosíntesis de alcaloides bencilisoquinolínicos. Debido a que los periodos de tiempo en los cuales se registraron los principales cambios en la concentración de los alcaloides aporfínicos en nuestro estudio, fueron consistentes con los periodos de tiempo en donde ocurren los principales cambios en el metabolismo del carbono y del nitrógeno en los estudios realizados por Scheible y Stitt. suponemos que la asimilación de nitrógeno durante los periodos de 2 a 6 h regula la biosíntesis de los alcaloides aporfínicos en las raíces, tallos y hojas de *A. diversifolia* mediante la disponibilidad de la tirosina. Una evidencia de la relación entre la disponibilidad de la tirosina y la concentración de alcaloides aporfínicos fue aportado por De la Cruz (2012) que demostró que la degradación de las proteínas en semillas de *A. diversifolia* en etapa de imbibición y de emergencia radicular generan tirosina y fenilalanina en forma de aminoácidos libres, los cuales se correlacionaron con el contenido de los alcaloides bencilisoquinolínicos, particularmente con la liriodenina.

También en este estudio se observó que el efecto del nitrógeno en los alcaloides totales no fue el mismo a lo observado en los alcaloides liriodenina, lisicamina y aterospermidina durante los periodos de tiempo evaluado. Si tomamos como ejemplo a la liriodenina, pudo observarse que la respuesta al tratamiento de 30 mM N en raíces, tallos y hojas (Figura 14 A, B, C) no corresponde al contenido de los alcaloides totales de la planta durante las 2 y 6 h (Figura 12). Este efecto particular podría deberse a que los órganos no son tejidos aislados y existe ya sea translocación de alcaloides o bien interconversión debido a su semejanza estructural (Figura 6). Evidencia de ello fue que se detectó el incremento y/o disminución coincidente del contenido de los alcaloides en los órganos, principalmente en la liriodenina (el alcaloide más abundante) (Figura 13). Lo anterior puede explicarse en parte a fenómenos subyacentes o bien traslapados con el efecto del nitrógeno y que se relacionan con la translocación o la interconversión de los alcaloides en la planta. En el caso de la translocación de los alcaloides se sabe que es rápida y ha sido explicada por el transporte de los alcaloides entre los órganos o bien por su catabolismo (Abdolzadeh *et al.* 2006; Daddona *et al.* 1976; DrØhse y MØlgaard 2000; Wink y Hartmann 1982; Wink y Witte 1984). En tanto que la interconversión no es un fenómeno nuevo en los alcaloides bencilisoquinolínicos, debido a que fue reportada por primera vez por Winterstein y Trier desde 1910 en los alcaloides del opio, y fue subsecuentemente reportada en otros estudios (Fairbairn *et al.* 1964; Fairbairn y El-Masry 1967; Fairbairn y Suwal 1961; Rapoport *et al.* 1961), y también con otro tipo de alcaloides (Adibfar *et al.* 2011; Blom *et al.* 1991; Demeyer and Dejaegere 1992; Misra and Gupta 2006; Sporer *et al.* 1993; Tso *et al.* 1970). Un ejemplo particular fue el trabajo de Sporer *et al.* (1993) en el cual detectaron que la variación de la L-hiosciamina de *A. belladonna* durante el periodo diurno se debe a la transformación de este alcaloide en su forma

racémica como D-hiosciamina o atropina. Algo similar a lo observado con la variación interespecífica entre la liriodenina (el alcaloide más abundante en *A. diversifolia*) con lisicamina y aterospermidina.

Sin embargo, ambos fenómenos hacen difícil de discernir el efecto del nitrógeno en los alcaloides aporfínicos de *A. diversifolia*, por lo que es necesario estudios de oxido-reducción y marcado isotópico para confirmar que esto suceda.

### **Efecto órgano-específico del nitrógeno en la concentración de los alcaloides aporfínicos.**

Se sabe que el nitrógeno suministrado altera ampliamente el metabolismo primario y secundario (Scheible *et al.* 2004). Sin embargo, el nitrógeno afecta de distinta manera a los órganos, particularmente difieren en los tiempos de respuesta del suministro de este elemento. En los resultados se observó que las raíces y los tallos fueron los órganos que más rápido respondieron a los cambios en el suministro de nitrógeno, debido a que los principales cambios en el contenido de alcaloides se observaron a las 2 h. Esto se debió posiblemente a que las raíces se encuentran en contacto directo con la solución nutritiva y tienen la función de la absorción primaria de nitrógeno en forma de nitrato a través de los transportadores *NRT1* y *NRT2*, así como los transportadores de amonio (*AMT*) (Wirén *et al.*, 2000; Amtmann y Blatt, 2009; Maathuis, 2009). El nitrógeno absorbido fue asimilado primero en las raíces y los tallos, debido a que se encargan tanto de asimilar como biosintetizar aminoácidos o precursores de ellos tales como el glutamato y aspartato a través de las enzimas GS1 y GOGAT-NADH dependiente, que se encuentran en ambos órganos (Wickert *et al.*, 2007; Duca *et al.*, 2011). Por lo tanto es posible que los cambios en el metabolismo del nitrógeno en tallos y raíces durante el periodo de 2 h hayan favorecido la disponibilidad de tirosina para la biosíntesis de alcaloides aporfínicos en estos órganos. Mientras que la disminución de los alcaloides aporfínicos totales a las 4 h y su posterior incremento a las 6 h (ver figura 12), podría ser reflejo de los cambios en el metabolismo del nitrógeno ya que la absorción y asimilación puede regularse por mecanismos enzimáticos de retroalimentación negativa (feedback) (Crawford, 1995; Wirén *et al.*, 1997; Miller *et al.*, 2007).

Los resultados de éste trabajo demostraron que las hojas tienen un papel preponderante en la asimilación de altas concentraciones de nitrógeno para la biosíntesis de los alcaloides aporfínicos. Este órgano fue el único que respondió positivamente al suministro alto de nitrógeno, debido a que en las hojas de *A. diversifolia* se observó el incremento del contenido de los alcaloides con el tratamiento de 60 mM N. Esto se debió probablemente a que las hojas tienen un mayor potencial fotoreductor que favorece la asimilación del nitrógeno en exceso. Como se sabe el amonio excesivo producto de la reducción del nitrato es metabolizado en las hojas por la isoenzima glutamina sintetasa (GS2) dependiente de la fotosíntesis y coordina la asimilación de nitrógeno en las hojas mediante esqueletos carbonados disponibles (Miao *et al.*, 1991; Lillo, 2004; Wickert *et al.*, 2007; Simonovic y Anderson, 2008; Duca *et al.*, 2011). Es posible que el suministro alto de nitrógeno favoreció la acumulación de tirosina, tal y como lo demostró Fritz *et al.* (2006) en las hojas de tabaco, en las cuales los aminoácidos menores (incluyendo a la tirosina) incrementan rápidamente con el aporte de nitrógeno durante las primeras 8 h del periodo diurno.

Por otra parte, la biosíntesis de tirosina se encuentra asociada al tejido fotosintético, debido a que las enzimas que lo biosíntetizan se encuentran particularmente en los cloroplastos (Rippert *et al.* 2009). Como se sabe, la tirosina es el principal aminoácido precursor de los alcaloides bencilisoquinolínicos y su disponibilidad podría facilitar la biosíntesis de los alcaloides bencilisoquinolínicos en *P. somniferum* (Lee y Facchini, 2011). Como hipótesis podríamos sugerir que estas condiciones pudieron haber favorecido la disponibilidad de la tirosina para la biosíntesis de los alcaloides bencilisoquinolínicos en las hojas, la cual podría relacionarse con la actividad de las enzimas pterinato aminotransferasa (PPA) y arogenato deshidrogenasa (ADH). Dado que en estudios previos se ha demostrado que la PPA incrementa su actividad con mayores concentraciones de los acarreadores de nitrógeno como el glutamato y el aspartato (Bonner y Jensen, 1985; Siehl *et al.*, 1986; De-Eknamkul y Ellis, 1988; Maeda *et al.*, 2010a, 2010b; Maeda *et al.*, 2012) facilitando de esta manera los precursores para la biosíntesis de la tirosina catalizado por la ADH. Ésta última ubicada en el estroma de los cloroplastos y regulada estrictamente por la tirosina (Rippert *et al.*, 2009; Schenck *et al.*, 2015).

En resumen, los efectos significativos del nitrógeno en el contenido de alcaloides se presentaron durante la primera mitad del periodo diurno, lo que podría deberse a las tasas de incorporación del nitrógeno en el metabolismo de *A. diversifolia* durante los periodos de asimilación de este elemento. También se detectaron posibles efectos subyacentes como la translocación y la interconversión de los alcaloides. Es por ello que para saber si el nitrógeno afecta la biosíntesis de los alcaloides bencilisoquinolínicos, se evaluó la actividad de las enzimas monofenol monooxigenasa y norcoclaurina sintasa que están implicadas en los primeros pasos de la biosíntesis.

## **Efecto del nitrógeno en la actividad de la MFO y NCS**

### **Monofenol monooxigenasa (MFO)**

La actividad de la MFO en tallos y hojas fue afectada por los niveles del suministro de nitrógeno principalmente con el tratamiento de 30 mM N durante las 2 primeras horas. El nitrógeno impactó principalmente al tejido fotosintético, por lo que la mayor actividad de la enzima fue detectada en tallos y hojas. Además se conoce que las MFO se encuentran principalmente en los cloroplastos y que su actividad se encuentra estrechamente relacionada con la actividad fotosintética (Tolbert, 1973) lo que es consistente con los resultados obtenidos. Así mismo se observó la mayor actividad de esta enzima a las 4 h bajo condiciones de deficiencia y alto suministro de nitrógeno. Lo que sugiere que podría estar más relacionada con la respuesta hipersensible derivada de las condiciones de estrés oxidativo debido al exceso o deficiencia de nitrógeno, o bien podría estar involucrada en otras funciones de la enzima, ya que las monooxigenasas pueden aceptar un amplio rango de sustratos y carecen de especificidad (Constabel y Barbehenn, 2008). Debido a ello es posible que durante las 2 primeras horas la MFO intervenga en la biosíntesis de los alcaloides bencilisoquinolínicos y posteriormente participe en otras funciones

relacionadas con el estrés oxidativo. No obstante, los resultados obtenidos no son lo suficientemente claros para conocer su relación en la respuesta del nitrógeno en la biosíntesis de los alcaloides aporfínicos de *A. diversifolia*.

### **Norcoclaurina sintasa (NCS)**

El principal efecto del nitrógeno se expresó en una mayor actividad de la norcoclaurina sintasa en las hojas, seguida de los tallos y raíces (Figura 13 D, E, F).

Los resultados de la actividad de esta enzima demostraron que el tejido fotosintético juega un papel importante entre la relación de la asimilación del nitrógeno y la biosíntesis de alcaloides bencilisoquinolínicos. Debido a que en las hojas la actividad de la enzima fue mayor con los tratamientos de 30 y 60 mM N durante las primeras 2 h (Figura 12 F). Se sabe que durante las primeras 2 h la asimilación de nitrógeno es alta y se requiere una gran cantidad de energía para la reducción de nitrato a nitrito (8 electrones por molécula de nitrato) (Crawford, 1995; Wickert *et al.*, 2007). Considerando además que la fotosíntesis y la respiración en las hojas proveen los esqueletos carbonados para la incorporación del nitrógeno al metabolismo y la producción de aminoácidos (Foyer *et al.*, 2003). Así mismo, los equivalentes reductores necesarios para la reducción del nitrato tienen su origen en los cloroplastos y el proceso se encuentra estrechamente relacionado con la luz por lo tanto la luz y la actividad fotosintética son capaces de influir en la tasa de asimilación de nitrógeno que se lleva a cabo en las hojas (Foyer *et al.*, 2003; Foyer *et al.*, 2011). Estos cambios en la tasa de asimilación de nitrógeno también influyen en la disponibilidad de precursores de los aminoácidos aromáticos. Algunos datos han sido aportados por Scheible *et al.* (1997) y Stitt *et al.* (2002) estudiando la relación de la asimilación de nitrógeno y su efecto en el metabolismo primario en hojas de tabaco. En ambos trabajos se demostró que durante las primeras 4 h del periodo de luz, el incremento de la asimilación de nitrógeno provoca que la síntesis y disponibilidad de carbohidratos disminuya, lo que provoca que una mayor cantidad de carbono se convierta a fosfoenol piruvato y favorezca la biosíntesis de aminoácidos aromáticos.

