

LACANDONIA

Revista de Ciencias de la UNICACH







Cymbopetalum mayanum Ver p.. 73



UNIVERSIDAD DE CIENCIAS
Y ARTES DE CHIAPAS

Directorio

Rector

Not. Adolfo Antonio Guerra Pérez

Secretario General

Lic. Juan José Solórzano Marcial

Abogado General

Lic. Luis Alfredo Sierra Sánchez

Secretario Académico

Dr. Ernesto Velázquez Velázquez

Directora de Investigación y Posgrado

Dra. María Adelina Schlie Guzmán

Editor responsable

Dr. Carlos Rommel Beutelspacher Baigts

Director de Extensión Universitaria

Lic. Rosemberg Maldonado Ortiz

Comité Editorial

BIOLOGÍA: Dr. Miguel Ángel Pérez-Farrera, Dr. Gustavo Rivera Velázquez y M. en C. Oscar Farrera Sarmiento

INGENIERÍA AMBIENTAL: Dr. Raúl González Herrera

INGENIERÍA TOPOGRÁFICA: Dr. Guillermo Ibáñez Duharte

NUTRICIÓN: Dra. Adriana Caballero Roque

PSICOLOGÍA: Dr. Germán Alejandro García Lara

Colaboradores

Adán Enrique Gómez- González, Adriana Caballero Roque, Alma Rosa González-Esquinca, Ana Guadalupe Rocha Loreda, Carlos Alberto Ríos-García, Carlos R. Beutelspacher, Carolina Orantes-García, Christian Anabí Riley-Saldaña, Claudia Azucena Durán-Ruiz, Cristian Tovilla-Hernández, David Alberto Muñoz Zetina, Denisse Bartolo Vicente, Dolores G. Vidal-López, Emilio I. Romero-Berry, Ernesto Velázquez-Velázquez, Florencia Ramos Vaquerizo, Fredi Eugenio Penagos García, Gabriela Palacios Pola, Gloria Angélica Hernández-González, Gustavo Rivera Velázquez, Hugo Alejandro Nájera Aguilar, Iván de Jesús Vázquez Montoya, Iván De-la-Cruz-Chacón, Javier Gutiérrez-Jiménez, Jesús Alberto Bautista Ramírez, José del Carmen Rejón-Orantes, Juan Carlos Torres-Guzmán, Juan C. De la Presa-Pérez, Lorena Mercedes Luna-Cázares, Manuel de Jesús Anzueto-Calvo, Marco Antonio Altamirano González-Ortega, Margarita E. Gallegos-Martínez, Marilyn Paola Ruíz Mondragón, María Adelina Schlie-Guzmán, María Teresa Dávila Esquivel, Mariela Moreno Aguilar, Marisol Castro-Moreno, Miguel Ángel Hernández-Espinosa, Miguel Ángel Peralta Meixueiro, Miguel de Jesús León Gómez, Miguel Pérez de la Mora, Nataly Jiménez-García, Nelsi Alejandra Burguete A., Oscar Farrera-Sarmiento, Patricia Ivett Meza Gordillo, Paulina Ayvar Ramos, Ramón Solano Barajas, Roberto García-Martínez, Roel Símuta Champo, Rolando Jiménez-Machorro, Rubén Antonio Moreno-Moreno, Rubén Fernando Gutiérrez Hernández, Salvador Santamaría-Damián, Samantha Stefany Coutiño-Ochoa, Selene Lucero Aguilar-Gordillo, Ulises Alberto Santiago-Vázquez, Zally Patricia Mandujano Trujillo.

Jefe de oficina editorial: Ricardo Garcías Robles

Diseño y formato: Salvador López Hernández

Diseño de portada: Manuel Cunjamá

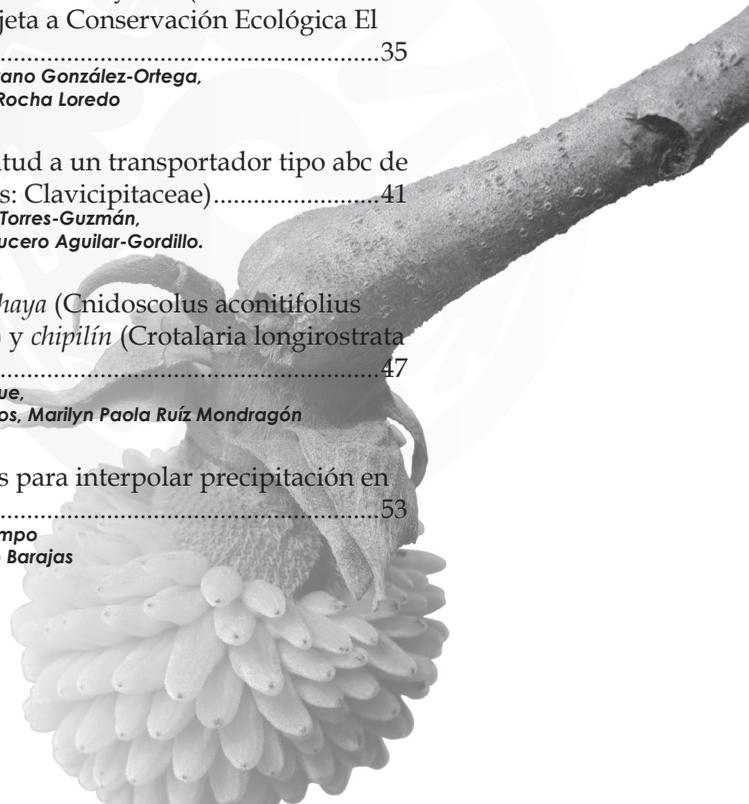
El contenido de los textos es responsabilidad de los autores.
Costo \$ 70.00 m.n.

Revista *Lacandonia*, año 10, vol. 10, núm. 2, julio-diciembre de 2016, es una publicación semestral editada por la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas a través de la Dirección de Extensión, edificio de Rectoría. 1a. Sur Poniente núm. 1460, C.P. 29000, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México. Tel. 01 (961) 61 7 04 00 extensión 4040, editorial@unicach.mx.

Editor responsable: Dr. Carlos Rommel Beutelspacher Baigts. Reserva de Derechos al Uso Exclusivo No. 04-2010-120712081500-102, ISSN: 2007-1000. Impresa por Talleres de Desarrollo Gráfico Editorial, S.A. de C.V. Municipio Libre 175, Nave Principal, col. Portales, Del. Benito Juárez, México D.F., C.P. 03300. Tel. (55) 5-605-81-75 este número se terminó de imprimir en diciembre de 2016 con un tiraje de 1,000 ejemplares.

Las opiniones expresadas por los autores no necesariamente reflejan la postura del editor de la publicación. Queda estrictamente prohibida la reproducción total o parcial de los contenidos e imágenes de la publicación sin previa autorización de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas.

Viabilidad y germinación de semillas de <i>Jopi</i> (<i>Ochroma pyramidale</i> (Cav. ex Lam.) Urb.) (Malvaceae)	7
<i>Carlos Alberto Ríos-García, Carolina Orantes-García, Rubén Antonio Moreno-Moreno, Oscar Farrera-Sarmiento</i>	
Redescubrimiento de <i>Gongora seideliana</i> Rchb.f. (Orchidaceae), una orquídea rara, en Chiapas, México	11
<i>Roberto García-Martínez, Rolando Jiménez-Machorro</i>	
Una nueva especie del género <i>Cranichis</i> Swartz (Orchidaceae: Cranichiinae) de Chiapas, México	15
<i>Carlos R. Beutelspacher Roberto García Martínez</i>	
Nuevos registros del mangle centroamericano <i>Avicennia bicolor</i> Standl. (Acanthaceae) en la costa pacífica del sureste mexicano con notas sobre su distribución y estatus de conservación	19
<i>Salvador Santamaría-Damián, Emilio I. Romero-Bermy, Cristian Tovilla-Hernández, Margarita E. Gallegos-Martínez, Juan C. De la Presa-Pérez</i>	
El género <i>Macrobrachium</i> (Decapoda: Palaemonidae) en la Reserva de la Biosfera “La Encrucijada”, Chiapas, México	25
<i>Gustavo Rivera Velázquez Miguel Ángel Peralta Meixueiro Fredí Eugenio Penagos García</i>	
Nuevos registros de peces en la presa Malpaso (Nezahualcóyotl) cuenca media del Grijalva, Chiapas, México	31
<i>Manuel de Jesús Anzueto-Calvo, Ernesto Velázquez-Velázquez, Miguel Ángel Peralta-Meixueiro, Adán Enrique Gómez-González y Gustavo Rivera Velázquez</i>	
Uso del espacio de la <i>chara verde</i> (<i>Cyanocorax yncas</i> (Boddaert, 1783, Aves, Corvidae) en la Zona Sujeta a Conservación Ecológica El Zapotal, Chiapas, México	35
<i>Mariela Moreno Aguilar, Marco Antonio Altamirano González-Ortega, David Alberto Muñoz Zetina y Ana Guadalupe Rocha Loredo</i>	
Caracterización de un gen con similitud a un transportador tipo abc de <i>Metarhizium anisopliae</i> (Hipocreales: Clavicipitaceae)	41
<i>Miguel Ángel Hernández-Espinosa, Juan Carlos Torres-Guzmán, Gloria Angélica Hernández-González, Selene Lucero Aguilar-Gordillo.</i>	
Evaluación de galletas con base en <i>chaya</i> (<i>Cnidoscolus aconitifolius</i> (Miller) I.M. Johnst., Euphorbiaceae) y <i>chipilín</i> (<i>Crotalaria longirostrata</i> Hook. & Arn., Fabaceae)	47
<i>Gabriela Palacios Pola, Adriana Caballero Roque, Patricia Ivett Meza Gordillo, Paulina Ayvar Ramos, Marilyn Paola Ruíz Mondragón</i>	
Análisis comparativo de los métodos para interpolar precipitación en el estado de Chiapas	53
<i>Miguel de Jesús León Gómez, Roel Símuta Champo Iván de Jesús Vázquez Montoya Ramón Solano Barajas</i>	



Proceso Fenton para lixiviados pretratados biológicamente.....	61
<i>Jesús Alberto Bautista Ramírez, Denisse Bartolo Vicente, Florencia Ramos Vaquerizo, Rubén Fernando Gutiérrez Hernández y Hugo Alejandro Nájera Aguilar</i>	
Annonaceae: relevancia biológica de sus atributos químicos	71
<i>Alma Rosa González Esquinca</i>	
La familia Annonaceae Juss. En México	73
<i>*Iván De-la-Cruz-Chacón, Marisol Castro-Moreno, Lorena Mercedes Luna-Cázares, Alma Rosa González-Esquinca</i>	
Desarrollo temprano y defensas químicas de <i>Annona macrophyllata</i> Donn. Smith. (Annonaceae).....	87
<i>Iván De-la-Cruz-Chacón</i>	
<i>Alma Rosa González-Esquinca</i>	
Inducción fúngica de defensas químicas en <i>Annona muricata</i> L. (Anonaceae)	99
<i>Christian Anabí Riley-Saldaña</i>	
<i>Alma Rosa González-Esquinca</i>	
El género <i>Bephratelloides</i> Girault (Insecta: Hymenoptera: Eurytomidae), parásitos de semillas de la familia Annonaceae Juss. ..	103
<i>Claudia Azucena Durán-Ruiz</i>	
<i>Alma Rosa González-Esquinca</i>	
Actividad inhibitoria de la liriodenina en la linea celular de adenocarcinoma de mama MCF-7	111
<i>María Adelina Schlie-Guzmán</i>	
<i>Nelsi Alejandra Bргуete A.</i>	
<i>Alma Rosa González-Esquinca</i>	
Efecto depresor del extracto alcaloidal de <i>Annona macrophyllata</i> Donn. Sm. (Annonaceae)	115
<i>José del Carmen Rejón-Orantes, Samantha Stefany Couñiño-Ochoa, Nataly Jiménez-García, Zally Patricia Mandujano Trujillo, María Teresa Dávila Esquivel, Dolores G. Vidal-López, Miguel Pérez de la Mora</i>	
Rolliniastatina-2, molécula aislada de <i>Annona macrophyllata</i> Donn. Sm. (Annonaceae) inhibe protoplastos de bacterias	123
<i>Lorena Mercedes Luna-Cazáres</i>	
<i>Alma Rosa González-Esquinca</i>	
Evaluación de extractos acuosos de <i>Annona lutescens</i> Safford (Annonaceae) contra <i>Escherichia coli</i> Escherich, 1885 (Enterobacteriaceae).....	129
<i>Javier Gutiérrez-Jiménez</i>	
<i>Ulises Alberto Santiago-Vázquez,</i>	
<i>Lorena Mercedes Luna-Cazáres</i>	



PRESENTACIÓN

Como lo mencionamos en el número anterior de LACANDONIA, este año conmemoramos 10 años de publicarse nuestra revista, y en este número se incluyen los siguientes artículos: “Viabilidad y germinación de semillas de *jopi* (*Ochroma pyramidale* (Cav. ex Lam.) Urb.) (Malvaceae)”, “Redescubrimiento de *Gongora seideliana* Rchb.f. (Orchidaceae), una orquídea rara, en Chiapas, México”, “Una nueva especie del género *Cranichis* Swartz (Orchidaceae: Cranichiinae) de Chiapas, México”, “Nuevos registros del mangle centroamericano *Avicennia bicolor* Standl. (Acanthaceae) en la costa pacífica del sureste mexicano con notas sobre su distribución y estatus de conservación”, “El género *Macrobrachium* (Decapoda: Palaemonidae) en la Reserva de la Biosfera “La Encrucijada”, Chiapas, México”, “Nuevos registros de peces en la presa Malpaso (Nezahualcóyotl) cuenca media del Grijalva, Chiapas, México”, “Uso del espacio de la *chara verde* (*Cyanocorax yncas* (Boddaert, 1783, Aves, Corvidae) en la Zona Sujeta a Conservación Ecológica El Zapotal, Chiapas, México”, “Caracterización de un gen con similitud a un transportador tipo abc de *Metarhizium anisopliae* (Hipopocreas: Clavicipitaceae)”, “Evaluación de galletas a base de *chaya* (*Cnidoscolus aconitifolius* (Miller) I.M. Johnst., Euphorbiaceae) y *chipilín* (*Crotalaria*

longirostrata Hook. & Arn., Fabaceae)” y finalmente “Análisis comparativo de los métodos para interpolar precipitación en el estado de Chiapas” y “Proceso Fenton para lixiviados pretratados biológicamente”.

Por otra parte, también se incluyen ocho artículos derivados del SIMPOSIO “ANNONACEAE: RELEVANCIA BIOLÓGICA DE SUS ATRIBUTOS QUÍMICOS”, de gran interés: “La familia Annonaceae Juss. en México”, “Desarrollo temprano y defensas químicas de *Annona macrophyllata* Donn. Sm.”, “Inducción fúngica de defensas químicas en *Annona muricata* L. (Annonaceae)”, “El género *Blephratelloides* Girault (Insecta: Hymenoptera: Eurytomidae), parásitos de semillas de la familia Annonaceae Juss.”, “Actividad inhibitoria de la liriodenina en la línea celular de adenocarcinoma de mama MCF-7”, “Efecto depresor del extracto alcaloidal de *Annona macrophyllata* Donn. Sm. (Annonaceae)”, “Rolliniastatina-2, molécula aislada de *Annona macrophyllata* Donn. Sm. (Annonaceae) inhibe protoplastos de bacterias”, y por último “Evaluación de extractos auosos de *Annona lutescens* Saff. (Annonaceae) contra *Escherichia coli* Escherich, 1885 (Enterobacteriaceae)”.

Carlos R. Beutelspacher

Viabilidad y germinación de semillas de *Jopi* (*Ochroma pyramidale* (Cav. ex Lam.) Urb.) (Malvaceae)

Carlos Alberto Ríos-García¹, Carolina Orantes-García^{1*},
Rubén Antonio Moreno-Moreno², Oscar Farrera-Sarmiento^{1,3}.

¹Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas, Instituto de Ciencias Biológicas, Libramiento Norte Poniente núm. 1150, colonia Lajas Maciel, Código Postal 29032, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México. | ²Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas, Facultad de Humanidades, Libramiento Norte Poniente núm. 1150, colonia Lajas Maciel, Código Postal 29032, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México. | ³Jardín botánico F. Miranda SEMAHN, Calzada de los Hombres Ilustres, Parque Madero, edificio Museo Botánico S/N, colonia Centro Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. *Autor de correspondencia: c_orantes@hotmail.com

RESUMEN

El *jopi* (*Ochroma pyramidale*) es una especie arbórea nativa de rápido crecimiento, con escasos estudios acerca de la fisiología de sus semillas, por lo que en el presente trabajo se estudió el efecto del almacenamiento sobre el tiempo de viabilidad (0, 3, 6, 9 y 12 meses) y el proceso germinativo (0, 6, 12 meses). Las semillas recién recolectadas presentaron 99% viabilidad y 97% de germinación final, lo cual descendió hasta 69% y 66% respectivamente. Por lo que es importante buscar alternativas de almacenamiento para la conservación y manejo de la especie.

PALABRAS CLAVE: Malvaceae, viabilidad, germinación, semillas.

ABSTRACT

The *jopi* (*Ochroma pyramidale*) is a native tree species of rapid growth, with few studies about of the physiology of their seeds, this study present the effect of storage on the time of viability (0, 3, 6, 9 and 12 months) and the germination process (0, 6, 12 months). Freshly harvested seeds had 99% and 97% viability final germination, which decreased to 69% and 66% respectively. So it is important to seek alternative storage for the conservation and management of the species.

KEYWORDS: Malvaceae, viability, germination, seeds.

INTRODUCCIÓN

La reproducción mediante semillas es importante debido a que aumenta la variabilidad genética, además de que desempeñan una función primordial para la regeneración y la sucesión ecológica (Vázquez-Yanes *et al.*, 1997). Las semillas son reservorios de material genético y constituyen la forma más importante de germoplasma vegetal (Hartmann y Kester, 2000), el conocimiento de su biología así como de sus patrones de germinación.

Entre los factores que influyen en la longevidad de la viabilidad de semillas, se citan el tiempo y condiciones de almacenamiento (Sánchez-Arellano *et al.*, 2011). La viabilidad de las semillas varía con los años, desde uno hasta más de 10, y no la pierden en forma repentina, sino que disminuye progresivamente a lo largo del tiempo y depende de las condiciones de almacenamiento (Valles, 2002).

Para conocer este valor de viabilidad, una de las pruebas bioquímicas utilizadas emplea la sal de tetrazolio (cloruro de 2, 3, 5, -trifenil-tetrazolio), que en los proce-

sos de reducción de las células vivas toma el hidrógeno liberado por las enzimas deshidrogenasas y forma una sustancia roja, estable y no difusible, el trifenil-formazan. Se establecen diferentes grados de tinción en regiones esenciales (radícula, plúmula, eje embrional y cotiledones, entre otros) y se relacionan con presencia o ausencia de germinación. La viabilidad expresa el potencial de una semilla para germinar (ISTA, 1999).

Ochroma pyramidale conocida comúnmente como *jopi*, *jonote real*, *balsa* y *corcho* en Chiapas y Tabasco; *pepe balsa* en Oaxaca y *pochote* o *cola de gato* en Veracruz (Rodríguez-Velázquez *et al.*, 2009), pertenece a la familia Malvaceae. Es una especie arbórea de rápido crecimiento con hoja perenne que puede alcanzar los 30 m de altura y 1,8 m de d.a.p. (diámetro altura de pecho). La corona es grande, ancho, difusión y escasamente ramificado; las ramitas son gruesas, hojas verde o marrón verdoso, lenticeladas, con un indumento ferruginoso, y que exudan una goma pegajosa. La corteza es lisa, un poco protuberante con cicatrices lineales, y de color grisáceo, pardo grisáceo

o marrón; que tiene pequeña lenticelas protuberantes. La corteza interior es fibrosa, de color blanco-amarillento, crema o rosáceo, volviéndose marrón rosáceo con la edad o cuando se expone al aire y la luz. Es un indicador de bosques secundarios, ya que se produce en los claros de los bosques. El fruto es una cápsula que contiene numerosas semillas (figura 1) (Pennington y Sarukhán, 2005). Esta especie es considerada multipropósito, con la madera se elaboran artesanías y juguetes, muy empleada en la construcción rural. Las fibras del fruto han sido

empleadas en relleno de almohadas, cojines, colchones, sofás, canoas, partes de aeroplanos, flotadores de redes y salvavidas. La madera extremadamente liviana (pesea menos que el corcho), es fuente de madera de “balsa”. Por su rápido crecimiento y condiciones en las que crece, resulta un recurso maderable susceptible de explotación inmediata (Conabio, 2012).

El objetivo de la presente investigación fue determinar el efecto que tiene el almacenamiento de semillas sobre la viabilidad y el proceso germinativo.



FIGURA 1

A). El fruto es una cápsula dehiscente que abre en cinco valvas, mide desde 10 cm hasta 20 cm de largo por 2.5 cm de ancho, al madurar se recubre de numerosos vellos sedosos de color café claro. **B).** Las semillas son de forma ovoide y color café oscuro de aproximadamente 0.5 cm de largo, se encuentran inmersas en filamentos fibrosos dentro del fruto, que al abrirse permite que las semillas floten y se dispersen por el viento.

METODOLOGÍA

El estudio se realizó en el periodo de 12 meses, de 2013-2014 en las instalaciones del Banco de germoplasma vegetal del ICBiol-UNICACH. Las semillas fueron recolectadas en el municipio de Pichucalco, Chiapas.

Pruebas de viabilidad. Esta prueba se realizó de acuerdo con la Regla Internacional de Pruebas de Semilla (International Seed Testing Association, ISTA, 1999). Se determinó cada 0, 3, 6, 9, 12 meses de almacenamiento. Se utilizó un diseño completamente al azar con tres repeticiones con 100 semillas cada una. Las semillas se remojaron durante 24 horas para facilitar un corte longitudinal en la testa y separar los cotiledones, a los cuales se les aplicaron tres gotas de la solución de tinción de tetrazolium (0.5% cloruro 2,3,5 trifenil-2H tetrazolio) permaneciendo durante 24 horas en cajas Petri, a temperatura ambiente. Se consideraron viables las semillas que se tiñeron de rojo, se determinó el porcentaje de viabilidad.

Prueba de germinación. Esta prueba fue realizada durante periodos de almacenamiento (0, 6 y 12 meses). Se aplicó un diseño completamente al azar con tres repeticiones de

50 semillas en cada una. No se aplicó ningún tratamiento. Las semillas se sembraron en charolas de germinación tipo forestal con un sustrato de polvillo de coco y agrolita 1:2. El riego de agua fue cada tres días a capacidad de campo, el registro de datos se realizó cada tres días durante 60 días. Se consideraron germinadas las semillas cuando presentaron emergencia de la radícula (Hartmann y Kester, 2000).

Análisis estadístico. En ambas pruebas se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) (Montgomery, 2002). Se compararon las medias mediante la prueba de Tukey ($P < 0,05$). Los análisis estadísticos se realizaron en el paquete Statgraphic Centurion®.

RESULTADOS

Se encontraron diferencias altamente significativas entre los tiempos de almacenamiento ($p < 0.0001$), lo cual confirma que el periodo de almacenamiento provocó una disminución en la viabilidad de las semillas (figura 1), las diferencias entre los porcentajes de germinación en cada mes se muestran en el cuadro 1, de acuerdo con Bidwell

(2000) el envejecimiento es un factor que generalmente disminuye la viabilidad en las semillas, y es de suma importancia conocer esta viabilidad para determinar el periodo de tiempo en el que conservan su capacidad para germinar y así lograr una propagación exitosa (Hartmann y Kester, 2000), muchas especies importantes de árboles tropicales y subtropicales producen semillas que no sobreviven la desecación ni toleran temperaturas bajas, lo cual puede deberse al proceso de almacenamiento a los cuales son sometidos o al tipo de testa (Kameswara-Rao *et al.*, 2007)

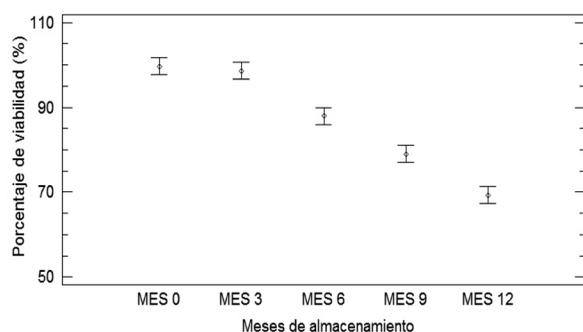


FIGURA 2

Viabilidad de semillas de *Ochroma pyramidale* a lo largo de un periodo de almacenamiento de 12 meses. Los datos corresponden a promedios y las barras a error estándar.

Tiempo de almacenamiento	<i>O. pyramidale</i>
0	99.67A
3	98.67A
6	88B
9	79C
12	69.33D

CUADRO 1

Prueba de Tukey, se muestra la heterogeneidad de los datos por meses de almacenamiento en semillas de *Ochroma pyramidale* sometidas a la prueba de viabilidad.

El análisis de varianza de la germinación acumulada mostró diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.0001$) (figura 2), lo que indica que el tiempo de almacenamiento afecta el porcentaje de germinación en semillas de jopi (cuadro 2), esto porque el deterioro de la semilla por la pérdida de la viabilidad y el vigor se refleja en una menor germinación (González y Mendoza, 1993), debido al tiempo en el que son almacenadas ya que la pérdida de la calidad es un proceso

irreversible que comienza desde el momento mismo de la cosecha (Takayanagi, 1973) por lo que el tiempo en el que son expuestas las semillas juega un papel importante sobre la viabilidad y germinación de semillas. *Ochroma pyramidale* presenta una germinación desde 8 hasta 54 días posteriores a la siembra (figura 3). El porcentaje de germinación varía de 60 a 84%, según la calidad de la semilla y se inicia ocho días después de la siembra (Rojas-Rodríguez y Torres-Córdoba, 2009; Román-Dañobeytia *et al.*, 2005), en este estudio, esos valores se encontraron muy cercanos a los obtenidos.

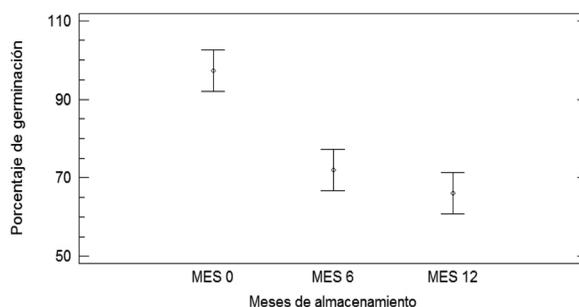


FIGURA 3

Porcentaje de germinación final de semillas de *Ochroma pyramidale* a diversos tiempos de almacenamiento. Los datos corresponden a promedios y las barras a error estándar.

Tiempo de almacenamiento	<i>O. pyramidale</i>
0	97.33A
6	72B
12	66B

FIGURA 4

Germinación acumulada de semillas de jopi (*O. pyramidale*). Se observa que el mayor número de semillas germinadas, se presentó a los 0 meses de almacenamiento, mientras que en los 6 y 12 meses se inicia la germinación de una manera exponencial, alcanzando una asintota, siendo una menor a la otra.

CONCLUSIONES

Se determinó que el almacenamiento juega un papel importante sobre la viabilidad y la germinación en las semillas de jopi (*Ochroma pyramidale*), mostrando una pérdida porcentual en ambos atributos conforme avanza el tiempo, por lo que es importante establecer métodos para la conservación ya que es una especie con potencial para reforestación productiva en zonas degradadas de selva.

LITERATURA CITADA

- BIDWELL, R.G.S., 2000. *Fisiología vegetal*. AGT Editores, S.A. México, DF. 784 p.
- COMISIÓN NACIONAL PARA EL CONOCIMIENTO Y USO DE LA BIODIVERSIDAD (CONABIO). 2012. *Ochroma pyramidale*. México. Consultado: 11/Abril/2016. En: http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles/doctos/15bomba6m.pdf
- GONZÁLEZ, Y. y F. MENDOZA, 1993. Efecto de diferentes tratamientos sobre la germinación de *Andropogon gayanus* cv. CIAT-621. *Pastos y Forrajes*. 16: 45 p.
- HARTMANN H.T. Y D.A. KESTER, 2000. *Propagación de plantas*. Compañía editorial Continental. 3ra edición. México. 758 p.
- ISTA (INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION), 1999. *Reglas internacionales para ensayos de semillas. Ensayo topográfico al Tetrazolío*. Secretaría de Estado de Agricultura y Ganadería. España. En: <https://www.seedtest.org/en/home.html>
- KAMESWARA-RAO, N., J. HANSON, M. EHSAN-DULLOO, K. GHOSH, D. NOWELLY Y M. LARINDE, 2007. *Manual para el manejo de semillas en bancos de germoplasma*. Manuales para bancos de germoplasma. 8. Biodiversity international. 165 p.
- MONTGOMERY, D.C., 1976. *Design and Analysis of Experiments*. John Wiley and Sons. USA. 418 p.
- PENNINGTON, T.D., Y J. SARUKHÁN, 2005. *Árboles tropicales de México*. Manual para la identificación de las principales especies. 3ª Edición. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. México. 413 p.
- RODRÍGUEZ-VELÁZQUEZ, J., P. SINACA-COLLIN Y G. JAMANGAPÉ-GARCÍA, 2009. *Frutos y árboles tropicales de México*. SEMARNAT-INE. México. 119 p.
- ROJAS-RODRÍGUEZ, F. Y G. TORRES-CÓRDOBA, 2009. Árboles del Valle Central de Costa Rica: reproducción Balsa. *Revista Forestal Mesoamericana Kurú* 6 (17): 64-66.
- ROMÁN-DAÑOBEYTIA, F.J., S.I. LEVY-TACHER Y J.R. AGUIRRE-RIVERA, 2005. *Árboles de la Selva Lacandona útiles para la restauración ecológica*. CONAFOR. México. 89 p.
- SÁNCHEZ-ARELLANO, J.G., M.A. PARRA-GALINDO, M.F. SILVAS-OLIVAS Y D. PEDROZA-PÉREZ, 2011. Efecto de la temperatura y tiempo de almacenamiento sobre la viabilidad en semillas de zámota (*Coursetia glandulosa* Gray). *BIOtecnica* 13 (3): 36-40.
- TAKAYANAOKI, K., 1973. Seed storage and longevity. Department of Genetic and Physiology National Institute of Agricultural Science, Japan. *Extensión Bulletin*. No. 36: 22 p.
- VALLES, J.M., 2002. Conservación de Semillas. Horturba, www.horturba.com/castellano.
- VÁZQUEZ-YANES, C., A. OROZCO-SEGOVIA, M. ROJAS-ARÉCHIGA Y V. CERVANTES, 1997. *La reproducción de las plantas: semillas y meristemas*. México. Fondo de Cultura Económica. 167 p.

Redescubrimiento de *Gongora seideliana* Rchb.f. (Orchidaceae), una orquídea rara, en Chiapas, México

Roberto García-Martínez¹, Rolando Jiménez-Machorro²

¹Instituto de Ciencias Biológicas, Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. Libramiento Norte Poniente 1150, Tuxtla Gutiérrez Chiapas. | ²Herbario AMO, Montañas Calizas 490, Lomas de Chapultepec, C.P. 11000 México D.F. robertogama93@hotmail.com

RESUMEN

Dentro de una serie de prospecciones en campo, se recolectó y herborizó un ejemplar de *Gongora* Ruíz y Pavón, concluyendo que se trata de un nuevo registro de *Gongora seideliana* Rchb.f. para el estado de Chiapas y para México, a 164 años de que Gustav Reichenbach la describiera con localidad exacta desconocida. Se realizó una redesccripción basada en el ejemplar recolectado y una ilustración científica que complementa la información hasta ahora escasa; y se discuten las similitudes con *Gongora truncata* Lindl., especie mexicana con la que se está relacionada morfológicamente.

Palabras clave: *Gongora*, redescubrimiento, descripción, Chiapas, México.

Abstract

Into a serie of field trips, we collected and processed a plant of *Gongora* Ruíz y Pavón, concluding that this is a new record of *Gongora seideliana* Rchb.f. for the state of Chiapas and Mexico, later Gustav Reichenbach described it 164 years ago with unknown location. We made a redescription based on the collected specimen and a scientific illustration that supplements the limited information; and it's discussed similarities with the nearly-closed related orchid *Gongora truncata*.

Keywords: *Gongora*, rediscovered, description, orchid, Chiapas.

INTRODUCCIÓN

El género *Gongora* Ruíz y Pavón (*Epidendroideae Cymbidiae*) comprende 60 especies las cuales se distribuyen desde México y Centro América hasta Bolivia y el sureste de Brasil, encontrándose también en Trinidad y Tobago (Guerlach en Pridgeon *et al.*, 2009). Se puede definir como un grupo de orquídeas herbáceas, epífitas, de pseudobulbos bifoliados (excepto *G. sanderiana* que es unifoliada), hojas plicadas, alargadas, elíptico-lanceoladas y cortamente pecioladas en la mayoría. La inflorescencia péndula (excepto en *G. erecta* Whitten & D.E.Behn en la que es erecta) y con un raquis en ocasiones anguloso con vainas papiráceas, sépalos libres y pétalos parcialmente fusionados a la columna. El género se divide en tres subgéneros: *Acroptera*, *Gongora* y *Portentosa* (Guerlach en Pridgeon *et al.*, 2009).

En México, se han registrado ocho especies: *Gongora aromatica* Rchb.f., *G. cassidea* Rchb.f., *G. galeata* (Lindl.) Rchb.f., *G. galeottiana* Rich. & Galeotti, *G. leucochila* Lem., *G. tridentata* Whitten, *G. unicolor* Schltr. y *G.*

truncata Lindl. (Soto Arenas *et al.*, 2007). En Chiapas se distribuyen todas estas especies a excepción de *G. galeottiana*, que se distribuye en la vertiente del Pacífico desde Nayarit hasta Oaxaca (Beutelspacher-Baigts, 2013).

Dentro de una prospección realizada el 18 de julio del 2014, se recolectó una planta con características de *Gongora*, con inflorescencias inmaduras. Una vez que estas abrieron, el espécimen se identificó erróneamente como *G. truncata* Lindl, sin embargo, presentaba diferencias en la forma del hipoquilo y coloración, por lo cual se identificó nuevamente como *G. seideliana* Rchb.f.

Gongora seideliana fue descrita por primera vez por G. Reichebach en 1852 de una planta que recibió de la colección de T.J. Seidel, y la cual depositó en su colección; sin embargo, no había datos acerca de la localidad ni el país de origen (Jenny, 1993). Fue en 1993 que R. Jenny la registró para México mencionando tres especímenes en el herbario de Ginebra (G) aparte del tipo en el herbario de Reichenbach en Viena (W). R. Jenny obtuvo una planta presuntamente proveniente de Chiapas, México

sin datos de localidad que le floreció y pudo fotografiar y hacer un ejemplar de herbario, mientras que en 1992, Dodson la citaría en *Checklist of the Orchids of the Western Hemisphere* un ejemplar para Colombia (¹). Sin embargo, en México siempre quedó la duda si realmente existía en el país porque nunca había sido vista ni recolectada por orquideólogos mexicanos. Williams en 1951 la colocó con duda bajo la sinonimia de *Gongora truncata* y Soto Arenas *et al.*, (2007), menciona que no existían, hasta ese entonces, registros que avalaran su presencia en México.

Gongora seideliana Rchb.f., Bot. Zeit. 10: 637 (1852)

Hierba rupícola, hasta de 57 cm de alto. Raíces delgadas, blanquecinas, 2 mm de grosor, pseudobulbos cónico-ovoides, surcados, surcos no angulares, bifoliados, cubiertos en la base por vainas escarioso-fibrosas, hasta de 6.4 centímetros de alto y 2.5 cm de ancho. Hojas apicales, erectas, plicadas, angostamente elípticas a venaseoladas, atenuadas en la base, acuminadas, con tres venas principales prominentes en el envés y dos secundarias a cada lado, hasta de 20 cm de largo y 5 cm de ancho, peciolo acanalado, 10.8-13.2 cm de largo. Inflorescencia basal, arqueado péndula, laxa, hasta de 30 cm de largo, con 8-12 flores, pedúnculo cilíndrico, con cuatro brácteas tubulares, agudas, escariosas, raquis del racimo en zig-zag. Brácteas florales lanceoladas, agudas, escariosas, de largo.

Flores vistosas, no resupinadas, los sépalos y pétalos amarillos con manchas pardas numerosas y finas, labelo amarillo huevo, con manchas pardas en su interior, con la punta del epiquilo manchado de color pardo. Ovario pedicelado, descendente y luego arqueado, incurvado, 5-6 cm de largo, 0.2-0.3 cm de ancho. Sépalo dorsal extendido, cóncavo, elíptico-ovado, redondeado, cortamente apiculado, ligeramente recurvado, apuntado hacia abajo, 7-nervado, 2.1-2.6 cm de largo y 1.2 cm cuando se despliega. Sépalos laterales extendidos, con los lados revolutos, ampliamente ovados, oblicuos, ligeramene falcados, agudos, 7-nervados con venas secundarias a los lados de la central, 2.2-2.3 cm de largo y 1.3-1.4 cm de ancho. Pétalos unidos a la columna por dos tercios de su longitud, libres en el resto, oblicuos, sigmoides, ampliamente triangulares, acuminados, 5-nervados, 0.5-0.7 mm de largo, 0.5 mm de ancho. Labelo soldado al pie de columna, carnoso, brillante, con textura cerosa, cóncavo-cymbiforme, lateralmente comprimido, complejo, dividido en hipoquilo y epiquilo, 1.5 cm de largo y 0.7 cm en su punto más angosto, el hipoquilo con una uña larga, de XXX? de largo, con un pequeño callo transversal. La lámina conduplicada, casi cuadrada cuando se le mira por la parte externa, ancho en la base formando dos lóbulos y angosto cerca del epiquilo, con dos pequeños lóbulos uncinados, retrorsos en la parte

superior, en la parte exterior e inferior cerca del epiquilo formando un lóbulo triangular, romo, que apunta hacia adelante, formando una costilla que va a dar directamente a los lóbulos uncinados; el epiquilo separado del hipoquilo por un tabique en cuyo ápice forma un pequeño lóbulo triangular retrorso, el epiquilo cimbiforme, con el ápice recurvado y agudo. Columna ligeramente arqueada, con alas triangulares, perpendiculares al eje de la columna, 2 cm de largo y 0.2 cm de ancho, con dos lóbulos a ambos lados de la antera; pie de columna plano, dilatado, de 6 mm de largo; clinandrio semicircular, cóncavo. Antera semi-elipsoide, unilocular, 3 mm de largo x de 2.4 mm ancho. Polinario de ca. 4 mm de largo, con dos polinias angostamente elipsoides, dorsiventralmente comprimidas, sulcadas en el margen externo, unidas por pequeñas caudículas translúcidas a un estípite redondeado. Rostelo triangular-linguiforme, corto, 1-1.4 mm de largo. Cavidad estigmática apenas una ranura transversal, debajo del rostelo. Cápsula no vista.

Ejemplares examinados.- Predio Tierra Caliente, municipio de San Fernando, Chiapas. Depresión Central de Chiapas. Bosque Tropical Subcaducifolio. García-Martínez Roberto 018 (AMO) y García-Martínez Roberto 019 (HEM).

Gongora seideliana. Está cercanamente relacionada con *G. truncata*, al punto que las dos plantas son a simple vista casi iguales. Sin embargo, la diferencia clave se encuentra en el labelo; *G. truncata* posee dos filamentos retrorsos alargados que salen de la parte media del hipoquilo, y dos protuberancias redondeadas en la base de este; en *G. seideliana*, estos dos filamentos se encuentran cerca de la base y las costillas son prácticamente inexistentes; el ovario de *G. seideliana* es alargado e incurvado, y en *G. truncata* este es más corto y no llega a ser incurvado. También hay diferencias en la coloración de las flores; en *G. truncata* los sépalos y pétalos son blanco o blanco-amarillentos con escasas manchas rojizas, mientras que en *G. seideliana* son amarillos con manchas pardas; el labelo en *G. truncata* es blanco a blanco marfil y *G. seideliana* es amarillo huevo.

El redescubrimiento de esta especie es esperanzador, pues significa que aún pueden existir otros ejemplares en ambientes similares, que de encontrarlos se complementaría la información sobre su fenología y relación con sus polinizadores. Debido a la escasa presencia de la especie en el sitio de colecta y que no se encuentra dentro de ninguna categoría de riesgo por su aparente ausencia en el territorio mexicano, se sugieren estudios que apoyen la conservación y propagación de la especie, la cual, como muchas otras, es vulnerable a la fragmentación de su hábitat debido al manejo del paisaje con fines agropecuarios.

AGRADECIMIENTO

El primer autor agradece la valiosa ayuda de la M. en C. Nayely Martínez Meléndez por sus sugerencias en la elaboración de esta nota, y al señor Jorge Gutiérrez por la accesibilidad otorgada para guiarnos en campo.

LITERATURA CITADA

BEUTELSPACHER-BAIGTS, C.R., 2013. *Guía de orquídeas de Chiapas*. 2ª edición del autor y la Asociación Mexicana de Orquideología. Tuxtla Gutiérrez, México.

JENNY, R., 1993. *Monograph of genus Gongora Ruiz & Pavon*. Koeltz Scientific Books 136 p.

PRIDGEON, A. M., CRIBB, P.J., CHASE, M.W., RASMUSSEN, F.N. 2009. *Genera Orchidacearum: 5: Epidendroideae (Part Two)*. Oxford University Press. Oxford, New York. 585 p.

SOTO-ARENAS, M.A., E. HÁGSATER, R. JIMÉNEZ-MACHORRO, G.A. SALAZAR-CHÁVEZ, R. SOLANO-GÓMEZ, R. FLORES-GONZÁLEZ E I. RUÍZ-CONTRERAS, 2007. *Catálogo digital de las orquídeas de México*. Instituto Chinoín (Herbario AMO).

Link consultado:

¹Missouri Botanical Garden. © 2015. Disponible en: <http://www.tropicos.org>

APÉNDICE

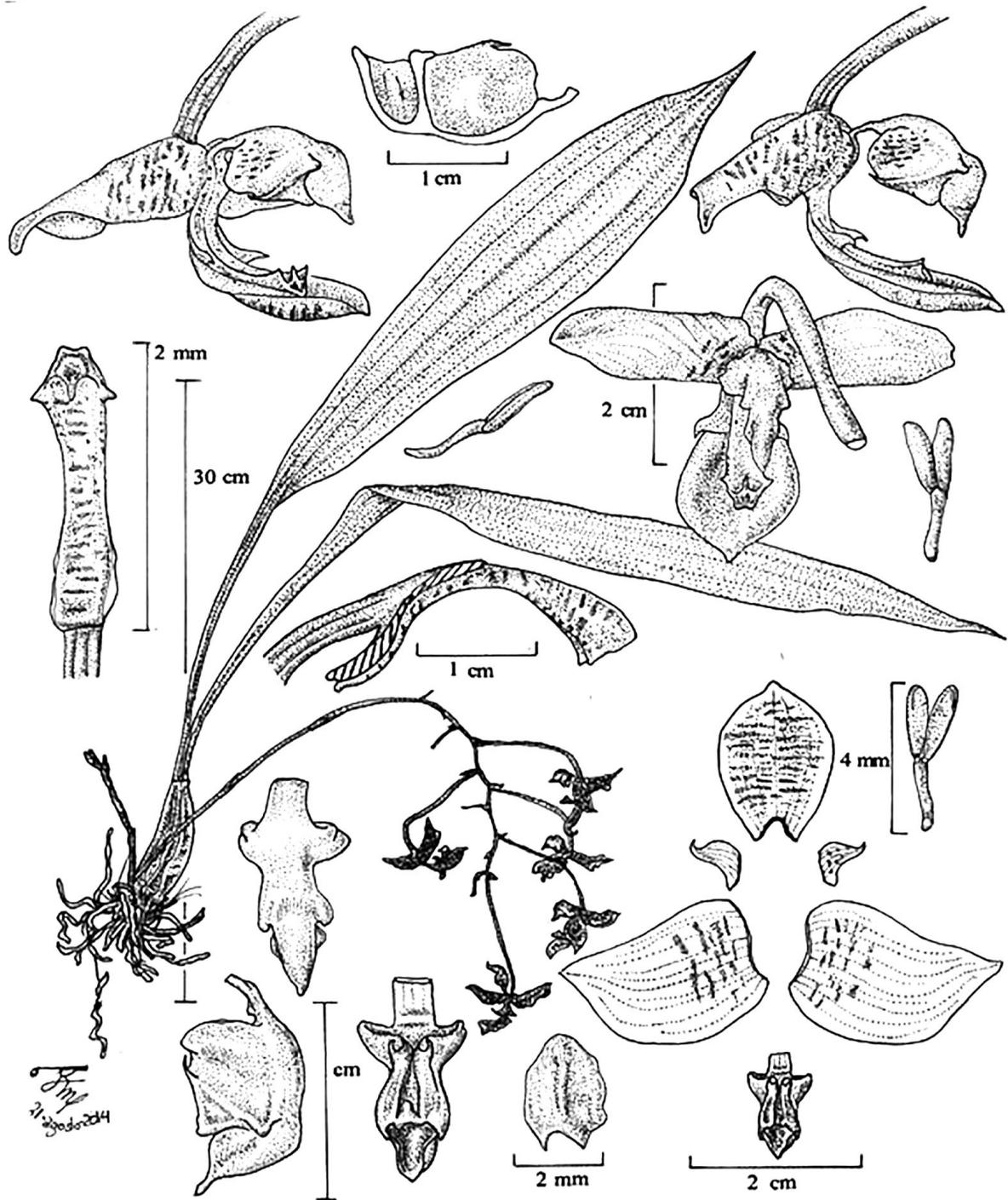


FIGURA 1

Figura 1. Ilustración de *Gongora seideliana* Rchb.f. basada en R. García-Martínez 18 en AMO por R. Jiménez-Machorro.

Una nueva especie del género *Cranichis* Swartz (Orchidaceae: Cranichiinae) de Chiapas, México

Carlos R. Beutelspacher¹
Roberto García Martínez¹

¹Instituto de Ciencias Biológicas, Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. Libramiento Norte Poniente 1150, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas.

RESUMEN

Se describe e ilustra una especie nueva de orquídea terrestre del género *Cranichis* Swartz, (Orchidaceae: Cranichiinae), recolectada en la Sierra Madre de Chiapas, México. Se compara con otras especies del género.

Palabras clave: *Cranichis*, Orchidaceae, nueva especie, Chiapas, México.

ABSTRACT

A new species of terrestrial orchid of the genus *Cranichis* Swartz, (Orchidaceae: Cranichiinae), collected in the Sierra Madre of Chiapas, Mexico, is described and illustrated. It is compared with other species of the genus.

Keywords: *Cranichis*, Orchidaceae, new Species, Chiapas, Mexico.

INTRODUCCIÓN

El género *Cranichis* Swartz, comprende alrededor de 30 especies de orquídeas terrestres, epífitas o rupícolas, distribuidas desde el centro de México hasta Brasil (Genera Orchidacearum, Cranichideae, 2003), y está representado en Chiapas por las siguientes especies: *Cranichis apiculata* Lindl., *Cranichis ciliata* Kunth., *Cranichis ciliilabia* C. Schweinf., *Cranichis cochleata* Dressler, *Cranichis diphylla* Sw., *Cranichis hieroglyphica* Ames & Correll, *Cranichis muscosa* Sw., *Cranichis revoluta* Hamer & Garay, *Cranichis sylvatica* A. Rich. & Galeotti y *Cranichis wagneri* Rchb.f. (Beutelspacher, 2013, Beutelspacher e Moreno-Molina, en prensa), además de la especie que ahora describimos.

Cranichis chiapasensis Beutelspacher y García-Martínez, sp. nov.

Tipo. Finca Santa Cruz, La Concordia, Chiapas. 26/10/2016. Selva Lluviosa de Montaña. 15° 48' 06.9" N 93° 04' 06.4" W. Altura: 1,344 msnm. Carlos R. Beutelspacher S/N, depositado en el Herbario HEM, del Instituto de Ciencias Biológicas de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas (UNICACH).

Descripción. Hierba terrestre-rupícola, hasta de 12 cm de largo sin contar la inflorescencia. **Raíces** tuberosas, blancas, verdosas en la base, hasta de 15 x 0.4 cm de diámetro. **Tallo** muy corto, hasta de 3 cm de largo, por 0.6 cm de ancho en su porción más amplia. **Hojas.** Generalmente con tres hojas quebradizas, basales, pediceladas, ampliamente lanceoladas, hasta de 9 cm de largo, por 3 cm de ancho en su parte media; el pedicelo hasta de 4 cm. Más oscuras en el haz que en el envés. **Inflorescencia** racemosa, brevemente piramidal, hasta con 20 flores resupinadas que abren casi simultáneamente. Ésta emerge a partir del ápice del tallo, midiendo hasta 9.5 cm de largo, y provista de 3-5 brácteas amplexicaules. **Flores** carnosas, de color blanco-verdoso, más verdes hacia la mitad apical. **Bráctea floral** verdosa con puntos blancos, membranácea, unguiculada, se origina en la base del ovario, cubriendo este, de color verde claro a blancuzco, 0.2 cm de largo. **Ovario** largo, verdoso, 0.5 cm de largo por 0.1 cm de ancho, con surcos o estrías longitudinales. **Labelo** cóncavo y cuculado en el ápice, formando una plataforma casi triangular, verde oscuro en su porción apical interior y con una franja verdosa vertical a todo lo largo, con tenues líneas o rayas verdosas que parten de centro

del labelo hacia los lados, extendido mide 0.4 cm de largo por 0.2 cm de ancho en su porción superior. **Segmentos florales** angostos, blancuzcos, verdes en el ápice. **Pétalos** lanceolados y romos en el ápice, ligeramente asimétricos, miden de 0.3 cm de largo, por 0.1 cm de ancho. **Sépalo dorsal** es algo más delgado que los laterales y mide 0.5 cm de largo, por 0.2 cm de ancho. **Sépalos laterales** angostos, miden 0.3 cm de ancho por 0.4 cm de largo. **Columna** corta, con el borde redondeado a semitriangular, 0.2 cm de largo por 0.1 cm de ancho, termina con una pequeña uña en el ápice, la cavidad estigmática es amplia. **Polinias** blancas, un par, en forma de gotas, 0.1 cm de largo. **Rostelo** curvo, unguiculado. **Cápsula** no vista.

ETIMOLOGÍA. El nombre de la especie hace alusión al estado de Chiapas de donde es originaria.

DISTRIBUCIÓN. Conocida únicamente la localidad tipo: finca Santa Cruz, municipio de La Concordia, Chiapas, México, aunque posiblemente se encuentre en otras localidades de la Sierra Madre de Chiapas.

ECOLOGÍA. Planta rupícola dentro de un cafetal, con restos de Selva Húmeda de Montaña.

RECONOCIMIENTO. La mayoría de los representantes del género *Cranichis* Swartz tienen inflorescencias con un tallo largo y delgado, además de presentar varias brácteas florales; *Cranichis chiapasensis* sp. nov. curiosamente es una excepción, con tallos cortos, gruesos y pocas brácteas florales, por lo que es fácil reconocer a los ejemplares de esta especie, aún tratándose de ejemplares de herbario. La morfología floral de esta especie es semejante a *Cranichis apiculata* Lindl., siendo que ambas especies presentan un labelo blanco con un patrón de rayas o manchas verdosas y una depresión que lo divide longitudinalmente; sin embargo, en esta última especie, el ápice del labelo termina de forma semitriangular (Soto-Arenas et al., 1995), mientras que la nueva especie presenta un labelo bilobulado cuyos bordes forman una cavidad con una mancha oscura.

LITERATURA CITADA

BEUTELSPACHER B., C.R., 2013. *Guía de orquídeas de Chiapas*. 2ª. Ed. AMO y autor. 187 p.

BEUTELSPACHER B., C.R. & I. MORENO-MOLINA, 2016. *En prensa*. *Las orquídeas de Chiapas*.

PRIDGEON, A., J. PHILLIP, M. CRIBB, W. CHASE & FINN N. RASMUSSEN, (Ed.), 2003. *Genera Orchidacearum*. Vol.3. Orchidoideae (Part 2) Vanilloideae. Oxford University Press.

SOTO-ARENAS, G.A. SALAZAR Y E. HÁGSATER, 1995. *The Orchidaceae of Mexico. A Taxonomic Sinopsis*. Reporte final del proyecto P107. Información original no publicada.

APÉNDICE



Cranichis chiapasensis sp. nov. Inflorescencia.

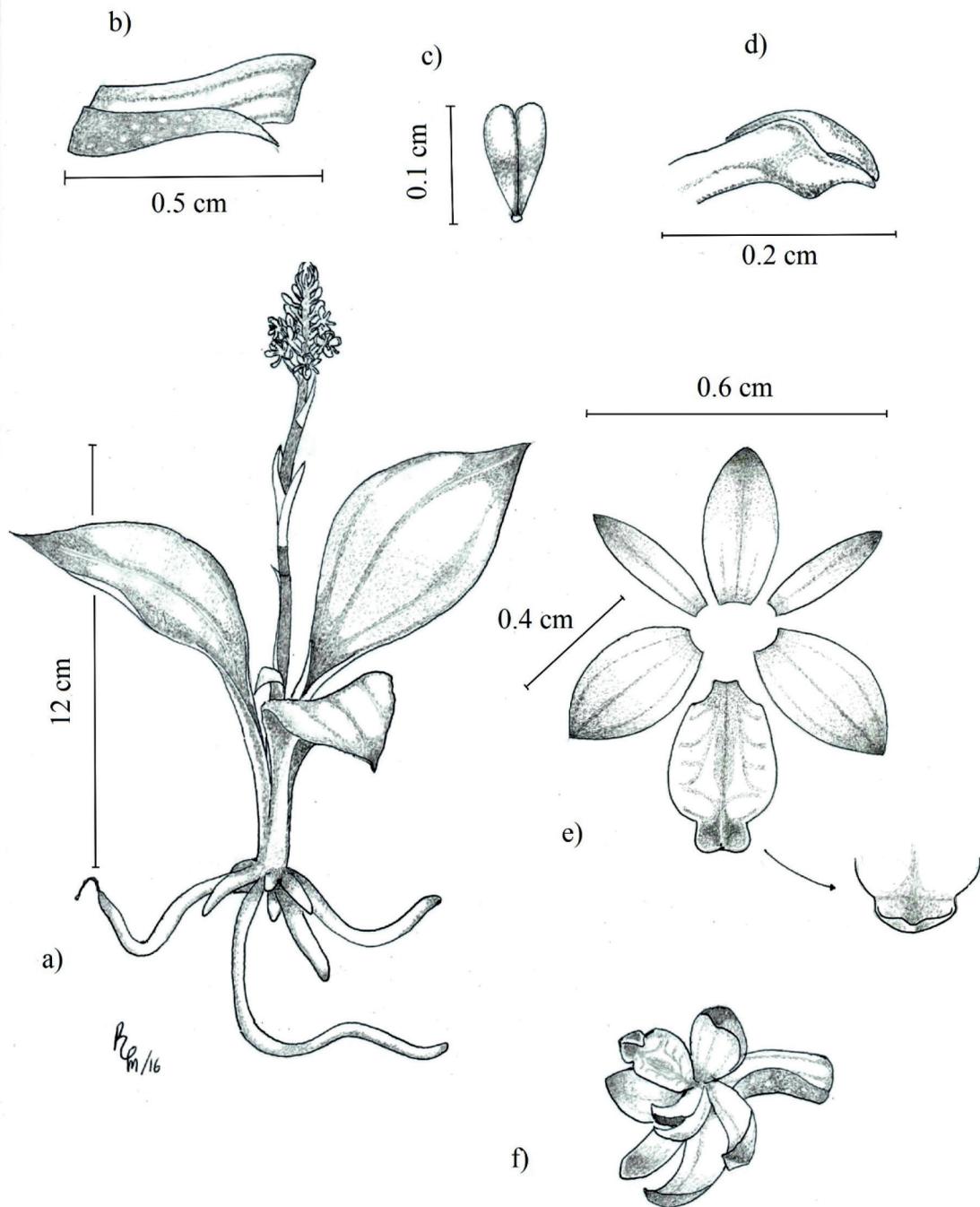
Cranichis chiapasensis sp. nov. Planta con flores.



Mapa con la ubicación de *Cranichis chiapasensis* sp. nov.



APÉNDICE



Cranichis chiapasensis sp. nov. a) Vista de la planta. b) Ovario y bráctea floral, c) Polinias, d) Columna y rostelo, e) Flor extendida (no resupinada), f) Vista lateral de la flor. Dibujos de Roberto García Martínez.

Nuevos registros del mangle centroamericano *Avicennia bicolor* Standl. (Acanthaceae) en la costa pacífica del sureste mexicano con notas sobre su distribución y estatus de conservación

Salvador Santamaría-Damián¹, Emilio I. Romero-Bermy²,
Cristian Tovilla-Hernández³, Margarita E. Gallegos-Martínez⁴, Juan C. De la Presa-Pérez³

¹Posgrado en El Colegio de la Frontera Sur Unidad Tapachula, Carretera Antiguo Aeropuerto km. 2.5, C.P. 30700, Tapachula, Chiapas, | ²Centro de Investigaciones Costeras, Instituto de Ciencias Biológicas, Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas, Tonalá, Chiapas, México, | ³Laboratorio de Manejo de Ecosistemas Costeros, Departamento de Ciencias de la Sustentabilidad, El Colegio de la Frontera Sur-Unidad Tapachula, Tapachula, Chiapas, México | ⁴Departamento de Hidrobiología, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Ciudad de México, México. Correo electrónico, salvadorsantamaría80@gmail.com

RESUMEN

Se dan a conocer nuevos registros de *Avicennia bicolor* Standl., para México (Pijijiapan, Chiapas). Actualmente, el registro de *A. bicolor* recolectado por el botánico Eizi Matuda en 1946 en el sistema lagunar Mar Muerto (Paredón, Chiapas) representa el más septentrional en toda su área de distribución. Los resultados presentados en este trabajo, indican que *A. bicolor* se distribuye en un área limitada pero importante en la costa sur del Pacífico mexicano en rodales relativamente densos con un alto desarrollo estructural. Ante la falta de protección ambiental de la especie, se considera necesaria su inclusión en la NOM-059 así como el diseño de estrategias de conservación a nivel nacional, regional y local.

Palabras clave: *Avicennia bicolor*, Costa de Chiapas, mangle centroamericano.

ABSTRACT

New records for Mexico of *Avicennia bicolor* Standl. (Pijijiapan, Chiapas). Currently, registration of *A. bicolor* collected by the Botanical Eizi Matuda in 1946 in the Mar Muerto lagoon system (Paredon, Chiapas) represents the most northern throughout its range. The results presented in this paper indicate that *A. bicolor* is distributed in a limited but important area in the southern Pacific coast of Mexico in relatively dense stands with high structural development. In the absence of environmental protection of this species, their inclusion in the NOM-059 and the design of conservation strategies at national, regional and local it is deemed necessary.

Keywords: *Avicennia bicolor*, Chiapas Coast, central american mangrove.

INTRODUCCIÓN

Los manglares son comunidades de árboles y arbustos que ocupan las zonas intermareales de las regiones tropicales y subtropicales. Las especies que componen este grupo presentan rasgos morfológicos, fisiológicos y ecológicos distintivos que les permiten adaptarse al entorno costero (Waisel, 1972; Tomlinson, 1995).

A nivel de ecosistema, los manglares son altamente productivos y proporcionan diferentes bienes y servicios como sumideros de carbono, protección contra la erosión costera, la retención de sedimentos y como zonas de crianza y alimentación para especies de importancia ecológica y pesquera (Sanjurjo-Rivera y Welsh-Casas, 2005; Polidoro *et al.*, 2010; Donato *et al.*, 2011).

En México existen cuatro especies de mangle am-

pliamente distribuidas tanto en las costas del Pacífico y del Atlántico: *Rhizophora mangle* L. (mangle rojo, Rhizophoraceae), *Avicennia germinans* Jacq. (Mangle negro, Acanthaceae), *Laguncularia racemosa* Gaertn. (Mangle blanco, Combretaceae) y *Conocarpus erectus* L. (mangle botón; Combretaceae) con dos variedades (*erectus* y *sericeus*) (López-Portillo y Ezcurra, 2002; Pennington y Sarukhán, 2005). Además, en el estado de Chiapas se ha registrado la presencia de *Rhizophora x harrisonii* Leechman (híbrido natural entre *R. mangle* y *Rhizophora racemosa* G. Mey.) y *Avicennia bicolor* Standl. (Mangle salado) (Moldenke, 1960; Rico-Gray, 1981).

A. bicolor es un manglar típico del Pacífico centroamericano y se encuentra restringido entre la Bahía de Buenaventura en Colombia y la costa sur del Pacífico Mexicano (Jiménez, 1994; Tomlinson, 1995; Duke,

2010). Se puede encontrar con *A. germinans* en grupos mixtos y se distingue fácilmente por los caracteres morfológicos (hojas y disposición de las inflorescencias) (Gibson, 1970) Análisis de microsátélites revelaron el aislamiento genético contemporáneo entre las dos especies (Nettel *et al.*, 2008). Con base en los resultados de ese estudio se confirma la posición taxonómica de *A. bicolor* y su presencia en México.

La información relacionada con *A. bicolor* en México es particularmente escasa. Ha sido citada con pocos datos locales e insuficientes colectas de referencia, lo que ha generado una incertidumbre de su situación actual en este país. En el presente trabajo, documentamos registros recientes del mangle centroamericano *A. bicolor* en el estado de Chiapas. Además hemos proporcionado datos sobre la estructura del bosque de manglar y las características generales de su hábitat y la comparación con su distribución en Centroamérica.

METODOLOGÍA

Antecedentes históricos. El botánico japonés Eizi Matuda realizó el primer registro de *A. bicolor* en México en 1946. El espécimen recolectado por Matuda (número 16353) Paredón, Tonalá, Chiapas. (aproximadamente 16° 2'25.5" N, 093° 51'59.91" W) fue depositado en el Herbario Nacional de Estados Unidos (número 1889845; se revisó la imagen del espécimen previa solicitud al departamento de Botánica del Smithsonian Institution-NMNH, a través del programa de Base de Datos y Digitalización del Herbario Nacional MEXU, el 9 de abril de 2015). Un segundo espécimen fue recolectado después de 40 años en la zona oriente de la laguna costera del Mar Muerto en un proyecto de investigación y servicio social de la Universidad Autónoma de Metropolitana, Unidad Iztapalapa en 1987 (Gallegos y Gómez, 1989). Antes de las nuevas colectas aquí presentadas, este último ejemplar correspondía al único depositado en un herbario de México (UAMIZ; véase la sección "Material examinado"). La información proporcionada por el inventario de manglares realizado en la costa de Chiapas y Oaxaca (Tovilla-Hernández *et al.*, 2007; 2010) reportan la observación de *A. bicolor* en sitios dispersos y escasos en el municipio de Tonalá y de un bosque monoespecífico en el canal San José en Pijijiapan, Chiapas, México.

Registro de la especie. Durante el trabajo de campo derivado de la tesis de maestría del primer autor (Santamaría-Damián, 2013), *A. bicolor* fue recolectado en el sitio prioritario de manglar Los Patos-Solo Dios (CONABIO-PS28; Rodríguez-Zúñiga *et al.*, 2013) (figura 1). En este sitio, los parámetros estructurales de los bosques (DBH \geq

2.5 cm, altura densidad, área basal) fueron determinados en un inventario de tres parcelas de (300 m²) donde se encontró *A. bicolor*. En abril de 2015, se recolectaron especímenes utilizando técnicas estándar de herbario (Lot y Chiang, 1986) y de campo. Para la determinación botánica, nos basamos en las claves de Gibson (1970) y la de Pool y Rueda (2001), además de cotejar los especímenes con los ejemplares recolectados en México y con 3 de Centroamérica (Véase la sección de Material examinado). También, la identificación fue confirmada por J. Santana (UAMIZ). Los especímenes recolectados fueron depositados en el MEXU (Herbario Nacional, Universidad Nacional Autónoma de México), UAMIZ (Herbario Metropolitano Dr. Ramón Riba y Nava Esparza, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa), HEM (Herbario Eizi Matuda, Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas) y ECO-SC-H (El Colegio de la Frontera Sur-San Cristóbal).



FIGURA 1

Hojas e inflorescencia de *Avicennia bicolor*.

Material examinado. México, Chiapas. Municipio de Tonalá: Mar Muerto, estero Cinco Arrobas, ca. 7,5 km al sureste de Paredón, 15° 51' N, 093° 51' W, A. Gómez y M. Gallegos, 268 (UAMIZ: 32515), 28 de febrero de 1987; Panamá, Provincia de Coclé, Isla del Pozo en salinas del río Estero Salado, 8° 11' N, 80° 30' W, S. Knap, K. Clary & D. Piperno 3401, (MEXU: 378957), 12 Febrero de 1982; Nicaragua, Chinandega, municipio de Puerto Morazán, del poblado de Morazán, hasta 5 kilómetros en dirección de Tonalá, 12° 49' N 87° 09' W, R. Rueda, D. Paguagua & M. Garmendía 17322, (MEXU: 1273826) 21 de junio de 2002; Honduras, Departamento de Valle, San Lorenzo, bosque tropical a nivel del mar, Domingo Aguilar Sierra 30 (MEXU: 784957).

RESULTADOS

Material adicional de las nuevas localidades. México. Chiapas. Municipio de Pijijiapan: Sistema Lagunar, Los Patos-Solo Dios, ca. 120 m al este del canal estuárico San José y a 500 m al norte de la playa, 15°43'39.50"N, 93°29'50.20"W, *Santamaría-Damián S. y E. I. Romero-Berry*, s/n (MEXU, UAMIZ. HEM, ECO-SC-H), 13 April 2015. Ca. 40 m al este de el canal estuárico San José y a 510 m al norte de la línea de playa, 15°42'55.60"N, 093°28'52.70"W, *Santamaría-Damián S. y E. I. Romero-Berry*, s/n (MEXU, UAMIZ. HEM, ECO-SC-H), 15 April 2015 (figura 2).

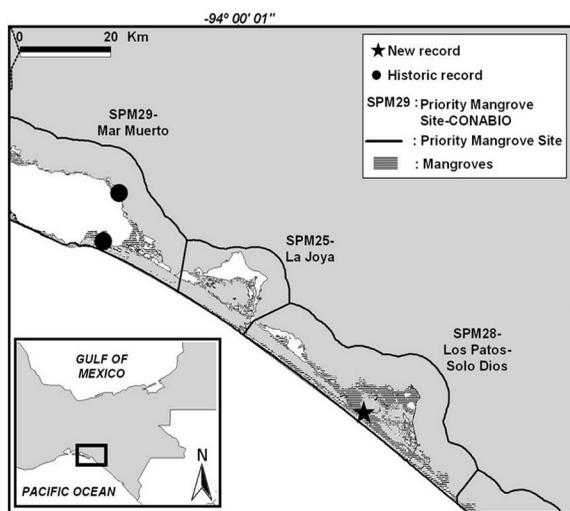


FIGURA 2

Registros históricos y nuevos de *Avicennia bicolor* en la costa del Pacífico del sureste mexicano.

Estructura del manglar y hábitat. En la localidad del sistema lagunar Los Patos-Sólo Dios se presenta un rodal mixto tipo cuenca (Índice de Valor de Importancia de las Especies: *A. germinans* > *R. mangle* > *A. bicolor*). La densidad media de *A. bicolor* (dbh \geq 2.5 cm) fue estimada en 161 individuos ha⁻¹. Área basal media y altura media fue de 16,1 m² ha⁻¹ y 13,9 m, respectivamente. Los sitios con presencia de *A. bicolor* fueron localizados en una zona intermareal adyacente al canal principal del estuario. Este sitio está ubicado al lado de una zona de barra arenosa que separa el estuario del océano abierto con una salinidad superficial de 34 psu (estación seca, febrero de 2010). Se observó presencia de *R. mangle* en los límites del canal y a individuos de *A. germinans* rodeando a los de *A. bicolor*. La estructura y composición de los manglares

de clima seco a lo largo del Pacífico Centroamericano, muestra diferencias entre rodales en las secciones internas y los bordes donde la escorrentía estacional modifica los patrones locales de sequía y salinidad, lo cual es evidente en rodales mixtos de *A. bicolor*-*A. germinans* (Jiménez, 1990; 1994).

Distribución y estado de conservación. Para analizar la distribución de *A. bicolor* en Centroamérica, hemos compilado datos de localización utilizando información del Global Biodiversity Information Facility dataset (GBIF, 2013) y de la literatura. La búsqueda en el GBIF arrojó 176 registros con datos georreferenciados (incluyendo la sinonimia de *A. tonduzii*). La especie ha sido recolectada en siete países, entre ellos México. La mayoría de los registros provienen de Costa Rica y Panamá. Sin embargo, no hay registros al norte del Golfo de Fonseca y la costa de Guatemala, con excepción de los mencionados para México en esta nota (figura 3).

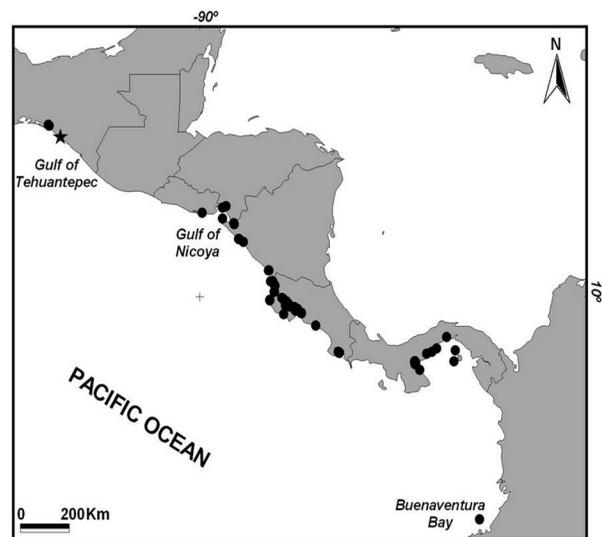


FIGURA 3

Localidades georreferenciadas de *Avicennia bicolor*. Los registros de ocurrencia están representados con un círculo negro. Las colectas recientes en Los Patos-Sólo Dios, Chiapas (México) con una estrella.