Además en las hojas se biosintetiza la tirosina, un precursor requerido para la biosíntesis de alcaloides (Rippert *et al.*, 2009; Schenck *et al.*, 2015). Los resultados y antecedentes mencionados apoyan la propuesta de ésta tesis de que la asimilación activa de nitrógeno durante las primeras 2 h se llevó a cabo en las hojas de *A. diversifolia* lo que favoreció a la disponibilidad de tirosina para la biosíntesis de alcaloides bencilisoquinolínicos.

En contraste, la actividad de la norcoclaurina sintasa fue menor con el tratamiento de 0 mM N durante las primeras 2 h en los tres órganos de *A. diversifolia*, lo que indicó que el déficit de nitrógeno limitó la actividad de la norcoclaurina sintasa en las hojas, pero la biosíntesis de alcaloides no fue inhibida (Figura 16). De acuerdo a estudios previos con hojas de tabaco se ha demostrado que aunque en condiciones deficientes de nitrógeno la biosíntesis de metabolitos secundarios se induce (Fritz *et al.*, 2004; Scheible *et al.*, 2004), el metabolismo de los aminoácidos se reprime (Scheible *et al.*, 2004). Por lo tanto, la tirosina disponible para la biosíntesis de alcaloides bencilisoquinolínicos podría haber sido obtenida de los pools de aminoácidos o bien de la proteólisis de proteínas. Aunque éste aspecto aún no ha sido estudiado, el trabajo realizado en *Datura stramonium* por

Gupta y Gipson (1972) en el cual evaluaron la tasa de incorporación de los aminoácidos a los alcaloides tropánicos, demostraron que la prolina resultante de la degradación de proteínas fué incorporada a la hiosciamina. Mientras que la mayor actividad de la norcoclaurina sintasa a las 4 h en el tratamiento sin nitrógeno en el tejido fotosintético pudo haberse inducido por los cambios en el metabolismo del carbono en esos órganos.

En resumen, se considera que el principal órgano en donde se llevan a cabo los primeros pasos biosintéticos son las hojas, debido a que la mayor actividad de la norcoclaurina sintasa se detectó en éste órgano y que los alcaloides biosintetizados son movilizados a las raíces las cuales podrían también considerarse como el principal sitio de almacenamiento de los alcaloides bencilisoquinolíncos en *A. diversifolia*. Evidencia de ello es el estudio de Castro-Moreno *et al.* (2013) sobre la variación estacional de liriodenina en ejemplares juveniles y adultos de *A. lutescens*. En este trabajo la mayor concentración de liriodenina se detectó en las raíces. Además se observó que el incremento significativo del contenido de liriodenina en las raíces ocurrió simultáneamente con la senescencia y la ligera disminución de alcaloides en tallos durante la temporada de sequía. El nitrógeno es un factor que influye en la biosíntesis de estos alcaloides, aunque existen factores subyacentes que están involucrados en su efecto. Por último, la biosíntesis de los alcaloides bencilisoquinolíncos y particularmente de los alcaloides aporfínicos de *A. diversifolia* no se inhibe en condiciones deficientes de nitrógeno por lo que se considera que esta ruta biosintética es privilegiada para esta especie.

Este trabajo aporta un nuevo panorama sobre el estudio del nitrógeno en las plantas, el cuál permite conocer algunos de los factores que inciden en la biosíntesis de los alcaloides. Así mismo se incorporan nuevas interrogantes las cuales pueden ser originar futuros estudios sobre el efecto del nitrógeno en la biosíntesis de los alcaloides en las plantas.

## VII. CONCLUSIONES

La biosíntesis de alcaloides bencilisoquinolíncos de *A. diversifolia* es afectada por el suministro de nitrógeno.

El efecto del nitrógeno en la biosíntesis de los alcaloides bencilisoquinolíncos es variable durante el día, principalmente durante la primera mitad del periodo diurno.

Las hojas parecen ser el principal sitio de biosíntesis de alcaloides bencilisoquinolíncos y son mayormente afectadas por el suministro de nitrógeno.

Las raíces se consideran como el principal órgano de almacenamiento de éstos compuestos.

El efecto del nitrógeno en el contenido de alcaloides totales en la planta, no representa de manera general el efecto en los alcaloides liriodenina, lisicamina y aterospermidina.

La biosíntesis de los alcaloides bencilisoquinolínicos y particularmente de los alcaloides aporfínicos de *A. diversifolia* no se inhibe en condiciones deficientes de nitrógeno, por lo que se considera que esta ruta biosintética es privilegiada.



## VIII. LITERATURA CITADA

- Abdolzadeh, A., Hosseinian, F., Aghdasi, M. y Sadgipoor, H. (2006).** Effects of nitrogen sources and levels on growth and alkaloid content of Periwinkle. *Asian J. Plant Sci.* 5(2), 271-276.
- Adibfar, E., Dilmaghani, K. y Hemak Shoar, H. (2011).** Alkaloids contents of *Hyoscyamus niger* L. at different organs in different growth stages. *Iran. J. Plant Physiol.* 1(3), 187-192.
- Aguilar, E., González-Esquinca, A.R., De la Cruz, I., Riley, C. y Vidal, D. (2011).** Posible actividad estimulante y ansiógena de un extracto de alcaloides quinolínicos de *A. diversifolia* en ratonas. En: González-Esquinca; Luna-Cazáres; Gutiérrez-Jiménez; Schlie-Guzmán; Vidal-López. (Eds). Anonáceas: Plantas antiguas, estudios recientes (pp. 249-283). Colección Jaguar/ UNICACH, Mexico.
- Ali, M.B., Singh, N., Shohael, A.M., Hahn, E.J. y Paek, K.Y. (2006).** Phenolics metabolism and lignin synthesis in root suspension cultures of *Panax ginseng* in response to copper stress. *Plant Science.* 171(1), 147-154.
- Amtmann, A. y Blatt, M. (2009).** Regulation of macronutrient transport. *New Phytol.* 181: 35-32.
- Andrés-Agustín, J. y Andrés-Hernández, I. (2011).** Biología, diversidad, conservación y uso sostenible de los recursos genéticos de Annonaceae en México. Chapingo: Universidad Autónoma Chapingo. Pp. 141.
- Andrés-Agustín, J. y Ledesma, S.D. (2014).** Conservación y uso de los recursos genéticos de annonaceae en México. *Rev. Bras. Frut.*, 36, 118-124.
- Araji, S., Grammer, T.A., Gertzen, R., Anderson, S.D., Mikulic-Petkovsek, M., Veberic, R., Phu, M.L., Solar, A., Charles, A., Dandekar, A.M. y Escobar, M.A. (2014).** Novel roles for the polyphenol oxidase enzyme in secondary metabolism and the regulation of cell death in walnut (*Juglans regia*). *Plant Physiol.*, 164 (3), 1191-1203.
- Arias, M., Angarita, M., Aguirre, A., Restrepo, J. y Montoya, C. (2009).** Estrategias para incrementar la producción de metabolitos secundarios en cultivos de células vegetales. *Rev. Nac. Agric. Col.*, 62 (1), 4881-489.
- Asencio-Alvarado, J.I. (2012).** Evaluación de la actividad insecticida y repelente del extracto obtenido a partir de la semilla de *Annona diversifolia* (Anona) sobre el *Zabrotes subfasciatus* (gorgojo común del frijol). Tesis de Licenciatura en Química y Farmacia. Universidad del Salvador. San Salvador, El Salvador, Centroamérica.
- Battersby, A.R. y Bink, R. (1960).** Biosynthesis of morphine: formation of morphine from norlaudanoline. *Proc. Chem. Soc.*, 360-361.
- Baricevic, D., Umek, A., Kreft, S., Maticic, B. y Zupancic, A. (1999).** Effect of water stress and nitrogen fertilization on the content of hyoscyamine and scopolamine in roots of deadly nightshade (*Atropa belladonna*). *Environ. Exp. Bot.*, 42, 17-24.
- Beaudoin, G.A. y Facchini, P. (2014).** Benzylisoquinoline alkaloid biosynthesis in opium poppy. *Planta*, 240, 19-32
- Beevers, L. y Hageman, R. (1969).** Nitrate reduction in higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 20, 495-522.

- Benesova, M. y Bode, R. (1992).** Chorismate mutase isoforms from seeds and seedlings of *Papaver somniferum*. *Phytochem.*, 31, 2983–2987.
- Bensadek, L., Gillet, F., Saucedo, J.E. y Fliniaux, M.A. (2001).** The effect of nitrate and ammonium concentrations on growth and alkaloid accumulation of *Atropa belladonna* hairy roots. *J. Biotech.*, 85: 35-40.
- Bentley, K.W. (1998).** Isoquinoline Alkaloids. Vol. 1. *CRC Press*. Pp. 479.
- Bentley, K.W. (2006).** B-Phenylethylamines and isoquinoline alkaloids. *Nat. Prod. Rep.*, 23: 444-463.
- Betti, M., García-Calderón, M., Pérez-Delgado, C.M., Credali, A., Estivill, G., Veja, J.M. y Márquez, A.J. (2012).** Glutamine Synthetase in Legumes: Recent Advances in Enzyme Structure and Functional Genomics. *Int. J. Mol. Sci.*, 13, 7994-8024.
- Bindu, S. (2009).** Transcriptional and posttranscriptional regulation of cytosolic glutamine synthetase genes in alfalfa. *Tesis doctoral*. Universidad Estatal de Nuevo México.
- Birecka, H. y Zebrowska, J. (1960).** Diurnal changes in the alkaloid content in *Lupinus albus*, *Lupinus luteus*. *Bull. Acad. Polon. Sci. Ser. Sci. Biol.*, 8, 339-347.
- Blom, T.J., Sierra, M., van Vliet, T.B., Franke-van Dijk, M.E., de Koning, P., van Iren, F., Verpoorte, R. y Libbenga, K.R. (1991).** Uptake and accumulation of ajmalicine into isolated vacuoles of cultured cells of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. and its conversion into serpentine. *Planta*, 183, 170-177.
- Bonamore, A., Barba, M., Botta, B., Boffi, A. y Macone A. (2010).** Norcoclaurine Synthase: Mechanism of an Enantioselective Pictet-Spengler Catalyzing Enzyme. *Molecules*, 15(4), 2070-2078.
- Bonner, C. y Jensen, R. (1985).** Novel Features of Prephenate Aminotransferase from Cell Cultures of *Nicotiana glauca*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 238(1), 237-246.
- Bryant, J.P., Chapin, S. y Klein, D. (1983).** Carbon/Nutrient Balance of Boreal Plants in Relation to Vertebrate Herbivory. *Oikos*, 40, 357-368.
- Burnham, R.J. y Johnson, K.R. (2004).** South American paleobotany and the origins of neotropical rainforest. *The Royal Soc. B: Biol. Sci.*, 359(1450), 1595-1610.
- Camacho-Corona, M., Favela-Hernández, J.M., González-Santiago, O., Garza-González, E., Molina-Salinas GM, Said-Fernández S, Delgado G y 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, W.H. (1999).** Nitrate reductase structure, function and regulation: Bridging the Gap between Biochemistry and Physiology. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 50, 277-303.
- Cánovas, F., Avila, C., Cantón, F., Cañas, R. y de la Torre, F. (2007).** Ammonium assimilation and amino acid metabolism in conifers. *J. Exp. Bot.*, 58(9), 2307-2318.