CONCLUSIONES

En México, esta especie se encuentra restringida en una zona estrecha de la costa a lo largo de la Laguna de Mar hasta el límite con el canal de dragado Joaquín Amaro-La Conquista (40,3 kilómetros. El registro de Mar Muerto (Paradón, Chiapas) representa la localidad más septentrional

de esta especie en el representa el más septentrional en toda su área de distribución, aunque es necesario intensificar la exploración en la región sureste del Istmo de Tehuantepec en Oaxaca para localizar un límite de distribución más preciso. Las leyes federales protegen los ecosistemas de manglar en México; sin embargo existe un vacío en relación con *A. bicolor*, la cual, no se encuentra listada en la *Norma Oficial Mexicana* (NOM-059-SEMARNAT-2001) (SEMARNAT, 2010), aunque la Lista Roja de la UICN la clasifica como Vulnerable (Duke, 2010). Los registros presentados en este trabajo, indican que *A. bicolor* se distribuye en un área limitada pero importante en la costa sur del Pacífico mexicano, en rodales relativamente densos con un alto desarrollo estructural.

El sistema prioritario de manglar Los Patos-Sólo Dios carece de un plan de conservación y se encuentra amenazado por los cambios en el uso del suelo (Santamaría-Damián, 2013). Por tanto, se considera congruente darle protección legal al sitio y necesario incluir *A. bicolor* en la NOM-059. Los resultados del presente trabajo representan una actualización del estado actual de *A. bicolor* en la costa de Chiapas

y aporta información relevante de su importancia como especie prioritaria para la conservación en México.

AGRADECIMIENTO

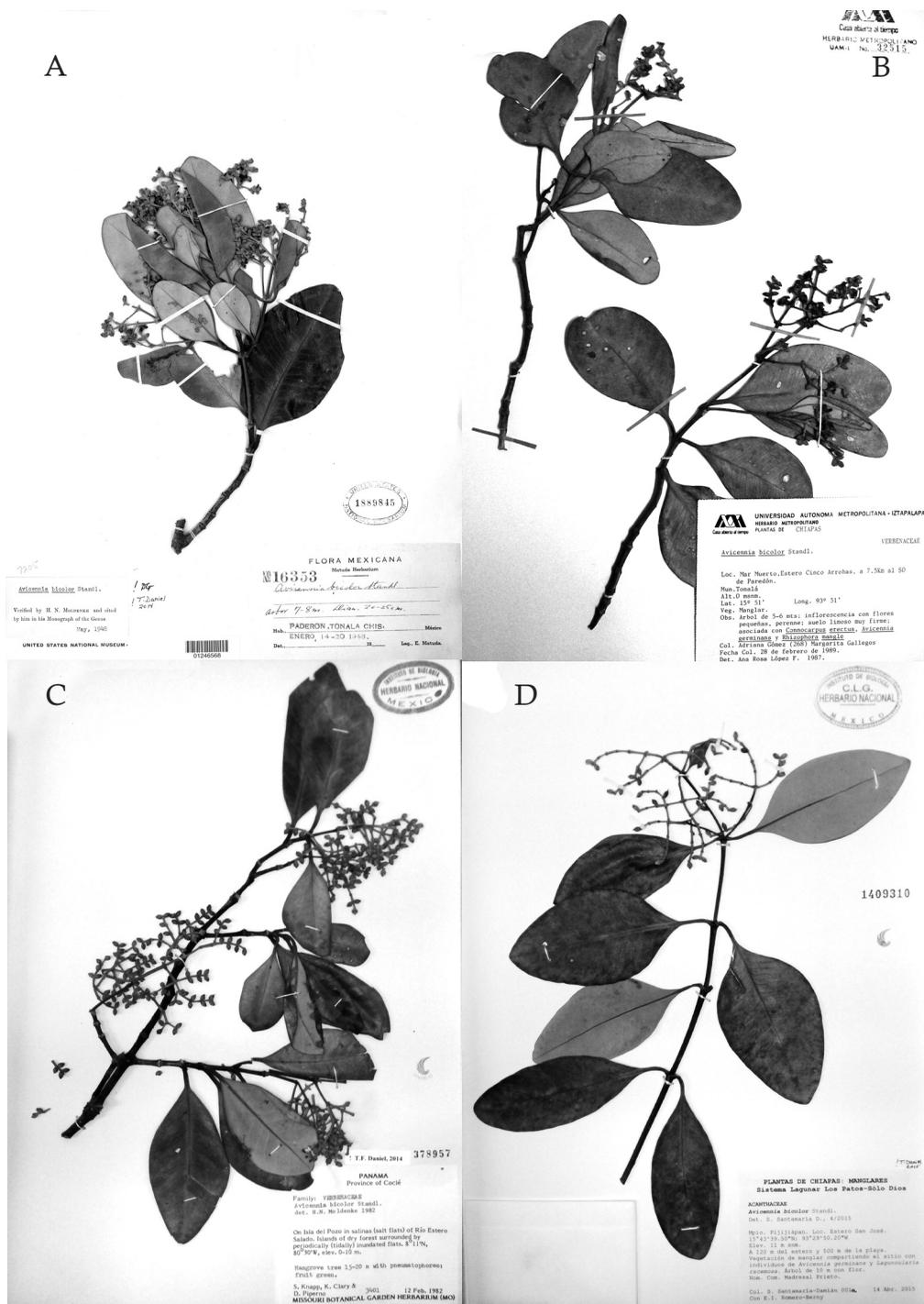
Agradecemos a D. Gernandt por su invaluable apoyo durante todo el proceso y el acceso al permiso de colecta SEMARNAT (SGPA/DGGFS/712/2105/14); J. Santana Carrillo (UAMIZ), A. Reyes García, B.V. Juárez Jaimés, (MEXU), H. Gómez Domínguez, M.A. Pérez Farrera (HEM), I. Vásquez Lara, M. Ishiki Ishihara (ECO-SC-H) por la asesoría en la consulta de base de datos de las colecciones y el depósito de especímenes; F. Ovalle Estrada, A. Lang, G. Montes y E. Serrano por el constante apoyo en campo. A.G. Mejía y Pescadores de la S.C.P.P. El Remolino por favorecer el acceso a los sitios de colecta; M.R. García Peña (MEXU) e I. Lin (Smithsonian Institution) por la solicitud y acceso a la imagen digitalizada del ejemplar despositado al National Herbarium del NMNH; Al CONACYT por la beca no. 239311 otorgada para realizar estudios de maestría del primer autor.

LITERATURA CITADA

- DONATO, C.D., J.B. KAUFFMAN, D. MURDIYARSO, S. KURNIANTO, M. STIDHAM & M. KANNINEN, 2011.** Mangroves among the most carbon rich forests in the tropics. *Nature Geoscience* 4: 293-297.
- DUKE, N.C., 2010.** *Avicennia bicolor*. The IUCN Red List of Threatened Species. V.2015.2. <iucnredlist.org/details/178847/0> (acceso septiembre 26, 2016).
- GALLEGOS, M. y A. GÓMEZ, 1989.** *Análisis estructural del manglar de la laguna costera Mar Muerto, Chiapas, México.* Boletín de Resúmenes del III Congreso Venezolano sobre Ciencias del Mar, Cumaná, Venezuela.
- GBIF, 2013.** *Avicennia bicolor* Standley. GBIF Backbone Taxonomy. <gbif.org/species/4196610> (acceso septiembre 20, 2015).
- GIBSON, D.N., 1970.** Verbenaceae. En P. C. Standley y L. O. Williams (Eds.), Flora of Guatemala. *Fieldiana Botany* 24 (9/1-2): 167-236.
- JIMÉNEZ, J.A., 1990.** The structure and function of dry weather mangroves of the Pacific coasts of Central America, with emphasis on *Avicennia bicolor* forests. *Estuaries* 13 (2): 182-192.
- JIMÉNEZ J.A., 1994.** *Los manglares del Pacífico centroamericano.* Fundación UNA. Heredia, Costa Rica.
- LÓPEZ-PORTILLO J. y J. EZCURRA, 2002.** Los manglares de México: una revisión. *Madera y Bosques* 8 (1): 27-51.
- LOT A. y F. CHIANG C., 1986.** *Manual de Herbario: administración y manejo de colecciones, técnicas de recolección y preparación de ejemplares botánicos.* Consejo Nacional de la Flora de México A.C., México.

- MOLDENKE H.N., 1960. Materials toward a monograph of the genus *Avicennia*. *Phytologia* 7: 123-168.
- NETTEL, A., R.S. DODD, Z. AFZAL-RAFII & C. TOVILLA-HERNÁNDEZ, 2008. Genetic diversity enhanced by ancient introgression and secondary contact in East Pacific Black mangroves. *Molecular Ecology* 17: 2680-2690.
- PENNINGTON, T.D. y J. SARUKHÁN, 2005. *Árboles tropicales de México. Manual para la identificación de las principales especies*. Universidad Nacional Autónoma de México-Fondo de Cultura Económica. México.
- POLIDORO, A.B., K.E. CARPENTER, L. COLLINS, N. DUKE, A.M. ELLISON, J.C. ELLISON, E.J. FARN-SWORTH, E.S. FERNANDO, K. KATHIRESAN, N.E. KOEDAM, S.R. LIVINGSTON, T. MIYAGI, G.E. MOORE, V. NGOC, NAM, J. EONG ONG, J.H. PRIMAVERA, S.G. SALMO III, J.C. SANSIANGCO, S. SUKARDJO, Y. WANG & J.W. JONG-YONG, 2010. The loss of species: Mangrove extinction risk and geographic areas of global concern. *Plos one* 5 (4): e10095.
- POOL A., & M. RUEDA, 2001. Verbenaceae. In: Stevens W.D., Ulloa C., Pool A. and Montiel O.M. Eds. *Flora de Nicaragua*, pp.2497-2525, Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden, St Louis, Missouri.
- RICO-GRAY, V., 1981. *Rhizophora harrisonii* (Rhizophoraceae), un nuevo registro para las costas de México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 7: 163-165.
- RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA, M.T., C. TROCHE-SOUZA, A.D. VÁSQUEZ-LULE, J.D. MÁRQUEZ-MENDOZA, B. VÁSQUEZ-BALDERAS, L. VALDERRAMA-LANDEROS, S. VELÁZQUEZ-SALAZAR, M.I. CRUZ-LÓPEZ, R. RESSL, A. URIBE-MARTÍNEZ, S. CERDEIRA-ESTRADA, J. ACOSTA-VELÁZQUEZ, J. DÍAZ-GALLEGOS, R. JIMÉNEZ-ROSENBERG, L. FUEYO-MACDONALD Y C. GALINDO-LEAL, 2013. *Manglares de México. Extensión, distribución y monitoreo*. CONABIO, México.
- SANJURJO-RIVERA, E. Y S. WELSH-CASAS, 2005. Una descripción del valor de los bienes y servicios ambientales prestados por los manglares. *Gaceta Ecológica* 74: 55-68.
- SANTAMARÍA-DAMIÁN S., 2013. *Caracterización estructural y cambios en la cobertura del manglar en el sistema lagunar Los Patos-Sólo Dios en la costa de Chiapas*. Tesis de Maestría. El Colegio de la Frontera Sur, ECOSUR. Tapachula, Chiapas, México. 105 p.
- SEMARNAT, 2010. Norma Oficial Mexicana. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos naturales. NOM 059-SE-MARNAT-2010, Protección ambiental. Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. *Diario Oficial de la Federación*, 30 de diciembre de 2010, Segunda sección, México.
- TOMLINSON P.B., 1995. *The botany of mangroves*. Cambridge University Press.
- TOVILLA-HERNÁNDEZ, C., R.L. SALAS-ROBLERO, J.C. DE LA PRESA-PÉREZ, E. ROMERO-BERNY, F. OVALLE-ESTRADA, R. GÓMEZ-ORTEGA, J. HERNÁNDEZ-SANDOVAL, E. DE LA CRUZ-MONTES Y A. HERNÁNDEZ-GUZMÁN, 2007. *Inventario forestal de los bosques de manglar de la costa de Chiapas*. Informe final, ECOSUR-COCYTECH, Chiapas, México.
- TOVILLA-HERNÁNDEZ, C., F. OVALLE-ESTRADA, J.C. DE LA PRESA-PÉREZ Y D.T. GONZÁLEZ-CASTILLO, 2010. *Inventario y monitoreo del estado actual de los bosques de manglar de Chiapas y Oaxaca*. 2º Informe, ECOSUR-CONABIO, México.
- WASEL, Y., 1972. *Biology of halophytes*. Academic Press. New York.

APÉNDICE



Registros históricos de *Avicennia bicolor* recolectados en Chiapas (A y B); espécimen recolectado en Panamá y parte del material examinado (C); nuevo registro, espécimen recolectado en el Sistema Prioritario de Manglar Los Patos-Sólo Dios, Pijijiapan, Chiapas (D).

El género *Macrobrachium* (Decapoda: Palaemonidae) en la Reserva de la Biosfera “La Encrucijada”, Chiapas, México

Gustavo Rivera Velázquez¹
Miguel Ángel Peralta Meixueiro²
Fredy Eugenio Penagos García³

¹Laboratorio de Acuicultura y Evaluación Pesquera, ICB-UNICACH, gustavo.rivera@unicach.mx. | ²Secretaría Académica ICB-UNICACH, | ³Laboratorio de Hidrobiología, ICB-UNICACH.

RESUMEN

Se realizó un estudio taxonómico de las especies de decápodos del género *Macrobrachium*. Incluye la revisión de material biológico recolectado desde 1995 hasta 2010 en la Reserva de la Biosfera La Encrucijada y que fue depositado en la colección científica resguardada en el laboratorio de Acuicultura y Evaluación Pesquera del Instituto de Ciencias Biológicas de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. Se revisaron 88 lotes en los cuales se presentan siete especies de las cuales seis ya estaban registradas para Chiapas: *M. tenellum*, *M. olfersii*, *M. americanum*, *M. digueti*, *M. occidentale* y *M. hobbsi*. Se extiende el área de distribución conocida de *M. michoacanus*.

Palabras clave: *Macrobrachium*, especies, riqueza, distribución, ampliación.

ABSTRACT

A taxonomic study of the species of decapod the genus *Macrobrachium* was performed. It includes review of biological material collected from 1995 to 2010 in the Biosphere Reserve La Encrucijada and was deposited in the scientific collection sheltered in the laboratory of Aquaculture and Fisheries Assessment of Instituto de Ciencias Biológicas, Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. 88 lots in which seven species of which six were already reported for Chiapas presented were reviewed: *M. Tenellum*, *M. olfersii*, *M. americanum*, *M. digueti*, and *M. occidentale* and *M. hobbsi*. The range of *M. michoacanus* extends.

Keywords: *Macrobrachium*, species, wealth distribution, expansion.

INTRODUCCIÓN

El estado de Chiapas se caracteriza por una riqueza biológica inusitada, por lo que su reconocimiento y conservación son un compromiso con las generaciones futuras (Reyes-Escutia *et al.*, 2010). Los inventarios de recursos son una herramienta que permite tomar medidas que complementan el uso del territorio y la conservación de la diversidad biológica (Palacio-Prieto *et al.*, 2004), nos permite saber dónde y cómo se localizan, cuál es su estado actual y como van cambiando con el tiempo. Además, considerando que la flora y la fauna al ser una fuente de energía para las poblaciones rurales del país su importancia no solo es ecológica, sino también económica y social.

Las lagunas costeras que posee el estado de Chiapas, representan áreas de gran diversidad biológica, esto se refleja con respecto a la fauna de crustáceos decápodos encontrada en la zona, y se puede señalar que por ello constituyen zonas

de elevada productividad, debido a que en estos lugares habitan un gran número de especies que son susceptibles de ser aprovechadas, y con ello, constituir la base del desarrollo de las comunidades que dependen en gran parte de la comercialización de algunos recursos acuáticos, en especial de crustáceos decápodos como el camarón, los langostinos y las jaibas, los cuales poseen gran demanda en el mercado como productos de consumo en la alimentación humana (Rodríguez-Cruz, 2001). Los camarones de agua dulce del género *Macrobrachium*, son crustáceos decápodos exitosos con una distribución circuntropical. Las especies ocupan una amplia variedad de hábitat, tales como estuarios, lagunas costeras, lagos, ríos (desde la planicie costera hasta altitudes de 1100 m), cenotes y cuevas (Acuña-Gómez *et al.*, 2013). En este estudio se hace una lista de las especies de langostinos del género *Macrobrachium* de la Reserva de la Biosfera La Encrucijada, y se discuten algunos aspectos de la diversidad y distribución en el área.

MATERIAL Y MÉTODOS

Área de estudio

La Reserva de la Biosfera La Encrucijada (REBIEN), se localiza en la planicie costera del Pacífico al sur del estado de Chiapas, geográficamente se ubica entre los 15°09' y 15° 32' de latitud Norte y 92°45' y 93° 15' de longitud Oeste (figura 1), posee una superficie total (terrestre y marina) de 144,868 ha (DOF, 1995), presenta varios ecosistemas característicos de zonas costeras de gran relevancia para el Pacífico americano debido a su gran extensión, estructura y productividad. Por lo anterior, constituye un área de gran interés biológico para la conservación y es considerada una de las regiones prioritarias terrestres y marinas establecidas por la Comisión Nacional para el uso y Conocimiento de la Biodiversidad (CONABIO; Arriaga-Cabrera *et al.*, 1998). La reserva comprende parte de los municipios de Pijijiapan, Mapastepec, Acapetahua, Huixtla, Villa Comaltitlán y Mazatán, incluye dos de los tres grandes sistemas lagunares costeros del estado, sirve como puente natural entre las regiones biogeográficas neártica y neotropical y alberga las variedades más norteñas y sureñas de numerosas especies tanto de flora como de fauna (INE, 1999).

Método

Se revisaron los ejemplares del género *Macrobrachium* obtenidos entre 1995 y 2010 en muestreos sistemáticos de los sistemas lagunares-estuarinos de la REBIEN, desde 1995 hasta 2003 el material biológico está asociado al programa *Contribución al conocimiento de la fauna de invertebrados y vertebrados acuáticos de Chiapas*, adscrito al Laboratorio de Hidrobiología de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas (UNICACH). Desde 2004 hasta 2010 son parte del programa de monitoreo de la calidad de agua y diversidad biológica acuática del sistema lagunar Carretas-Pereyra, con permisos de pesca de fomento por parte de la Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca de la Dirección General de Ordenamiento Pesquero y Acuícola SAGARPA. El material fue recolectado en 22 estaciones de muestreo en el sistema Carretas-Pereyra y 10 en el sistema Chantuto-Panzacola. Además de los puntos de muestreo, la recolecta se hacía en puntos de desembarco de forma directa, incluyendo playa o vegetación o la combinación de ambos. Los organismos fueron conservados en alcohol 70° etiquetados con los datos correspondientes. Los ejemplares se depositaron en la colección de crustáceos del Instituto de Ciencias Biológicas de la UNICACH.

La identificación taxonómica de cada especie citada fue revisada con las claves de Hernández *et al.* (2007) donde, para la identificación de las especies del género *Macrobrachium*, se consideran la forma del rostrum y de la quela del segundo par de pereiópodos del macho. Las determinaciones se corroboraron con las descripciones de las especies anotadas en Álvarez *et al.* (2011).

RESULTADOS

Se examinaron un total de 1,267 ejemplares del género *Macrobrachium* provenientes de 88 lotes. 55 registros pertenecen al sistema lagunar-estuarino Carretas-Pereyra y 33 al sistema lagunar-estuarino Chantuto-Panzacola.

Se identificaron siete especies para la REBIEN. El sistema Carretas-Pereyra presentó la mayor riqueza representada por las siete especies, mientras que en el sistema Chantuto-Panzacola fueron encontradas cinco especies (cuadro 1). De acuerdo a la Lista Roja de la IUCN (De Grave, 2013), la distribución de las especies registradas es: *M. tenellum* (Smith, 1871) de Baja California Sur, México a Perú; *M. olfersii* (Wiegmann, 1836) ambos litorales de México a Brasil, en el Pacífico desde Baja California Sur, en el Atlántico desde Tamaulipas; *M. americanum* Spence Bate, 1868 de Baja California, México al norte de Perú; *M. occidentale* Holthuis, 1950 de Sinaloa, México a Costa Rica; *M. michoacanus* Villalobos Hiriart & Nates Rodriguez, 1990 de Baja California Sur a Oaxaca, México; *M. digueti* (Bouvier, 1895) desde Baja California Sur, México hasta Perú; *M. hobbsi* Villalobos Hiriart & Nates Rodriguez, 1990 ambos litorales; en el Pacífico de Baja California Sur al sur de Chiapas. En el Atlántico de San Luis Potosí a Tabasco, México.

La especie con mayor distribución temporal y espacial es *M. tenellum*: se tienen registros de todos los meses excepto diciembre; se le encontró en ambos sistemas lagunares-estuarinos y los ríos tributarios a las lagunas, aunque la mayor abundancia numérica se registra hacia los ríos y en lagunas en época de lluvia, o sea cuando las lagunas se comportan como cuerpos de agua dulce (cuadros 1 y 2).

M. hobbsi es la especie con el menor número de registros (dos) y el menor número de ejemplares (dos). Se recolectó un ejemplar en cada sistema lagunar, uno en río y otro en canal estuarino en época de lluvia (octubre). *M. occidentale* y *M. digueti* sólo se recolectaron en el sistema Carretas-Pereyra; de la primera sólo cuatro registros en ríos en el mes de septiembre en dos años distintos, de la segunda tres registros, dos de río y uno de canal estuarino en época de lluvia (octubre).

M. michoacanus, presentó tres registros en ríos tributarios a ambos sistemas lagunares-estuarinos; dos del río Coapa (lotes de 1 y 175 ejemplares), y el tercer registro del río Vado Ancho (lote de 44 ejemplares). Esta especie no ha sido registrada para el estado de Chiapas, probablemente por los escasos estudios de este género en el área. También es importante comentar que Acuña-Gómez *et al.* (2013), encuentra 100% de similitud entre *M. digueti*, *M. michoacanus* y *M. acanthochirus*, sin embargo, coinciden con Hernández *et al.* (2007) en cuanto a que *M. michoacanus* morfológicamente se separa de las otras dos.

Hendrickx (1993) registra cuatro especies del género *Macrobrachium* para la vertiente del Pacífico en México (*M. acanthochirus*, *M. tenellum*, *M. americanum* y *M. occidentale*), la primera no coincide con las encontradas en la REBIEN ya que se distribuye desde Sinaloa hasta Oaxaca, en la Lista Roja de la IUCN (De Grave *et al.*, 2013) tiene la categoría de Vulnerable, presenta una población severamente fragmentada. Hernández *et al.* (2007), reportan seis especies para la península de Baja California, todas las que encontramos en la REBIEN con excepción de *M. occidentale*. Álvarez *et al.* (2011), registran para Chiapas nueve especies del género, tres para la vertiente del Atlántico (*M. acanthurus*, *M. carcinus* y *M. heterochirus*), y tres para la vertiente del Pacífico (*M.*

tenellum, *M. americanum* y *M. occidentale*), en el orden respectivo, las tres especies del Atlántico son las especies geminadas del Pacífico. Además, registran dos especies que se distribuyen en ambas vertientes (*M. hobbsi* y *M. olfersii*), y una especie epigea de desarrollo abreviado (*M. vicconi*), por tanto coinciden cinco especies con las encontradas en la REBIEN, las tres de la vertiente del Pacífico y las dos que se distribuyen en ambas vertientes. De acuerdo a la Lista Roja de la IUCN, ninguna de las especies del género *Macrobrachium* encontradas en la REBIEN esta en alguna categoría de riesgo.

CONCLUSIONES

De las siete especies registradas en la Reserva de la Biosfera La Encrucijada, seis coinciden con la distribución señalada por De Grave (2013) para el Pacífico de México; *M. tenellum*, *M. olfersii*, *M. americanum*, *M. occidentale*, *M. digueti* y *M. hobbsi*. En el caso de *M. michoacanus*, se amplía su límite latitudinal de distribución geográfica conocida, ya que se registra hasta Oaxaca, México. De las especies reportadas para la vertiente del Pacífico mexicano, la REBIEN tiene todas con excepción de *M. acanthochirus*. Por tanto es un área de elevada riqueza de especies del género *Macrobrachium*.

LITERATURA CITADA

- ACUÑA-GÓMEZ, E.P., F. ÁLVAREZ, J.L. VILLALOBOS-HIRIART & L.E. EGUIARTE, 2013. Molecular phylogeny of Mexican Species of Freshwater Prawn Genus *Macrobrachium* (Decapoda: Palaemonidae: Palaemoninae). *Hidrobiológica*, 23 (3): 399-409.
- ÁLVAREZ, F., J.L. VILLALOBOS, M. ELÍAS-GUTIÉRREZ Y G. RIVERA, 2011. Crustáceos dulceacuícolas y terrestres de Chiapas. pp. 209-297. En: *Chiapas estudios sobre su diversidad biológica*. F. Álvarez Noguera. Coordinador general. Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. 518 p.
- ARRIAGA-CABRERA, L., E. VÁZQUEZ-DOMÍNGUEZ, J. GONZÁLEZ-CANO, R. JIMÉNEZ-ROSENBERG, E. MUÑOZ-LÓPEZ Y V. AGUILAR SIERRA (COORDINADORES), 1998. *Regiones marinas prioritarias de México*. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México.
- CONANP, 2015. *Estudio previo justificativo para la modificación del área natural protegida La Encrucijada*. Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, México. 139 p.
- DE GRAVE, S., 2013. *Macrobrachium americanum*. *The IUCN Red List of Threatened Species 2013: e.T198018A2508908*. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2013-1.RLTS.T198018A2508908.en>. Downloaded on 23 March 2016.
- , 2013. *Macrobrachium digueti*. *The IUCN Red List of Threatened Species 2013: e.T198223A2516561*. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2013-1.RLTS.T198223A2516561.en>. Downloaded on 23 March 2016.

- , 2013. *Macrobrachium hobbsi*. *The IUCN Red List of Threatened Species 2013: e.T197581A2491623*. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2013-1.RLTS.T197581A2491623.en>. Downloaded on **23 March 2016**.
- , 2013. *Macrobrachium michoacanus*. *The IUCN Red List of Threatened Species 2013: e.T197833A2502021*. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2013-1.RLTS.T197833A2502021.en>. Downloaded on **23 March 2016**.
- , S., 2013. *Macrobrachium occidentale*. *The IUCN Red List of Threatened Species 2013: e.T198281A2518817*. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2013-1.RLTS.T198281A2518817.en>. Downloaded on **23 March 2016**.
- , S., 2013. *Macrobrachium olfersii*. *The IUCN Red List of Threatened Species 2013: e.T198217A2516281*. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2013-1.RLTS.T198217A2516281.en>. Downloaded on **23 March 2016**.
- , S., 2013. *Macrobrachium tenellum*. *The IUCN Red List of Threatened Species 2013: e.T197816A2501192*. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2013-1.RLTS.T197816A2501192.en>. Downloaded on **23 March 2016**.
- DE GRAVE, S., F. ALVAREZ & J. VILLALOBOS, 2013. *Macrobrachium acanthochirus*. *The IUCN Red List of Threatened Species 2013: e.T198205A2515715*. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2013-1.RLTS.T198205A2515715.en>. Downloaded on **24 March 2016**.
- DOF, 1995. *Diario Oficial de la Federación*. Secretaría de Gobernación de México.
- HENDRICKX, M.E., 1993. Crustáceos decápodos del Pacífico Mexicano. pp. 271-318. *In: Biodiversidad Marina y Costera de México*. Salazar-Vallejo, S.I. y N.E. González (eds.). Com. Nal. Biodiversidad y CIQRO, México, 865 p.
- HERNÁNDEZ, L., G. MURUGAN, G. RUIZ-CAMPOS & A.M. MAEDA-MARTÍNEZ. 2007. Freshwater Shrimp of the Genus *Macrobrachium* (Decapoda: palaemonidae) From the Baja California Peninsula, México. *J. Crustacean Biology* 27 (2): 351–369.
- INE, 1999. *Programa de manejo de la Reserva de la Biosfera La Encrucijada*. Instituto Nacional de Ecología SEMARNAP. 184 p.
- PALACIO-PRIETO J.L., M.T. SÁNCHEZ-SALAZAR, J.M. CASADO-IZQUIERDO, E. PROPIN-FREJOMIL, J. DELGADO-CAMPOS, A. VELÁZQUEZ-MONTES, L. CHIAS-BECERRIL, M.I. ORTIZ-ÁLVAREZ, J. GONZÁLEZ-SÁNCHEZ, G. NEGRETE-FERNÁNDEZ, J. GABRIEL-MORALES Y R. MÁRQUEZ-HUITZIL, 2004. *Indicadores para la caracterización y ordenamiento del territorio*. SEMARNAT, INE, UNAM, IG-UNAM. México.
- REYES-ESCUPIA F., C.L. MICELI-MÉNDEZ, G. RIVERA-VELÁZQUEZ Y E. VELÁZQUEZ-VELÁZQUEZ, 2010. *La complejidad de la problemática ambiental en Chiapas*. F. Reyes-Escutia (Coord.) Biodiversidad y sustentabilidad, investigación para la conservación en las áreas naturales protegidas de Chiapas Volumen 1. Colección Jaguar UNICACH, pp. 21-63.
- RODRÍGUEZ, C.M., 2001. *Fauna de crustáceos decápodos del Sistema Lagunar Chantuto-Panzacola de La Reserva de la Biosfera “La Encrucijada”, Chiapas*. Tesis de licenciatura. Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. 87 p.
- VILLALOBOS, A., 1982. “Decapoda” *Aquatic Biota of México, Central America and the West Indies*: 215-239. San Diego State University, San Diego, California.

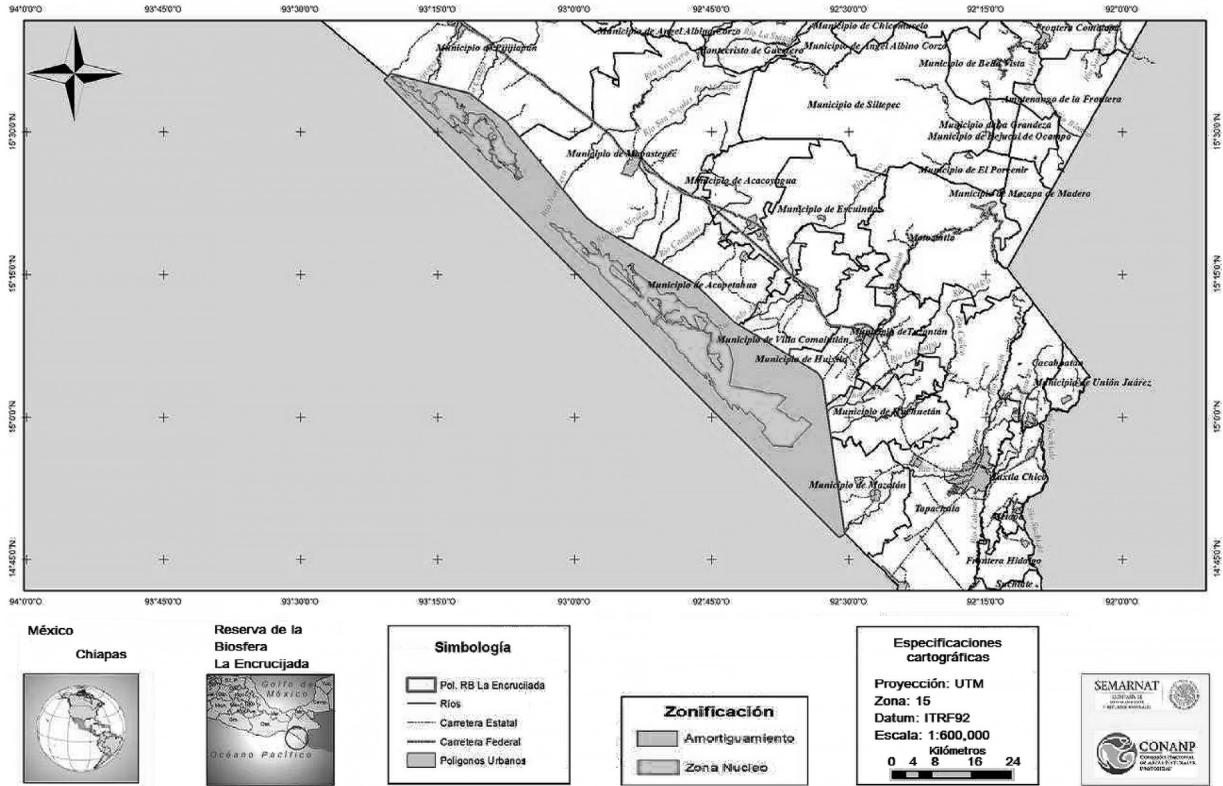


FIGURA 1

Ubicación geográfica de la Reserva de la Biosfera La Encrucijada en el estado de Chiapas, México (modificado de CONANP, 2015).

Especie	Número de lotes	Número de ejemplares	Sistema	
			Carretas-Pereyra	Chantuto-Panzacola
<i>M. tenellum</i> (Smith, 1871)	63	982	36	27
<i>M. olfersii</i> (Wiegmann, 1836)	8	17	5	3
<i>M. americanum</i> Spence Bate, 1868	5	6	4	1
<i>M. occidentale</i> Holthuis, 1950	4	5	4	0
<i>M. michoacanus</i> Villalobos Hiriart & Nates Rodriguez, 1990	3	220	2	1
<i>M. digueti</i> (Bouvier, 1895)	3	35	3	0
<i>M. hobbsi</i> Villalobos Hiriart & Nates Rodriguez, 1990	2	2	1	1
Totales	88	1267	55	33

CUADRO 1

Especies del género *Macrobrachium* por sistema lagunar-estuarino en la Reserva de la Biosfera La Encrucijada

Especie	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
<i>M. tenellum</i> (Smith, 1871)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
<i>M. olfersii</i> (Wiegmann, 1836)							X		X			X
<i>M. americanum</i> Spence Bate, 1868	X			X					X			
<i>M. occidentale</i> Holthuis, 1950	X								X			
<i>M. michoacanus</i> Villalobos Hiriart & Nates Rodriguez, 1990			X	X	X		X		X			
<i>M. digueti</i> (Bouvier, 1895)			X	X			X		X	X		
<i>M. hobbsi</i> Villalobos Hiriart & Nates Rodriguez, 1990									X			

CUADRO 2

Presencia-ausencia de especies del género *Macrobrachium* por meses representados en la colección de crustáceos de la UNICACH, de las recolectas en la Reserva de la Biosfera La Encrucijada.

Nuevos registros de peces en la presa Malpaso (Nezahualcóyotl) cuenca media del Grijalva, Chiapas, México

Manuel de Jesús Anzueto-Calvo, Ernesto Velázquez-Velázquez,
Miguel Ángel Peralta-Meixueiro, Adán Enrique Gómez-González y Gustavo Rivera Velázquez.

Museo de Zoología José Álvarez del Villar, Instituto de Ciencias Biológicas, Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas (UNICACH). Libramiento Norte Poniente No. 1150, Col. Lajas Maciel, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México. C.P. 29039. Tel. (01 961) 12 1 08 94, ext. 4301.