- Castro-Moreno, M., Tinoco-Ojangurén, C., Cruz-Ortega, R. y González-Esquinca, A.R. (2013).** Influence of seasonal variation on the phenolgy and lirioidenine content of *Annona lutescens* (Annonaceae). *J. Plant Res.*, 126(4), 529-537.
- Cavé, A. (1985).** Annonaceae alkaloids. En: Phillipson et al. (ed). The chemistry and biology of isoquinoline alkaloids (pp.71-101). Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Chang, F.R., Chen, Ch.Y., Kuo, R.Y., Chang, Y.Ch. y Wu, YCh. (2000).** New alkaloids from *Annona purpurea*. *Journal of Natural Products*, 63(6), 746-748.
- Chapin III, F. (1980).** The mineral nutrition of wild plants. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 11, 233-260.
- Chapin III, F., Bloom, A., Field, C. y Waring, R. (1987).** Plant Responses to Multiple Environmental Factors. *BioSci.*, 37, 49-57.
- Chatrou, L.W., Pirie, M.D., Van Velzen, R. y Bakker, F.T. (2014).** Annonaceae substitution rates-a codón model perspective. *Rev. Bras. Frut.*, 36,108-117.
- Chen, Y.Y., Chang, F.R. y Wu Y.C. (1996).** Isoquinoline alkaloids and lignans from *Rollinia mucosa*. *J. Nat. Prod.*, 59(9), 904-906.
- Chou, W.M. y Kutchan, T.M. (1998).** Enzymatic oxidations in the biosynthesis of complex alkaloids. *The Plant J.*, 15(3), 289-300.
- Constabel, C.P., Yip, L., Patton, J.J. y Christopher, M.E. (2000).** Polyphenol oxidase from hybrid poplar. Cloning and expression in response to wounding and herbivory. *Plant Physiol.*, 124:285–295.
- Constabel, C.P. y Barbehenn R. (2008).** Defensive roles of polyphenol oxidase in plants. En: Schaller A. Induced plant resistance to herbivory (pp. 253-270), Springer New York.
- Constabel, C.P. y Ryan, C.A. (1998).** A survey of wound- and methyl jasmonate-induced leaf polyphenol oxidase in crop plants. *Phytochem.*, 47(4), 507-511.
- Cortes, D., Moreno, L., Párraga, J., Galán, A, y Cabedo, N. (2014).** New medicines inspired in Annonaceas. *Rev. Bras. Frut.*, 36(1), 22-31.
- Costa, E.V., Pinheiro, M.L.B., Marques, F.A., Braga, R.M. y Maia, B.H.L.S. (2009).** First report of alkaloids in the genus *Guatteria* (Annonaceae). *Biochem. System. Ecol.*, 37(1), 43-45.
- Costes, C., Milhet, Y., Candillon, C. y Magnier, G. (1976).** Mineral nutrition and morphine production in *Papaver somniferum*. *Physiol. Plant.*, 36: 201-207.
- Crawford, N. (1995).** Nitrate: Nutrient and Signal for Plant Growth. *The Plant Cell*, 7, 859-868.
- Crawford, N. y Glass, A. (1998).** Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. *Trends Pl. Sci.*, 3(10), 389-395.
- Cren, M. y Hirel, B. (1999).** Glutamina synthetase in higher plants: regulation of gene and protein expression from the organ to the cell. *Plant Cell Physiol.*, 40(12), 1187-1193.

- Cronquist, A. (1988).** An Integrated System of Classification of Flowering Plants. Nueva York: Columbia University
- Daddona, P.E., Wright, J.L. y Hutchinson, C.R. (1976).** Alkaloid catabolism and mobilization in *Catharanthus roseus*. *Phytochem.*, 15, 941-945.
- Dal Cin, V., Tieman, D., Takayuki, T., McQuinn, R., de Vos, R., Osorio, S., Schmelz, E., Taylor, M., Smits-Kroon, M., Schuurink, R., Haring, M., Giovannoni, J., Femie, A. y Klee, H. (2011).** Identification of Genes in the Phenylalanine Metabolic Pathway by Ectopic Expression of a MYB Transcription Factor in Tomato Fruit. *The Plant Cell*, 23, 2738-2753.
- D'Amato, T.A., Ganson, R.J., Gaines, C.G. y Jensen, R.A. (1992).** Subcellular localization of chorismate mutase isoenzymes in protoplasts from mesophyll and suspension-cultured cells of *Nicotiana glauca*. *Planta*, 162, 104–108.
- Daquinag, A.C., Nakamura, S., Takao, T., Shimonishi, Y. y Tsukamoto, T. (1995).** Primary structure of a potent endogenous dopa-containing inhibitor of phenol oxidase from *Musca domestica*. *PNAS*, 92(7), 2964-2968.
- De-Eknankul, W. y Ellis, B. (1988).** Purification and Characterization of Tyrosine Aminotransferase Activities from *Anchusa officinalis* Cell Cultures. *Arch. Biochem. Biophys.*, 267(1), 87-94.
- De la Cruz, I. (2001).** Acetogeninas bioactivas de *Annona diversifolia* Safford. Tesis de Licenciatura en Ingeniería Bioquímica. Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. México.
- De la Cruz-Chacón, I. y González-Esquinca, A.R. (2012).** Liriodenine alkaloid in *Annona diversifolia* during early development. *Nat. Prod. Res.*, 26(1), 42-49.
- De la Cruz-Chacón, I. (2012).** Alcaloides Bencilisoquinolínicos y su relación órgano-específica en las primeras fases de desarrollo de *Annona diversifolia* Safford. *Tesis de doctorado*. UNAM.
- De la Cruz-Chacón, I. y González-Esquinca, A.R. (2013).** Activities of enzymes catalyzing benzylisoquinoline alkaloid biosynthesis in *Annona diversifolia* saff. during early development. *Russ. J. Plant Physiol.*, 60(6), 791-799.
- De la Torre, F., El-Azaz, J., Ávila, C. y Cánovas, F.M. (2014).** Deciphering the role of aspartate and prephenate aminotransferase activities in plastid nitrogen metabolism. *Plant Physiol*, 164, 92-104.
- De la Torre, F., Suárez, M.F., De Santis, L. y Cánovas, F.M. (2007).** The aspartate aminotransferase family in conifers: biochemical analysis of a prokaryotic-type enzyme from maritime pine. *Tree Physiol.*, 27, 1283-1291.
- Delgado, E., Mitchell, A., Parry, M., Driscoll, S., Mitchell, V. y Lawlor, D. (1994).** Interacting effects of CO<sub>2</sub> concentration, temperature and nitrogen supply on the photosynthesis and composition of winter wheat leaves. *Plant, Cell Environ.*, 17, 1205-1213.
- De Luca, V. y Laflamme, P. (2001).** The expanding universe of alkaloid biosynthesis. *Curr. Op. Plant Biol.*, 4, 225–233.

- Demeyer, K. y DeJagere, R. (1992).** Effect of the nitrogen form used in the growth medium (NO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>) on alkaloid production in *Datura stramonium* L. *Plant and Soil.*, 147, 79-86.
- Deng, Y.W., Zhang, Y.D., Guan, S.Q., Chen, Y., Jiang, W., Tang, D.M. y Huang, D.F. (2011).** Molecular cloning and characterization of nitrogen source responsive *GSI* gene from melon. *Biol. Plantarum*, 55(1), 61-67.
- Drøhse, B. y Mølgaard, P. (2000).** HPLC analysis of the seasonal and diurnal variation of iridoids in cultivars of *Antirrhinum majus*. *Biochem. Syst. Eco.*, 28, 949-962.
- Duca, M., Glijin, A., Lupascu, V. y Orozco-Cardenas M. (2011).** Possible up-regulation of GS and Fd-GOGAT in transgenic tobacco as a response to phosphinothricin. *J. Plant Genet Transg.*, 2(1), 5-10.
- Duckworth, H.W. y Coleman, J.E. (1970).** Physicochemical and kinetic properties of mushroom tyrosinase. *J. Biol. Chem.*, 245, 1613-1625.
- Eberhard, J., Ehrler, T., Epple, P., Felix, G., Raesecke, H., Amrhein, N. y Schmid, J. (1996).** Cytosolic and plastidic chorismate mutase isoenzymes from *Arabidopsis thaliana*: molecular characterization and enzymatic properties. *The Plant J.*, 10(5), 815-821.
- Elmlinger, M.W., Bolle, C., Batschauer, A., Oelmüller, R. y Mohr, H. (1994).** Coaction of blue light and light absorbed by phytochrome in control of glutamine synthetase gene expression in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) seedling. *Planta*, 192, 189-194.
- Evans, W.C., Evans, D. y Trease, G.E. (2009).** Alkaloids. Part 5: Pharmacopoeial and related drugs of biological origin, In: Trease and Evan's pharmacognosy (pp. 353-415). Evans WC, Ed., 16th ed. Saunders/Elsevier, USA.
- Facchini, P. (2001).** Alkaloids biosynthesis in plants: biochemistry, cell biology, molecular regulation, and metabolic engineering applications. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol.*, 52, 29-66.
- Fairbairn, J.W. y El-Masry, S. (1967).** The alkaloids of *Papaver somniferum* L-V\*. Fate of the "end-product" alkaloid morphine. *Phytochem.*, 3, 499-504.
- Fairbairn, J.W. y Suwal, P.N. (1961).** The alkaloid of Hemlock (*Conium maculatum* L.). Part II: Evidence for a rapid turnover of the major alkaloids. *Phytochem.*, 1: 38-46.
- Fairbairn, J.W., Paterson, A. y Wassel, G. (1964).** The alkaloids of *Papaver somniferum* L. Part I: Evidence for a rapid turnover of the major alkaloids. *Phytochem.*, 3: 253-258.
- Farrokh, A.R., Azizov, I., Farrokh, A., Esfahani, M., Choubeh, M.R. y Kavooosi, M. (2012).** Effect of nitrogen and potassium fertilizer on yield, quality and some quantitative parameters of flue-cured tobacco cv. K326. *Afr. J. Agric. Res.*, 7(17), 2601-2608.
- Felton, G.W., Donato, K., Del Vecchio, R.J. y Duffey, S.S. (1989).** Activation of plant foliar oxidases by insect feeding reduces nutritive quality of foliage for noctuid herbivores. *J. Chem. Ecol.*, 15(12), 2667-2694.
- Fenoll, L.G., Peñalver, M.J., Rodríguez-López, J.N., Varón, R., García-Cánovas, F. y Tudela, J. (2004).** Tyrosinase kinetics: discrimination between two models to explain the oxidation mechanism of monophenol and diphenol substrates. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 36, 235-246.

- Forde, B.G. y Lea, P.J. (2007).** Glutamate in plants: metabolism, regulation, and signaling. *J. Exp. Bot.*, 58(9), 2339-2358.
- Foyer, C., Parry, M. y Noctor, G. (2003).** Markers and signals associated with nitrogen assimilation in higher plants. *J. Exp. Bot.*, 54(382), 585-593.
- Foyer, C., Noctor, G. y Hodges, M. (2011).** Respiration and nitrogen assimilation: targeting mitochondria-associated metabolism as a means to enhance nitrogen use efficiency. *J. Exp. Bot.*, 62(4), 467-1482.
- Fritz, C., Palacios-Rojas, N., Feil, R. y Stitt, M. (2006).** Regulation of secondary metabolism by the carbon-nitrogen status in tobacco: nitrate inhibits large sectors of phenylpropanoid metabolism. *Plant J.*, 46, 533-548.
- Galangau, F., Daniel-Vedele, F., Moureaux, T., Dorbe, M.F., Leydecker, M.T. y Caboche, M. (1988).** Expression of leaf nitrate reductase genes from tomato and tobacco in relation to light-dark regimes and nitrate supply. *Plant Physiol*, 88: 383-388
- Galili, G. (2011).** The aspartate-family pathway of plants: Linking production of essential amino acids with energy and stress regulation. *Plan Sign. Behav.*, 6 (2), 192-195.
- Geiger, M., Haake, V., Ludewig, F., Sonnewald, U. y Stitt, M. (1999).** The nitrate and ammonium nitrate supply have a major influence on the response of photosynthesis, carbon metabolism, nitrogen metabolism and growth to elevated carbon dioxide in tobacco. *Plant Cell Environ.*, 22,1177-1199.
- Gentry, A.H. (1995).** Diversity and floristic composition of neotropical dry forest. En: In: Stephen H. Bullock *et al.* (eds.) *Seasonally Dry Tropical Forests*. Cambridge University Press. Pp.450
- Gilchrist, D.G., Woodin, T., Johnson, M. y Kosuge, T. (1972).** Regulation of Aromatic Amino Acid Biosynthesis in Higher Plants. *Plant Physiol.*, 49, 52-57.
- Glass A., Britto, D., Kaiser, B., Kinghorn, J., Kronzucker, H., Kumar, A., Okamoto, M., Rawat, S., Siddiqi, M., Unkles, S. y Vidmar, J. (2002).** Steps towards an integrates view of nitrogen metabolism. *J. Exp. Bot. Inorganic Nitrogen assimilation Special Issue*, 53(370), 855-864.
- Gholamhosseinpour, Z., Hemati, K., Dorodian, H. y Bashiri-Sadr, Z. (2011).** Effect of Nitrogen Fertilizer on Yield and Amount of Alkaloids in Periwinkle and Determination of Vinblastine and Vincristine by HPLC and TLC. *Plant Sci. Res.*, 3(2), 4-9.
- Golbeck, J.H. y Cammarata, K.V. (1981).** Spinach thylakoid polyphenol oxidase: isolation, activation, and properties of the native chloroplast enzyme. *Plant Physiol.*, 67, 977-984.
- González-Esquinca, A.R. (2001).** Contribución al género *Annona* (Annonaceae): análisis fitoquímico de 3 especies del estado de Chiapas. *Tesis de doctorado*. UNAM.
- González-Esquinca, A.R., Luna-Cazares, L.M., Guzmán, M.S., De la Cruz-Chacón, I., Hernández, G.L., Breceda, S.F. y Gerardo, P.M. (2012).** In Vitro Larvicidal Evaluation of *Annona muricata* L., *A. diversifolia* Saff. and *A. lutescens* Saff. extracts Against *Anastrepha ludens* Larva (Diptera, Tephritidae). *Interciencia*, 37(4), 284-289.

- González-Trujano, E., López-Meraz, L., Reyes-Ramírez, A., Aguillón, M. y Martínez A. (2009).** Effect of repeated administration of *Annona diversifolia* Saff. (ilama) extracts and palmitone on rat amygdale kindling. *Epil. Behav.*, 16: 590–595.
- González-Trujano, E., Tapia, E.M., López-Meraz, L., Navarrete, A., Reyes-Ramírez, A. y Martínez, A. (2006).** Anticonvulsant effect of *Annona diversifolia* Saff. and palmitone on penicillin-induced convulsive activity. A behavioral and EEG study in rats. *Epilepsia*, 47,1810-1817.
- Graindorge, M., Giustini, C., Jacomin, A., Kraut, A., Curien, G. y MAttringe M. (2010).** Identification of a plant gene encoding glutamate/aspartate-prephenate aminotransferase: The last homeless enzyme of aromatic amino acids biosynthesis. *FEBS Lett.*, 584, 4357-4360.
- Guinaudeau, H., Leboeuf, M. y Cavé, A. (1988).** Aporphinoid alkaloids. IV. *J. Nat. Prod.*, 51(3), 389-474.
- Guinaudeau, H., Leboeuf, M. y Cavé, A. (1994).** Aporphinoid alkaloids, V. *J. Nat. Prod.*, 57(8), 1033-1135.
- Guinaudeau, H. y Shamma, M. (1982).** The protopine alkaloids. *J. Nat. Prod.*, 45(3), 237-246.
- Guo, X.R., Zu, Y.G. y Tang Z.H. (2012).** Physiological responses of *Catharanthus roseus* to different nitrogen forms. *Acta Physiol. Plant.*, 34, 589-598.
- Gupta, M.P. y Gibson, M.R. (1972).** Protein-alkaloid relationship in *Datura stramonium* var. tatula. *J. Pharmaceut. Sci.*, 61(8),1257-1262.
- Hagel, J. y Fachini, P. (2013).** Benzylisoquinoline alkaloid metabolism – a century of discovery and a brave new world. *Plant Cell Physiol.*, 54(5), 647-672.
- Haruta, M., Pedersen, J.A. y Constabel, P. (2001).** Polyphenol oxidase and herbivore defense in trembling aspen (*Populus tremuloides*): cDNA cloning, expression, and potential substrates. *Physiol. Plant.*, 112(4), 552-558.
- Hashimoto, T., Matsuda, J., y Yamada, Y. (1993).** Two-step epoxidation of hyoscyamine to scopolamine is catalyzed by bifunctional hyoscyamine 6 $\beta$ -hydroxylase. *FEBS letters*, 329(1), 35-39.
- Hayashi, T., Yoshida, K. y Sano, K. (1988).** Formation of alkaloids in suspension-cultured *colchicum autumnale*. *Phytochem.*, 27(5), 1371-1374.
- Heidari, B., Matre, P., Nemie-Feyissa, D., Meyer, C., Rognli, O.A., MØller, S.G. y Lillo C. (2011).** Protein phosphatase 2A B55 and A regulatory subunits interact with nitrate. *Plant Physiol.*, 156(1), 165-177.
- Hemberg, T. y Flück, H. (1953).** Die Tagesperiodizitat des alkaloid-gehaltes und des gehaltes an übrigen stichstoffhaltigen stoffen bei *Datura stramonium* L. *Pharm. Acta Helv.*, 28: 74-78.
- Herrmann, K. (1996).** The shikimate pathway as an entry to aromatic secondary metabolism. *Plant Physiol.*, 107, 7-12
- Herrmann, K. (1999).** The shikimate pathway: early steps in the biosynthesis of aromatic compounds. *The Plant Cell*, 7, 907-919.

- Hsieh, T.J., Liu, T.Z., Chern, C.L., Tsao, D.A., Lu, F.J., Syu, Y.H., Hsieh, P.Y., Hu, H.S., Chang, T.T. y Chen, C.H. (2005).** Liriodenine inhibits the proliferation of human hepatoma cell lines by blocking cell cycle progression and nitric oxide-mediated activation of p53 expression. *Food Chem. Toxicol.*, 43(7), 1117-1126.
- Hu, P., Meng, Y. y Wise, R. (2009).** Functional Contribution of Chorismate Synthase, Anthranilate synthase, and Chorismate Mutase to Penetration Resistance in Barley–Powdery Mildew Interactions. *MPMI.*, 22(3), 311-320.
- Ilari, A., Franceschini, S., Bonamore, A., Arengi, F., Botta, B., Macone, A., Pasquo, A., Bellucci, L. y Boffi, A. (2009).** Structural basis of enzymatic (S)-Norcoclaurine biosynthesis. *J. Biol. Chem.*, 284, 897-904.
- Ishiyama, K., Inoue, E., Watanabe-Takashi, A., Obaras, M., Yamaya, T. y Takahashi, H. (2004).** Kinetic Properties and Ammonium-dependent Regulation of Cytosolic Isoenzymes of Glutamine Synthetase in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.*, 279(16), 16598-16605.
- Israilov, I.A., Karimova, S.U., Yunusov, M.S. y Yunusov, S.Y. (1980).** Aporphine alkaloids. *Chem. Nat. Comp.*, 16(3), 197-225.
- Itenov, K., MØlgaard, P. y Nyman, U. (1999).** Diurnal fluctuations of the alkaloid concentration in latex of poppy *Papaver somniferum* is due to day/night fluctuations of the latex water content. *Phytochem.*, 52, 1229-1234.
- Jaenicke, E. y Decker, H. (2003).** Tyrosinases from crustaceans form hexamers. *Biochem. J.*, 371, 515-523.
- Johnson, C. y Decoteau, D. (1996).** Nitrogen and potassium fertility affects jalapeño pepper plant growth, pod yield, and pungency. *HortSci.*, 31(7), 1119-1123.
- Kaiser, W.M. y Huber, S.C. (1994).** Posttranslational Regulation of Nitrate Reductase in Higher Plants. *Plant Physiol.*, 106, 817-821.
- Kaiser, W.M. y Huber, S.C. (2001).** Posttranslational Regulation of Nitrate Reductase: mechanism, physiological relevance and environmental triggers. *J. Exp. Bot.*, 52(363), 1981-1989.
- Kametani, T. y Fukumoto, K. (1971).** Synthesis of morphinandienone alkaloids by phenol oxidation and the pschorr reaction. *J. Heter. Chem.*, 8(3), 341-356.
- Khlapsev, E.E. (1978).** Effect of fertilizers on the harvest of plume poppy and content of alkaloids under conditions of a greenhouse experiment. *Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal*, 12(11), 67-71.
- Kissen, R., Wing, P., Diem, T.T., Tommy, J., Trond, S., Christensen, T. y Bones, A. (2010).** Transcriptional profiling of an Fd-GOGAT1/GLU1 mutant in *Arabidopsis thaliana* reveals a multiple stress response and extensive reprogramming of the transcriptome. *BMC Gen.*, 11, 190-221.
- Koricheva, J., Larsson, S., Haukioja, E. y Keinänen, M. (1998).** Regulation of woody plants secondary metabolism by resource availability: hypothesis testing by means of meta-analysis. *Oikos*, 83, 212-226.
- Kowalski, S.P., Eannetta, N.T., Hirzel, A.T. y Steffens, J.C. (1992).** Purification and characterisation of polyphenol oxidase from glandular trichomes of *Solanum berthaultii*. *Plant Physiol.*, 100(2), 677-684.



- Kraiser, T., Gras, D.E., Gutierrez, A.G, González, B. y Gutierrez R.A. (2011).** A holistic view of nitrogen acquisition in plant. *J. Exp. Bot.*, 62(4), 1455-1466.
- Kusano, M., Fukushima, A., Redestig, H. y Saito, K. (2011).** Metabolomic approaches toward understanding nitrogen metabolism in plants. *J. Exp. Bot.*, 62(4), 1439-1453.
- Lam, H.-M., Coschigano, K.T., Oliveira, I.C., Mlo-Oliveira, R. y Coruzzi G.M. (1996).** The molecular-genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 47, 569-593.
- Laughlin, J.C. (1982).** The effect of time of application and chemical formulation of nitrogen fertilizers on the morphine production of Poppies (*Papaver somniferum* L.). *Acta Hort. (ISHS)*, 132, 233-238.
- Laughlin, J.C. (1987).** The effect of nitrogen top-dressing and plant density on the yield and lodging of Poppies (*Papaver somniferum* L.). *Acta Hort (ISHS)*, 208, 93-100.
- Lea, U., Leydecker, M.T., Quilleré, I., Meyer, C. y Lillo, C. (2006).** Posttranslational regulation of nitrate reductasa strongly affects the levels of free amino acids and nitrate, whereas transcriptional regulation has only minor influence. *Plant Physiol.*, 140, 1085-1094.
- Leboeuf, M., Cavé, A., Bhaumik, P.K., Mukherjee, B. y Mukherjee, R. (1982).** The phytochemistry of the Annonaceae. *Phytochem.*, 21(12), 2783-2813.
- Lee, R.B. (1993).** Control of net uptake of nutrients by regulation of influx in barley plants recovering from nutrient deficiency. *Ann. Bot.*, 72, 223-230.
- Lee, E.J. y Facchini, P. (2011).** Tyrosine aminotransferase contributes to benzyloquinoline alkaloid biosynthesis in opium poppy. *Plant Physiol.*, 157(3), 1067-1078.
- Lerdau, M. (2002).** Benefits of Carbon-Nutrient balance hypothesis. *Oikos*, 98(3), 534-536.
- Li, L. y Steffens, J.C. (2002).** Overexpression of polyphenol oxidase in transgenic tomato plants result in enhanced bacterial disease resistance. *Planta*, 215, 239-247.
- Lillo, C. (1994).** Light regulation of nitrate reductase in green leaves of higher plants. *Physiol. Plant.*, 90, 616-620.
- Lillo, C. (2004).** Light Regulation of nitrate uptake, assimilation and metabolism. En: Amancio A y Stulen I. (eds.) Nitrogen acquisition and assimilation in higher plants (pp. 133-147). Kluwer academic Publishers.
- Lindsey, K. (1985).** Manipulation, by nutrient limitation, of the biosynthetic activity of immobilized cells of *Capsicum frutescens* Mill. cv. Annum. *Planta*, 165, 126-133.
- Liscombe, D. y Facchini, P. (2008).** Evolutionary and cellular webs in benzilisoquinoline alkaloid biosynthesis. *Curr. Op. Biotech.*, 19, 173-180.
- Liscombe, D., MacLeod, B., Loukanina, N., Nandi, O. y Facchini, P. (2005).** Evidence for the monophyletic evolution of benzyloquinoline alkaloid biosynthesis in angiosperms. *Phytochem.*, 66, 1374-1393.