RESUMEN

Chiapas posee una gran riqueza ictiofaunística e hidrológica; destaca la presencia de dos cuencas la del Usumacinta y la del Grijalva; sobre esta última se encuentran la presa Malpaso (Nezahualcóyotl). Durante el periodo desde abril hasta julio de 2014 se han encontrado dos nuevos registros de especies: *Cichlasoma urophthalmus* (21) y *Gambusia sexradiata* (17), Cichlidae y Poeciilidae respectivamente, ambas con distribución de la vertiente del atlántico desde Veracruz hasta Guatemala (hasta Nicaragua para *C. urophthalmus*), abarcando los estados de Tabasco y norte de Chiapas; sin embargo, en diversos estudios anteriores llevados a cabo en la cuenca media y alta del Grijalva, no se registraron dichas especies, por lo que se considera que la presencia de estas se debe a una introducción de manera intencionada para fines de acuicultura, ya que se ha observado un alto crecimiento de esta actividad en la zona, con crías de *Oreochromis niloticus*, provenientes del estado de Tabasco, donde se desarrolla el cultivo de *C. urophthalmus*, y es común emplearla para crianza. Es importante documentar estos registros debido a que se desconocen los posibles efectos que estas tengan a futuro sobre la ictiofauna nativa, particularmente por el tipo de alimentación que *C. urophthalmus* posee, principalmente carnívora, que ya está formando parte de la pesquería de Malpaso y podría competir con *Petenia splendida*.

Palabras clave: *Cichlasoma urophthalmus*, *Gambusia sexradiata*, presa Malpaso, nuevos registros.

ABSTRACT

Chiapas has a great ichthyofaunistic and hydrological richness; It highlights the presence of two basins, the Usumacinta and the Grijalva; on the latter are the Malpaso dam (Nezahualcoyotl), during the period from April to July 2014 found two new records of species: *Cichlasoma urophthalmus* (21) and *Gambusia sexradiata* (17), Cichlidae and Poeciilidae respectively, both with distribution of the Atlantic slope from Veracruz to Guatemala (to Nicaragua for *C. urophthalmus*), covering the states of Tabasco and northern Chiapas; however, in several previous studies conducted in the middle and upper basin of the Grijalva, were not recorded such species, so it is considered that the presence of these is due to an introduction intentionally for aquaculture purposes, since there has been a high growth of this activity in the area, with hatchlings of *Oreochromis niloticus*, from the state of Tabasco, where the cultivation of *C. urophthalmus* develops, and it is common to use it for breeding. It is important to document these records because the possible effects these have a future on the native fish fauna, particularly the type of food that has *C. urophthalmus*, manly carnivorous, which is already part of the Malpaso fishery and could compete with *Petenia splendida*.

Keywords: *Cichlasoma urophthalmus*, *Gambusia sexradiata*, Malpaso dam, new records.

INTRODUCCIÓN

Chiapas posee una de las mayores riquezas hidrológicas del país cuenta con 265 kilómetros de litoral, la influencia de las dos vertientes; la del Pacífico y la del Atlántico, y la presencia de dos cuencas la del Usumacinta y la del Grijalva (Lozano y Contreras, 1987); sobre esta última se encuentran diversas presas hidroeléctricas. Además, se caracteriza por poseer una importante di-

versidad de peces (Orozco, 2004). Del total de especies de peces continentales en el estado, 103 se encuentran en la región hidrológica de la costa de Chiapas, 112 en la región hidrológica del Grijalva-Usumacinta y sólo 10 especies son comunes en ambas regiones. Encontrándose el 85% del total de las especies dulceacuícolas en la región Grijalva-Usumacinta, en el cual ambos ríos tienen una similitud del 72%, comparten 68 especies; y 28 especies son exclusivas (14 especies diferentes en cada

una de ellas) (Rodiles-Hernández, 2005). De acuerdo con Velasco (1976), diversas localidades a lo largo del río Grijalva desarrollaban importantes pesquerías, pero la presa Malpaso modificó el sistema hidrológico del río Grijalva con la formación de dos cuencas que cambiaron y redujeron drásticamente su diversidad de peces (Rodiles-Hernández, 2005). Sin embargo, los grandes embalses en el estado de Chiapas, se han constituido como una de las bases importantes del desarrollo de una pesca comercial continental, que actualmente da sustento y empleo a un gran número de familias (Martínez, 2009). Una de las especies que sustentan diversas pesquerías en otros estados es *Cichlasoma urophthalmus* miembro de la familia Cichlidae que juntamente con la familia Poeciliidae son las mejores representadas para el estado de Chiapas, en esta última se encuentra *Gambusia sexradiata* cuya distri-

bución de ambas especies se restringe para la parte norte del estado de Chiapas (Miller *et al.*, 2005).

ÁREA DE ESTUDIO

La presa hidroeléctrica Nezhualcóyotl (Malpaso) se encuentra ubicada en la cuenca media del Grijalva, en los municipios de Tecpatán y Ocozocoautla en el noreste del estado de Chiapas dentro de las coordenadas geográficas 17° 15' de latitud Norte y 93° 40' de longitud Oeste, la cual pertenece a la provincia fisiográfica de la Sierra Madre del Sur y Sierra de Chiapas, en su estribación hacia el Golfo de México (CFE, 1980 citado por Pérez, 2005). El área de estudio comprendió dos localidades de la presa Malpaso, 1) Embarcadero de Apic-pac (17° 03' 27.9" N y 93° 28' 00.6" W) y 2) frente a Raudales (17° 10' 45.6" N y 93° 36' 59.9" W) (figura 1).

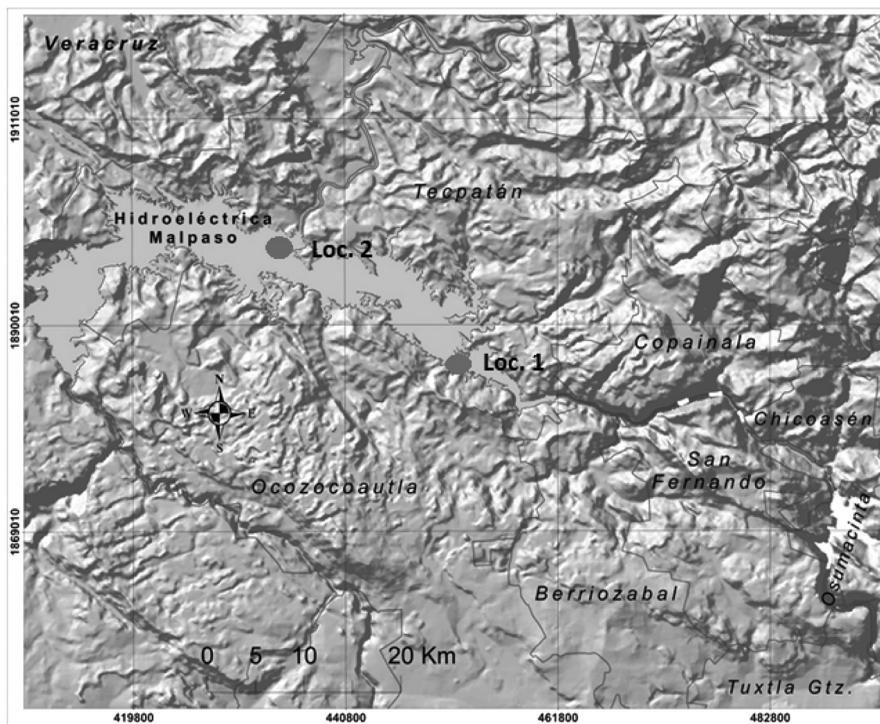


FIGURA 1

Ubicación de Apic-pac (Loc. 1) y Raudales (Loc.2), presa Malpaso, Chiapas, México.

MÉTODO

El muestreo de peces se llevó a cabo utilizando una atarraya y una malla tipo chinchorrito, en cada una de las dos localidades, de la presa Nezhualcóyotl, desde

abril hasta julio de 2014, la identificación taxonómica de los peces se realizó utilizando literatura básica y claves, principalmente los trabajos de Álvarez del Villar (1970), Castro-Aguirre *et al.* (1999), Lozano y Contreras (1987), Velasco (1976) y Miller *et al.* (2005), así como descrip-

ciones originales y revisiones sistemáticas recientes. Los ejemplares fueron fijados en formalina al 10% y conservados en alcohol al 70%.

Además se revisó los registros de peces, depositados en la colección ictiológica regional del instituto de Cien-

cias Biológicas de la UNICACH (REGISTRO: CHIS-PEC- 210-03-09) que contiene entre otros, los registros del estudio realizado por Velázquez et al., en el periodo comprendido desde 2008 hasta 2013, que incluyó más de 30 localidades de muestreo (figura 2).

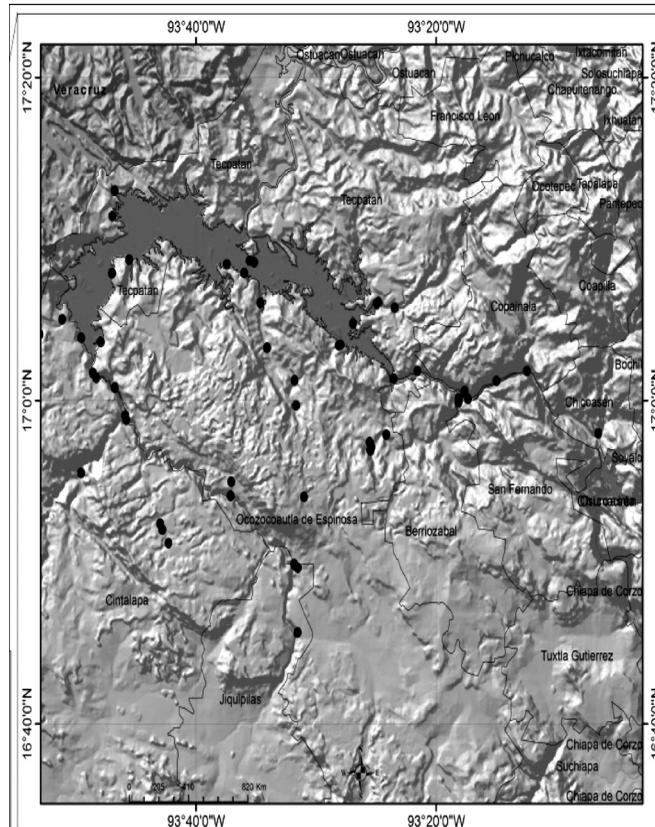


FIGURA 2

Localidades de muestreo desde 2008 hasta 2013 en la presa Malpaso.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se recolectó un total de 38 ejemplares de peces 21 de *Cichlasoma urophthalmus* y 17 de *Gambusia sexradiata*, ambas con distribución original de la vertiente del atlántico desde Veracruz hasta Guatemala (hasta Nicaragua para *C. urophthalmus*), abarcando los estados de Tabasco y norte de Chiapas (Miller et al., 2005), actualmente resguardados en la colección ictiológica de la UNICACH, de igual forma al revisar dicha colección, se encontraron dos registros recolectados en 1991 y 1994, de únicamente un ejemplar para cada registro de *C. urophthalmus* en la presa Malpaso, mientras que de *G. sexradiata* ningún registro. Sin embargo

diversos estudios llevados a cabo en la cuenca media y alta del Grijalva, no registraron dichas especies, particularmente de 2008 a 2013 Velázquez-Velázquez et al. (2011) realizó un estudio en la presa Malpaso y reserva de la Biosfera Selva El Ocote, reportando 45 especies de peces, sin registrarse la presencia de *C. urophthalmus* y *G. sexradiata* por lo que se considera que la presencia de estas se debe a una introducción de manera intencionada para fines de acuicultura, ya que se ha observado un alto crecimiento de esta actividad en la zona, con crías de *Oreochromis niloticus*, provenientes del estado de Tabasco, donde se desarrolla el cultivo de *C. urophthalmus*, y es común emplearla para crianza. Es importante documentar estos registros debido a

que se desconocen los posibles efectos que estas tengan a futuro sobre la ictiofauna nativa, particularmente por el tipo de alimentación que *C. urophthalmus* posee principalmente carnívora, que ya está formando parte de la pesquería de Malpaso y podría competir con *Petenia splendida*.

Se sugiere hacer un análisis de secuenciación genética para su comparación con los resultados de Harrison *et al.* (2014), quien muestreo el sur de México y Centroamérica, y así determinar a qué población y de qué región pertenecen estos ejemplares recolectados.

CONCLUSIONES

Se registra la presencia de *C. urophthalmus* y *G. sexradiata*, para la presa Malpaso, Chiapas, México. La presencia de estas especies parece ser debido a una introducción de manera intencionada con fines de acuicultura, sin embargo deberá realizarse un estudio de secuenciación para comparar con otros trabajos y verificar su procedencia.

LITERATURA CITADA

- ÁLVAREZ D.J., 1970. *Peces mexicanos*. Comisión Nacional Consultiva de Pesca. México. CONAPESCA...México D.F. 166 p.
- CASTRO-AGUIRRE, J.L., H.S. ESPINOZA-PÉREZ, Y J.J. SCHMITTER-SOTO, 1999. *Ictiofauna estuarino-lagunar y vicaria de México*. Editorial Limusa / Instituto Politécnico Nacional, México. D.F., 711 p.
- HARRISON E, J.C. TREXLER, T. M. COLLINS, E. VAZQUEZ-DOMÍNGUEZ & U. RAZO MENDIVIL, 2014. Genetic Evidence for Multiple Sources of the Non-Native Fish *Cichlasoma urophthalmus* (Günther; Mayan Cichlids) in Southern Florida. *PLoS ONE* 9(9): e104173. doi:10.1371/journal.pone.0104173.
- LOZANO, V. M. Y B.S. CONTRERAS, 1987. Lista Zoogeográfica y ecológica de la Ictiofauna continental de Chiapas, México. *The Southwestern Naturalist* 32 (2): 223-236.
- MILLER, R.R., 2005. *Freshwater Fishes of México*. University of Chicago. United States of America. 490 p.
- RODILES-HERNÁNDEZ, R., A.A. GONZÁLEZ-DÍAZ Y C. CHAN-SALA, 2005. Lista de peces continentales de Chiapas, México. *Hidrobiológica* 15 (2 Especial): 245-253.
- VELASCO, C.R., 1976. *Los Peces de Agua dulce del Estado de Chiapas*. Ediciones del Gobierno del Estado de Chiapas. Edit. Progreso. S.A., México. 143 p.
- VELÁZQUEZ-VELÁZQUEZ, E., S. CONTRERAS-BALDERAS, S. E. DOMÍNGUEZ-CISNEROS Y A. E. GÓMEZ-GONZÁLEZ, 2013. Riqueza y diversidad de peces continentales. En: *La biodiversidad en Chiapas: Estudio de Estado*. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO)/Gobierno del Estado de Chiapas, México. Pp. 275-282.
- MARTÍNEZ V., C.L., 2009. *Riqueza ictiofaunística y actividad pesquera en el municipio de la Concordia, presa la Angostura, Chiapas, México*. Tesis de Licenciatura. UNICACH. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México. 66 p.
- OROZCO G.,M., 2004. *La pesca en Chiapas*. Tonalá, Chiapas, México. 72 p.
- PÉREZ M., E., 2005. *Biología alimentaria y reproductiva de la tenguayaca Peteniasplendida (Günther, 1862) en la presa Nezahualcóyotl, Malpaso, Chiapas*. Tesis de Licenciatura. UNICACH. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México. 52 p.
- VELÁZQUEZ VELÁZQUEZ, E., 2011. *Inventario de peces y crustáceos decápodos de la Reserva de la Biosfera Selva El Ocote y Presa Nezahualcóyotl (Malpaso), Chiapas México*. Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. Escuela de Biología. Base de datos SNIB-CONABIO proyecto FM005. México D.F.

Uso del espacio de la *chara verde* (*Cyanocorax yncas* (Boddaert, 1783, Aves, Corvidae) en la Zona Sujeta a Conservación Ecológica El Zapotal, Chiapas, México

Mariela Moreno Aguilar¹*, Marco Antonio Altamirano González-Ortega²,
David Alberto Muñoz Zetina¹ y Ana Guadalupe Rocha Loredo¹

¹Instituto de Ciencias Biológicas. Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. Ira. Sur Poniente 1460, Centro, 29000. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México. | ²Secretaría de Medio Ambiente e Historia Natural, Coordinación Técnica de Investigación. Calzada de los Hombres Ilustres s/n. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, 29000.* Correspondencia: mary.479@hotmail.com

RESUMEN

Se realizó el estudio del uso del espacio de la chara verde (*Cyanocorax yncas*) en la Zona Sujeta a Conservación Ecológica El Zapotal, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. Se determinaron dos periodos de análisis: desde octubre de 2013 hasta enero de 2014 como periodo no reproductivo y desde febrero hasta mayo de 2014, como periodo reproductivo. Mediante el método de muestreo total aleatorio, se realizaron observaciones mensuales de individuos de *C. yncas*, en seis cuadrantes de 230 x 230 m, entre las 7:00 am y 1:30 p.m. Se empleó el programa Home Range, v.1.5 para el análisis de 640 registros georeferenciados: 257 registros correspondieron al periodo no reproductivo y 383 al periodo reproductivo. El uso del espacio en general se ubicó entre 1 y 38.5 hectáreas, para el periodo no reproductivo resultó estar entre 1 y 36.0 hectáreas y para el periodo reproductivo entre 0.7 y 24.9 hectáreas. Los resultados señalan un requerimiento de uso del espacio por parte de *C. yncas* en el periodo reproductivo, de por lo menos un 20% más de superficie. Se requiere, desarrollar una estrategia de conservación a largo plazo para la chara verde, con base en la información generada sobre uso del espacio, donde se reconozca la variación temporal y espacial de los procesos ecológicos en los que la especie está involucrada, así como las interacciones de competencia y la dispersión.

Palabras clave: aves, córvidos, área natural protegida, urbanización.

ABSTRACT

We studied the use of space of the Green Jay (*Cyanocorax yncas*) in the Subject Zone to Ecological Conservation El Zapotal, Tuxtla Gutierrez, Chiapas. Two periods of analysis they were determined: non-reproductive period (October 2013 to January 2014) and reproductive period (February to May 2014). We use the total random sampling for make monthly observations of individuals of *C. yncas*, in six quadrants of 230 x 230 m between 7:00 and 13:30 hours. We used the Home Range program v.1.5 for the analysis of 640 records georeferenced: 257 records correspond to non-reproductive period, and 383 to reproductive period. The result of use of space in general was between 1 and 38.5 hectares. To the non-reproductive period the use of space was between 1 and 36.0 hectares and the reproductive period was between 0.7 and 24.9 hectares. The results indicate a requirement for use of space by *C. yncas* in the reproductive period of at least 20% more surface area. It is required to develop a conservation strategy of long term based on the information generated at use of space, where the temporal and spatial variation of ecological processes where *C. yncas* participates, are recognized, as well as competitive interactions and dispersion.

Keywords: birds, corvids, natural protected area, urbanism.

INTRODUCCIÓN

La pérdida, degradación y fragmentación del hábitat, modifican los patrones de distribución, abundancia y composición de las especies de las comunidades (Rangel *et al.*, 2013). No obstante, Chiapas es uno de los estados con mayor riqueza de aves a nivel nacional (Escalante-Pliego *et al.*, 1998), con un registro de 694 especies (Rangel-Salazar *et al.*, 2013), que es producto

de la posición geográfica que ocupa y por su compleja topografía (Navarro-Sigüenza *et al.*, 2014). A pesar del grado de alteración que presentan en Chiapas algunos ecosistemas, son escasos los estudios de aves que se han realizado a nivel de especie dentro de las Áreas Naturales Protegidas de Chiapas. Estos sitios son considerados estratégicos para la conservación de los ecosistemas y las especies (Jiménez-González 2013).

En Chiapas, se han realizado estudios de diversa índole con especies de aves, como el quetzal y el pavón en la Reserva de la Biosfera El Triunfo (Solórzano *et al.*, 2003 y González-García, 1984); sin embargo en aquellas áreas naturales ubicadas dentro de zonas conurbadas como la Zona Sujeta a Conservación Ecológica (ZSCE) El Zapotal, en el municipio de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, no existen investigaciones a este nivel. Estudios sobre la distribución y uso del espacio de especies representativas de estas zonas, pueden ser indicativos para explicar como la variación espacio-temporal en los ecosistemas es influenciada por la alta fragmentación del hábitat, sobre todo en áreas con un elevado crecimiento urbano (Alberti, 2008).

La chara verde (*Cyanocorax yncas*) es un ave representativa del trópico de América del Norte y se distribuye ampliamente en Chiapas y en la ZSCE El Zapotal. Esta especie pertenece a la familia Corvidae (De Juana *et al.*, 2010), es una especie residente y altamente territorial, que se distribuye desde el sur de Texas, hasta Colombia y Bolivia. En México se distribuye de la vertiente del Pacífico, hacia el sur y este a través de la Península de Yucatán (Howell y Webb, 1995). La chara verde es una especie considerada abundante dentro La ZSCE El Zapotal (Fernández, 1998).

Por lo expuesto anteriormente, se estimó el espacio que utiliza la chara verde en La ZSCE El Zapotal. Ese tipo de estudios, pueden derivar en acciones de manejo que propicien la coexistencia de las especies (Niemelä, 2000; González-Oreja, 2010). También se consideran prioritarios, sobre todo en áreas naturales protegidas que se encuentran rodeadas de grandes amenazas que ejerce la creciente urbanización y que pueden estar poniendo en riesgo la sobrevivencia y reproducción de las especies (Halfpter, 1994).

METODOLOGÍA

La ZSCE El Zapotal se ubica en la Depresión Central de Chiapas, en la elevación conocida como Meseta de Copoya (Müllerried, 1957), con una superficie de 192.57 hectáreas: 100 hectáreas como centro ecológico recreativo y 92.57 hectáreas como zona de amortiguamiento. La ubicación de la ZSCE El Zapotal dentro de la zona urbana del municipio de Tuxtla Gutiérrez, minimiza las amenazas antropogénicas originadas por el crecimiento poblacional (Fernández, 2002). En esta reserva, se han registrado 521 especies vegetales y 118 especies de aves

en libertad, donde sobresale la chara verde (*Cyanocorax yncas*) por su elevada abundancia (Fernández, 1998).

Entre octubre de 2013 y mayo de 2014, durante las tres últimas semanas de cada mes, se realizaron observaciones de individuos de *Cyanocorax yncas* en la ZSCE El Zapotal. El registro se realizó dentro de seis cuadrantes de 230 x 230 m², delimitados mediante un GPS Garmin^{MR}. Los cuadrantes de muestreo se distribuyeron en diferentes tipo de vegetación del área de estudio: dos en Selva Alta Perennifolia (SAP), dos en Acahual de Selva Alta Perennifolia (ASAP) y dos en Selva Baja Caducifolia (SBC). Ver figura 1.

Los registros de *C. yncas* fueron obtenidos en cada uno de los cuadrantes, durante tres días a la semana, entre las 7:00 am y 1:30 p.m. y de forma alterna en cada visita, lo que permitió tener registros en cada uno de ellos, con un tiempo de muestreo de tres horas. Los datos fueron separados para su análisis en periodo no reproductivo, que comprendió desde octubre hasta enero (36 días de muestreo) y en periodo reproductivo, entre febrero a mayo (36 días de muestreo). El método utilizado fue el de muestreo total aleatorio (Fjeldså, 1999), que consiste en recorrer un cuadrante de forma aleatoria y en el momento de observar a los individuos de la especie seleccionada, se registran las coordenadas geográficas y su comportamiento.

Para poder conocer el espacio utilizado de *C. yncas* en la ZSCE El Zapotal, se empleó el programa Home Range, versión 1.5, que estima el ámbito hogareño con base en la distribución de una población o especie, utilizando el método Kernel fijo. Este análisis se realizó para todos los registros georreferenciados en campo y en cada uno de los periodos (no reproductivo y reproductivo). El principal supuesto considerado en el modelo de distribución, fue el cumplimiento de independencia de los datos ($Iss > 1.0$), con base en el índice de Swihart y Slade (1985a, 1985b).

RESULTADOS

Uso del espacio en general

Se obtuvieron 640 registros de individuos de *C. yncas*. 257 registros correspondieron al periodo no reproductivo y 383 al periodo reproductivo. El análisis geográfico señaló que los datos analizados son independientes entre sí ($Iss > 1.0$) y generó un modelo resultante de la distribución de *C. yncas* en cinco contornos. El uso del espacio en general resultante, señaló que se encuentra entre 1 y 38.5 hectáreas (Cuadro 1, figura 2).

Contorno	Uso del espacio (%)	No. de individuos	Área (has)
1	25	17.02	1
2	50	7	3.4
3	75	3.01	9
4	95	0.81	20.9
5	100	0.02	38.5

CUADRO 1

Uso del espacio en general de *C. yncas*, en la Zona Sujeta a Conservación Ecológica El Zapotal.

Contorno	Uso del espacio (%)	No. de individuos	Área (ha)
1	25	15.65	1.0
2	50	6.90	3.0
3	75	3.35	8.0
4	95	0.88	19.0
5	100	0.02	36.0

CUADRO 2

Uso del espacio de *C. yncas*, en periodo no reproductivo, en la Zona Sujeta a Conservación Ecológica El Zapotal.

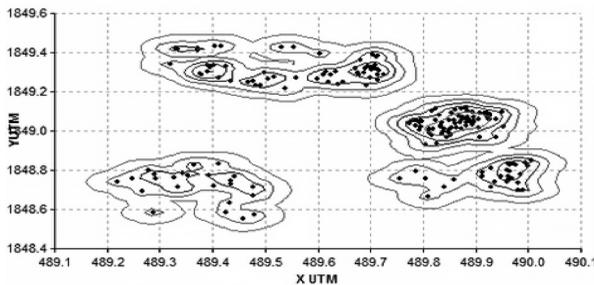


FIGURA 2

Representación geográfica de uso del espacio en general de *C. yncas*, en la Zona Sujeta a Conservación Ecológica El Zapotal. Contorno gris= 25% de uso. Contorno verde= 50% de uso. Contorno marrón =75% de uso. Contorno azul= 95% de uso y contorno rojo= 100%. Los puntos representan los registros individuales de los individuos de *C. yncas* registrados.

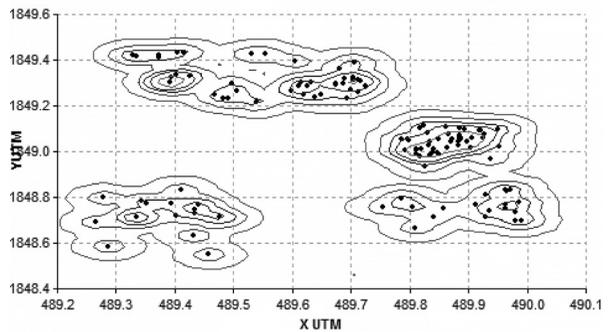


FIGURA 3

Representación geográfica de uso del espacio utilizado durante el periodo no reproductivo por *C. yncas*, en la Zona Sujeta a Conservación Ecológica El Zapotal. Contorno gris= 25% de uso. Contorno verde= 50% de uso. Contorno marrón= 75% de uso. Contorno azul= 95% de uso y contorno rojo= 100%. Los puntos representan los registros individuales de los individuos de *C. yncas* registrados.

Uso del espacio en el periodo no reproductivo y reproductivo

Tanto en periodo no reproductivo como en periodo reproductivo, el análisis geográfico señaló independencia de los datos ($I_{ss} > 1.0$). Durante el periodo no reproductivo, el modelo resultante generó contornos de la distribución de *C. yncas* con una ocupación entre 1 y 36 hectáreas (cuadro 2 y figura 3). Para el periodo reproductivo la distribución de la ocupación se ubicó entre 0.7 y 24.9 hectáreas (cuadro 3 y figura 4).

Tomando el criterio de *C. yncas* > 1 individuo, en el modelo obtenido, la estimación de superficie obtenida para el periodo no reproductivo fue de ocho hectáreas (contorno marrón), que es menor al obtenido para el periodo reproductivo, que es de 12.2 hectáreas (contorno verde). Lo anterior señala un mayor requerimiento de uso del espacio por parte de *C. yncas* en el periodo reproductivo, de por lo menos un 20% más de superficie dentro de la ZSCE El Zapotal.

La información obtenida por periodo, evidencia la importancia de la ZSCE El Zapotal para *C. yncas*, al proporcionar un uso de espacio de más de un tercio (24.9-36.0 hectáreas) de la superficie total de la zona de amortiguamiento. Además, la necesidad señalada de una mayor superficie para los aspectos reproductivos se hace evidente ya que se tienen registros de *C. yncas* más allá de la zona de amortiguamiento, en el área pública del Zoológico Regional Miguel Álvarez del Toro (ZOOMAT), que se encuentra en la parte central de la ZSCE El Zapotal (Gobierno Constitucional del estado de Chiapas, 1990). En esta área, se han registrado nidos activos de *C. yncas* (Chanona, 2013).

Debido a que en la ZSCE El Zapotal, las amenazas antropogénicas se encuentran minimizadas, la estrategia reproductiva de *C. yncas* parece ser ampliar su rango de uso del espacio para este fin. Especies del mismo género (e.g. *C. dickeyi*), en condiciones ambientales completamente dife-

rentes (bosques de pino-encino con fuertes disturbios como la tala), son más vulnerables y puede existir disminución de sus nidadas (Monterrubio-Rico, 2010; Panjabi *et al.*, 2005), contrario a lo observado en *C. yncas*, ya que se encuentra protegido por la ZSCE El Zapotal y por consiguiente, las evidencias obtenidas señalan la capacidad de ampliar su rango de uso del espacio para la reproducción.

Contorno	Uso del espacio (%)	No. de individuos	Área (ha)
1	25	23.5	0.7
2	50	11.9	2.3
3	75	5.46	5.4
4	95	1.33	12.2
5	100	0.03	24.9

CUADRO 3

Uso del espacio de *C. yncas*, en periodo reproductivo, en la Zona Sujeta a Conservación Ecológica El Zapotal.

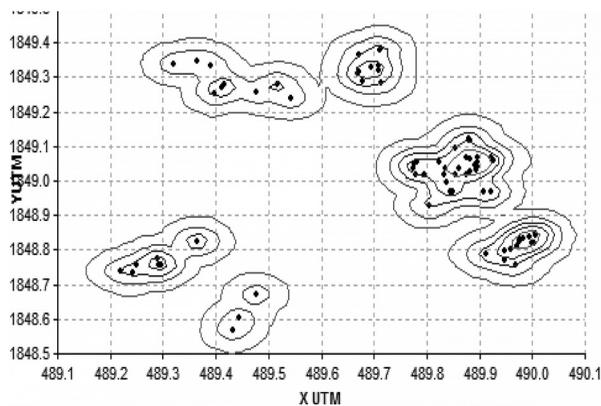


FIGURA 4

Representación geográfica de uso del espacio utilizado durante el periodo reproductivo por *C. yncas*, en la Zona Sujeta a Conservación Ecológica El Zapotal. Contorno gris= 25% de uso. Contorno verde= 50% de uso. Contorno marrón= 75% de uso. Contorno azul= 95% de uso y contorno rojo= 100%. Los puntos representan los registros individuales de los individuos de *C. yncas* registrados.

CONCLUSIONES

El uso del espacio total que la chara verde (*Cyanocorax yncas*) puede utilizar dentro del área de la zona de amortiguamiento de la ZSCE El Zapotal, con base en el modelo obtenido, se

encuentra entre 1 y 38.5 hectáreas. Sin embargo tomando en cuenta el criterio de $C. yncas > 1$, en el modelo obtenido, la estimación de superficie fue de tan sólo nueve hectáreas, que representa el 8% de la superficie total del área natural protegida. Bajo esta misma consideración, *C. yncas* requiere para el periodo no reproductivo hasta 8 hectáreas y para el periodo reproductivo hasta 12.2 hectáreas.

Se observó que *C. yncas* también utiliza espacios más allá de la zona de amortiguamiento dentro de la ZSCE El Zapotal, dentro del área pública del ZOOMAT, donde se han registrado nidos activos de la especie. Posiblemente ocurra algo semejante hacia la zona suroeste, en dirección al Cerro Mactumactzá, donde el macizo forestal es todavía continuo. Por consiguiente, investigaciones futuras deben estar relacionadas en comprender como la dinámica del hábitat en la Zona Sujeta a Conservación Ecológica El Zapotal puede estar afectando la supervivencia de *C. yncas*, así como su dispersión hacia hábitats que circundan a la reserva. Se requiere entonces, desarrollar una estrategia de conservación a largo plazo para la chara verde, con base en información sobre la variación temporal y espacial de los procesos ecológicos en los que está involucrada, como las interacciones de competencia y la dispersión de los juveniles, ya que de no hacerlo pueden existir problemas en el uso del espacio, coexistencia dentro de la ZSCE El Zapotal y repercutir en su reproducción.

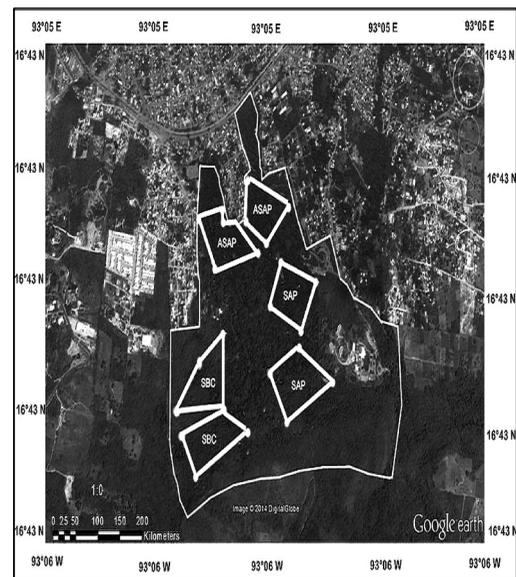


FIGURA 5

Ubicación de los cuadrantes de muestreo para el registro de *Cyanocorax yncas*, en la Zona Sujeta a Conservación Ecológica El Zapotal, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas.