- Loeffler, S. y Zenk, M.H. (1990).** The hydroxylation in the biosynthetic pathway leading from norcoclaurine to reticuline. *Phytochem.*, 29(11), 3499-3503.
- Losak, T., Hlusek, J. y Popp, T. (2009).** Potassium sulphate and potassium chloride in the nutrition of poppy (*Papaver somniferum* L.) in relation to nitrogen supply. *Elec. Int. Fert. Corresp.*, 19, 10-13
- Losak, T. y Richter, R. (2004).** Split nitrogen doses and their efficiency in poppy (*Papaver somniferum* L.) nutrition. *Plant Soil Environ.*, 50(11), 484-488.
- Lu, Y., Luo, F., Yang, M., Li XH, Lian XM. (2011).** Suppression of glutamate synthase genes significantly affects carbon and nitrogen metabolism in rice (*Oryza sativa* L.). *Sci. China*, 54(7), 651-663.
- Lubbe, A., Choi, Y.H., Vreeburg, P. y Verpoorte, R. (2011).** Effect of Fertilizers on Galanthamine and Metabolite Profiles in Narcissus Bulbs by <sup>1</sup>H NMR. *J. Agric. Food Chem.*, 59, 3155-3161.
- Luk, L.Y., Bunn, S., Liscombe, D., Facchini, P. y Tanner, M.E. (2007).** Mechanistic studies on norcoclaurine synthase of benzyloisoquinoline alkaloid biosynthesis: An enzymatic Pictet-Spengler reaction. *Biochem.*, 46, 10153-10161.
- Maathuis, F. (2009).** Physiological functions of mineral macronutrients. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12, 250-258.
- Maeda, H. y Dudareva, N. (2012).** The shikimate pathway and aromatic aminoacids biosynthesis in plants. *Ann. Rev. Plant Biol.*, 63, 73-105.
- Maeda, H., Shasany, A.K., Schnepf, J., Orlova, I., Taguchi, G., et al. (2010b).** RNAi suppression of Arogenate Dehydratase1 reveals that phenylalanine is synthesized predominantly via the arogenate pathway in *petunia* petals. *Plant Cell*, 22, 832-49.
- Maeda, H., Yoo, H. y Dudareva, N. (2010a).** Prephenate aminotransferase directs plant phenylalanine biosynthesis via arogenate. *Nat. Chem. Biol.*, 7, 19-21.
- Manukyan, A.E. (2005).** Optimum nutrition for biosynthesis of pharmaceutical compounds in celandine and catmint under outside hydroponic conditions. *J. Plant Nut.*, 28, 751-761.
- Martínez-Vázquez, M. y Estrada-Reyes, R. (2014).** Secondary metabolism in Annonaceae: potencial source of drugs. *Rev. Bras. Frutic.*, 36, 141-146.
- Mass, P.J., Westra, L.Y., Rainer, H., Lobao, A.Q. y Erkens, H.J. (2011).** An update index to genera, species, and infraspecific taxa of Neotropical Annonaceae. *Nor. J Bot.*, 29, 257-356.
- Masclaux-Daubresse, C., Valadier, M.-H., Carrayol, E., Reisdorf-Cren, M. y Hirel B. (2002).** Diurnal changes in the expression of glutamate dehydrogenase and nitrate reductase are involved in the C/N balance of tobacco source leaves. *Plant, Cell and Environ.*, 25, 1451-1462. **Mayer AM. 2006.** Polyphenol oxidases in plants and fungi: Going places? A review. *Phytochem.*, 67: 2318-2331
- Matt P, Geiger M, Walch-Liu P, Engels C, Krapp A, Stitt M. (2001).** The immediate cause of the diurnal changes of nitrogen metabolism in leaves of nitrate-replete tobacco: a major imbalance between the rate of nitrate reduction and the rates of nitrate uptake and ammonium metabolism during the first part of the light period. *Plant, Cell & Environ.*, 24: 177-190

- Mayer, A.M. (2006).** Polyphenol oxidases in plants and fungi: Going places? A review. *Phytochem.*, 67, 2318-2331.
- Medina-Lara, F., Echevarria-Machado, I., Pacheco-Arjona, R., Ruíz-Lau, N., Guzmán-Antonio, A. y Martínez-Estevez, M. (2008).** Influence of Nitrogen and Potassium Fertilization on Fruiting and Capsaicin Content in Habanero Pepper (*Capsicum chinense* Jacq.). *HortSci.*, 43(5), 1549-1554.
- Mendelssohn, I. (1979).** Nitrogen metabolism in the height forms of *Spartina Alterniflora* in North Carolina. *Ecol.*, 60(3), 574-584.
- Miao, G.H., Hirel, B., Marsolier, M., Ridge, R. y Desh Verma D. (1991).** Ammonia-Regulated Expression of a Soybean Gene Encoding Cytosolic Glutamine Synthetase in Transgenic *Lotus corniculatus*. *The Plant Cell*, 3, 11-22.
- Miller, A., Fan, X., Shen, Q. y Smith, S. (2007).** Amino acids and nitrate as signals for the regulation of nitrogen acquisition. *J. Exp. Bot. Transport of Plant Growth Regulators Special Issue*, 59(1), 111-119.
- Minami, H. (2013).** Fermentative production of plant benzyloisoquinoline alkaloids in microbes. *Biosc. Biotechnol. Biochem.*, 77(8), 1617-1622.
- Misra, N. y Gupta, A. (2006).** Effect of salinity and different nitrogen sources on the activity of antioxidant enzymes and indole alkaloid content in *Catharanthus roseus* seedlings. *J. Plant Physiol.*, 163, 11-18.
- Mobley, E.M, Kunkel, B.N. y Keith, B. (1999).** Identification, Characterization and comparative analysis of a novel chorismate mutase gene in *Arabidopsis thaliana*. *Gene*, 240(1), 115-123.
- Moore, B.M. y Flurkey, W.H. (1990).** Sodium dodecyl sulfate activation of a plant polyphenol oxidase. *J. Biol. Chem.*, 265, 4982-4988.
- Murashige, T. y Skoog, F. (1962).** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant.*, 15, 473-497.
- Nakagawa, A., Minami, H., Kim, J.S., Koyanagi, T., Katayama, T., Sato, F. y Kumagai, H. (2011).** A bacterial platform for fermentative production of plant alkaloids. *Nat. Commun.*, 2, 326.
- Ngantchou, I., Nyasse, B., Denier, C., Blonski, C., Hannaert, V. y Schneider, B. (2010).** Antitrypanosomal alkaloids from *Polyalthia suaveolens* (Annonaceae): Their effects on three selected glycolytic enzymes of *Trypanosoma brucei*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 20(12), 3495-3498.
- Nishiyama, Y., Moriyasu, M., Ichimaru, M., Iwasa, K., Kato, A., Mathenge, S.G., Mutiso, P.B. y Juma, F.D. (2006).** Secondary and tertiary isoquinoline alkaloids from *Xylopiya parviflora*. *Phytochem.*, 67(24), 2671-2675.
- Nitao, J.K., Zangerl, A.R., Berenbaum, J.G., Hamilton, J.G y DeLucia, E.H. (2002).** CNB: requiescat in peace?. *Oikos*, 98(3), 540-546.
- Nunes-Nesi, A., Fernie, A.R. y Stitt M. (2010).** Metabolic and Signaling Aspects Underpinning the Regulation of Plant Carbon Nitrogen Interactions. *Mol. Plant*, 3(6): 973-996

- Oliveira, I. y Coruzzi, G. (1999).** Carbon and Amino Acids Reciprocally Modulate the Expression of Glutamine Synthetase in Arabidopsis. *Plant Physiol.*, 121, 301-309.
- Onoyovwe, A., Hagel, J.M., Chen, X., Khan, M.F., Schriemer, D.C. y Facchini, P. (2013).** Morphine Biosynthesis in Opium Poppy Involves Two Cell Types: Sieve Elements and Laticifers. *The Plant Cell*, 25(10), 4110-4122.
- Orozco-Castillo, J.A. (2009).** Efecto del nitrógeno en la producción de alcaloides en plántulas de *Annona diversifolia* Saff. *Tesis de licenciatura*. Facultad de Ciencias Biológicas, UNICACH.
- Otero-Sánchez, M.A., Becerril-Román, A.E., Castillo-Morales, A., Michel-Aceves, A.C., Ariza-Flores, R., Barrios-Ayala, A. y Rebolledo-Martínez, A. (2006).** Producción de ilama (*Annona diversifolia* Saff.) en el trópico seco de Guerrero, México. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 12(2), 137-143.
- Pate, J.S. (1973).** Uptake, assimilation and transport of nitrogen compounds in plants. *Soil Biol. Biochem.*, 5, 109-119.
- Pienkny, S., Brand, W., Schmidt, J., Kramell, R. y Ziegler, J. (2009).** Functional characterization of a novel benzylisoquinoline O-methyltransferase suggests its involvement in papaverinebiosynthesis in opium poppy (*Papaver somniferum* L.). *The Plant J.*, 60, 56-67.
- Pourcel, L., Routaboul, J.M., Chevner, V., Lepiniec, L. y Debeaujon, I. (2007).** Flavonoid oxidation in plants: from biochemical properties to physiological functions. *Trends Plant Sci.*, 12(1), 1360-1385.
- Protais, P., Cortes, D., Pons, J.L., Lopez, S., Villaverde, M.C. y Castedo, L. (1992).** Displacement activity of some natural colurine alkaloids at striatal <sup>3</sup>H-SCH 23390 and <sup>3</sup>H-raclopride binding sites. *Experientia*, 48(1), 27-30.
- Rainer, H. (2013).** Taxonomy of Annonaceae. *Annona and Rollinia*. V International Congress Brazilian Meeting about Annonaceae: from gene to exportation. Agosto, 2013. Botucatu, Brasil.
- Rapoport, H., Levy, N. y Stermitz, F.R. (1961).** Distribution of radioactivity in morphine from biosynthesis with carbon-14 dioxide. *J. Am. Chem. Soc.*, 83(20), 4298-4300.
- Raven, J.A., Smith, F.A. (1976).** Nitrogen assimilation and transport in vascular land plants in relation to intracellular pH regulation. *New Phyt.*, 76(3), 45-431.
- Rejón-Orantes, J., González-Esquinca, A.R., de la Mora, M., Roldan, G. y Cortes, D. (2010).** Actividad farmacológica sobre el sistema nervioso central de la liriodenina, alcaloide extraído de la raíz de la *Annona diversifolia*. *Memorias del IV Congreso Internacional y V Nacional de Anonáceas*, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. 2, 4 y 5 noviembre de 2010. Pp. 11
- Rejón-Orantes, J., González-Esquinca, A.R., de la Mora, M., Roldan, G. y Cortes, D. (2011).** Annomontine, an alkaloid isolated from *Annona purpurea*, has anxiolytic-like effects in the elevated plus-maze. *Planta med.*, 77(4), 322-327.
- Ren, F. y Lu, Y.T. (2006).** Overexpression of tobacco hydroxyproline-rich glycopeptide systemin precursor A gene in transgenic tobacco enhances resistance against *Helicoverpa armigera* larvae. *Plant Sci.*, 171(2), 286-292.

- Richardson, J.E., Chatrou, L.W., Mols, J.B., Erkens, R.H. y Pirie, M.D. (2004).** Historical biogeography of two cosmopolitan families of flowering plants: Annonaceae and Rhamnaceae. *Phil.Trans.Roy. Soc. B: Biol. Sci.*, 359(1450), 1495-1508.
- Riley-Saldaña, C.A. (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.
- Rippert, P. y Matringe, M. (2002).** Purification and kinetic analysis of the two recombinant arogenate dehydrogenase isoforms of *Arabidopsis thaliana*. *Eur. J. Biochem.*, 269(19), 4753-4761.
- Rippert, P., Puyaubert, J., Grisolle, D., Matringe, M. (2009).** Tyrosine and phenylalanine are synthesized within the plastids in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, 149(3), 1251-1260.
- Rubio-Wilhelmi, M., Sanchez-Rodriguez, E., Leyva, R., Blasco, R., Romero, L., Blumwald, E. y Ruiz, J. (2012a).** Response of carbon and nitrogen-rich metabolites to nitrogen deficiency in P<sub>SARK::IPT</sub> tobacco plants. *Plant Physiol. Biochem.*, 57, 231-237.
- Rubio-Wilhelmi, M., Sanchez-Rodriguez, E., Rosales, M.A., Blasco, B., Rios, J.J., Romero, L., Blumwald, E. y Ruiz J. (2012b).** Ammonium formation and assimilation in P<sub>SARK::IPT</sub> tobacco transgenic plants under low N. *J. Plant Physiol.*, 169(2) 157-162.
- 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.
- Rueffer, M., El-Shagi, H., Nagakura, N. y Zenk, M.H. (1981).** (S)-norlaudanosoline synthase: The first enzyme in the benzyloquinoline biosynthetic pathway. *FEBS Lett.*, 129(1), 5-9.
- Rueffer, M. y Zenk, M.H. (1987).** Distant precursors of benzyloquinoline alkaloids and their enzymatic formation. *Z. Naturforsch., A: Phys.Sci.*, C42(4), 319–332.
- Ryan, C.A. (2000).** The systemin signalin pathway: differential activation of plant defensive genes. *BBA-Protein Struct. Mol. Enzymol.*, 1477(1-2),112-121.
- Sakakibara, H., Takei, K. y Hirose, N. (2006).** Interactions between nitrogen and Cytokinin in the regulation of metabolism and development. *Trends in Pl. Sci.*, 11(9): 440-448.
- Sakihama, Y., Cohen, M.F., Grace, S.C. y Yamasaki, H. (2002).** Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. *Toxicology*, 177, 67-80.
- Samanani, N. y Facchini, P. (2001).** Isolation and partial characterization of norcoclaurine synthase, the first committed step in benzyloquinoline alkaloid biosynthesis, from opium poppy. *Planta*, 6, 898-906.
- Samanani, N. y Facchini, P. (2002).** Purification and Characterization of Norcoclaurine Synthase: The first committed enzyme in benzyloquinoline alkaloid biosynthesis in plants. *J. Biol. Chem.*, 277, 33878-33883.
- Samanani, N., Liscombe, D. y Facchini, P. (2004).** Molecular cloning and characterization of norcoclaurine synthase, an enzyme catalyzing the first committed step in benzyloquinoline alkaloid biosynthesis. *The Plant J.*, 40(2), 302-313.

- Sato, F. y Kumagai, H. (2013).** Microbial production of isoquinoline alkaloids as plant secondary metabolites based on metabolic engineering research. *Proc. Jpn. Acad., Ser.*, 89(5),165-182.
- Sato, F., Hashimoto, T., Hachiya, A., Tamura, K.I., Choi, K.B., Morishige, T., Fujimoto, H. y Yamada, Y. (2001).** Metabolic engineering of plant alkaloid biosynthesis. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 98(1), 367-372.
- Shamma, M. (1972).** The Isoquinoline Alkaloids. *Academic Press*, New York. Pp. 234
- Schatchman, D. y Shin, R. (2007).** Nutrient Sensing and Signaling: NPKS. *Ann. Rev. Plant Biol.*, 58, 47-69.
- Scheible, W.R., González-Fontes, A., Lauerer, M., Müller-Röber, B., Caboche, M. y Stitt, M. (1997).** Nitrate acts as a signal to induce organic acids metabolism and repress starch metabolism in tobacco. *The Plant Cell.*, 9, 783-798.
- Scheible, W.R., Krapp, A. y Stitt, M. (2000).** Reciprocal diurnal changes of phosphoenolpyruvate carboxylase expression and cytosolic pyruvate kinase, citrate synthase and NADP-isocitrate dehydrogenase expression regulate organic acid metabolism during nitrate assimilation in tobacco leaves. *Plant, Cell Environ.*, 23, 1155-1167.
- Scheible, W.R., Morcuende, R., Czechowski, T., Fritz, C., Osuna, D., Palacios-Rojas, N., Schindelasch, D., Thimm, O., Udvardi, M.K. y 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.
- Schenck, C.A., Chen, S., Siehl, D.L. y Maeda, H.A. (2015).** Non-plastidic, tyrosine-insensitive prephenate dehydrogenases from legumes. *Nat. Chem. Biol.*, 11, 52-57.
- Schrader, L.E. y Hageman, R.H. (1967).** Regulation of Nitrate Reductase Activity in Corn (*Zea mays* L.) Seedlings by Endogenous Metabolites. *Plant Physiol.*, 42, 1750-1756.
- Schuler, M. (1996).** The Role of Cytochrome P450 Monooxygenases in Plant-Insect Interactions. *Plant Physiol.*, 112, 1411-1419.
- Shaner, D. y Boyer, J. (1976).** Nitrate Reductase Activity in Maize (*Zea mays* L.) Leaves. *Plant Physiol.*, 58, 499-504.
- Siehl, D.L., Connelly, J.A. y Conn, E.E. (1986).** Tyrosine biosynthesis in Sorghum bicolor: characteristics of prephenate aminotransferase. *Z Naturforsch C.*, 41(1-2), 79-86.
- Sikuli, N.N. y Demeyer, K. (1997).** Influence of the ion-composition of the medium on alkaloid production by "hairy roots" of *Datura stramonium*. *Plant Cell Tis. Org. Cul.*, 47, 261-267.
- Simonovic, A. y Andersan, M.D. (2008).** Light modulates activity and expression of glutamine synthetase isoforms in maize seedling roots. *Arch. Biol. Sci.*, 60(4), 649-660.
- Sims, J.L., Sheen, S.J., Grunwald, C. y Atkinson, W.O. (1975).** Effects of nitrogen fertilization and stalk position on certain chemical and physical characteristics of three tobacco genotypes. *Can. Plant Sci.*, 55, 285-490.

- Srinivasan, P.R., Shigeura, H., Sprecher, M., Sprinson, D.B. y Davis, B. (1956).** The biosynthesis of shirimic acid from D-glucose. *J. Biol. Chem.*, 220, 477-497.
- Stadler, R., Kutchan, T. y Zenk, M. (1989).** (S)-Norcoclaurine is the central intermediate in benzyloisoquinoline alkaloid biosynthesis. *Phytochem.*, 28(4), 1083-1086.
- Standman, E.R. (1990).** Discovery of Glutamine synthetase cascade. *Methods in Enzymol.*, 182, 793-808.
- Standley, P. y Steyermark, J. (1946).** Flora of Guatemala and the adjacent 265 regions. IV. *Fieldiana Bot.*, 24, 270-294.
- Steiner, U., Schliemann, W., Böhm, H. y Strack, D. (1999).** Tyrosinase involved in betalain biosynthesis of higher plants. *Planta*, 208, 114-124.
- Stock, W. y Lewis, O.A. (1984).** Uptake and Assimilation of Nitrate and Ammonium by an Evergreen Fynbos Shrub Species *Protea repens* L. (Proteaceae). *New Phytol.*, 97(2), 261-268.
- Spin, J.C. y Wichers, H.J. (1999).** Activation of a Latent Mushroom (*Agaricus bisporus*) Tyrosinase Isoform by Sodium Dodecyl Sulfate (SDS). Kinetic Properties of the SDS-Activated Isoform. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 3518-3525.
- Spin, J.C. y Wichers, H.J. (2001).** Effect of captopril on mushroom tyrosinase activity in vitro. *Biochem. Biophys. Acta*, 1544, 289-300.
- Sporer, F., Sauerwein, M. y Wink, M. (1993).** Diurnal and developmental variation of alkaloids accumulation in *Atropa belladonna*. *ISHS Acta Hort.*, 331, 381-386.
- Sreevalli, Y., Kulkarni, R.N., Baskaran, K. y Chandrashekara, R.S. (2004).** Increasing the content of leaf and root alkaloids of high alkaloid content mutants of periwinkle through nitrogen fertilization. *Ind. Crops Prod.* 19, 191-195.
- Stitt, M., Müller, C., Matt, P., Gibon, Y., Carrillo, P., Morcuente, R., Scheible, W.R. y Krapp, A. (2002).** Steps towards an integrated view of nitrogen metabolism. *J. Exp Bot.*, 53(370), 959-970.
- Stitt, M., Sulpicie, R. y Keurentjes, J. (2010).** Metabolic Networks: How to Identify Key Components in the Regulation of metabolism and Growth. *Plant Physiol.*, 152(2), 428-444.
- Takemura, T., Ikesawa, N., Iwasa, K. y Sato, F. (2010).** Metabolic diversification of benzyloisoquinoline alkaloid biosynthesis through the introduction of a branch pathway in *Eschscholzia californica*. *Plant Cell Physiol.*, 51(6), 949-959.
- Taniguchi, M., Kobe, A., Kato, M. y Sugiyama, T. (1995).** Aspartate aminotransferase isozymes in *Panicum miliaceum* L., an NAD-Malic enzyme-type C4 plant: Comparison of enzymatic properties primary structures, and expression patterns. *Arch. Biochem. Biophys.*, 318(2), 295-306.
- Tantisewie, B. y Ruchirawat, S. (1992).** Alkaloids from the plants of Thailand. *The alkaloids: Chemistry and Pharmacology*, 41, 1-40.

- Thipyapong, P., Hunt, M.D. y Steffens, J.C. (1995).** Systemic wound induction of potato (*Solanum tuberosum*) polyphenol oxidase. *Phytochem.*, 40(3), 673-676.
- Thipyapong, P., Melkonian, J., Wolfe, D.W. y Steffens J.C. (2004).** Suppression of polyphenol oxidases increases stress tolerance in tomato. *Plant Sci.*, 167(4), 693-703.
- Tjaden, G., Edwards, J. y Coruzzi G. (1995).** *cis* Elements and trans-Acting Factors Affecting Regulation of a Nonphotosynthetic Light-Regulated Gene for Chloroplast Glutamine Synthetase. *Plant Physiol.*, 108, 1109-1117.
- Tso, T.C., Kasperbauer, M.J. y Sorokin, T.P. (1970).** Effect of Photoperiod and End-of-Day Light Quality on Alkaloids and Phenolic Compounds of Tobacco. *Plant Physiol.*, 45, 330-333 .
- Tohge, T., Watanabe, M., Hoefgen, R. y Femie A.R. (2013).** Shikimate and phenylalanine biosynthesis in the green lineage. *Front. Plant Sci.*, 4, 1-13.
- Tolbert, N.E. (1973).** Activation of Polyphenol Oxidase of Chloroplasts. *Plant Physiol.*, 51, 234-244.
- Unni, L., Leydecker, M.T., Quilleré, I., Meyer, C. y Lillo, C. (2006).** Posttranslational Regulation of Nitrate Reductase Strongly Affects the Levels of Free Amino Acids and Nitrate, whereas Transcriptional Regulation Has Only Minor Influence. *Plant Physiol.*, 40, 1085-1094.
- Valverde, C. y Wall, L. (2003).** Ammonium assimilation in roots nodules of actinorhizal *Discaria trinervis*: Regulation of enzyme activities and protein levels by the availability of macronutrients (N, P y C). *Plant and Soil*, 254, 139-153.
- Vámos-Vigyázó, L. (1995).** Prevention of enzymatic browning in fruits and vegetables. In C. Y. Lee, & J. R. Whitaker (Eds.), *Enzymatic browning and its prevention* (pp. 49-62). Washington: American Chemical Society
- Van Oijen, M. Y Levy, P. (2004).** Nitrogen metabolism and plant adaptation to the environment-the scope for process-based modelling. En: Amancio A y Stulen I (eds.) *Nitrogen acquisition and assimilation in higher plants* (133-147), Kluwer academic Publishers.
- Voll, L.M., Allaire, E.E., Fiene, G. y Weber, A.P. (2004).** The Arabidopsis phenylalanine insensitive growth Mutant Exhibits a Deregulated Amino Acid Metabolism. *Plant Physiol.*, 136(2), 3058-3069.
- Vranová, E., Inzé, D. y Van Breusegen, F. (2002).** Reactive oxygen gene network of plants. *J. Exper. Bot.*, 53 (372), 227-1236.
- Wickert, E., Marcondes, J., Lemos, M. y Lemos, E. 2007.** Nitrogen assimilation in Citrus based on CitEST data mining. *Genet. Molec. Biol.*, 30(3), 810-818.
- Walker, J.R.L. (1995).** Enzymatic browning in fruits. En: Lee, C.Y. y Whitaker, J.R. (Eds.). *Enzymatic browning and its prevention* (pp. 8-22). Washington: American Chemical Society
- Whitaker, J.R. y Lee, C.Y. (1995).** Recent advances in chemistry of enzymatic browning: an overview (pp 2-7). Lee, C.Y. y Whitaker, J.R. (Eds.). *Enzymatic browning and its prevention*. Washington: American Chemical Society.