LITERATURA CITADA

- ALBERTI, M., 2008. *Advances in urban ecology. Integrating humans and ecological processes in urban ecosystems*. Springer Science. New York. USA:
- CHANONA, P. A.K., 2013. *La red de anidación de aves en la Reserva el Zapotal Chiapas. Tuxtla Gutiérrez Chiapas*. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, UNICACH. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México. P. 56.
- DE JUANA, E., J. DEL HOYO, M. FERNÁNDEZ-CRUZ, X. FERRER, R. SÁEZ-ROYUELA Y J. SARGATAL, 2010. Nombres en castellano de las aves del mundo recomendados por la Sociedad Española de Ornitología (Decimocuarta parte: Orden Passeriformes, Familias Malacotoniidae a Passeridae). *Ardeola* 57: 199-205.
- ESCALANTE-PLIEGO, P., A.G. NAVARRO-SIGÜENZA Y A.T. PETERSON, 1998. Un análisis geográfico, ecológico e histórico de la diversidad de aves terrestres de México. Pp. 279-304. En: T. P. Ramamoorthy, R. Bye, A. Lot y J. Fa (Eds). *Diversidad Biológica de México: orígenes y distribución*. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. DF.
- FERNÁNDEZ, M.Y., 1998. *Contribución al estudio de la fauna silvestre libre de El Zapotal, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas*. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Ciencias, D.F., México.
- , 2002. Áreas naturales en ciudades y su conservación: El caso de la avifauna de El Zapotal, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México. Tesis de Maestría. El Colegio de la Frontera Sur. San Cristóbal de Las Casas, Chiapas, México.
- FJELDSÅ, J., 1999. The impact of human forest disturbance on the endemic avifauna of the Udzungwa Mountains. Tanzania. *Bird Conservation International* 1: 47-62.
- GOBIERNO CONSTITUCIONAL DEL ESTADO DE CHIAPAS, 1990. Acuerdo del ejecutivo del estado mediante el cual se declara zona de amortiguamiento ecológico del zoológico regional de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, la superficie territorial de 92-57-31 hectáreas. *Periódico Oficial Tuxtla Gutiérrez, Chiapas*. 99 (92): 1-4.
- GONZÁLEZ-GARCÍA, F., 1984. *Aspectos biológicos del pavón Oreophasis derbianus G. R. Gray (Aves:Cracidae) en la reserva natural El Triunfo, municipio de Angel Albino Corzo, Chiapas, México*. Tesis de Licenciatura. Universidad Veracruzana. Facultad de Biología. Xalapa, Ver, México. 84 p.
- GONZÁLEZ-OREJA, J.A., 2010. Birds of different biogeographic origins respond in contrasting ways to urbanization. *Biological Conservation* 144: 234-242.
- HALFFTER, G., 1994. Conservación de la biodiversidad y áreas protegidas en los países tropicales. *Ciencias* 36: 4-13.
- HOWELL, S.N.G. & S. WEBB, 1995. *A guide to the birds of Mexico and northern Central America*. Oxford University Press. New York, USA.
- JIMÉNEZ-GONZÁLEZ, F.J., 2013. Las Áreas Naturales Protegidas Federales. pp. 391-396. En: *La Biodiversidad en Chiapas: Estudio de Estado*. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (conabio) y Gobierno del estado de Chiapas, México.
- MONTEERRUBIO-RICO, T.C., 2010. Ficha técnica de *Cyanocorax dickeyi*. En: Escalante-Pliego. P. (compilador). *Fichas sobre las especies de aves incluidas en Proyecto de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-059- ECOL-2000. Parte 1*. Instituto de Biología, UNAM. Bases de datos SNIBCONABIO. Proyecto No. W007. México, D.F.

- MÜLLERRIED, F.K.G., 1957. *La Geología de Chiapas*. Gobierno Constitucional del Estado de Chiapas. México. 180 p.
- NAVARRO-SINGÜENZA, A.G., M.F. REBÓN-GALLARDO, A. GORDILLO-MARTÍNEZ, A. TOWNSEND-PETERSON, H. BERLANGA-GARCÍA Y L.A. SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, 2014. Biodiversidad de aves de México. *Revista Mexicana de Biodiversidad. Suplemento 85: S476-S495*.
- NIEMELÄ, J., 2000. Biodiversity monitoring for decision-making. *Ann. Zool. Fennici 37: 307-317*.
- PANJABI, A.O., E.H. DUNN, P.J. BLANCHER, W.C. HUNTER, B. ALTMAN, J. BART, C.J. BEARDMORE, H. BERLANGA, G.S. BUTCHER, S.K. DAVIS, W.D. DEMAREST, R. DETTMERS, W. EASTON, H. GÓMEZ DE SILVA GARZA, E.E. IÑIGO-ELIAS, D.N. PASHLEY, C.J. RALPH, T.D. RICH, K.V. ROSENBERG, C.M. RUSTAY, J.M. RUTH, J.S. WENDT & T.C. WILL, 2005. *The Partners in Flight handbook on species assessment*. Version 2005. Partners in Flight Technical Series No. 3.
- RANGEL-SALAZAR, J.L., P. ENRÍQUEZ-ROCHA, M.A. ALTAMIRANO-ORTEGA, C.M. CABALLERO, E.C. CASTELLANOS, P.G. DOMÍNGUEZ, J.A. MARTÍNEZ-ORTEGA, Y U.R.M. RODRÍGUEZ, 2013. Diversidad de aves: un análisis espacial pp.329-337. En: *La Biodiversidad en Chiapas: Estudio de Estado*. Comisión nacional para el conocimiento y uso de la biodiversidad (CONABIO) y Gobierno del Estado Chiapas.
- SOLORZANO, S., M.A. CASTILLO- SANTYAGO, D.A. NAVARRETE-GUTIÉRREZ & K. OYAMA, 2003. Impact of the loss of Neotropical Highland forests on the species distribution: a case study using resplendent quetzal and endangered bird species. *Biological Conservation 114: 341-349*.
- SWIHART, R. K. & N.A. SLADE, 1985a. Influence of Sampling Interval on Estimates of Home Range Size. *Journal of Wildlife Management 49 (4): 1019-1025*.
- SWIHART, R. K. & N.A. SLADE, 1985b. Testing for Independence of Observations in Animal Movements. *Ecology 66 (4): 1176-1184*.

Caracterización de un gen con similitud a un transportador tipo abc de *Metarhizium anisopliae* (Hipocreales: Clavicipitaceae)

Miguel Ángel Hernández-Espinosa^{1,2}, Juan Carlos Torres-Guzmán²,
Gloria Angélica Hernández-González², Selene Lucero Aguilar-Gordillo¹.

¹Centro de Investigaciones Costeras, Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. Libramiento Norte Poniente 1150, col. Lajas Maciel, 29000 Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México. | ²Departamento de Ciencias Naturales y Exactas, Departamento de Biología, Universidad de Guanajuato, Campus Guanajuato Noria Alta s/n, Colonia Noria Alta, 36050 Guanajuato, Guanajuato, México. miguel.hernandez@unicach.mx

Resumen

Metarhizium anisopliae es un hongo entomopatógeno empleado en el control biológico de insectos plaga alrededor del mundo. Con el propósito de elucidar los mecanismos involucrados en las diversas etapas del ciclo infectivo de *M. anisopliae* hacia su hospedero, se analizó la secuencia del gen Mamdr2 que presenta homología con proteínas transportadoras del tipo ABC, las cuales se caracterizan por transportar una amplia variedad de sustratos y juegan un papel principal en la resistencia a multifarmacos (MDR). El análisis de la expresión del gen Mamdr2 de *M. anisopliae* durante la invasión a su hospedero *Plutella xylostella*, indicó que este gen se expresa a partir de las 48 horas, cuando se inicia el crecimiento invasivo, lo que sugiere que el producto del gen participa en el proceso infectivo y durante la formación del nuevo conidio, posiblemente para iniciar un nuevo ciclo infectivo en otro hospedero. La adición de compuestos tóxicos para *M. anisopliae* como son los antifúngicos incrementó la expresión del gen Mamdr2 a nivel de RNA mensajero, sugiriendo que el producto de este gen podría participar en la destoxificación de las células en *M. anisopliae* durante la invasión a su hospedero.

Palabras clave: *M. anisopliae*, antifúngicos, control biológico, expresión génica.

Summary

Metarhizium anisopliae is an entomopathogenic fungus used in the biological control of pest insects around the world. For the purpose of elucidating the mechanisms involved in the different stages of the infectious cycle of *M. anisopliae* into its host, we analyzed the sequence Mamdr2 gene having homology to ABC transporters, which are characterized by carrying a wide variety of substrates and play a major role in multidrug resistance (MDR). Analysis of the expression of Mamdr2 gene of *M. anisopliae* during the invasion of its host *Plutella xylostella*, indicated that this gene is expressed after 48 hours, when the invasive growth starts, suggesting that the product of this gene is involved in the infective process and during the formation of the new conidium, possibly to start a new infection cycle in another host. The addition of toxic compounds to *M. anisopliae* such as antifungals, increased Mamdr2 gene expression of messenger RNA level, suggesting that the product of this gene might be involved in the detoxification of cells during invasion *M. anisopliae* its host.

Keywords: *M. anisopliae*, antifungals, biological control, gene expression

INTRODUCCIÓN

M. anisopliae es un hongo entomopatógeno que crece naturalmente en el suelo y ha sido aislado de insectos infectados de diferentes partes del mundo (Roberts y St. Leger, 2004). *M. anisopliae* es utilizado como biocontrolador exitoso para más de 200 insectos plaga en la agricultura, ganadería e incluso en vectores de enfermedades humanas como el mosquito vector de la malaria *Anopheles stephensi* (Kannan *et al.*, 2008). El estudio del mecanismo y de los genes involucrados en el

proceso infectivo de este hongo entomopatógeno sobre su hospedero es de interés para entender el mecanismo de acción y así obtener cepas genéticamente modificadas que sean más eficientes en el control biológico de especies blanco (Freimoser *et al.*, 2003).

En el presente estudio se evaluó el gen Mamdr2 que presenta homología con proteínas transportadoras del tipo ABC. Los transportadores ABC presentes en membranas plasmáticas tienen el potencial para secretar compuestos

antifúngicos al exterior de la membrana, de esta manera evitan la acumulación de compuestos tóxicos en sus sitios blancos dentro de las células miceliales ayudando a prevenir su acción tóxica. Los transportadores ABC en hongos son los más importantes ya que están involucrados en la protección contra antifúngicos (De Waard *et al.*, 2006). El primer transportador ABC caracterizado fue PDR5 de *Saccharomyces cerevisiae* el cual confiere resistencia a muchas toxinas no relacionadas. Otros transportadores ABC han sido identificados en hongos patógenos oportunistas como *Candida albicans*, *Aspergillus nidulans* y en hongos fitopatógenos como *Magnaporthe grisea*, *Botrytis cinerea* y *Mycosphaerella graminicola*, cuya función es la de proveer protección al hongo contra antibióticos, compuestos de plantas y fungicidas (Sun *et al.*, 2006).

En el presente trabajo se analizó la participación del gen Mamdr2 en respuesta a antifúngicos y durante el proceso infectivo contra su hospedero *P. xylostella*, un insecto plaga de los cultivos de crucíferas en México.

METODOLOGÍA

Organismos biológicos

Para los bioensayos se utilizó la cepa CARO19 de *M. anisopliae*, procedente del Centro Nacional de Referencia, Tecomán, Colima, México. Así como su hospedero el insecto *P. xylostella*, obtenido del departamento de agronomía de la Universidad de Guanajuato.

Medios de cultivo sólidos y líquidos

Los medios de cultivo empleados para *M. anisopliae* fueron: Medio Mínimo (MM), Medio Dextrosa Sabourad (MDS) y para los medios de cultivo sólido se adicionaron 20 g de agar bacteriológico (Bioxon) por litro de medio de cultivo, con un pH final de 5.7 ± 0.2 . En el cultivo en Medio Sólido se sembraron 500 conidios/mL de *M. anisopliae*, incubando a 28 °C durante 10 días para la producción de conidios. Los conidios de *M. anisopliae* se sembraron en 100 mL de MDS líquido a una concentración de 1×10^6 conidios/mL, se incubaron por 48 h a 28 °C, en agitación constante a 160 rpm.

Recolección de conidios

Para la obtención de conidios de la cepa CARO19 de *M. anisopliae*, se sembraron (500 conidios/caja) en Medio Mínimo (MM) sólido, se incubaron a 28° C por 5-8 días, hasta observar conidiación. Se añadieron a la caja de Petri 10 mL de agua con TRITON X-100 al 0.1 % estéril, se

raspo con un asa de Nigransky estéril, para desprender las esporas del micelio. Las esporas desprendidas se recolectaron con una pipeta Pasteur estéril y se filtraron a través de una malla sintética a un tubo Corning de 50 mL estéril. Una vez colectadas las esporas, se centrifugaron a 5000 xg durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante y se lavaron con 15 ml de agua con TRITON X-100 al 0.1% tres veces, repitiendo el procedimiento anterior. Finalmente, los conidios se diluyeron 1:100 y se contaron en una cámara de Neubauer, para posteriormente guardarlos en agua con TRITON X-100 al 0.01% a 4%.

Extracción de ARN total

La extracción del ARN total se realizó mediante el método de Trizol® Reagent (Invitrogen). El micelio fue recolectado de los insectos infectados durante las diferentes etapas del ciclo infectivo.

Tratamiento de RNA total con ADNasas

Para remover el ADN contaminante y evitar que sirva como templado en los ensayos de RT-PCR semicuantitativo, las muestras de ARN total en las distintas condiciones de crecimiento, fueron tratadas con ADNasa RQ1 RNAase-free DNAase (Promega) según las especificaciones del fabricante.

Reacción en cadena de polimerasa

La amplificación del ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa se realizó de la siguiente manera, la mezcla de reacción contiene 150-200 ng/ μ L de ADN como cadena patrón, 1 μ g/ μ L por cada oligonucleótido específico, 3 μ L H₂O grado HPLC y 19 a 44 μ L High Fidelity PCR Master Mix (Invitrogene) para completar un volumen final desde 25 hasta 50 μ L según sea el caso. Las condiciones generales de amplificación fueron; 5 min a 94°C, seguido de 30 ciclos de: 1 min a 94°C, 1 min a 55°C y 1 min a 72 °C, posteriormente un ciclo de 10 min a 72 °C. Se empleó un termociclador GeneAmp PCR System 9700 de Applied Biosystems.

RT-PCR

Para los ensayos de RT-PCR la síntesis del cDNA se realizó usando el kit ThermoScript RT-PCR System (Invitrogen), dicho cDNA se utilizó como cadena templado para el PCR utilizando el kit PCR SuperMix High Fidelity (Invitrogene) siguiendo las indicaciones del fabricante. Utilizando un termociclador GeneAmp PCR System 9700 de Applied Biosystems.

Análisis de la expresión *in vitro* del gen Mamdr2 de *M. anisopliae* durante su ciclo de vida en el hospedero *P. xylostella*. Se utilizó una suspensión de 1.5×10^9 conidios/ml en agua destilada con Triton X-100 al 0.5 % de la cepa CARO 19 de *M. anisopliae*, de la cual se asperjaron 0.5 ml sobre cada muestra de 25 larvas del tercer instar de *P. xylostella* contenidas en una caja de Petri, mediante una torre de microaspersión (Potter Precision Lab Spray Tower Burkard, manufacturing co. Ltd. Kmansworth Herst England) a una presión de 10 libras /pulgada².

Transcurridas las primeras 2 horas postinoculación, se alimentó a las larvas con hojas de brócoli cada 24 horas. Se recolectaron las muestras de 25 larvas cada una, durante diferentes tiempos postinoculación: 4, 8, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, y 192 h. Asimismo, se guardó una muestra de los conidios usados en la infección para el tiempo cero y se recolectaron los conidios usados en el tiempo 216 h, también se usaron 25 larvas sin infectar 48 horas. Todas las muestras se almacenaron a -70°C hasta que se les extrajo el ARN total. El ARN fue tratado con DNAasas previamente a los ensayos de RT-PCR semicuantitativo. La electroforesis se realizó por 120 min a 50 Voltios en geles de agarosa ultrapure TM agarose-1000 (invitrogene) al 3 %, conteniendo 4 μL de bromuro de etidio para cada 100 ml de agarosa.

Análisis de la expresión *in vitro* del gen Mamdr2 con antifúngicos y antibióticos

Se realizó el análisis de la expresión del gen Mamdr2 con los antifúngicos resveratrol, methotrexato, miconazol, ciclohexamida, glufosinato, carboxina y el antibiótico higromicina (tabla 1). Se recolectó micelio crecido en MM durante 48 horas, se filtró el micelio y se agregaron 50 ml de medio mínimo en matraces, posteriormente se adicionó el antifúngico usando para cada uno de ellos la mitad de la concentración mínima inhibitoria. Se agregó micelio a cada matraz con 50 ml de medio mínimo con el antifúngico. Se incubó durante 5 hrs y finalmente se recolectó el micelio y se guardó a -70°C . Posteriormente se realizó la extracción de ARN y se realizaron ensayos de RT-PCR para determinar el nivel de expresión en la presencia de cada antifúngico. Como control se usó el ARN obtenido de micelio sin exposición al antifúngico.

RESULTADOS

Análisis de la expresión *in vivo* del gen Mamdr2 de *M. anisopliae* durante la invasión a su hospedero *P. xylostella* Para realizar el análisis de la expresión del gen Mamdr2 durante el proceso infectivo del hongo a su hospedero

P. xylostella, se usaron larvas de tercer instar que fueron asperjadas con conidios de la cepa CARO 19 de *M. anisopliae*. Se monitorearon diferentes estadios de la infección mediante fotografías y se recolectaron larvas infectadas para realizar la extracción de ARN de los tiempos postinoculación a las 4, 8, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192 y 226 horas (figura 1C).

A partir de este ARN se hicieron ensayos de RT-PCR semicuantitativo amplificando simultáneamente, el gen Mamdr2 y el gen de expresión constitutiva utilizado como control. Se utilizó el programa Quanty One (BioRad), para medir el nivel de expresión del gen Mamdr2 comparándolo con la expresión del gen control de 156 pb correspondiente a un EST AJ274118 de expresión constitutiva (Freimoser *et al.*, 2003; Morales-Hernández *et al.*, 2010). Los productos se separaron mediante electroforesis y el análisis densitométrico de las bandas de amplificación mostrado en la figura 1A, indicó que el gen Mamdr2 está presente en el conidio, desaparece y no se expresa en las primeras 24 horas posteriores a la inoculación durante la germinación temprana y penetración. Su expresión reaparece a partir de las 48 horas durante el crecimiento invasivo, la cual continúa incrementando hasta las 120 horas, coincidiendo este máximo de expresión con el inicio de la conidiación sobre el cadáver del insecto. Aunque se presentan oscilaciones en los niveles del transcrito éste se mantiene alto hasta su empaquetamiento en el conidio (figura 1B).

Expresión del gen Mamdr2 en respuesta a antifúngicos y antibióticos

Se realizó el análisis de la expresión del gen Mamdr2 cuando el micelio está expuesto a los antifúngicos resveratrol, methotrexato, miconazol, ciclohexamida, glufosinato, carboxina y el antibiótico higromicina. Para ello el micelio de 48 horas, se suspendió en medio mínimo fresco y se le adicionó el antifúngico a concentración subletal (la mitad de la concentración mínima inhibitoria, tabla 1). Después de 5 horas de exposición al compuesto tóxico se extrajo el RNA y se realizaron ensayos de RT-PCR. En la figura 2, se observa un incremento de la expresión del gen Mamdr2 desde 40 % hasta 60 % en respuesta a los antifúngicos glufosinato, higromicina, ciclohexamida, miconazol y resveratrol. Un 20 % de incremento en la expresión en respuesta al glufosinato y solo en el caso del metotrexato no hubo cambio en los niveles de expresión del gen.

Antifúngicos	Concentración (µg/µl) DL ₅₀
Resveratrol	400
Metotrexato	200
Miconazol	100
Ciclohexamida	200
Higromicina	100
Carboxina	200
Glufosinato	50

TABLA 1

Concentración de antifúngicos usados en los ensayos de expresión del gen Mamdr2.

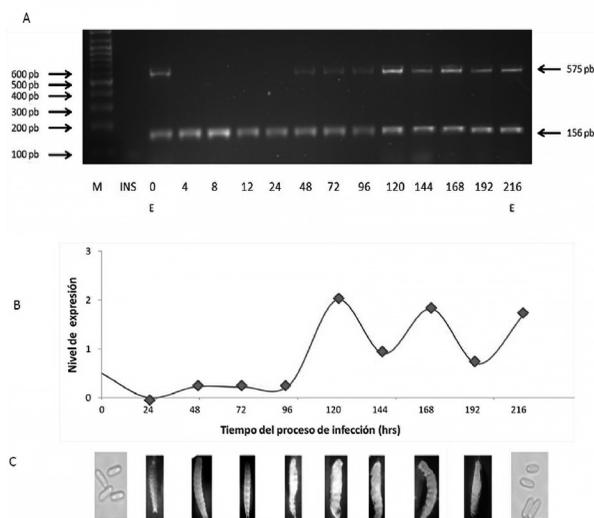


FIGURA 1

Figura 1. Análisis de la expresión el gen Mamdr2 de la cepa CARO19 de *M. anisopliae* mediante RT-PCR semicuantitativo durante el proceso de infección de larvas de *P. xylostella*. A) Productos de la amplificación mediante RT-PCR semicuantitativo, separados por electroforesis en gel de agarosa al 3%. B) Análisis densitométrico del nivel de expresión relativo del gen Mamdr2. El gen de expresión constitutiva EST AJ274118 se usó como control de carga en la reacción de PCR C) Aspecto de las larvas de *P. xylostella* durante el proceso de infección a distintos tiempos postinoculación con conidios del hongo. (M): marcador de tamaño molecular (GeneRuler™ DNA ladderMix 0.1-10 Kp). (E): Representa el producto de amplificación obtenido de esporas. INS: cDNA del insecto sin infectar.

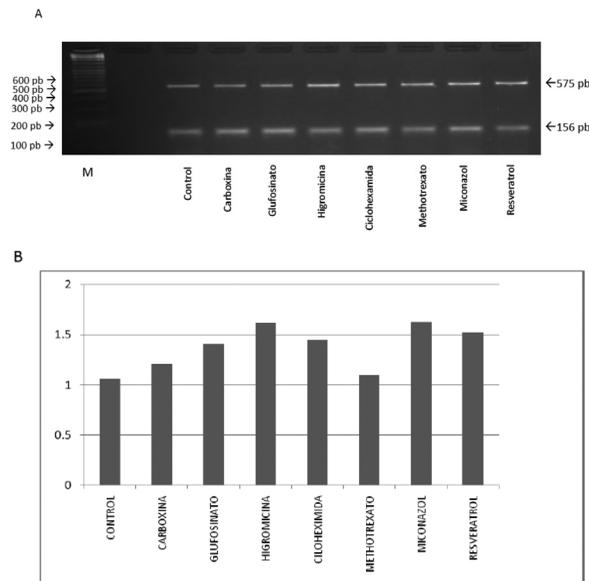


FIGURA 2

Análisis de la expresión del gen Mamdr2 de la cepa CARO19 de *M. anisopliae* durante la presencia de antifúngicos. En reacciones de RT-PCR semicuantitativo se evaluó la expresión del gen Mamdr2 en poblaciones de ARN de células expuestas al inhibidor. A) Productos de la amplificación mediante RT-PCR semicuantitativo, separados por electroforesis en gel de agarosa al 3%. B) Análisis densitométrico del nivel de expresión relativo del gen Mamdr2. El gen de expresión constitutiva EST AJ274118 se usó como control de carga en la reacción de PCR. (M): marcador de tamaño molecular (GeneRuler™ DNA ladderMix 0.1-10 kp). (Control): Representa el RNA sin presencia de antifúngicos.

DISCUSIÓN

En el ensayo de expresión in vivo para el gen Mamdr2 de *M. anisopliae* durante la invasión al hospedero *P. xylostella*, se observó que en la cepa CARO19, la expresión del gen comienza a partir de las 48 horas coincidiendo con el crecimiento invasivo del hongo dentro del cuerpo del insecto. Esta expresión se va incrementando, alcanzando un máximo a las 120 horas, cuando el micelio emerge e inicia el proceso de conidiación sobre el exoesqueleto del insecto. Aunque después de este tiempo se observaron oscilaciones en los niveles de expresión del gen, la expresión se mantiene alta hasta la conidiación completa. Adicionalmente observamos que este gen responde a

todos los antifúngicos probados (excepto a methotrexato) incrementado su expresión desde 25 hasta el 60 %. Estos resultados se correlacionan con otros reportes donde estos genes aumentan su expresión ante la presencia de ciertos antifúngicos (Gupta y Chattoo, 2007). Estos resultados nos permiten sugerir que el gen Mamdr2 podría estar involucrado en eventos de detoxificación para evadir el mecanismo de defensa del insecto que está siendo invadido, y/o para expulsar las toxinas que el hongo produce para acelerar la muerte del insecto. La comprobación de esta hipótesis requeriría la caracterización de cepas sobre-expresantes o deletantes del gen.

En otros sistemas se ha demostrado que los transportadores ABC (Cassette de unión a ATP) pertenecen a una superfamilia de proteínas integrales de membrana que utilizan la energía de hidrólisis de ATP para transportar activamente una amplia variedad de sustratos tales como; toxinas, fármacos, iones, polisacáridos, aminoácidos, vitaminas péptidos y lípidos. A través de membranas celulares en organismos que van desde procariotas a eucariotas. Varios miembros de esta superfamilia funcionan como exportadores de agentes citotóxicos que cruzan las membranas biológicas ayudando a mantener un reducido nivel intracelular de toxinas o metabolitos (Driessen *et al.*, 2000; De Waard *et al.*, 2006).

En el hongo fitopatógeno *M. grisea* la mutación del gen Abc3 se demostró que juega un papel importante durante la penetración al huésped y en la supervivencia al estrés oxidativo durante la patogénesis (Sun *et al.*, 2006).

Se ha reportado que el transportador ABC del hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea* puede ser un factor en la patogénesis a plantas y en la protección contra fungicidas; ya que la delección del gen de BcatrB que codifica un transportador ABC, reduce ligeramente la virulencia de *B. cinerea* y aumenta la sensibilidad a fungicidas comerciales (Schoonbeek *et al.*, 2001). También la sobreexpresión o la delección del gen AtrB de *Aspergillus nidulans* que codifica para un transportador ABC MDR, afecta la resistencia a todas las principales clases de fungicidas y algunos compuestos naturales, aumentando su resistencia o sensibilidad respectivamente (Andrade *et al.*, 2000).

CONCLUSIONES

El análisis de la expresión del gen Mamdr2 de la cepa CARO 19 de *M. anisopliae* durante la invasión a su hospedero *P. xylostella* indicó que este gen se expresa durante este proceso a partir de las 48 horas, cuando inicia el crecimiento invasivo, lo que sugiere que el producto del gen participa en el proceso infectivo y durante la formación del nuevo conidio, posiblemente para iniciar un nuevo ciclo infectivo en otro hospedero.

La adición de compuestos tóxicos para el hongo como son los antifúngicos incrementa la expresión del gen Mamdr2 a nivel de RNA mensajero, sugiriendo que el producto de este gen podría participar en la detoxificación de las células.

LITERATURA CITADA

- ANDRADE, A.C., G. DEL SORBO, J. VAN NISTELROOY & M. DE WAARD, 2000. The ABC Transporter AtrB from *Aspergillus nidulans* Mediates Resistance to all Major Clases of Fungicides and some Natural Toxic Compounds. *Microbiology* 146: 1987-1997.
- DE WAARD, M., A. ANDRADE, K. HAYASHI, H. SCHOONBEEK, I. STERGIPOULOS & L. ZWIERS, 2006. Impact of Fungal Drug Transporters on Fungicide Sensitivity, Multidrug Resistance and Virulence. *Pest Management Science* 62: 195-207.
- DE WAARD, M.A., 1997. Significance of ABC Transporters in Fungicide Sensitivity and Resistance. *Pest Management Science* 51: 271-275.
- DRIESSEN, A., B. ROSEN & W. KONINGS, 2000. Diversity of Transport Mechanism: Common Structural Principles. *Trends Biochemistry Science* 25: 397-401.
- FREIMOSER, F., S. SCREEN, G. HU & R. ST. LEGER, 2003. EST Analysis of Genes Expressed by the Zygomycete Pathogen *Conidiobolus coronatus* During Growth on Insect Cuticle. *Microbiology* 149: 1893-1900.

- GUPTA, A. & B. CHATTOO, 2007.** Functional Analysis of a Novel ABC Transporter ABC4 from *Magnaphorte grisea*. *FEMS Microbiology letter* 278: 22-28.
- KANNAN S., K. MURUGAN, K. NARESH, N. RAMASUBRAMANIAN & P. MATHIYAZHAGAN, 2008.** Adulticidal Effect of Fungl Pathogen, *Metarhizium anisopliae* on Malarial Vector *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae). *African Journal of Biotechnology* 7: 838-841.
- ROBERTS, D.W. & R. ST. LEGER, 2004.** *Metarhizium* spp. Cosmopolitan Insect-Pathogenic Fungi: Micological Aspects. *Advances in Applied Microbiology* 54: 1-70.
- SCHOONBEEK, H., G. DEL SORBO G & M. DE WAARD, 2001.** The ABC Transporter BcatrB Affects the Sensitivity of *Botrytis cinerea* to the Phytoalexin Resveratrol and the Fungicide Fenpiclonil. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 14: 562-571.
- SUN, C., A. SURESH, Y. DENG & N. NAQVI, 2006.** A Multidrug Resistance Transporter in *Magnaporthe* is Required for Host Penetration and for Survival During Oxidative Stress. *The Plant Cell* 18: 3686-3705.

Evaluación de galletas con base en *chaya* (*Cnidoscolus aconitifolius* (Miller) I.M. Johnst., Euphorbiaceae) y *chipilín* (*Crotalaria longirostrata* Hook. & Arn., Fabaceae)

Gabriela Palacios Pola¹, Adriana Caballero Roque¹,
Patricia Ivett Meza Gordillo¹, Paulina Ayvar Ramos¹, Marilyn Paola Ruíz Mondragón²

¹Facultad de Ciencias de la Nutrición y Alimento, Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. Libramiento Norte Poniente 1150. Col. Lajas Maciel. Edificio 11. Ciudad Universitaria. | ² Instituto Politécnico Nacional. Ingeniería en Alimentos. Avenida Instituto Politécnico Nacional s/n Edificio 7, Gustavo A. Madero, Lindavista, 07738 Ciudad de México, D.F. Autor para correspondencia: Gabriela.Palacios@unicach.mx

RESUMEN

Algunas plantas nativas de México y Centroamérica, como la chaya (*Cnidoscolus aconitifolius* (Miller) I.M. Johnst., Euphorbiaceae) y chipilín (*Crotalaria longirostrata* Hook. & Arn., Fabaceae), han contribuido a la alimentación de varias generaciones, ya sea incorporada en aguas frescas o licuados, o bien formando parte de ensaladas y guisos. En este proyecto se evaluaron galletas adicionadas con un 5% de chaya y chipilín en forma deshidratada, para conocer sus características bromatológicas, microbiológicas y sensoriales. Niños de entre 8 y 12 años de edad evaluaron las muestras de galletas y otorgaron calificaciones satisfactorias a ambas muestras, lo cual significa que ésta puede ser una manera de aumentar el consumo y la utilización de hojas verdes en la alimentación infantil y al mismo tiempo ofrecer productos nutritivos e inoocuos.

Palabra clave: harinas, vegetales, hojas verdes, colaciones.

ABSTRACT

Some native plants from Mexico and Central America, as Chaya (*Cnidoscolus aconitifolius* (Miller) I.M. Johnst., Euphorbiaceae) and chipilín (*Crotalaria longirostrata* Hook. & Arn., Fabaceae) have contributed to food several generations, either built in or liquefied fresh water, or forming part of salads and stews. In this project cookies containing 5% of chaya and chipilín in dehydrated form, to know their bromatological, microbiological and sensory characteristics they were evaluated. Children between 8 and 12 years old evaluated samples of cookies and gave satisfactory to both samples qualifications, which means that it can be a way to increase the consumption and utilization of green leaves on infant feeding and at the same time offer nutritious and safe products.

Keywords: flour, vegetables, greens, collations.

INTRODUCCIÓN

La chaya (*Cnidoscolus aconitifolius*) es un arbusto semiperenne y semileñoso de hasta cinco metros de altura perteneciente a la familia Euphorbiaceae, el cual es cultivado en climas cálidos subhúmedos ubicados desde 0 hasta 1,000 msnm. Esta planta requiere de suelos bien drenados para su adecuado desarrollo, además que es tolerante a condiciones ambientales adversas incluyendo lluvias fuertes y sequía intraestival (Valenzuela *et al.* 2015). Se cultivan cuatro variedades de chaya: estrella, picuda, chayamansa y redonda. La chayamansa es la variedad más domesticada, comúnmente tiene cinco lóbulos, de naturaleza fuertemente obovada y por lo general tiene una superposición de los tres lóbulos centrales el cual es un rasgo que no se ve en material silvestre, las hojas

no presentan pelos urticantes, son de tamaño reducido y sólo se encuentran a lo largo del peciolo y el margen inferior de la lámina.

El uso de la chaya salvaje como fuente de alimento es confirmada por el texto maya de Chilám Balám de Chumayel y en las crónicas españolas del siglo XVI; su presencia en la dieta mesoamericana es probablemente debido a su contenido nutrimental ya que muchos análisis químicos han mostrado que las hojas de chaya tiene un alto contenido de vitamina C, β -carotenos y proteínas, además de ser ricos en calcio, fósforo, hierro, tiamina, riboflavina y niacina como lo mencionan Ross y Molina (2002); por lo que en términos nutricionales es superior a la acelga, lechuga, berros, col y espinaca (Palos, 2007).

En el estado de Chiapas, dentro las hierbas consumidas ampliamente por la población, se encuentra el chipilín

(*Crotalaria longirostrata*) también conocido como chop, chipile, etc. Cada rama está compuesta por tres hojas pequeñas en forma ovalada y color verde oscuro. Sus flores son de color amarillo intenso y tiene forma de mariposa, constituyen racimos en la punta de la rama. El uso de las hojas de chipilín es muy popular para hacer tamales y caldo, al igual que la chaya es uno de los quelites con mayor contenido nutrimental reportándose que es rico en calcio, hierro, tiamina, riboflavina, niacina y ácido ascórbico (Mortón, 1994).

Jiménez y Grusak (2015) estudiaron estos dos quelites y concluyen que son excelentes fuentes de vitamina C; además pudieron establecer que la chaya proporciona concentraciones elevadas de fenoles totales y flavonoides totales, en tanto que el chipilín ofrece elevados niveles de actividad antioxidante. Ellos argumentan que la presencia de estos compuestos en estos vegetales de hoja verde indígenas se considera de gran importancia para la salud de los humanos, además sugieren que los esfuerzos para promover su cultivo, la comercialización y el consumo deben ser fomentados. Debido a que estas especies también son más tolerantes a la sequía comparadas con muchos vegetales no autóctonos.

La industria de las botanas es muy variable debido a los cambios en los estilos de vida de los consumidores. Por esta razón, constantemente se innovan nuevos productos para satisfacer las necesidades, jugando un papel muy importante los ingredientes utilizados para su elaboración ya que proporcionan características nutricionales y sensoriales para el mercado actual. Las botanas se han convertido en una parte importante de las dietas de muchos individuos. Existe un gran interés en incrementar la fibra dietética de los alimentos incluyendo botanas para conducir las hacia un enfoque saludable (Escudero y González, 2006).

Una de las botanas preferidas son las galletas que de acuerdo a la norma NMX-F-006-1983 se definen como el producto elaborado con harinas de trigo, avena, centeno, harinas integrales, azúcares, grasa vegetal y/o aceites vegetales comestibles, agentes leudantes, sal yodada; adicionados o no de otros ingredientes y aditivos alimenticios permitidos los que se someten a un proceso de amasado, moldeado y horneado.

Por tanto, en este trabajo se planteó la elaboración de galletas con base en harina de trigo, adicionadas con chaya y chipilín con el objetivo de aumentar el valor nutrimental de las mismas y fomentar el uso de los quelites.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Los materiales vegetales empleados fueron la chaya (*Cnidoscolus aconitifolius*) y el chipilín (*Crotalaria longirostrata*). Las hojas de chaya se recolectaron de las plantas cultivadas en el huerto *Muil itaj* de la Facultad de Ciencias de la Nutrición y Alimentos, UNICACH. El chipilín fue adquirido en forma de manojos en el mercado público del norte de la ciudad de Tuxtla Gutiérrez. Se seleccionaron las hojas sin daños físicos, mecánicos o causados por insectos, eliminando la materia extraña, después fueron guardadas en bolsas Ziploc® en refrigeración, el tiempo de almacenamiento no excedió de 2 días.