- Wichers, H.J., Recourt, K., Hendriks, M., Ebbelaar, C.E., Biancome, G., Hoerberichts, F.A., Mooibroek, H. y Soler-Rivas, C. (2003).** Cloning, expression and characterisation of two tyrosinase cDNA from *Agaricus bisporus*. *Appl. Microbiol. Biotech.*, 61, 336-341.
- Williams, L.E. y Miller, A.J. (2001).** Transporters responsible for the uptake and partitioning of nitrogenous solutes. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 52, 659-658.
- Wink, M. y Witte, L. (1984).** Turnover and transport of quinolizidine alkaloids. Diurnal fluctuations of lupanine in the phloem sap, leaves and fruits of *Lupinus albus* L. *Planta*, 161, 519-524.
- Wink, M. y Hartmann, T. (1982).** Diurnal fluctuation of quinolizidine alkaloids accumulation in legume plants and photomixotrophic cell suspension cultures. *Z. Naturforsch.*, 37c, 369-375.
- Winterstein, E. y Trier, G. (1910).** Die Alkaloide. En: Herzog, R.O. (ed). Eine Monographie der natürlichen basen (pp. 340). Verlag von Gebrüder Borntraeger.
- Wirén, N., Gazzarrini, S. y Frommer, W. (1997).** Regulation of mineral nitrogen uptake in plants. *Plant and Soil*, 196, 191-199.
- Wirén, N., Gazzarrini, S., Gojon, A. y Frommer, W.B. (2000).** The molecular physiology of ammonium uptake and retrieval. *Curr. Op. Plant Biol.*, 3, 254-261.
- Yamada, T., Matsuda, F., Kasai, K., Fukoka, S., Kitamura, K., Tozawa, Y., Miyagawa, H. y Wakasa, K. (2008).** Mutation of a Rice Gene Encoding a Phenylalanine Biosynthetic Enzyme Results in Accumulation of Phenylalanine and Tryptophan. *Plant Cell*, 20(5), 1316-1329.
- Yadav, R.L., Mohan, R., Singh, R. y Verma, R.K. (1984).** The effect of application of nitrogen fertilizer on the growth of opium poppy in north central India. *J. Agric. Sci.*, 102, 361-366.
- Yang, X., Wang, X., Wei, M., Hikosaka, Sh. y Goto, E. (2011).** Changes of glutamine and asparagine content in cucumber seedlings in response to nitrate stress. *Int. J. Plant Prod.*, 5(1), 1735-8043.
- Zhonghua, T., Yanju, L., Xiaorui, G., y Yuangang, Z. (2011).** The combined effects of salinity and nitrogen forms on *Catharanthus roseus*: the role of internal ammonium and free amino acids during salt stress. *J. Plant Nut. Soil Sci.*, 174(1), 135-144.

## IX. ANEXOS

### Anexo 1

Cuadro I. Composición de la solución Murashige y Skoog (1962) modificada.

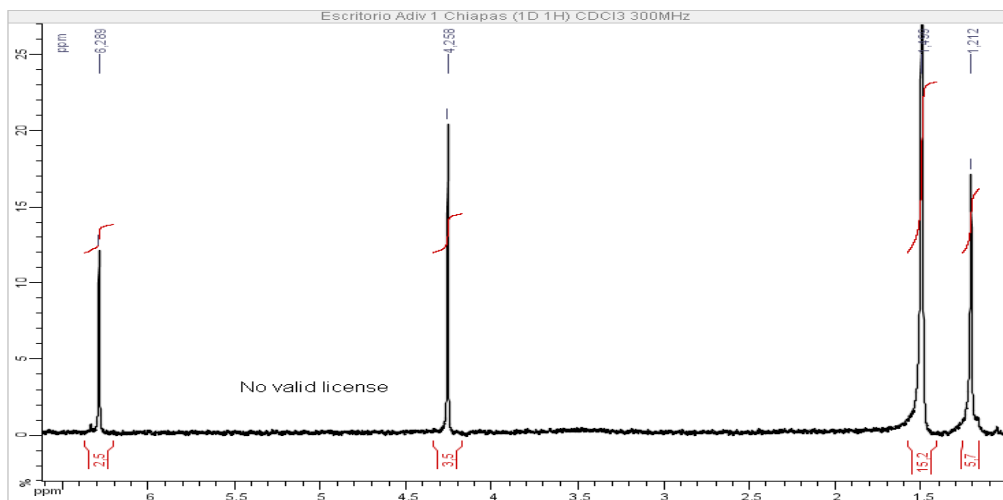
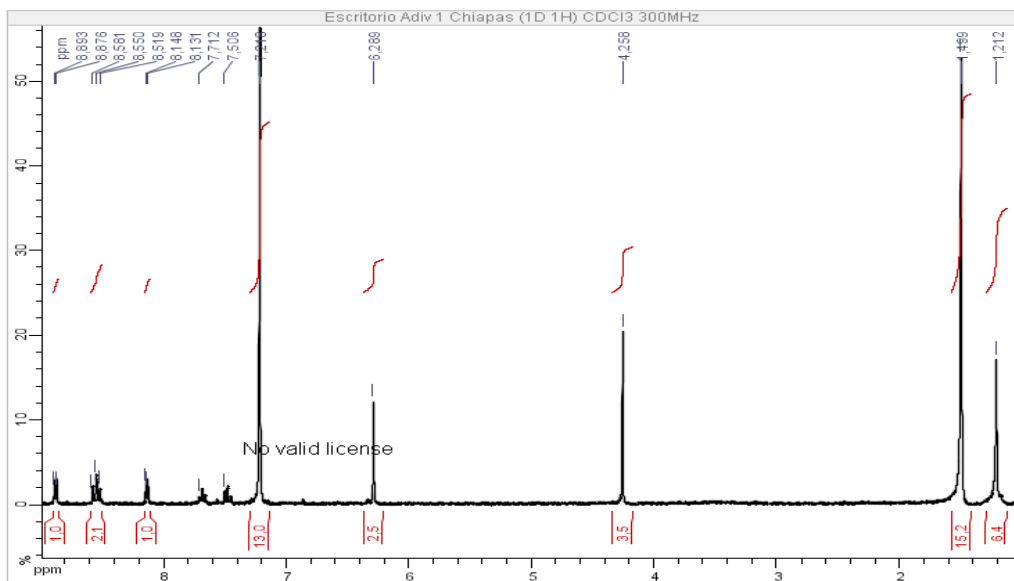
Tratamientos	60 mM N	45 mM N	30 mM N	015 mM N	0 de N
<i>Macroelementos (ppm)</i>					
<b>NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub></b>	1650	1224	816	408	0
<b>KNO<sub>3</sub></b>	1900	1457	971	486	0
<b>KOH</b>	0	245	515	783	1054
<b>CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O</b>	440	440	440	440	440
<b>MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O*</b>	370	370	370	370	370
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	170	170	170	170	170
<b>Na<sub>2</sub>EDTA</b>	37.3	37.3	37.3	37.3	37.3
<b>FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O</b>	27.8	27.8	27.8	27.8	27.8
<i>Microelementos (ppm)</i>					
<b>H<sub>3</sub>PO<sub>3</sub></b>	6.2	6.2	6.2	6.2	6.2
<b>MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O</b>	16.9	16.9	16.9	16.9	16.9
<b>ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O</b>	8.6	8.6	8.6	8.6	8.6
<b>KI</b>	0.83	0.83	0.83	0.83	0.83
<b>Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O</b>	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
<b>CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O</b>	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025
<b>CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O</b>	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025

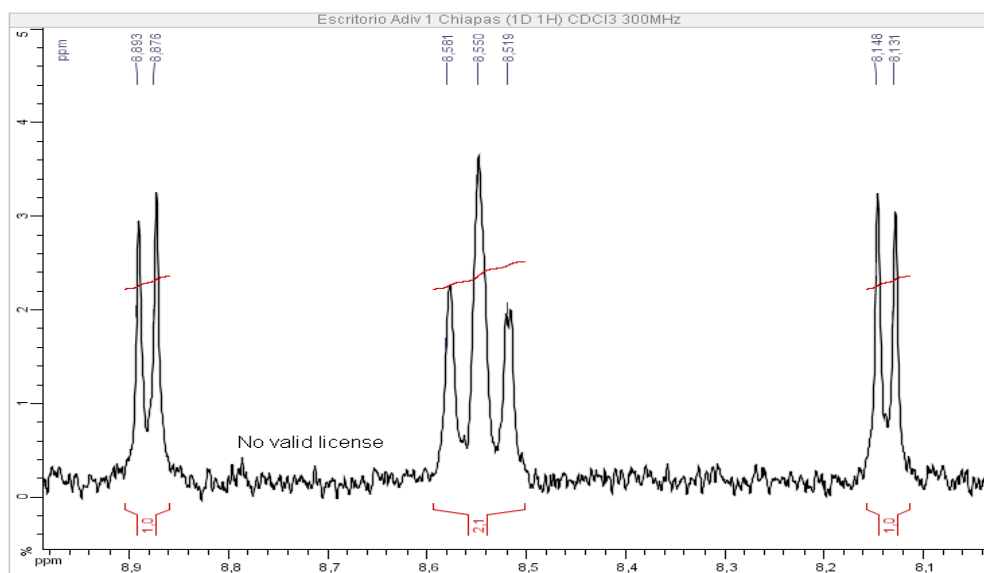
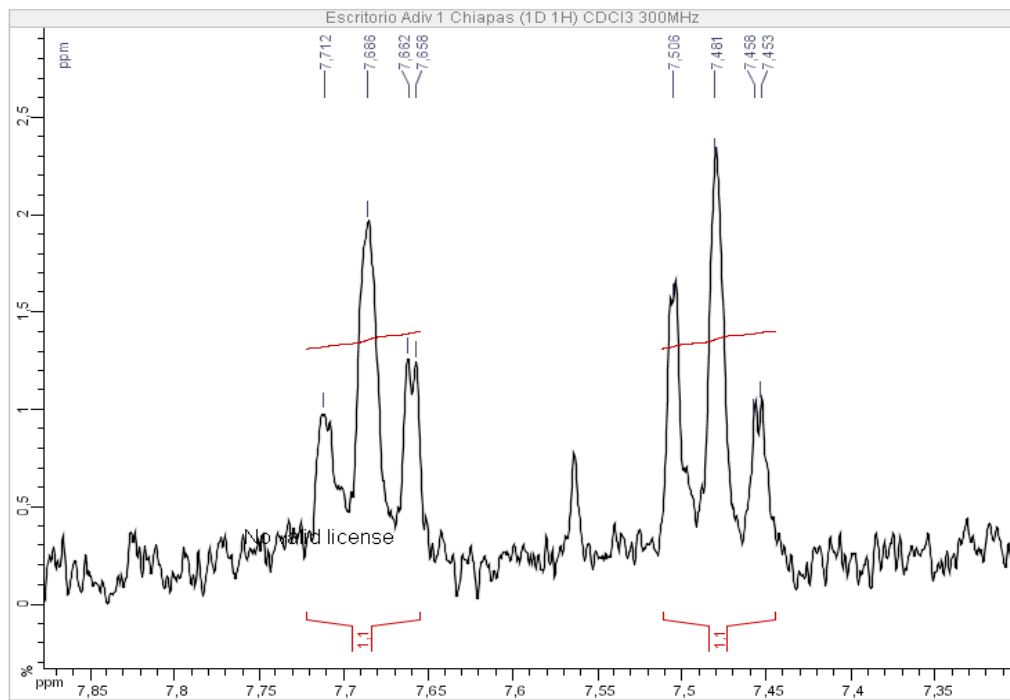
**Anexo 2****Cuadro II.** Composición de sales de la solución Murashige y Skoog (1962).

Sales	Tratamiento		
	60 Mm N	30 mMN	0 mMN
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	816	-
KNO <sub>3</sub>	1900	971	-
KOH	-	515	1054
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	440	440	440
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	370	370	370
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	170	170
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	27.8	27.8	27.8
Na.EDTA	37.3	37.3	37.3
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	16.9	16.9	16.9
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	8.6	8.6	8.6
KI	0.83	0.83	0.83
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.025	0.025	0.025
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.025	0.025	0.025
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2	6.2	6.2
NaMoO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0.25	0.25	0.25

### Anexo 3

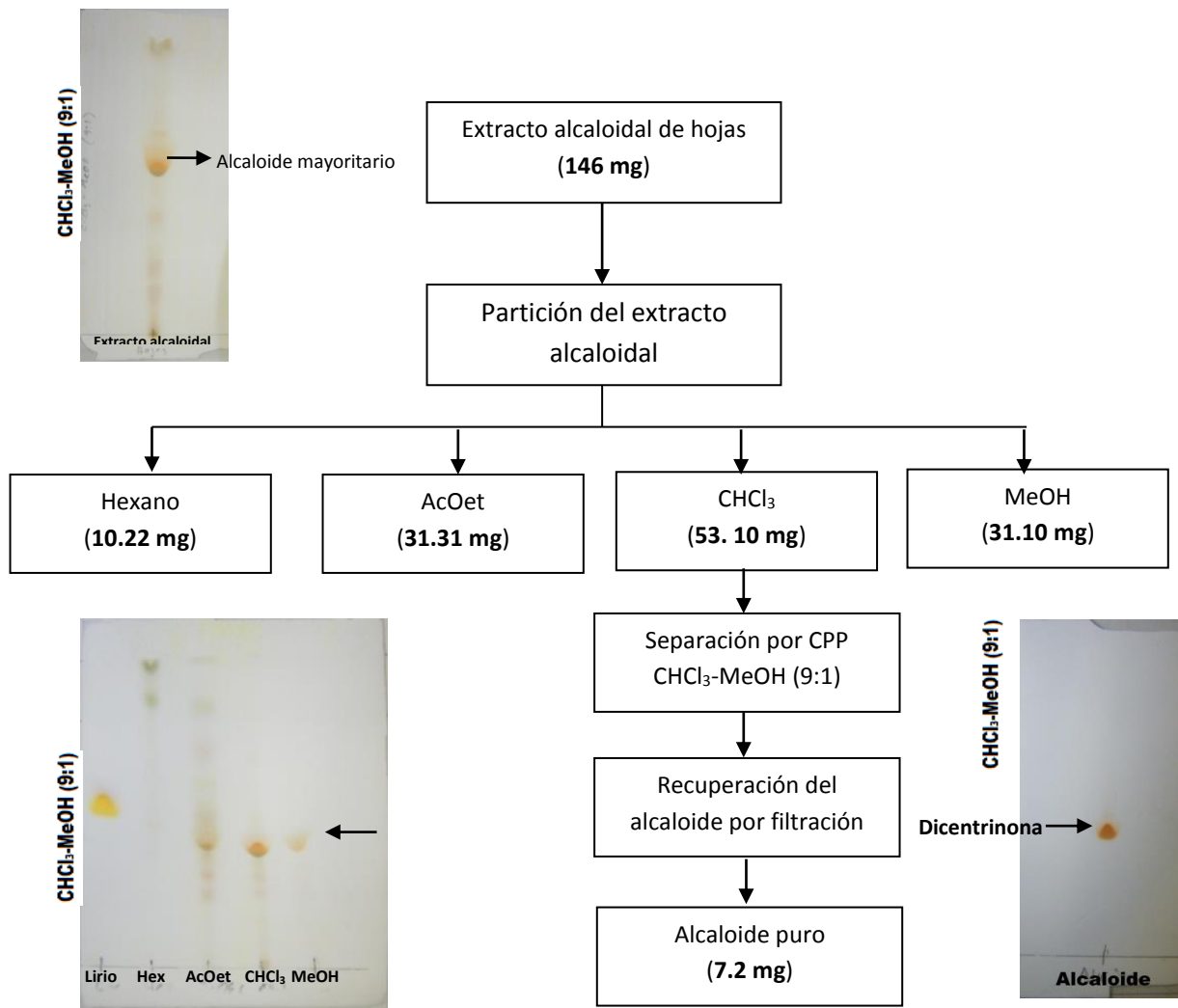
### Espectro de RMN $^1\text{H}$ de alcaloide atrospermidina



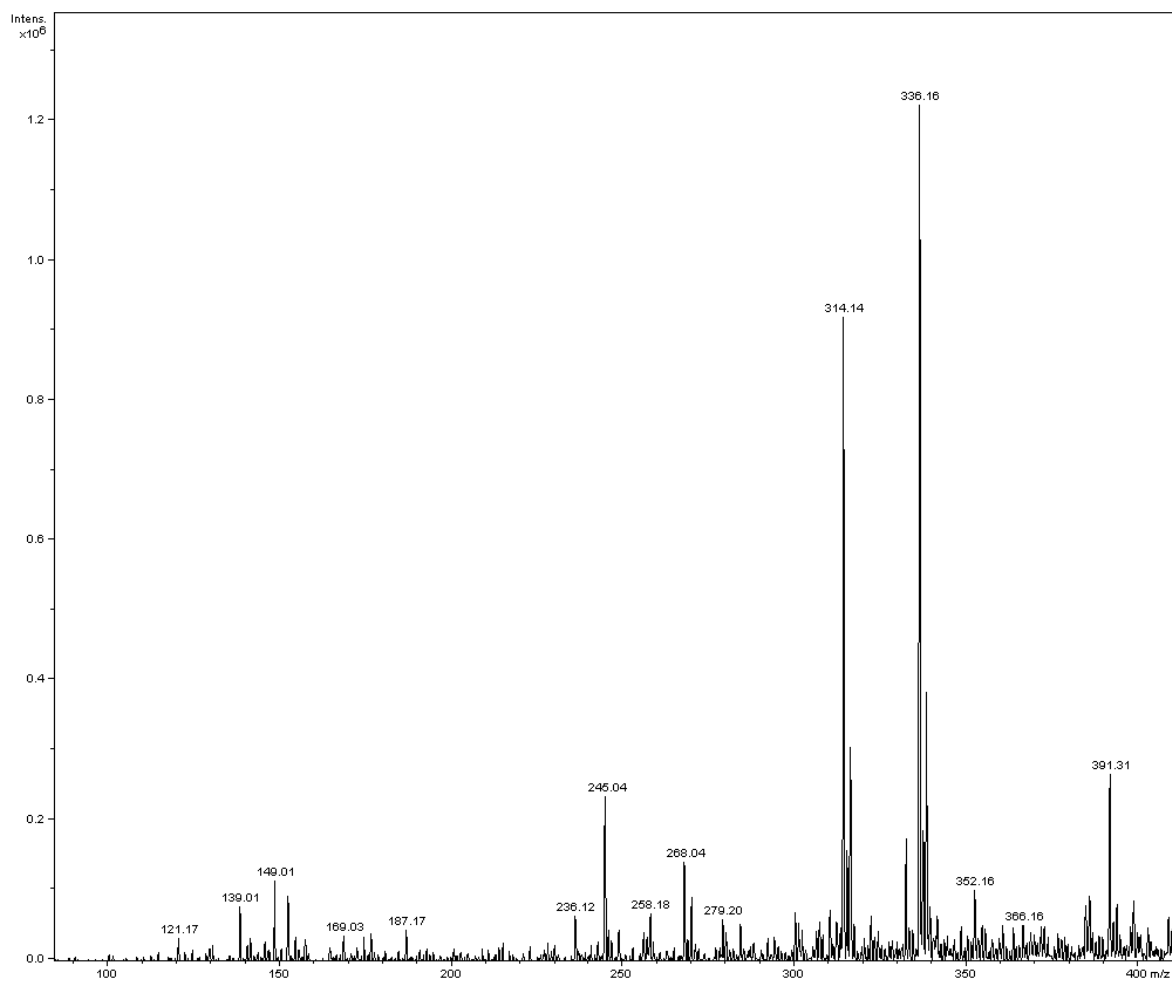


## Anexo 4

### Proceso de separación del alcaloide dicentrinona



**Diagrama 1.** Proceso de separación y purificación del alcaloide dicentrinona en hojas del ejemplar adulto.



**Figura 1.** Espectro de masas del alcaloide dicentrinona aislado de hojas de ejemplar adulto.

SHORT COMMUNICATION

## Aporphine alkaloid contents increase with moderate nitrogen supply in *Annona diversifolia* Saff. (Annonaceae) seedlings during diurnal periods

José Agustín Orozco-Castillo<sup>a,b</sup>, Rocío Cruz-Ortega<sup>c</sup>, Mariano Martínez-Vázquez<sup>d</sup> and Alma Rosa González-Esquinca<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Laboratorio de Fisiología y Química Vegetal, Instituto de Ciencias Biológicas, Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas, Tuxtla Gutiérrez, Mexico; <sup>b</sup>Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Coyoacán, Mexico; <sup>c</sup>Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, Delegación Coyoacán, Mexico; <sup>d</sup>Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Delegación Coyoacán, Mexico

Downloaded by [A.R. González-Esquinca] at 03:23 01 March 2016

**ABSTRACT**

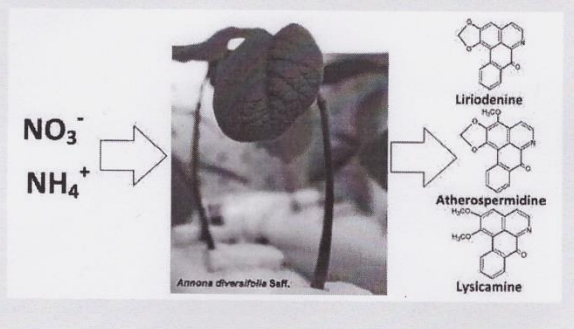
Aporphine alkaloids are secondary metabolites that are obtained in low levels from species of the Annonaceae family. Nitrogen addition may increase the alkaloid content in plants. However, previous studies published did not consider that nitrogen could change the alkaloid content throughout the day. We conducted this short-term study to determine the effects of nitrogen applied throughout the diurnal period on the aporphine alkaloids via measurements conducted on the roots, stems and leaves of *Annona diversifolia* seedlings. The 60-day-old seedlings were cultured with the addition of three levels of nitrogen (0, 30 and 60 mM), and alkaloid extracts were analysed using high-performance liquid chromatography. The highest total alkaloid content was measured in the treatment with moderate nitrogen supply. Further, the levels of aporphine alkaloids changed significantly in the first few hours of the diurnal period. We conclude that aporphine alkaloid content increased with moderate nitrogen supply and exhibited diurnal variation.


**ARTICLE HISTORY**


Received 2 April 2015  
 Accepted 26 December 2015

**KEYWORDS**

Liriodenine;  
 atherospermidine;  
 lysicamine; diurnal variation;  
 hydroponic



**CONTACT** Alma Rosa González-Esquinca  [aesquinca@unicach.mx](mailto:aesquinca@unicach.mx)

 Supplemental data for this article can be accessed at <http://dx.doi.org/10.1080/14786419.2016.1143826>.

© 2016 Taylor & Francis