HARINA NO CONVENCIONAL DE CHAYA (*CNIDOSCOLUS ACONITIFOLIUS*) Y CHIPILÍN (*CROTALARIA LONGIROSTRATA*)

La chaya (*Cnidoscolus aconitifolius*), se lavó, desinfectó y escaldó a una temperatura de 80°C durante dos minutos; se introdujo a un horno de secado FELISA Modelo FE294AD durante 12 horas a una temperatura de 60°C, se pulverizó con el uso de un procesador marca Nutribullet® modelo NB-101B y se hizo pasar por un tamiz de malla No. 50.

Para la elaboración de harina no convencional de chipilín (*Crotalaria longirostrata*) primeramente se retiraron las hojas del tallo y se colocaron en un contenedor para después lavarlas y desinfectarlas, posteriormente se colocaron en charolas procurando tener la mayor superficie de contacto y se introdujeron a un horno de secado durante 12 horas a una temperatura de 60°C.

Ya completamente secas las hojas se pulverizaron en el Nutribullet® modelo NB-101B, para obtener un diámetro de partícula homogéneo y uniforme, la harina obtenida se pasó por un tamiz de malla número 50.

Preparación de galletas a base de harina no convencional de chaya y chipilín

Para preparar 250 gramos de masa para galletas, se emplearon 2 tazas de harina de trigo, 80 gramos de mantequilla, 100 ml de leche pasteurizada, 5 ml de aceite de oliva, 0.3 gramos de sal gruesa, 5 gramos de levadura y 12.5 gramos de harina no convencional de chaya y chipilín respectivamente.

En el centro se colocó la mantequilla a temperatura ambiente cortada en cuadros. Se agregó la harina de trigo y la harina no convencional de chaya o chipilín según sea el caso, la levadura, la sal y el aceite de oliva en el centro.

Se agregó la leche poco a poco y se amasó aproximadamente durante 10 minutos hasta obtener una masa que pueda estirarse. Se dejó reposar 30 minutos a temperatura ambiente para luego proceder a extender la masa mediante un rodillo de acero inoxidable y formar las galletas mediante un troquelador hexagonal. Finalmente se cocinaron en un Southbend Silverstar SLGS/12SC durante 10 minutos a 180° C.

Análisis proximales

Los análisis proximales de la muestra de galleta de chipilín y chaya fueron determinados usando el método de AOAC, 1990.

Análisis microbiológico

Determinación de microorganismos coliformes totales y fecales. Se realizaron diluciones seriadas por duplicado de la muestra de 1:10 (10 g de alimento en 90 mL de solución de trabajo, y 1 ml llevar a tubo con 9 ml de solución de trabajo) hasta 1:1000, se inoculó 1 ml de cada dilución en cada uno de los 3 tubos con tapón de rosca y campana Durham, que contienen 10 ml de Caldo Bilis Verde Brillante, posteriormente se incubó a 35°C durante 48 horas. La presencia de burbujas de gas se reporta como prueba positiva y se reporta bajo el Método del Número más Probable (NMP). De aquellos tubos con gas, se tomó una asada y se sembró por estría cruzada en cajas petri preparadas con Agar EMB. Se incubó en posición invertida a 35°C, durante 48 horas. Las bacterias coliformes fecales detectadas en la placa se determinaron en Unidades Formadoras de Colonias por gramo (UFC/g) de muestra.

Determinación de hongos y levaduras

Se realizaron diluciones seriadas de la muestra desde 1:10 hasta 1:1,000, se inoculó 1 ml de cada una de las

diluciones en el centro de cada caja petri estéril y se adicionaron desde 15 hasta 20 ml de Agar Papa Dextrosa acidificado con ácido tartárico al 10% hasta un pH 3. Se homogenizó el inóculo mediante movimientos circulares y posteriormente se incubaron las placas a 35°C durante 7 días (en posición invertida). Se revisaron las placas a las 48 y 72 horas y se hicieron los recuentos correspondientes, en UFC/g de muestra, a los 7 días después de la siembra.

Prueba de evaluación sensorial

Se realizó prueba hedónica tipo facial, aplicada a 60 niños y niñas de entre 8 y 12 años de edad. Se empleó una papeleta de 5 puntos con “caritas” que van de “súper rico” a “súper feo”, con un punto intermedio que señala “más o menos”. Para el empleo de las papeletas se dirigió un entrenamiento preliminar mediante un programa generado en la Universidad de Costa Rica que explica cada punto de la escala. Los niños recibieron de manera individual un contenedor blanco que contaba con 2 vasitos de prueba con galleta 1 y galleta 2, además de agua para enjuague, la papeleta de calificaciones y un lápiz de color.

Análisis estadístico

Los resultados de los análisis químico proximales fueron analizados mediante la estadística descriptiva del programa Excel, en tanto que las calificaciones de las pruebas de evaluación sensorial se analizaron empleando el programa estadístico Minitab© versión 17 a través de estadística mediante ANOVA ($\alpha = 0.05$).

RESULTADOS

Una vez realizadas todas las pruebas bromatológicas, microbiológicas y sensoriales a los snacks con base en chaya y chipilín se prosiguió a analizar los resultados.

Especificaciones	Galletas con base en harina no convencional de chaya (5 %)	Galletas con base en harina no convencional de chipilín (5 %)	NMX-F-006-1983. Alimentos. Galletas. Normas Mexicanas. Dirección General de Normas
Humedad %	3.57 ± 0.08	3.4 ± 0.14	8 %máximo
Grasa (g)	15.54 ± 0.27	21.29 ± 0.53	5 mínimo
Proteína cruda (g)	11.38 ± 0.02	11.61 ± 1.26	6 mínimo
Fibra cruda (g)	1.87 ± 0.59	1.39 ± 0.22	0.5 máximo
Ceniza (g)	2.17 ± 0.001	1.92 ± 0.04	2 máximo

CUADRO 1

Comparación de nutrientes entre las galletas de chaya y chipilín con respecto a la NMX-F-006-1983

De acuerdo con los resultados obtenidos en los análisis proximales de la muestra de galleta con harina de chipilín al 5 % y chaya al 5 %, (cuadro1.) el aporte de proteína por parte de las galletas es importante ya que contienen el doble (11.38 gramos y 11.61 gramos en 100 g⁻¹) del requerimiento mínimo especificado por la norma NMX-006-1983 que marca un mínimo de 6 gramos en 100 g⁻¹ de proteína en galletas comerciales. Este aporte de proteína puede deberse a que de manera natural el chipilín en su composición contiene 4 gramos de proteínas y por su parte la chaya contiene 7.20 gramos de proteínas (Muñoz *et al.*, 1996) lo cual le confieren a las galletas un valor extra de proteínas que no contienen las galletas convencionales comerciales.

En cuanto al contenido de grasa, generalmente las galletas son productos que se caracterizan por un contenido alto de grasa, ya que durante su elaboración se incorpora gran cantidad de esta, la cual va a conferir la textura deseada. La norma hace referencia a un mínimo de 5 g de grasa en 100 g⁻¹ de muestra para ser considerada una galleta comercial. Las galletas de chaya presentan en su composición un aporte de 585 kJ (15.54 gramos en 100 g⁻¹) y las de chipilín aportan 1067.25 kJ (21.29 gramos en 100 g⁻¹) de grasa, respectivamente, esto debido principalmente a la cantidad de mantequilla empleada para su elaboración ya que de manera natural ambos quelites no representan en sí un aporte significativo de lípidos.

De los resultados obtenidos de fibra, la norma indica como máximo en galletas comerciales un 0.5 gramos de fibra en 100 gramos de muestra, sin embargo las galletas

elaboradas presentaron en su composición mayor contenido de fibra 1.87 g en 100 g⁻¹ para las galletas de chaya, resultando un valor menor para las galletas de chipilín lo cual les otorga un valor agregado, beneficia al consumidor.

En lo que respecta a la ceniza, de acuerdo a la norma citada con anterioridad indica que se puede tener un máximo de 2 gramos de cenizas, para lo cual la galleta de chipilín cumple teniendo 1.92 gramos en 100 gramos de galleta; sin embargo, la galleta de chaya rebasa este límite, presentado en su composición 2.17 gramos por cada 100 gramos de muestra, de manera natural la chaya en su composición tiene un alto contenido de este tipo de carbohidratos.

Y mencionando los carbohidratos el aporte calórico de la galleta de chipilín es 1067.25 kJ por una porción de 100 gramos, mientras que la galleta de chaya contribuye con 1,155.56 kJ por cada porción de 100 gramos, dando así un aporte total de 2,063.59 kJ comparando esta cantidad con el índice de ingesta diaria recomendada para un niño entre 6 y 12 años va desde 1,900 hasta 2,150 kcal por día lo que correspondería desde 7,949.6 hasta 8,995.6 kJ por día (FAO/OMS/ONU), de esta manera una porción de 100 gramos de galletas cubre aproximadamente una cuarta parte del requerimiento. Haciendo una comparación entre las dos galletas respecto a su composición nutrimental, la diferencia entre ambas es mínima, por una parte la galleta de chipilín presenta ligeramente más proteína que la de chaya; sin embargo, también presenta mayor contenido de grasas, por lo que un componente complementa al otro.

ANÁLISIS	GALLETA CHIPILÍN				GALLETA CHAYA			
	DISOLUCIONES			UFC/ g	DISOLUCIONES			UFC/ g
HONGOS Y LEVADURAS				<1				<1
	0	0	0		0	0	0	

UFC/g= Unidades formadoras de colonias de mohos y levaduras por gramo de alimento en agar papa-dextrosa acidificado incubadas a 25°C durante 7 días

CUADRO 2

Análisis microbiológicos de hongos y levaduras de galletas de chaya y chipilín.

ANÁLISIS	GALLETA CHIPILÍN			GALLETA CHAYA				
	DISOLUCIONES			NMP/ g	DISOLUCIONES			NMP/ g
COLIF. TOTALES				< 3				< 3
	0	0	0		0	0	0	
COLIF. FECALES	DISOLUCIONES			UFC/ g	DISOLUCIONES			UFC/ g
				< 1				< 1
	0	0	0		0	0	0	
NMP/ g= Número más probable de coliformes totales por gramo de alimento en caldo bilis verde brillante incubadas a 35°C durante 48 horas								
UFC/ g= Unidades formadoras de colonias de coliformes fecales por gramo de alimento en agar eosina azul de metileno incubadas a 35°C durante 48 horas								

CUADRO 3 Análisis microbiológicos de coliformes totales y fecales de galletas y frituras de chaya y chipilín.

De acuerdo con los resultados obtenidos en los análisis microbiológicos de la muestra de galleta con harina de chipilín al 5 % y chaya al 5 % (cuadro 3) se encuentra que los productos son inocuos para el consumo humano, ya que hay ausencia de microorganismos patógenos, lo que con base en las normas de referencia NOM-112, 113 y 111-SSA1-1994, se señala mediante Unidades Formadoras de Colonia (UFC) y Número más Probable (NMP).

Resultando que estos resultados fueron favorables debido a las buenas prácticas de higiene en alimento, donde las hojas fueron lavadas y desinfectadas, todos los materiales fueron cuidados de estar en condiciones limpias para reducir el riesgo de una contaminación cruzada durante el procesamiento de las harinas no convencionales de chaya y chipilín. Asimismo, durante la elaboración de las galletas se cuidó la limpieza, así como el almacenamiento del producto para que estuviera libre de contaminación.

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	1	0.471	0.4712	0.30	0.583
Error	102	158.058	1.5496		
Total	103	158.529			
Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%	
Galleta chaya (5%)	52	3.250	1.186	(2.908, 3.592)	
Galleta chipilín (5%)	52	3.385	1.301	(3.042, 3.727)	

CUADRO 4 Análisis de Varianza aplicado a las galletas con incorporación de 5% de harina no convencional de chaya y chipilín.

Al realizar las comparaciones en parejas de Tukey con un nivel de confianza de 95%, se confirmó que no existió diferencia estadística significativa entre las muestras de galletas incorporadas con quelites como se observa en la figura 1. Lo anterior puede atribuirse a que los atributos

sensoriales de ambas muestras son parecidos, la apariencia de las galletas es similar ya que la coloración es verde y el sabor es ligeramente salado con notas a hierbas, al igual que el suave aroma a hoja fresca que no resultó desagradable para los niños que las evaluaron.

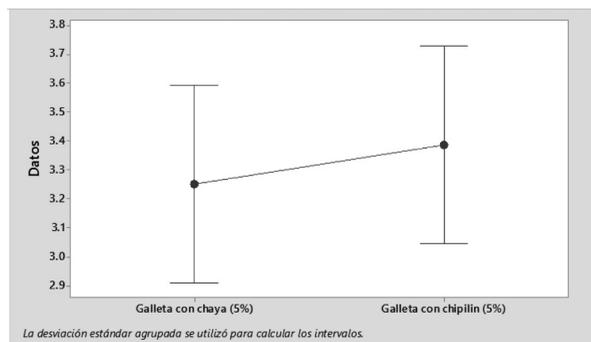


FIGURA 1

Comparativo con base en Tukey (95%) de las medias obtenidas por las galletas de trigo adicionadas con 5% de harinas no convencionales de chaya y chipilín.

CONCLUSIONES

Las galletas adicionadas con hojas verdes (chaya y chipilín) son más ricas en proteínas que las de tipo comercial. Los resultados de la evaluación sensorial indican que los niños en edad escolar aceptan favorablemente la incorporación de estas hojas deshidratadas y molidas en sus galletas, lo que es de gran beneficio porque es rica en nutrientes. Esta puede ser una manera de aumentar el consumo y la utilización de hojas verdes en la alimentación infantil, así como el aumento del contenido nutricional, por tanto, podrían servir como ingredientes en la formulación de alimentos para reducir la malnutrición de los grupos vulnerables en el estado.

RECONOCIMIENTO

Al programa Interinstitucional para el fortalecimiento de la investigación y el posgrado del pacífico (Delfin-CONACYT).

LITERATURA CITADA

- AOAC. Association of Official Analytical Chemist. 1990. *Official Methods of Analysis*. 15 edición. U.S.A
- ESCUADERO-ALVAREZ E. Y P. GONZALEZ-SÁNCHEZ, 2006. La fibra dietética. *Nutrición Hospitalaria* 21: 61-72.
- JIMÉNEZ-AGUILAR D.M. & A. GRUSAK-MICHAEL, 2015. *Evaluation of Minerals, Phytochemical Compounds and Antioxidant Activity of Mexican, Central American, and African Green Leafy Vegetables*. *Plant Foods or Human Nutrition* 70:357-364 DOI 10.1007/s11130-015-0512-7.
- MORTON, J., 1994. Pito (*Erythrina berteroana*) and Chipilín (*Crotalaria longirostrata*), (Fabaceae), two soporific vegetables of central America. *Economic Botany* 48 (2): 130-138.
- MUÑOZ DE CHÁVEZ, M.A., J.A. CHÁVEZ, J.A. ROLDAN, E. LEDESMA, F. MENDOZA, S.L. PÉREZ-GIL, HERNÁNDEZ Y A.G. CHAPARRO, 1996. *Tablas de Valor Nutritivo de los Alimentos de Mayor Consumo en México*. Editorial Paz México, México, D.F., México.
- ROSS-IBARRA J. & A. MOLINA-CRUZ, 2002. The ethnobotany of chaya (*Cnidoscolus aconitifolius* ssp. *aconitifolius* Breckon): a nutritious maya vegetable. *Economic Botany* 56: 350-65.
- PALOS G., 2007. *Evaluación de la actividad antioxidante de la chaya (Cnidoscolus chayamansa) en un modelo experimental de diabetes en ratas wistar*. Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional. Querétaro, México.
- VALENZUELA-SOTO R., M.E. MORALES RUBIO, M.J. VERDE-STAR, A. ORANDAY-CÁRDENAS, P. PRECIADO-RANGEL, J.A. GONZÁLEZ Y J.R. ESPARZA-RIVERA, 2015. *Cnidoscolus chayamansa* hidropónica orgánica y su capacidad hipoglucemiante, calidad nutraceutica y toxicidad. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 6 (4): 815-825. Recuperado en 29 de junio de 2016, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-09342015000400012&lng=es&tlng=es.

Análisis comparativo de los métodos para interpolar precipitación en el estado de Chiapas

Miguel de Jesús León Gómez¹, Roel Símuta Champo¹
Iván de Jesús Vázquez Montoya¹, Ramón Solano Barajas²

¹ Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas, Libramiento Norte Poniente 1150, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas; miguel.leon.gomez@hotmail.com, roel.simuta@unicach.mx, ivan.vazquez@unicach.mx | ²Universidad de Colima, Carretera Colima Coquimatlán km 9, Coquimatlán, Colima; rsolano@uacol.mx

RESUMEN

Se evalúan y comparan tres métodos de interpolación de precipitación que son el Inverso de la Distancia Ponderada, el Kriging Ordinario y el Co-Kriging Ordinario, con el objetivo de proponer un adecuado método para realizar un continuo de precipitaciones en el estado de Chiapas, partiendo de los valores mensuales obtenidos en 175 estaciones meteorológicas distribuidas en el estado durante el año 2014. Con la ayuda del software ArcGIS 9.3, específicamente con el módulo Análisis Geoestadístico y la extensión Asistente Geoestadístico, se evaluó el método Inversa de la Distancia Ponderada y se realizó el cálculo de los valores óptimos de potencia y el método estadístico de validación cruzada, lo que permitió identificar a exactitud que el modelo predice los valores desconocidos. Para el Kriging Ordinario se estimaron los datos de transformación y tendencia como ayuda de la aplicación Explorador de datos/ Histograma; se identificó el tipo de transformación que los datos requieren a partir de la distribución. Por otra parte con la aplicación Explorador/ Análisis de tendencia se identificó la tendencia que sigue la distribución de los datos. Para el método Co-Kriging Ordinario se emplearon los mismos datos que para el Kriging Ordinario además de emplear la elevación como variable secundaria. El estudio concluye que el interpolador que mayor bondad estadística expone es el Inverso de la Distancia Poderada.

Palabras clave: interpolación, precipitación, ArcGis, geoestadística, estaciones meteorológicas.

ABSTRACT

This paper evaluated and compared three methods of interpolation of precipitation that are the Inverse Distance Weighting, the Kriging ordinary and Co-Kriging Ordinary, with the aim of proposing a suitable method for continuous rainfall in the state of Chiapas, based on the monthly values obtained from 175 weather stations in the state during 2014. With the help of ArcGIS 9.3 software, specifically with geostatistical analysis module and the Wizard Geostatistical extension, the Inverse Distance Weighted method was evaluated and calculating the optimum values of power and the statistical method of cross-validation was conducted, which identified how well the model predicts the unknown values. For the Kriging Ordinary data processing and tendency to help the Explorer application data / Histogram estimated; the type of processing that require data from the distribution was identified. Moreover with Explorer / Trend Analysis application trend following the distribution of the data was identified. For the Co-Kriging Ordinary method the same data that were used in the Kriging Ordinary and elevation as a secondary variable. The study concludes that the interpolator is greater statistical goodness exposes the Inverse Distance weighted.

Keywords: Interpolation, Precipitation, ArcGis, Geostatistics, Weather stations.

INTRODUCCIÓN

Los métodos de interpolación climática disponibles en los SIG (Sistemas de Información Geográfica), en principio han sido creados para predecir la distribución espacial de diversos fenómenos o elementos naturales. Estos métodos de interpolación se pueden dividir en dos grupos específicos: los locales que pueden ser polígonos de Thiessen e inverso de distancia ponderada (IDP) mé-

todos que han sido de los más frecuentemente utilizados en la predicción climática y desarrollo cartográfico (New & Hulme, 2000; Vicente-Serrano *et al.*, 2003), y por otra parte se encuentran los geo-estadísticos que pueden ser Kriging, co-Kriging y Spline (Vicente-Serrano *et al.*, 2003; Apaydin *et al.*, 2004; Hong *et al.*, 2005).

En este sentido estos métodos de interpolación son utilizados para crear una superficie continua de variables climáticas como temperatura y precipitación (Dressler

et al., 2000), diversos autores han propuesto métodos de interpolación, y se han hecho además diversos estudios para tratar de identificar la metodología que genere el modelo que mejor se ajuste a la variable precipitación para un área determinada. Con herramientas más avanzadas como los SIG y la inclusión de herramientas geoestadísticas, se han desarrollado nuevas metodologías que incluyen en el procedimiento de interpolación variables topográficas y geográficas como información secundaria (Agnew and Palutikof, 2000; Ninyerola *et al.*, 2000; Marquín *et al.*, 2003).

Métodos de interpolación que permiten la interacción de datos topográficos y geográficos han sido utilizados en diversas partes del mundo para generar mapas de precipitación (Hevesi *et al.*, 1992; Agnew y Palutikof, 2000; Ninyerola *et al.*, 2000; Daly *et al.*, 2002; Brown y Comrie, 2002). Estos métodos usan modelos estadísticos multivariados que permiten evaluar las relaciones de los datos climáticos con las variables geográficas y topográficas de las estaciones climáticas y su correlación espacial (Ninyerola *et al.*, 2000; Brown y Comrie, 2002). Actualmente, la combinación de modelos de regresión con métodos geo-estadísticos hace posible el desarrollo de cartografía climática con predicciones precisas y mínima varianza espacial (Vicente-Serrano *et al.*, 2003).

En México han sido pocos los esfuerzos realizados para evaluar la bondad de métodos de interpolación de datos climáticos, en este sentido el análisis comparativo desarrollado por Díaz *et al.*, en 2006, en el que evaluó cuatro métodos de interpolación para representar espacialmente la precipitación particularmente en la región de sotavento y barlovento del Golfo de México¹, concluyen que el método thin plate smoothing spline fue el de mayor eficiencia. Por otra parte el trabajo de Nuñez Daniel *et al.*, 2014 y el trabajo presentado en el congreso internacional de Ingeniería Geomática y Topográfica por Portales Cristina *et al.*, 2008 apuntalan la generación de modelos de regresión lineal múltiple (MRLM) utilizando variables que tienen alta influencia en la distribución de la precipitación.

Considerando lo anterior y además de que Ramos Silvia *et al.*, 2010 indican que la variabilidad en la distribución de las precipitaciones es un comportamiento que se expresa altitudinalmente en el territorio estatal, el objetivo de este trabajo es el de proponer un adecuado método para realizar un continuo de la precipitación en el estado de Chiapas, con información de 175 estaciones meteorológicas distribuidas en el estado, para tal efecto

se realizó un análisis comparativo entre los dos métodos de interpolación más utilizados para interpolar precipitación. Actualmente los métodos de Co-Kriging y de MRLM (Modelo de Regresión Lineal Múltiple) son métodos que permiten incluir variables que se relaciona con la precipitación, de tal forma que Vicente Serrano *et al.*, 2003 indican que, la combinación de modelos de regresión con métodos geo-estadísticos como el Co-Kriging hace posible el desarrollo de cartografía climática con predicciones precisas y mínima varianza espacial.

MÉTODO

El estado de Chiapas se encuentra al sureste de México y tiene una extensión territorial de 73 670 km², que representa aproximadamente 3.8 % de la superficie total del país, sus coordenadas geográficas extremas son las siguientes: al norte 17°59'00" y al sur 14°32'00" de latitud Norte; al este 90°22'00" y al oeste 94°14'00" de longitud Oeste (INEGI, 2000). Colinda al norte con el estado de Tabasco; al este y sureste con la República de Guatemala; al sur y suroeste con el océano Pacífico, y al oeste con los estados de Oaxaca y Veracruz. (SEGOB CHIAPAS, 2016). La mayor parte del estado está conformado por sierras, al sureste se encuentran las mayores altitudes como el cerro Mozotal con 3,050 msnm y el volcán Tacaná con 4,080 metros sobre el nivel del mar (msnm) en los límites con la República de Guatemala, por otra parte, la región norte del estado presenta lluvias todo el año, en el resto de la entidad, abundantes lluvias en verano. La precipitación total anual varía, dependiendo de la región, de 1,200 mm a 4,000 mm (INEGI, 2012).

Para estimar el continuo de precipitación con los métodos de interpolación de IDP, y Kriging Ordinario, se utilizaron 175 estaciones meteorológicas distribuidas en todo el estado, por otra parte, además de utilizar las estaciones, se utilizó la variable altura al aplicar los métodos de Co-kriging Ordinario.

Inversa de la distancia ponderada (IDP). Los continuos de precipitación mensual obtenidos a partir del método IDP se realizaron a partir del programa ArcGIS 9.3, específicamente con el módulo Análisis Geoestadístico y la Extensión Asistente Geoestadística, extensión que permite calcular los valores óptimos de potencia, y realizar el método estadístico de validación cruzada, lo que permitió identificar lo bien que el modelo predice los valores desconocidos. Para este caso se consideraron los valores de potencia y de vecinos que arrojaran datos de la media cercanos a cero y los valores de desviación típica más bajos, como se muestra en la Tabla 1.

¹ Se ubica en entre los 19° 55' 48" y 18° 47' 24" de latitud norte y los 99° 09' 00" y 96° 03' 36" de longitud Oeste.

Datos	Enero	Febrero	Marzo	Abril	Mayo	Junio
Potencia	1.1476	3.1425	2.7271	1.326	21.63	3.6993
Vecinos	3	14	6	6	10	3
Media	-0.6601	-1.074	0.5652	1.21	2.473	3.78
Datos	Julio	Agosto	Septiembre	Octubre	Noviembre	Diciembre
Potencia	3.2947	3.1516	1	3.3269	2.7719	2.5732
Vecinos	25	2	10	25	5	2
Media	0.9014	3.471	-0.5127	0.04	-0.6207	-0.9283

TABLA 1

Datos de Potencia y Vecinos que generan mejores datos de Media y Desviación Típica.

Kriging Ordinario (KO). Con el módulo Análisis Geoestadístico y la extensión Asistente Geoestadístico, del programa ArcGis 9.3, se desarrolló el proceso para elaborar continuos de precipitación en el estado de Chiapas, para ello se realizó un análisis geoestadístico previo para determinar los parámetros que permitieron

obtener continuos de precipitación con mejor bondad estadística. Para el método KO se estimaron los datos de transformación y tendencia como ayuda de la aplicación Explorador de datos/ Histograma (figura 1); se identificó el tipo de transformación que los datos requieren a partir de la distribución.

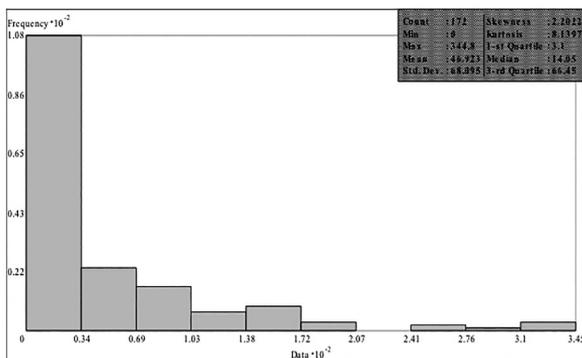


FIGURA 1

Histograma de precipitación media mensual.

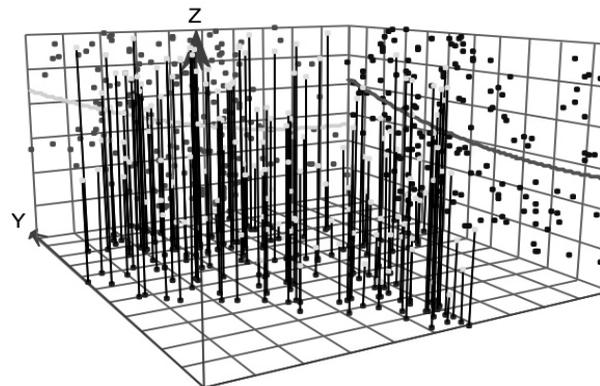


FIGURA 2

Gráfico de tres dimensiones.

Por otra parte con la aplicación Explorador/ Análisis de tendencia (figura 2) se identificó la tendencia que sigue la distribución de los datos, de tal forma que los datos de transformación y tendencia de cada mes se representan en la tabla 2.

	ENE	FEB	MAR	ABR	MAY	JUN	JUL	AGO	SEP	OCT	NOV	DIC
Transformación	None	Log										
Tendencia	3er Orden											

TABLA 2

Ajuste estadístico de los datos de transformación y tendencia de precipitación por mes.

Fue necesario definir si los datos mensuales presentaban Anisotropía o Isotropía, en este sentido se definió que enero, marzo y noviembre presentan Isotropía, mientras que el resto de los meses presentan Anisotropía. Por otra parte, es necesario determinar el modelo que mejor se aproxime a la varianza de los datos mensuales, esto se realizó con la aproximación de la *meseta parcial* al valor de la varianza de cada mes, el modelo con mejor aproximación para cada mes se representa en la tabla 3.

Modelo	Enero	Febrero	Marzo	Abril	Mayo	Junio	Julio	Agosto	Septiembre	Octubre	Noviembre	Diciembre
Circular	1054.4	0.205	0.2025	0.137	0.0346	0.0208	0.032599	0.04022	0.04245	0.08537	0.1369	0.2688
Esférico	1010.3	0.17981	0.1843	0.125	0.02697	0.0183	0.031314	0.038095	0.0398	0.08004	0.1256	0.29489
Tetraesférico	984.52	0.4258	0.1683	0.116	0.05215	0.016242	0.030329	0.036494	0.03779	0.07499	0.1185	5.50E-07
Pentaesférico	936.09	0.1742	0.1539	0.108	1.75E-07	0.013604	0.02952	0.035188	0.03598	0.07088	0.1121	3.62E-07
Exponencial	1138.1	0.2928	0.201	0.156	1.41E-07	0.019009	0.038643	0.046193	0.04613	0.09682	0.1568	2.99E-07
Gausiano	993.19	0.1823	0.184	0.12	0.030824	0.017908	0.028172	0.034901	0.03843	0.0774	0.1185	0.22813
Cuadrático	896.83	0.4795	0.157	0.137	2.23E-07	1.63E-08	0.09699	0.034109	0.03463	0.08019	0.12	0.37376
Efecto Agujero	631.04	0.2067	0.176	0.159	0.001146	0.0060623	0.016744	0.0200007	0.02235	0.04142	0.06034	0.22022
K-Bessel	968.17	0.1834	0.176	0.1164	0.029125	0.017438	0.027789	0.034341	0.03776	0.07449	0.1151	0.26703
J-Bessel	731.59	0.0094	0.005	0.0006	0.00042	0.000002	0.0053381	0.0025431	0.02632	0.0002	0.001854	0.037744
Estable	974.4	0.1825	0.1838	0.119	0.000614	0.017907	0.028114	0.034773	0.03834	0.0761	0.11838	0.28612
VARIANZA	4636.93	2.25	1.22	0.66	0.31	0.15	0.18	0.18	0.18	0.48	0.94	2.33
DESVIACIÓN	68.095	1.5003	1.1066	0.80966	0.55843	0.38815	0.4256	0.4298	0.42802	0.68966	0.97006	1.5253

TABLA 3

Aproximación de los valores meseta parcial a los valores de varianza de cada mes.

Posteriormente se realizó el ajuste de número de vecinos y tipo de sectores que genera mejor valor de media cuadrática estandarizada (valor que debe de ser cercano a uno). Y finalmente se realizó el cálculo de confiabilidad (tabla 4). A partir de estos datos se generó el continuo de precipitación del estado de Chiapas para cada mes.

Parámetro	Enero	Febrero	Marzo	Abril	Mayo	Junio
Media cuadrática	38.57	57.12	39.96	41.6	73.47	104.3
Error promedio estándar	35.45	180.4	87.16	49.05	74.94	100.8
Media cuadrática estandarizada	1.078	0.914	0.76	0.8427	0.8466	0.9777
Confiabilidad	48.97	91.81	97.16	97.27	93.53	94.82
Parámetro	Julio	Agosto	Septiembre	Octubre	Noviembre	Diciembre
Media cuadrática	99.75	110.1	122.3	138.1	169.7	101
Error promedio estándar	98.27	106.8	118.9	153.4	193.6	269.7
Media cuadrática estandarizada	0.9977	1.006	0.9648	0.9047	0.9735	1.038
Confiabilidad	92.25	93.13	93.68	98.25	96.06	58.7

TABLA 4

Resultados estadísticos de cada mes con el método KO.

Co-Kriging Ordinario (CKO): Con el módulo Análisis Geoestadístico y la extensión Asistente Geoestadístico, del programa ArcGIS 9.3, se realizó el proceso para elaborar continuos de precipitación en el estado de Chiapas aplicando el método CKO, los parámetros estadísticos transformación y tendencia para los datos de precipitación son los mismos utilizados con el método KO, mientras que para los datos de elevación se evaluaron

de la misma forma que los de precipitación, resultando que los valores de elevación no requieren transformación y la tendencia es de segundo orden. Los datos de Anisotropía o Isotropía, presentan el mismo patrón que los considerados en el KO y además se determinaron los modelos que mejor se ajusta para cada mes aplicando los criterios considerados en el análisis del KO los resultados se muestran en la tabla 5.

Modelo	Enero	Febrero	Marzo	Abril	Mayo	Junio	Julio	Agosto	Septiembre	Octubre	Noviembre	Diciembre
Circular	-45.367	1.959	1.311	0.764	1.0331	0.53634	0.25682	0.33489	0.1348	0.16473	0.83101	54.363
Esférico	-59.06	3.013	1.845	1.267	1.2389	0.82766	0.33027	0.4995	0.2129	0.335	1.3216	22.883
Tetraesférico	-59.64	74.325	2.374	1.691	13.905	0.87231	0.8996	0.62364	0.2779	0.47808	1.5807	-0.0003
Pentaesférico	-77.77	3.8	2.625	2.037	0.000188	0.74531	0.43191	0.71187	0.3273	0.6115	1.9098	0.00018
Exponencial	-207.67	10.123	5.627	4.638	-0.0001516	1.4069	0.73459	1.3404	0.7486	1.1299	4.0896	-0.0002
Gausiano	-11.136	2.5	0.424	0.542	0.89865	0.43466	0.088738	0.20532	0.0578	0.07059	0.2901	42.323
Cuadrático	-207.21	48.65	0.424	8.513	-0.000239	0.00025	0.81414	1.3161	0.9425	1.7679	5.6604	36.021
Efecto Agujero	-6.8854	8.374	6.224	0.321	10.074	6.4419	0.091127	0.12503	0.0657	0.10335	0.2853	17.962
K-Bessel	-18.588	3.224	0.43	0.7681	1.1542	0.59857	0.14499	0.30667	0.0714	0.11939	0.47681	22.34
J-Bessel	-14.11	30.457	22.56	7.9632	6.1586	0.44331	-2.8837	-0.49023	0.1037	3.9792	13.263	34.809
Estable	-16.118	2.497	0.437	0.56025	0.86976	0.43438	0.090573	0.20581	0.0557	0.09076	0.30957	25.593
VARIANZA	-45.367	1.959	1.311	0.764	1.0331	0.53634	0.25682	0.33489	0.1348	0.16473	0.83101	54.363
DESVIACIÓN	-59.06	3.013	1.845	1.267	1.2389	0.82766	0.33027	0.4995	0.2129	0.335	1.3216	22.883

TABLA 5

Aproximación de los valores meseta parcial de cada mes con el método CKO.

Se realizó el ajuste de número de vecinos y tipo de sectores que genera mejor valor de media cuadrática estandarizada, y además los datos de confiabilidad que se presentan en la tabla 6. A partir de estos datos se generó el continuo de precipitación del estado de Chiapas.

Parámetro	Enero	Febrero	Marzo	Abril	Mayo	Junio
Media cuadrática	41.02	75.9	39.96	53.41	96.56	115.8
Error promedio estándar	41.2	221.2	87.16	54.58	82.65	105.8
Media cuadrática estandarizada	0.9904	0.9548	0.76	0.9517	0.9369	1.006
Confiabilidad	46.2	90.59	97.16	97.202	90.38	94.54
Parámetro	Julio	Agosto	Septiembre	Octubre	Noviembre	Diciembre
Media cuadrática	105.2	117.3	134.4	164.8	149.1	117.5
Error promedio estándar	102.9	113.6	123	156.5	158.5	290.9
Media cuadrática estandarizada	1.001	0.9998	1.001	0.9521	0.9414	1.158
Confiabilidad	92.64	93.12	93.56	98.24	95	29.2

TABLA 6

Resultados estadísticos de cada mes con el método CKO.

RESULTADOS

Para evaluar la bondad de los continuos de precipitación en términos estadísticos y de distribución de la precipitación, se realizó la validación cruzada con ayuda del asistente geoestadístico del software ArcGis 9.3. Los datos estadísticos calculados para la evaluación son el coeficiente de determinación (R^2), el error medio cuadrático (RMSE) y el error medio absoluto (MAE) (Vicente-Serrano *et al.*, 2003).

Las siguientes gráficas representan el comportamiento y tendencia de las pruebas estadísticas aplicadas a los continuos de precipitación mensual obtenidos con los métodos IDP, KO y CKO. En la figura 1, se observa que los resultados de la prueba R^2 indican que el método que tiene un mejor acercamiento a uno es el método IDP, y el método de menor acercamiento es el método CKO. En la figura 2, se observa que en los datos generados con la prueba EMC, el método de interpolación que genera datos más bajos (cerca de cero), es el IDP y finalmente en la figura 3, se observa que de los datos estadísticos generados con la prueba EMA. El método de interpolación que mejor se aproximan a cero es nuevamente el IDP, de tal forma que para las tres evaluaciones estadísticas el modelo que mejor bondad estadística presenta es el Inverso de la Distancia Ponderada.

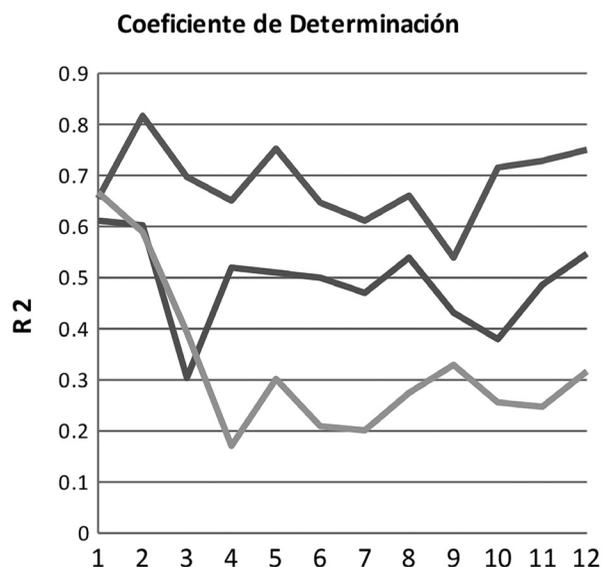


FIGURA 1

Datos obtenidos con la prueba Coeficiente de Determinación.

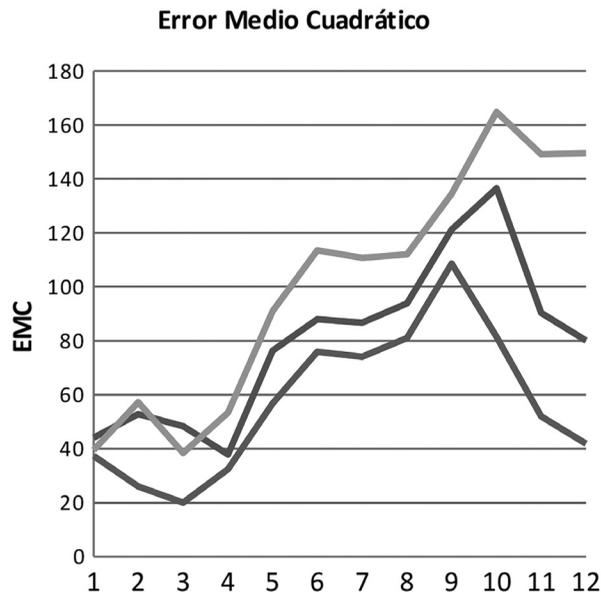


FIGURA 2

Datos obtenidos con la Error Medio Cuadrático.

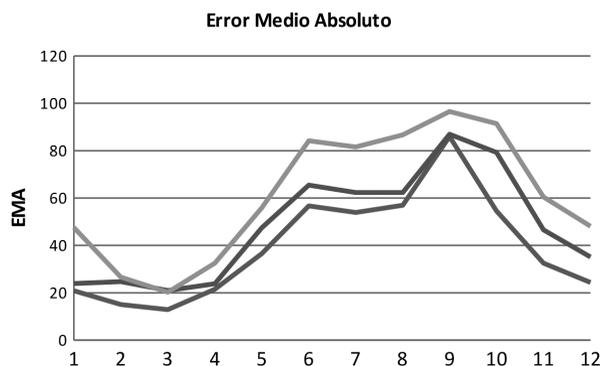


FIGURA 3

Datos obtenidos con la prueba Error Medio Absoluto.

La figura 4 presenta la distribución del continuo de precipitación anual en el estado de Chiapas, en donde se puede observar que la zona con menor precipitación anual es la depresión central del estado, las zonas en donde existe mayor precipitación anual es la parte norte y la región del Soconusco.

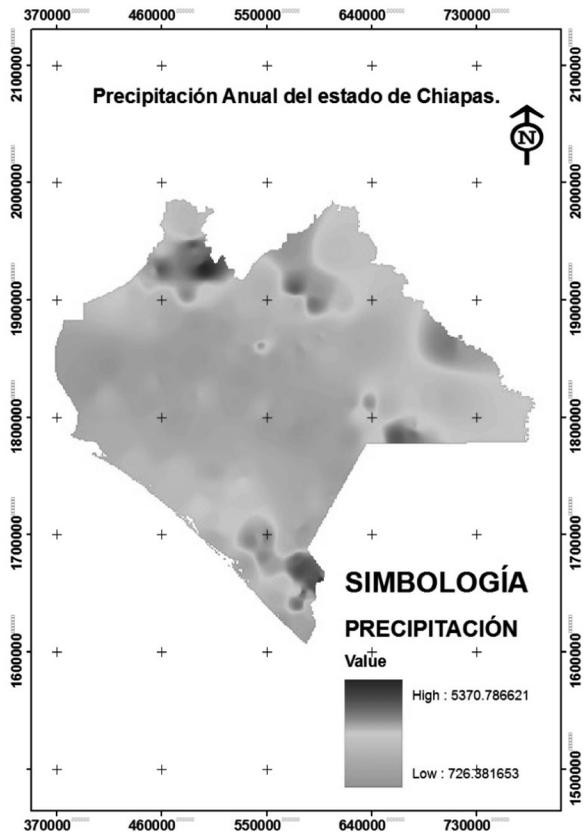


FIGURA 4

Continuo de precipitación anual del estado de Chiapas.

CONCLUSIONES

En este trabajo analizaron tres métodos de interpolación para obtener continuos de precipitación para el estado de Chiapas. En primer lugar, se determinaron los parámetros que aseguraban un mejor acercamiento en el continuo de precipitación según los criterios estadísticos antes mencionados. En segundo lugar, se calcularon los modelos y se estadísticamente a través de la validación cruzada. Para el modelo CKO se añadió como variable secundaria los valores de elevación. Las conclusiones que se derivan del análisis se pueden resumir en estos puntos:

1. El método de interpolación Inversa de la Distancia Ponderada, que ha sido tradicionalmente utilizado para la interpolación de datos de precipitación, ha proporcionado mejores precisiones en cada mes, que los métodos geoestadísticos, y por tanto se recomienda seguir aplicando este método para el estado de Chiapas.
2. El método CKO mostró deficiencias con la variable secundaria seleccionada (altura), para lo que se recomienda realizar pruebas con variables como temperatura, cercanía a costas y variables geográficas.
3. Finalmente, es recomendable realizar Modelos de Regresión Lineal Múltiple, con los ajustes estadísticos necesarios y evaluar su bondad para la generación de continuos de precipitación del estado de Chiapas.

LITERATURA CITADA

- AGNEW, M.D. & J.P. PALUTIKOF, 2000. GIS-based construction of base line climatologies for the Mediterranean using terrain variables. *Climate Res.* 14: 115-127.
- APAYDIN, H, F. KEMAL SONMEZ, Y. ERSOY YILDIRIM, 2004. Spatial interpolation techniques for climate data in the GAP region in Turkey. *Climate Res.* 28:31-40.
- BROWN, D. P. AND COMRIE, A. C. 2002. Spatial modeling of winter temperature and precipitation in Arizona and New Mexico, USA. *Climate Research.* 22:115-128
- DALY, C. W. P. GIBSON, G. H. TAYLOR, G. L. JOHNSON, P. PASTERIS, 2002. A knowledge-based approach to the statistical mapping of climate. *Climate Res.* 22: 99-113.
- DÍAZ, P. G. C. J. ARUIZ, G.G. MEDINA, G. M. A. CANO, A. V. SERRANO, 2006. Estadísticas climáticas básicas del estado de Tabasco (periodo 1961-2003). INIFAP. CIRGOC. Campo Experimental Cotaxtla. Veracruz, México. Libro Técnico. Núm. 12. 159 p.

- DRESSLER, K.A., S. R. FASSNACHT, R. C. BALES, R. E. DAVID, D. LAMPKIN, D. E. MYERS, 2000.** Geostatistical interpolation of point-measured SWE in the Colorado River Basin. EOS Transactions. *American Geophysical Union, Fall Meet. Suppl. 81 (48): F 397.*
- GOBIERNO DE CHIAPAS. (2016).** *Ubicación de Chiapas.* Recuperado de: <http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:FZAFOS7uzAAJ:www.chiapas.gob.mx/ubicacion+&cd=1&hl=es&ct=clnk&gl=mx>
- HEVESI, J. A., ISTOK, J. D. AND FLINT, A. L. 1992.** Precipitation estimation in mountainous terrain using multivariate geostatistics. Part I: Structural analysis. *J. Appl. Meteorol.* 31:661–676.
- INEGI (2012).** Página del Instituto Nacional de Estadística y Geografía. *Clima de Chiapas.* Recuperado de: <http://www.cuentame.inegi.org.mx/monografias/informacion/chis/territorio/clima.aspx?tema=me&e=07>
- MARQUÍNEZ, J., J. LASTRA & P. GARCÍA, 2003.** Estimation models for precipitation in mountainous regions: the use of GIS and multivariate analysis. *J. Hydrology.* 270: 1-11.
- NEW, M. & M. HULME, 2000.** Representing twentieth-century space-time climate variability. Part II. Development of 1901 monthly grids of terrestrial surface climate. *J. Climatol.* 13: 2217-2238.
- NINYEROLA, M., X. PONS, J. M. ROURE, 2000.** A methodological approach of climatological modelling of air temperature and precipitation through GIS techniques. *Int. J. Climatol.* 20: 1823-1841.
- NUÑEZ, D. et al. (2014).** Uso de modelos de regresión para interpolar espacialmente la precipitación media mensual en la cuenca del río Conchos. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas,* 5(2), 201-213.
- PORTALES C., N. BORONAT-ZARCÑO Y J.E. PARDO-PASCUAL, 2008.** Un nuevo método para el cálculo de precipitaciones medias mediante técnicas de interpolación geoestadística considerando las características geográficas y topográficas del territorio. *Congreso internacional de ingeniería en Geomática y Topográfica, IX Congreso Nacional TOP-CAR Valencia.*
- RAMOS S., J.C. MOTA, H. MORALES, E. CASTELLANOS, I.G. COSSÍO, R.A. DÍAZ, L.H. GÓMEZ Y J.L. SERRANO, 2010.** *Escenarios climáticos para el estado de Chiapas.* Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas (CIGERCC).
- VICENTE-SERRANO, S.M., M. A. SAZ-SÁNCHEZ, J. M. CUADRAT, 2003.** Comparative analysis of interpolation methods in the middle Ebro Valley (Spain): application to annual precipitation and temperature. *Climate Res.* 24: 161-180.

Proceso Fenton para lixiviados pretratados biológicamente

Jesús Alberto Bautista Ramírez¹, Denisse Bartolo Vicente¹,
Flores Ramos Vaquerizo¹, Rubén Fernando Gutiérrez Hernández² y Hugo Alejandro Nájera Aguilar^{1*}

¹Escuela de Ingeniería Ambiental. Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. Ciudad Universitaria, Libramiento Norte Poniente S/N, col. Lajas Maciel, C.P. 29000, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México; Tel: 52 (961)1256033, correo electrónico: hnajera72@hotmail.com. | ²Departamento de Ingeniería Química. Instituto Tecnológico de Tapachula. Tapachula, Chiapas

RESUMEN

Los lixiviados son líquidos altamente contaminados y difíciles de tratar. En este trabajo se presenta la aplicación del proceso Fenton para el tratamiento de lixiviados provenientes del relleno sanitario de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, los cuales fueron previamente tratados por un biorreactor semiaeróbico. Las variables ensayadas para el proceso fueron el pH (2.5, 3.5 y 4.5) y relaciones molares $[H_2O_2]/[Fe^{+2}]$ (2, 3 y 4). El mejor tratamiento para una hora de reacción fue obtenido bajo las condiciones de pH 3.5 y relación molar $[H_2O_2]/[Fe^{+2}]$ de 2, donde se alcanzaron remociones por arriba del 50% para DQO y más del 90% para color. De acuerdo al análisis estadístico (ANOVA) de los resultados, no se observaron diferencias significativas en una relación molar de 2 y pH de 4.5, siendo este último el más recomendable por requerir un menor consumo de reactivos ante un posible escalamiento.

Palabras claves: DQO, Fenton, lixiviados de rellenos sanitarios, procesos avanzados de oxidación.

ABSTRACT

The landfill leachate is a liquid highly contaminated and difficult to treat. This paper present the application of Fenton process for the treatment of leachate from the landfill in Tuxtla Gutierrez, Chiapas; which they were pretreated for semi-aerobic bioreactor. The process variables were tested for pH (2.5, 3.5 and 4.5) and molar ratios $[H_2O_2]/[Fe^{+2}]$ (2, 3 and 4). The best treatment for one hour of reaction was obtained under the conditions of pH 3.5 and molar ratio $[H_2O_2]/[Fe^{+2}]$ 2, where removals were reached above 50% for COD and 90% for color. According to statistical analysis (ANOVA) of the results, no significant differences were observed in a molar ratio of 2 and pH 4.5, the latter being the most recommended by requiring lower consumption of reagents to a possible escalation.

Keywords: advanced oxidation processes, COD, Fenton, landfill leachate.

INTRODUCCIÓN

La creciente generación de residuos sólidos es atribuida al crecimiento industrial y comercial acelerada por la obsolescencia de los productos y una tendencia general de la sociedad por el despilfarro, ha llevado a los municipios tener que gestionar grandes cantidades de residuos sólidos (Renou *et al.*, 2008; Ahmed y Lan, 2012).

En la mayoría de los países los rellenos sanitarios son, actualmente, la forma más común para disponer los residuos sólidos urbanos (RSU) (Xie *et al.*, 2010). Estudios comparativos sobre los diversos medios de eliminación de RSU (depósito en vertederos, incineración, compostaje, etc.) han demostrado que el más barato, en términos de costos de explotación y de capital, es el relleno sanitario (Renou *et al.*, 2008). Dentro de un relleno sanitario se

generan líquidos nocivos como resultado de la percolación del agua de lluvia a través de los residuos sólidos, extrayendo y llevando consigo varios materiales contaminantes, produciendo un agua residual muy compleja, conocida propiamente con el término *lixiviado* (Fernandes *et al.*, 2015). Varios tipos de contaminantes pueden ser encontrados en estos líquidos, tanto de naturaleza orgánica como inorgánica; algunos de ellos refractarios y tóxicos, como los metales pesados.

En general, como se muestra en la tabla 1, los lixiviados pueden ser clasificados como: jóvenes (menor a 5 años), intermedios (entre 5 y 10 años) y estabilizados o maduros (mayor a 10 años) (Foo y Hameed, 2009). Aunque el contenido orgánico declina dramáticamente con el tiempo, la mayor fracción orgánica en un lixiviado maduro se vuelve gradualmente refractaria (Deng y

Ezyske, 2011). Definitivamente la tecnología utilizada para el tratamiento dependerá de la biodegradabilidad y el volumen de los lixiviados, así, para materia orgánica que se degrade fácilmente, como ácidos grasos volátiles, podrían eliminarse de manera eficiente por los procesos de tratamiento biológico tradicionales, sin embargo, presenta algunos inconvenientes operacionales como la formación de espuma, la toxicidad de metales, la deficiencia de nutrientes y sedimentación de lodos (Oulego *et al.*, 2016), pero esto no impide que deje de ser la mejor opción de tratamiento para lixiviados jóvenes.

En lo que respecta a lixiviados maduros, los procesos fisicoquímicos son la mejor opción de tratamiento como primera etapa, o como una etapa de refinamiento para un lixiviado tratado biológicamente (Kurniawan *et al.*, 2006). Dentro de esta gama de procesos se encuentran los de oxidación avanzada, los cuales implican la generación del radical hidroxilo, uno de los radicales libres más reactivos y con alto potencial de oxidación ($\text{HO}\cdot + \text{H}^+ + \text{e}^- \rightarrow \text{H}_2\text{O}$; $E^0 = 2.33 \text{ mV}$) (López *et al.*, 2004), con capacidad para oxidar casi todos los contaminantes orgánicos, muchos de ellos hasta su mineralización.

Los procesos avanzados de oxidación (PAO) generalmente se aplican acompañados de otros procesos, bien sean biológicos o fisicoquímicos, dado que si se aplican como único proceso de tratamiento, podría resultar costoso en términos económicos (Morais y Zamora, 2005) y en muchos casos no cumplir con los límites máximos permisibles de contaminantes. Muchos sistemas se pueden clasificar como PAO y la mayoría de ellos utilizan una combinación de: dos oxidantes ($\text{O}_3 + \text{H}_2\text{O}_2$); catalizador más oxidante ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2$); oxidante más irradiación ($\text{H}_2\text{O}_2 + \text{UV}$); oxidante más foto-catalizador ($\text{H}_2\text{O}_2 + \text{TiO}_2$ más $h\nu$); oxidante más ultrasonido ($\text{H}_2\text{O}_2 + \text{ultrasonido}$), siendo una característica común de estos sistemas la gran demanda de energía eléctrica, especialmente en dispositivos como ozonizadores, lámparas UV, ultrasonido, lo que se traduce en mayores costos de tratamiento (López *et al.*, 2004), a excepción del proceso Fenton, que no demanda energía eléctrica para su funcionamiento, más que solo la necesaria para la agitación del medio.

El proceso Fenton típico incluye cinco etapas: acidificación, oxidación, neutralización, coagulación/ floculación y separación del sobrenadante (Gogate y Pandit, 2004). Este proceso ofrece ventajas como: (I) el bajo costo y la nula toxicidad del hierro y el peróxido de hidrógeno, (II) no hay ninguna limitación de transferencia de masa debido a su naturaleza catalítica homogénea, (III) no se utiliza una fuente de energía como catalizador, (IV)

el proceso es tecnológicamente sencillo (López *et al.*, 2004). En la actualidad, la capacidad de tratamiento de lixiviados provenientes de rellenos sanitarios, sin ningún tipo de tratamiento previo, por el proceso Fenton ha sido ampliamente investigado (Deng, 2007; Hermosilla *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009; Singh y Tang, 2013; Singh *et al.*, 2013). En relación con lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la efectividad del proceso Fenton en la remoción de contaminantes orgánicos de lixiviados pretratados, provenientes de un biorreactor semiaerobico empacado con residuos sólidos de edad avanzada.

Parámetro	Joven	Intermedio	Maduro
Edad (Años)	< 5	5-10	> 10
pH	< 6.5	6.5-7.5	> 7.5
DBO/ DQO	0.5-1	0.1-0.5	< 0.1
DQO mg/ L	> 10,000	4,000-10,000	< 4,000
$\text{NH}_3\text{-N}$ mg/ L	< 400	N.A.	> 400
Metales pesados	Baja-medio	Baja	Baja
Biodegradabilidad	Alta	Media	Baja

N.A.–No aplicable

TABLA 1

Clasificación y composición típica de los lixiviados de relleno sanitario (Adaptado de Foo y Hameed, 2009)

MATERIAL Y MÉTODOS

Caracterización del lixiviado pretratado

Las muestras de lixiviado crudo fueron recolectadas del relleno sanitario del municipio de Tuxtla Gutiérrez, ubicado en el predio San Francisco Tucutzano en las coordenadas geográficas $16^{\circ}40'7.57''$ de latitud norte y $93^{\circ}11'47.36''$ de longitud Oeste. El lixiviado crudo fue tratado inicialmente por un proceso biológico, cuyo efluente fue caracterizado con los parámetros y las técnicas señaladas en las normas mexicanas, mostrados en la tabla 2.

Procedimiento experimental

Considerando lo señalado por diversos autores (López *et al.*, 2004; Deng, 2007; Méndez *et al.*, 2010; Xie *et al.*, 2010; Mohammad *et al.*, 2012) se establecieron las relaciones molares $[\text{H}_2\text{O}_2]/[\text{Fe}^{+2}]$ y los valores de pH, bajo un diseño experimental de 3^2 con un total de nueve tratamientos y tres repeticiones en cada uno de ellos tal y como se muestra en la tabla 3.

Durante todos los ensayos se fijó la concentración del catalizador (Fe⁺²) a 700 mg/L. Los reactivos utilizados en el tratamiento fueron FeSO₄·7H₂O como catalizador y H₂O₂ al 30% como agente oxidante. Todos los productos químicos fueron grado analítico (Reactivos J. T. Baker). Para determinar el tiempo de reacción, se realizaron dos ensayos a diferentes tiempos: 1 y 1.5 horas.

Parámetros	Normatividad aplicada
Demanda química de oxígeno (mg/L)	NMX-AA-030/2-SCFI-2011
Alcalinidad (mg CaCO ₃ /L)	NMX-AA-036-SCFI-2001
Color (Pt/Co)	NMX-AA-017-1980
pH	NMX-AA-008-SCFI-2011
Conductividad (μS)	NMX-AA-093-SCFI-2000

TABLA 2 Parámetros medidos y normas aplicadas

Variables	pH		
	2.5	3.5	4.5
Relación molar [H ₂ O ₂]/[Fe ⁺⁺]	T1	T2	T3
2	T4	T5	T6
3	T7	T8	T9
4			

TABLA 3 Diseño experimental 3² para el proceso Fenton

Tratamiento Fenton

El tratamiento Fenton para el lixiviado pretratado se corrió a temperatura ambiente acorde a las siguientes etapas:

Acidificación. El lixiviado fue acidificado con H₂SO₄ al 10%. (2) Oxidación. Los ensayos se realizaron en una prueba de jarras (Phipps y Bird modelo PB-700) con un volumen de 150 ml por cada repetición. Se adicionó el catalizador, seguido del agente oxidante. La etapa de oxidación se llevó a cabo a 120 rpm por 1 hora. (3) Neutralización. La neutralización de la muestra se realizó con NaOH 1.5 M. (4) Coagulación/ Floculación. Se realizó por un tiempo de 20 min a 30 rpm. (5) Sedimentación. Se dejó reposar la muestra por una hora para permitir la sedimentación de los flocúlos formados y se decantó para separar el sobrenadante.

Se obtuvieron las eficiencias de remoción de color y DQO considerando la ecuación 1. La determinación de la DQO se llevó a cabo con el método de tubo sellado con espectrofotometría (HACH DR600) de acuerdo a la nor-

matividad mexicana (NMX-AA-030/2-SCFI-2011). El color fue determinado mediante el método estándar platino cobalto con un colorímetro marca HACH DR/890.

Ecuación 1
$$\eta = \left(\frac{V_0 - V_f}{V_0} \right) * 100$$

η= Eficiencia
V₀= Valor inicial

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos en los ensayos para determinar el tiempo de reacción óptimo fueron analizados estadísticamente con apoyo del Software Rstudio versión 3.2.1 y los obtenidos con el proceso Fenton en el programa Statistica versión 7.0, en ambos se realizaron pruebas de normalidad, posterior análisis ANOVA con un valor de significancia de p < 0.05 y con la prueba de Turkey para el software Statistica y la prueba Shapiro Wilk y T-student en Rstudio. De igual manera se realizaron gráficas bifactoriales en el Software Sigma Plot para evaluar la influencia de los factores de estudio sobre las variables de respuesta.

RESULTADOS

Caracterización del lixiviado

El lixiviado tratado con un reactor biológico tenía una carga orgánica cercana a los 1000 mg/L de DQO, por lo que fue necesario un tratamiento adicional antes de su descarga o reúso. La carga orgánica y la baja biodegradabilidad del líquido, justificaron la aplicación de un proceso avanzado de oxidación, en este caso, el proceso Fenton (tabla 4).

V_f= Valor final

Propiedad	Valores promedio (± Desviación estándar)
	Lixiviado pretratado biológicamente
Demanda química de oxígeno (mg/L)	918.75 ± 20.43
Alcalinidad (mg CaCO ₃ /L)	320.00 ± 52.92
Color (Pt/Co)	1063.33 ± 57.74
pH	8.01 ± 0.24
Conductividad (μS)	274.4 ± 2.16

TABLA 4 Características fisicoquímicas del lixiviado pretratado biológicamente

Establecimiento del tiempo de reacción

El tiempo de reacción es una de las variables importantes para la optimización de la prueba Fenton; para determinar este tiempo, se trabajó con el tratamiento 1 por triplicado. La primera prueba se realizó a 1 hora de reacción y para la segunda prueba el tiempo de reacción fue a 1 hora y media. Los resultados se presentan en la tabla 5.

	Tratamiento 1 1 hora		Tratamiento 1 1:30 hora	
	[DQO] mg/L	Eficiencia de remoción	[DQO] mg/L	Eficiencia de remoción
A	412.5	55.10%	401.5625	56.29%
B	419.53125	54.34%	412.5	55.10%
C	423.4375	53.91%	420.3125	54.25%
Promedio	418.489583	54.45%	411.458333	55.22%

TABLA 5

Pruebas a diferentes tiempos de reacción

Los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente en Rstudio y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos tratamientos ($p=0.3409$), por lo que el tiempo establecido para la realización de las pruebas fue de 1 hora. Desde un punto de vista económico, se ha demostrado que operar con altos tiempos de residencia no es viable (Muñoz *et al.*, 2005); de hecho, con bajos periodos de reacción se consiguen buenos niveles de degradación de contaminantes en comparación con otros procesos de oxidación química (Esplugas *et al.*, 2002; Burbano *et al.*, 2008).

Proceso Fenton

El pH es una de las variables más significativas en el proceso Fenton. Para el caso del estudio, las mayores remociones se tuvieron a valores de pH 3.5 (figura 1), coincidiendo con el rango reportado (2.4-4) por diversos autores (Durán-Moreno *et al.*, 2011; Pignatello *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2004, Zazouli *et al.*, 2012).

La relación molar H_2O_2/Fe^{2+} depende del tipo de contaminante que se pretenda remover (Rubio-Clemente *et al.*, 2014). Para este estudio las relaciones molares de 2 y 3 presentes en los tratamientos 2, 3 y 4 presenta la mayor eficiencia de remoción de DQO (figura 3), pero entre las relaciones molares de 2 y 3 no existen diferencias estadísticamente significativas (figura 2). Es de esperar que la velocidad de degradación de las moléculas orgánicas sea mayor a medida que aumenta la concentración del oxidante y del catalizador; sin embargo, grandes cantidades

de H_2O_2 y de Fe^{2+} limitan el porcentaje de degradación del contaminante, ya que se favorecen las reacciones secundarias (Rubio-Clemente *et al.*, 2014).

Respecto al tiempo de sedimentación en el proceso, este tuvo que ser modificado de 1 hora a 24 horas, debido a que los lodos obtenidos eran poco densos y por consiguiente difíciles de remover por acción de la gravedad (Méndez *et al.*, 2010).

Remoción de color y DQO

Para el caso de agua residual como los lixiviados de rellenos sanitarios, el color es un parámetro que refleja en buena medida el grado de contaminación por compuestos de naturaleza orgánica y que generalmente se relaciona con las concentraciones de DQO encontradas. Los resultados presentados en las figuras 1 y 3, muestran una eficiencia de remoción en color entre 90-96%.

La DQO representa el grado de contaminación de nuestro influente, es un parámetro importante para determinar la cantidad de contaminación orgánica en el agua (Gibbs, 1979; Boyles, 1997; Hasan *et al.*, 2012) y de gran importancia en el proceso Fenton (Bianco *et al.*, 2011). Los resultados obtenidos indican remociones de DQO por encima del 50%, observando la mayor remoción (78.97%) bajo las condiciones de pH 3.5 y una relación molar $[H_2O_2]/[Fe^{2+}]$ de 2 (figuras 2 y 3).

En general, las eficiencias obtenidas son altas comparándolo con lo obtenido por Wang *et al.* (2009), quienes reportan una eficiencia en el proceso Fenton del 56% de remoción de DQO con lixiviados pretratados.

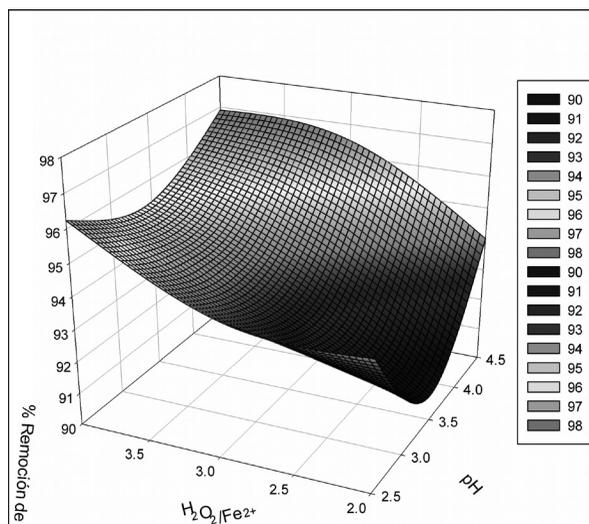


FIGURA 1

Remoción de color.

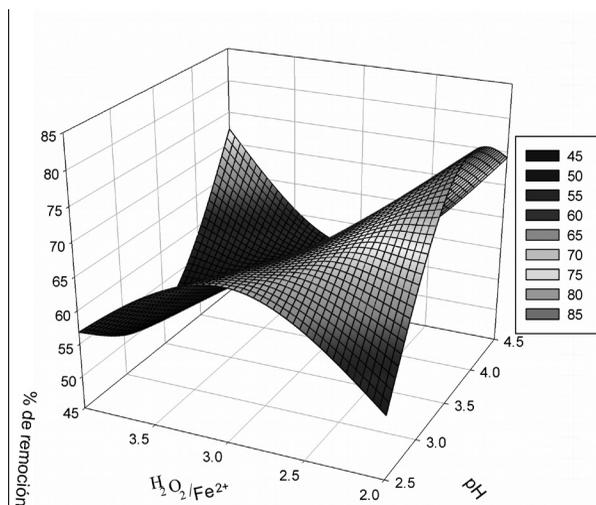


FIGURA 2

Eficiencias de remoción de DQO.

Análisis estadístico

Realizando un análisis ANOVA, se encontró que los tratamientos con mejores remociones (T2, T3 y T4) no tienen diferencias estadísticamente significativas. Por tanto, cualquiera de los tres tratamientos tiene una eficiencia aceptable en la remoción de la carga orgánica para un lixiviado con estas mismas características.

CONCLUSIONES

Los resultados indicaron que las mejores eficiencias de remoción en DQO (78.97%) se obtuvieron bajo las condiciones del tratamiento T2, en este caso, relación molar $[H_2O_2]/[Fe^{2+}]$ de 2 y pH 3.5. Aunque de acuerdo a la prueba ANOVA, no hubo diferencias significativas con el T3,

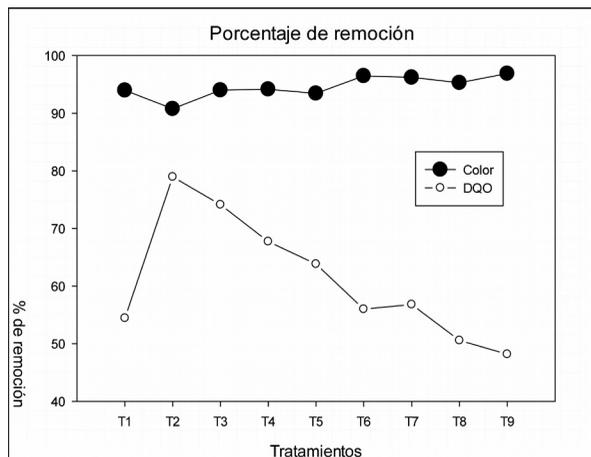


FIGURA 3

Porcentaje de remoción de DQO y color en cada tratamiento.

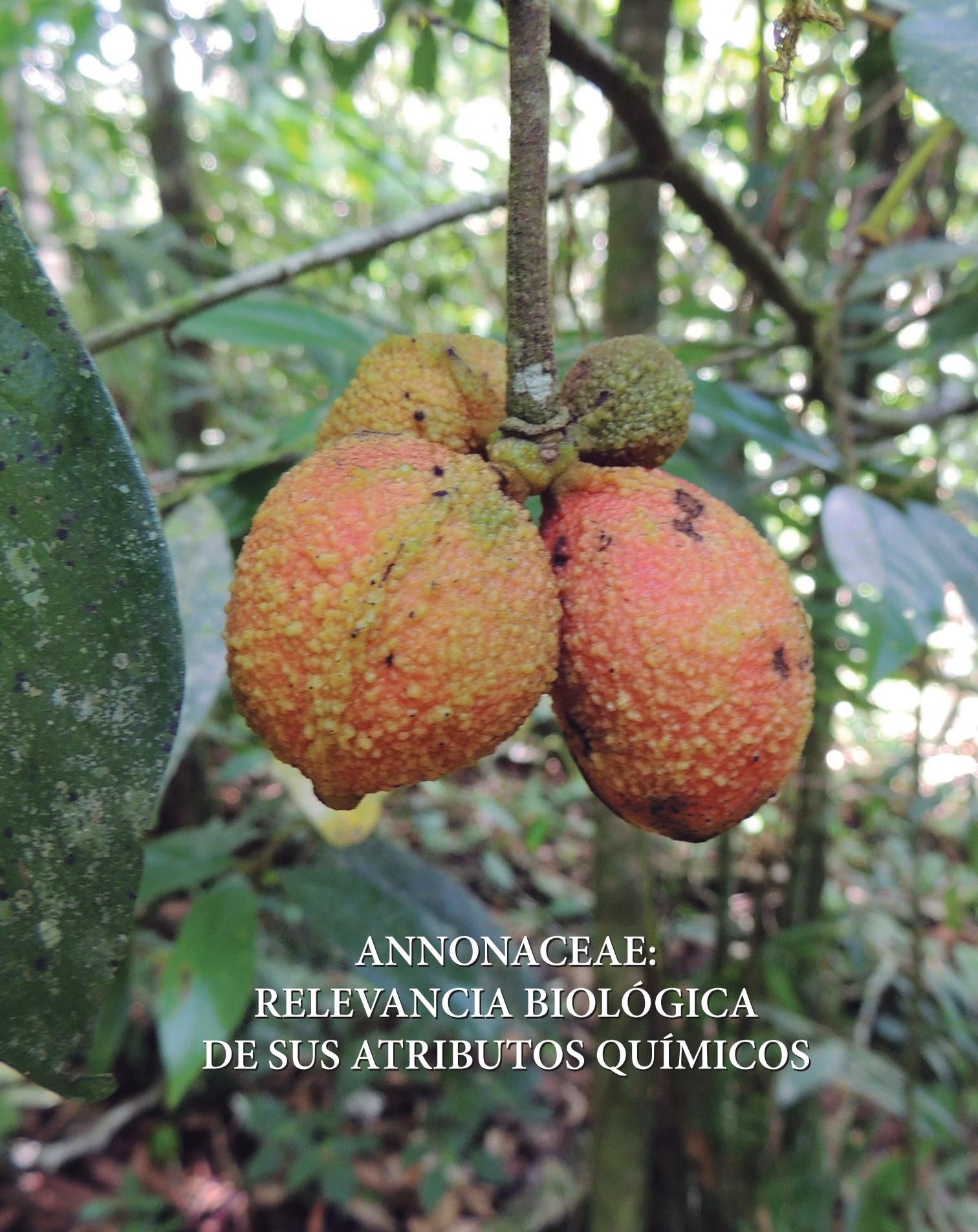
pudiendo recomendarse este último por demandar menor consumo de reactivos ante un posible escalamiento. Los ensayos realizados con pruebas de color demuestran que no existen diferencias significativas en la remoción de la carga orgánica, y que las eficiencias de remoción obtenidas oscilaron entre el 90-98%. Así, los resultados prueban que el tratamiento Fenton constituye uno de los procesos oxidativos más atractivos en la eliminación de contaminantes de difícil degradación, a partir del uso de pocos reactivos, que son amigables y fáciles de manipular. Por tanto, para un problema poco atendido en el estado de Chiapas, y en general en toda la república mexicana, el proceso Fenton puede ser una alternativa viable y económica como etapa de depuración final en el tratamiento de lixiviados pretratados.

LITERATURA CITADA

- AHMED F. & C. LAN, 2012. Treatment of landfill leachate using membrane bioreactors: A review. *Desalination* 287: 41-54.
- BIANCO B, I. DE MICHELIS, & F. VEGLIÒ, 2011. Fenton treatment of complex industrial wastewater: optimization of process conditions by surface response method. *Journal of hazardous materials*, 186: 1733-1738.
- BOYLES W., 1997. The Science of Chemical Oxygen Demand. *Technical Information Series, Booklet No. 9. Pp. 24.*
- BURBANO A, D. DIONYSIOU, & M. SUIDAN, 2008. Effect of oxidant-to-substrate ratios on the degradation of MTBE with Fenton reagent. *Water research*, 42: 3225-3239.

- DENG, Y., 2007.** Physical and oxidative removal of organics during Fenton treatment of mature municipal landfill leachate. *Journal of Hazardous Materials*, 146: 334-340.
- DENG Y, & C. EZYSKE, 2011.** Sulfate radical-advanced oxidation process (SR-AOP) for simultaneous removal of refractory organic contaminants and ammonia in landfill leachate. *Water Research*, 45: 6189-6194.
- DURÁN-MORENO A, S. GARCÍA-GONZÁLEZ, M. GUTIÉRREZ-LARA, F. RIGAS, & R. RAMÍREZ-ZAMORA, 2011.** Assessment of Fenton's reagent and ozonation as pre-treatments for increasing the biodegradability of aqueous diethanolamine solutions from an oil refinery gas sweetening process. *Journal of Hazardous Materials*, 186: 1652-1659.
- ESPULGAS S, J. GIMENEZ, S. CONTRERAS, E. PASCUAL, & M. RODRÍGUEZ, 2002.** Comparison of different advanced oxidation processes for phenol degradation. *Water Research*, 36: 1034-1042.
- FERNÁNDES A, M. PACHECO, L. CIRÍACO, & A. LOPEZ, 2015.** Review on the electrochemical processes for the treatment of sanitary landfill leachates: Present and future. *Applied Catalysis B: Environmental*, 176-177: 183-200.
- FOO K, & B. HAMEED, 2009.** An overview of landfill leachate treatment via activated carbon adsorption process. *Journal of Hazardous Materials*, 171: 54-60.
- GIBBS C., 1979.** The Science of Chemical Oxygen Demand. *Technical Information Series, Booklet No. 8. Pp. 17.*
- GOGATE P, & A. PANDIT, 2004.** A review of imperative technologies for wastewater treatment I: oxidation technologies at ambient conditions. *Advances in Environmental Research*, 8: 501-551.
- HASAN S, M. ELEKTOROWICZ, & J. OLESZKIEWICZ., 2012.** Correlations between trans-membrane pressure (TMP) and sludge properties in submerged membrane electro-bioreactor (SMEBR) and conventional membrane bioreactor (MBR). *Bioresource Technology*, 120: 199-205.
- HERMOSILLA D, M. CORTIJO, & C. HUANG., 2009.** Optimizing the treatment of landfill leachate by conventional Fenton and photo-Fenton processes. *Science of the Total Environment*, 407: 3473-3481.
- KURNIAWAN T, W. LO, & G. CHAN., 2006.** Physico-chemical treatments for removal of recalcitrant contaminants from landfill leachate. *Journal of Hazardous Materials*, B129: 80-100.
- LÓPEZ A., M. PENAGO, A. VOLPE, A. DI PINTO., 2004.** Fenton's pre-treatment of mature landfill leachate. *Chemosphere*, 54: 1005-1010.
- MÉNDEZ R., J. PIETROGIOVANNA, B. SANTOS, M. SAURI, G. GIACOMAN, & E. CASTILLO., 2010.** Determinación de la dosis optima de reactivo Fenton en un tratamiento de lixiviados por Fenton-Absorción. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 26 (3) 211-220.
- MORAIS J, & P. ZAMORA., 2006.** Use of advanced oxidation processes to improve the biodegradability of mature landfill leachates. *Journal of Hazardous Materials*, B123: 181-186.
- MUÑOZI, J. RIERADEVALL, F. TORRADES, J. PERAL, & X. DOMÈNECH., 2005.** Environmental assessment of different solar driven advanced oxidation processes. *Solar Energy*, 79: 369-375.

- NÁJERA H., J. CASTAÑÓN, J. FIGUEROA, & M. ROJAS-VALENCIA., 2009.** Caracterización y tratamiento físicoquímico de lixiviados maduros producidos en el sitio de disposición final de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México. *La Red de Ingenierías en Saneamiento Ambiental*.
- NORMA MEXICANA NMX-AA-030/2-SCFI-2011.** Análisis de Agua– Determinación de la Demanda Química de Oxígeno en aguas naturales, residuales y residuales tratadas–Método de prueba–Parte 2–Determinación del índice de la Demanda Química de Oxígeno–Método de tubo sellado a pequeña escala. *Diario Oficial de la Federación*, 27 de junio 2013.
- OULEGO P, S. COLLADO, A. LACA, & M. DÍAZ., 2016.** Impact of leachate composition on the advanced oxidation treatment. *Water Research*, 88: 389-402.
- PIGNATELLO J, E. OLIVEROS, & A. MACKAY., 2006.** Advanced oxidation processes for organic contaminant destruction based on the Fenton reaction and related chemistry. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 36: 1-84.
- RENOU S, J. GIVAUDAN, S. POULAIN, F. DIRASSOUYAN, & P. MOULIN. 2008.** Landfill leachate treatment: Review and opportunity. *Journal of Hazardous Materials*, 150: 468-493.
- RUBIO-CLEMENTE A, E. CHICA, & G. PEÑUELA., 2014.** Aplicación del proceso Fenton en el tratamiento de aguas residuales de origen petroquímico. *Ingeniería y Competitividad*, 16: 211-223.
- SINGH S, & W. TANG., 2013.** Statistical analysis of optimum Fenton oxidation conditions for landfill leachate treatment. *Waste Management*, 33: 81-88.
- SINGH S, W. TANG, & G. TACHIEV., 2013.** Fenton treatment of landfill leachate under different COD loading factors. *Waste Management*, 33: 2116-2122.
- WANG X, S. CHEN, X. GU, & K. WANG., 2009.** Pilot study on the advanced treatment of landfill leachate using a combined coagulation, fenton oxidation and biological aerated filter process. *Waste Management* 29(4), 1354-1358.
- XIE B, Z. LV, B. LV, & Y. GU., 2010.** Treatment of mature land fill leachate by biofilters and fenton oxidation. *Waste Management*, 30: 2108-2112.
- XU X, Z. ZHAO, X. Li, & J. GU., 2004.** Chemical oxidative degradation of methyl tert-butyl ether in aqueous solution by Fenton's reagent. *Chemosphere*, 55: 73-79.
- ZAZOULI M, Z. YOUSEFI, A. ESLAMI, & M. ARDEBILIAN., 2012.** Municipal solid waste landfill leachate treatment by fenton, photo-fenton and fenton-like processes: Effect of some variables. *Iranian Journal of Environmental Health Science & Engineering*, 9: 1.



ANNONACEAE:
RELEVANCIA BIOLÓGICA
DE SUS ATRIBUTOS QUÍMICOS

Annonaceae: relevancia biológica de sus atributos químicos

Alma Rosa González Esquinca

La familia Annonaceae, pertenece al orden Magnoliales que agrupa angiospermas antiguas, dentro de éste, tiene el mayor número de especies y es la más reciente desde el punto de vista evolutivo, de modo que está formada por organismos cuyo origen data del Cretácico, aunque también tiene géneros más recientes.

Las especies de Annonaceae también se caracterizan porque su metabolismo secundario está referido principalmente a la biosíntesis de moléculas como las acetogeninas, sustancias restringidas a la familia y los alcaloides de origen bencilisoquinolínico (abundantes en especies del antiguo complejo Ranaleano), además de aceites esenciales y terpenos. La presencia de estas moléculas parece estar relacionada con el desarrollo fenológico de las plantas y/o con el establecimiento de mecanismos de respuesta a las interacciones con factores bióticos y abióticos.

El género tipo es *Annona* y algunos miembros de éste, tienen frutos comestibles bastante apreciados como la guanábana (*A. muricata*), el saramuyo (*A. squamosa*), la chirimoya (*A. cherimolia*) y la papaya (*A. macrophyllata*). Otros, como la anona amarilla (*A. lutescens*) y la chincuya (*A. purpurea*) solo se consumen en las localidades donde se presentan de forma natural.

Se ha reportado la toxicidad de varias especies de *Annona* y algunos usos medicinales en diferentes culturas, y entre los metabolitos secundarios que les confieren estas propiedades están los mencionados alcaloides y acetogeninas.

En Chiapas, en el Laboratorio de Fisiología y Química Vegetal de la UNICACH se han realizado investigaciones sobre alcaloides y acetogeninas con especies nativas del género *Annona* (*A. lutescens*, *A. macrophyllata*, *A. purpurea* y *A. muricata*). Los trabajos realizados se agrupan en dos vertientes: 1) el aislamiento de compuestos y la determinación de sus actividades biológicas y 2) la modulación fenológica y ecológica de su presencia. La primera ha implicado el descubrimiento del potencial antimicrobiano, antifúngico, insecticida y citotóxico de

estas moléculas, así como su actividad inhibitoria sobre células tumorales humanas y la actividad ansiolítica de los alcaloides aislados.

En la otra vertiente, se han aislado y llevado a cabo estudios de distribución en la planta de estos compuestos en árboles adultos en fructificación, evaluando su respuesta a diferentes condiciones edafoclimáticas. También se ha realizado el seguimiento de estos compuestos en las diferentes etapas de la germinación y en plántulas. De este modo se establecieron algunas relaciones entre el desarrollo temprano de *A. macrophyllata*, *A. lutescens*, *A. muricata* y *A. purpurea* y los alcaloides que producen, entre lo más significativo se encontró que 1. Estas moléculas no se biosintetizan durante la organogénesis de las semillas; 2. La biosíntesis de ellas inicia muy tempranamente durante la germinación; 3. El perfil químico se enriquece en cada órgano a medida que la plántula completa su desarrollo.

También se conoció que algunos alcaloides solo dependen de la movilización de reservas acumuladas en las semillas y que otros, sin embargo, solo se biosintetizan cuando la plántula se vuelve fotosintética; que las semillas asignan parte de su material de reserva para la producción de sustancias antimicrobianas y que la biosíntesis de esta molécula está involucrada en la respuesta de la planta hacia patógenos y por tanto, es probable que sea parte del mecanismo de defensa temprano (De la Cruz *et al.*, 2011), que implica una estrategia de sobrevivencia de la especie.

En cuanto a las acetogeninas, éstas se biosintetizan durante la organogénesis de las semillas, además de que están presentes en varias partes de la planta y su concentración varía durante el desarrollo.

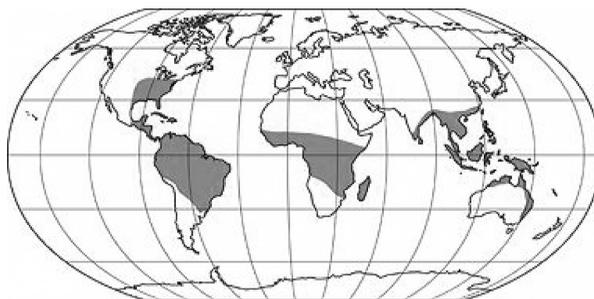
Este contraste entre la expresión genética que lleva a la biosíntesis de alcaloides y acetogeninas está regulado órgano específicamente y asociado a los cambios fenológicos y fisiológicos, que responden tanto al programa genético como a los factores ambientales. Por ejemplo, el aumento exponencial del contenido del alcaloide liriodenina en raíces en la temporada más severa del estiaje.

Ahora, se incursiona en las relaciones que establecen estos compuestos con los procesos fotosintéticos, enzimáticos, de estrés hídrico y nutrición mineral *in situ* o en condiciones controladas.

En particular, este tipo de estudios además de proporcionar información científica básica, permite escoger los mejores momentos y órganos para la obtención de moléculas con potencial biotecnológico referido, como compuestos ansiolíticos en colaboración con el Bioterio de nuestra Universidad y de la UNACH; antiproliferativos y antitumorales en colaboración con el Laboratorio de Biología Molecular y Genética y antibacterianos, antifúngicos, insecticidas y citotóxicos.

Los trabajos que a continuación se describen son una muestra de los presentados en el *Simposio ANNONACEAE: RELEVANCIA BIOLÓGICA DE SUS ATRIBUTOS QUÍMICOS*. Organizado por el Cuerpo Académico Recursos Fitogenéticos y Sustentabilidad en Chiapas que se realizó el 8 y 9 de septiembre de 2016. Se encuentran dos artículos de revisión que compendian la información sobre la presencia de las especies de esta familia en México y de *Bephrateloidea*, avispa barrenadora de las semillas de anonáceas; otros dos trabajos están referidos a la actividad

depresora de extractos alcaloidales y de extractos acuosos frente a *E. coli*, dos más a la actividad inhibitoria del alcaloide liriodenina sobre células neoplásicas de mama y la actividad inhibitoria de la acetogenina Rolliniastatina-2 sobre protoplastos de bacterias. Finalmente un estudio sobre la inducción fúngica de acetogeninas y alcaloides y las defensas químicas durante las primeras etapas del desarrollo de *A. macrophyllata*.



Annonaceae en el mundo
<http://www.mobot.org/mobot/research/apweb/maps/annonaceae.gif>

La familia Annonaceae Juss. En México

*Iván De-la-Cruz-Chacón¹, Marisol Castro-Moreno¹
Lorena Mercedes Luna-Cázares¹, Alma Rosa González-Esquinca¹

¹Instituto de Ciencias Biológicas. Laboratorio de Fisiología y Química Vegetal Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas Libramiento Norte Poniente 1150 Col. Lajas Maciel. C.P. 29032 Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México. ivan.cruz@unicach.mx

RESUMEN

Las plantas de la familia Annonaceae están ubicadas en el Orden de las Magnoliales y su distribución es pantropical, aunque mayormente son neotropicales. En este artículo se sistematiza la información de los géneros y especies en México, encontrada en diversas bases de datos. En el territorio nacional se encuentran 60 especies ubicadas en 12 géneros, y mayormente distribuidas en el centro y sur del país. Una tercera parte de las anonáceas son endémicas, incluyendo el género *Tridimeris*. Nueve anonáceas están en la lista roja de la UICN. Chiapas alberga 9 géneros y 37 especies, nueve endémicas.

Palabras clave: diversidad, endemismo, listado de plantas.

ABSTRACT

Annonaceae species are placed in the Magnoliales order, they have a Pantropical distribution, although most of them inhabit in the Neotropics. In this article the actual stage of the richness and distribution of Annonaceae family in Mexico are described. In the national territory there are 60 species in 12 genera. Three of them are living in the center and south of the country. The third part of the family is endemic but also the genera *Tridimeris*. Nine of these species are in risk (IUCN list), two species are cultivated.

Keywords: diversity, endemism, plant check-list.

INTRODUCCIÓN

Annonaceae es una familia de Angiospermas antiguas de distribución pantropical, situada taxonómicamente en el orden Magnoliales, junto con las familias Myristicaceae, Magnoliaceae, Degeneriaceae, Eupomatiaceae e Himantandraceae (Mass *et al.*, 2011; Chatrou *et al.*, 2012).

Aunque se han descrito cerca de 5,130 nombres científicos para especies de la familia, solo 2,106 son reconocidos, y están agrupados en 128 géneros (The Plant List, 2013) y de acuerdo a la filogenia más reciente, en cuatro subfamilias: Ambavioideae, Anaxagoreoideae, Annonoideae e Malmeoideae (Chatrou *et al.*, 2012). La subfamilia Annonoideae y Malmeoideae conjuntan gran parte de la diversidad con 60 y 35% de las especies, respectivamente (Stevens, 2016). Los géneros con mayor número de especies son *Guatteria* (254 especies), *Annona* (166), *Uvaria* (113) y *Xylopia* (109) (The Plant List, 2013).

Annonaceae contribuye a la diversidad de árboles en los bosques neotropicales y con lianas y árboles a los bosques lluviosos del Viejo Mundo (Chatrou *et al.*, 2012), sus estrategias fenológicas permiten a su vez dar cabida a otras especies que sincrónicamente conviven con ellas (González-Esquinca *et al.*, 2016). Además tienen relevancia económica porque algunas especies, principalmente del género *Annona* producen frutos agradables al paladar humano, otras generan esencias utilizadas en perfumería (*Cananga odorata* L.) o en la aromatización del chocolate (*Cymbopetalum penduliflorum* (Dunal) Baill.) y muchas de ellas biosintetizan moléculas de potencial interés para la industria farmacéutica y para la agricultura, debido a sus actividades anticancerígenas, antimicrobianas e insecticidas (González-Esquinca *et al.*, 2014; Cortes *et al.*, 2014; Martínez-Vázquez y Estrada-Reyes, 2014).

En el pasado, se han realizado revisiones para conocer el número de anonáceas que se encuentran en México, sin

embargo estuvieron limitadas a algunos herbarios y bases de datos (González-Esquinca, 2001; Agustín y Ledesma, 2014). En el presente, existen varias adecuaciones taxonómicas en los géneros y especies (Rainer, 2007; Maas *et al.*, 2011; Erkens *et al.*, 2012; Couvreur *et al.*, 2012.) y se han encontrado nuevos taxa (Jiménez-Ramírez y González-Martínez, 2016), de tal manera que la presente revisión tiene como objetivo, actualizar el estado sobre el número de géneros y especies reconocidas y contrastarlo con la diversidad mundial de la familia.

METODOLOGÍA

Para conocer la diversidad mundial de Annonaceae se consultaron principalmente las bases de datos de The Plant List (<http://www.theplantlist.org/>) del Royal Botanic Gardens, Kew y del Missouri Botanical Garden (MBG) y “Trópicos” del MBG (<http://www.tropicos.org/>). En tanto que para conocer la diversidad mexicana se consultó la base de datos de la Red Mundial de Información sobre Biodiversidad (REMIB) de la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO) del gobierno mexicano que incluyen a los herbarios nacionales y extranjeros: XAL, MEXU, ENCB, BANGEV, IEB, BCMEX, CICY, IBUNAM, IZTA, LL-TEX y ARIZ. Además, se realizaron exploraciones en algunas bases de datos virtuales: <http://www.tropicos.org/> (MOBOT), <http://sciweb.nybg.org/science2/hcol/allvasc/index.asp.html> (NY), www.mnh.si.edu (NMNH), <http://herbarium.univie.ac.at/> (WU) y www.huh.harvard.edu (GH). Se incluyeron los ejemplares de herbario del Herbario del Instituto de Historia Natural de Chiapas (CHIP) (Hernández-Najarro *et al.*, 2011). Las consultas fueron realizadas entre julio y septiembre del 2016. Todos los nombres fueron verificados en The Plant List. Para documentar los tipos de vegetación, además de las bases de datos, se realizó una búsqueda en artículos especializados en flora, diversidad y ecología donde se reportaban las distintas especies y su hábitat.

RESULTADOS Y DISCUSION

En México existen 60 especies de Annonaceae agrupadas en 12 géneros (cuadro 1), casi el 3 y 10% de la diversidad de la familia respectivamente. Tres de las cuatro subfamilias están representadas, Malmeoideae con mayor número de géneros (7) y Annonoideae con más especies (34) (figura 1). Los géneros más representativos en número de especies son *Annona* (18), *Gutteria* (8), *Cymbopetalum* (8), *Steannona* (7), *Desmopsis* (6) y *Sapranthus* (4).

Lo que significa que en algunos casos como *Stenanona* y *Sapranthus*, el territorio mexicano anida igual o casi el 50% de las especies del mundo.

En *Annona* está incluido ahora el género *Rollinia* A. St.-Hil. (Rainer, 2007), por lo que *R. rensoniana* y *R. mucosa* junto con sus sinonimias están en ese género.

Una tercera parte de las especies son endémicas del país, incluyendo todo el género *Tridimeris* (Ortiz-Rodríguez *et al.*, 2015), hay otros géneros con endemismo abundante, la mitad de *Steannona* (7/14), casi la mitad del género *Sapranthus* (4 de 9) y una tercera parte de *Desmopsis* (6/17) (cuadro 1 y cuadro 3).

En años recientes se han descubierto especies endémicas de algunos estados, por ejemplo, en Guerrero *Annona contreraasii* y *Desmopsis guerrensis* (Jiménez-Ramírez y Soto-Núñez, 2015; Jiménez-Ramírez y González-Martínez, 2016) y para Chiapas *Stenanona migueliana* (Ortiz-Rodríguez *et al.*, 2014).

Stenanona es el género con mayor proporción de endemismo en México (6/7 especies presentes), solo *Stenanona stenopetala* se extiende hasta Guatemala y Belice (Schatz y Maas, 2010). De ellas, *Stenanona flagelliflora* se distingue por ser el primer, y al parecer, único reporte del fenómeno de flagelifloria en la flora de México, lo que significa que sus flores nacen de ramas muy largas, delgadas y flexibles, que se posan sobre el suelo. El endemismo de esta planta parece estar limitada solo a las selvas de lomerío de la región de Uxpanapa-Chimalapa del Istmo de Tehuantepec en los estados de Veracruz y Oaxaca (Schatz y Wendt, 2004; Schatz y Mass, 2010).

Veracruz y Oaxaca son los estados con mayor número de géneros (11), seguidos por Tabasco (10), Chiapas (9) y Guerrero (7). Algo semejante ocurre con el número de especies: Veracruz (38), Chiapas (37), Oaxaca (32), Tabasco (25) y Guerrero (10) (cuadro 1 y figura 2).

Particularmente en Chiapas habitan 36 especies de 9 géneros de las subfamilias Malmeoideae y Annonoideae.

Nueve anonáceas de bosque templado están en la Lista Roja de Especies Amenazadas de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN), *Annona rensoniana*, *Annona liebmanniana*, *Annona spraguei*, *Cymbopetalum baillonii*, *Cymbopetalum mayanum*; *Desmopsis lanceolata*, *Desmopsis trunciflora*, *Gutteria galeottiana* y *Stenanona flagelliflora* (Schatz y Wendt, 2004; González-Espinosa *et al.*, 2011, IUCN, 2016).

Las anonáceas habitan en diferentes tipos de vegetación, una revisión menor sobre su hábitat señala que 50 % de las especies están en la Selva Alta Perennifolia o en zonas perturbadas de Selva Alta Perennifolia, 35% (21/60) en Selva Mediana Subperennifolia o Subcaducifolia, 25

% (15/59) en Selva Baja Caducifolia, mientras que solo 6/59 en Bosques Mesófilos de Montaña, 5% (3/59) en Sabanas, 3% (2/59) se reportan en Bosque Templado, y otro 3% (2/59) en zonas inundables, varias especies que se encuentran en Selva Alta Perennifolia, también se encuentran en Selva Mediana y Baja y *Mosannona*

depressa está registrada en cuatro tipos de vegetación SAP, SM, SBC y Sab.

Finalmente, treinta y nueve especies poseen por lo menos alguna sinonimia, se anexa en un apéndice las sinonimias correspondientes, consultadas en The Plant List.

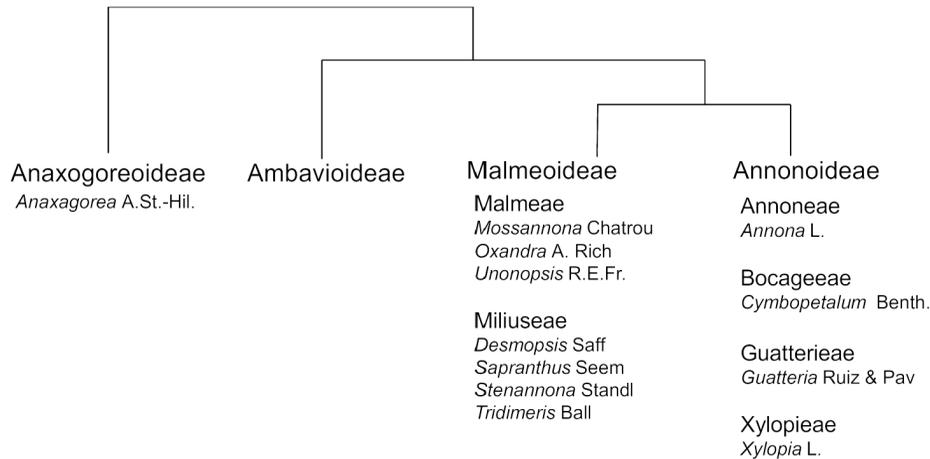


FIGURA 1 Subfamilias, tribus y géneros de Annonaceae en México.

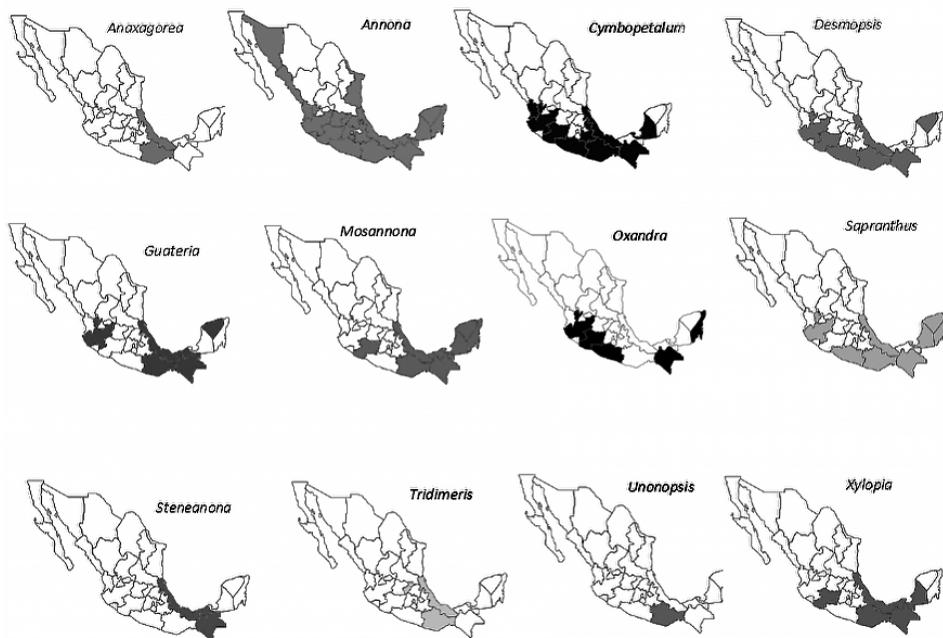


FIGURA 2 Presencia de géneros de Annonaceae en diversos estados de México.

Especie	Origen	Distribución
<i>Anaxagorea</i> A. St Hill.		
<i>Anaxagorea guatemalensis</i> Schltld.	Nativa	OAX., VER.
<i>Annona</i> L.		
<i>Annona cherimola</i> Mill	Nativa	CHIS., GRO, GTO, HGO, JAL., MEX., MICH., MOR., OAX., PUE., QRO, TAB, VER
<i>Annona contrerasii</i> J. Jiménez Ram. & J.C. Soto	Endémica	GRO, MICH.
<i>Annona glabra</i> L.	Nativa	CAM., CHIS., COL., GRO, GTO, HGO, JAL., NAY, MICH., OAX., PUE., QROO, TAB, TAMS., VER., YUC.
<i>Annona globiflora</i> Schltld.	Endémica	CHIS., GTO, HGO, MEX., MICH., QRO, QROO, SLP, TAMS., VER.
<i>Annona holosericea</i> Saff.	Nativa	CHIS.
<i>Annona liebmanniana</i> Baill.	Nativa	CHIS., OAX., VER.
<i>Annona longiflora</i> S. Watson	Endémica	COL., GRO, JAL., MEX., MICH., MOR., NAY, OAX., PUE., VER.
<i>Annona longipes</i> Saff.	Endémica	VER.
<i>Annona macrophyllata</i> Donn. Sm	Nativa	CHIS., GRO, GTO, HGO, MEX., MICH., MOR., QRO, QROO, SLP, TAMS., VER., YUC.
<i>Annona mucosa</i> (Jacq.) Baill.	Nativa	CHIS., OAX., PUE., TAB, VER.
<i>Annona muricata</i> L.	Nativa	CHIS., COL., GRO, MICH., QROO, TAB, VER., YUC.
<i>Annona palmeri</i> Saff.	Nativa	COL., GRO, JAL., MICH., OAX., VER.
<i>Annona purpurea</i> Moc. & Sessé ex Dunal	Nativa	CHIS., COL., JAL., MICH., OAX., PUE., QROO, TAB, VER., YUC.
<i>Annona rensoniana</i> Standl.	Nativa	CHIS., OAX., PUE., TAB, VER.
<i>Annona reticulata</i> L.	Nativa	CAM., CHIS., COL., DGO, GRO, HGO, JAL., MEX., MICH., MOR., NAY, OAX., PUE., QRO, QROO, SLP, SIN, TAB, TAMS., VER., YUC.
<i>Annona scleroderma</i> Saff.	Nativa	CHIS.
<i>Annona spraguei</i> Saff.	Nativa	CHIS.
<i>Annona squamosa</i> L.	Nativa	CAM., CHIS., COL., GRO, JAL., MEX., MICH., MOR., OAX., PUE., QRO, QROO, SLP, SIN, SON, TAB, VER., YUC.
<i>Cymbopetalum</i> Bent.		
<i>Cymbopetalum baillonii</i> R.F.Fr.	Endémica	CHIS., JAL., MEX., OAX., PUE., TAB, VER.
<i>Cymbopetalum gracile</i> R.E. Fr.	Endémica	GRO., OAX., VER.
<i>Cymbopetalum hintonii</i> Lundell	Endémica	JAL., MICH., NAY.
<i>Cymbopetalum mayanum</i> Lundell	Nativa	CAM., CHIS., QROO.
<i>Cymbopetalum mirabile</i> R.E. Fr.	Nativa	CHIS., VER.
<i>Cymbopetalum parviflorum</i> N.A. Murray	Nativa	OAX.
<i>Cymbopetalum penduliflorum</i> (Dunal) Baill.	Nativa	CAM., CHIS., GRO, JAL., MICH., NAY, OAX., PUE., TAB, VER.
<i>Cymbopetalum stenophyllum</i> Donn. Sm	Nativa	CHIS., GRO., OAX.
<i>Desmopsis</i> Saff.		
<i>Desmopsis guerrerensis</i> J. Jiménez Ram. & Gonz.-Martínez	Endémica	GRO.
<i>Desmopsis lanceolata</i> Lundell	Endémica	CHIS., OAX.
<i>Desmopsis mexicana</i> R.F.Fr.	Endémica	MICH.

Especie	Origen	Distribución
<i>Desmopsis schippii</i> Standl.	Nativa	CHIS.
<i>Desmopsis trunciflora</i> (Schltdl. Cham) G.E. Sachtz ex Maas, E.A.mennega&Westra	Endémica	CHIS., COL., JAL., NAY., OAX., TAB., VER.
<i>Desmopsis uxpanapensis</i> G.E.Sachtz & N.Zamora	Endémica	OAX., VER.
<i>Guatteria</i> Ruiz-& Pav.		
<i>Guatteria amplifolia</i> Triana & Planch	Nativa	CHIS., GRO., OAX., PUE., TAB., VER.
<i>Guatteria anomala</i> .FFr.	Nativa	CHIS., GRO., OAX., TAB., VER.
<i>Guatteria diospyroides</i> Baill.	Nativa	CHIS., OAX., VER.
<i>Guatteria dolichopoda</i> Donn. Sm	Nativa	CHIS., VER.
<i>Guatteria galeottiana</i> Baill.	Endémica	CAM., OAX., VER.
<i>Guatteria grandiflora</i> Donn. Sm	Nativa	CHIS., TAB., MEX., VER.
<i>Guatteria jurgensenii</i> Hemsl.	Nativa	OAX., TAB., VER.
<i>Guatteria oliviformis</i> Donn. Sm	Nativa	CHIS., TAB., MEX., VER.
<i>Mosannonna</i> Chatrou		
<i>Mosannonna depressa</i> (Baill.) Chatrou	Nativa	CAMP., CHIS., GRO., JAL., MICH., OAX., PUE., QROO., TAB., VER., YUC.
<i>Oxandra</i> A. Rich.		
<i>Oxandra lanceolata</i> (Sw.) Baill	Nativa	CHIS., COL., GRO., JAL., MICH., QROO., YUC.
<i>Oxandra maya</i> Miranda	Nativa	CHIS., TAB.
<i>Sapranthus</i> Seem		
<i>Sapranthus campechianus</i> (Kunth) Standl.	Nativa	CAMP., CHIS., GRO., QROO., TAB., VER., YUC.
<i>Sapranthus chiapensis</i> G.E. Schatz	Endémica	CHIS., OAX.
<i>Sapranthus microcarpus</i> (Donn. SM.) R.Re.Fr.	Nativa	CHIS., COL., GRO., JAL., MOR., OAX., SIN., VER.
<i>Sapranthus violaceus</i> (Dunal) Saff.	Nativa	COL., GRO., JAL., NAY., OAX., SIN., VER.
<i>Stenanona</i> Standl.		
<i>Stenanona cauliflora</i> (J.W. Walker) G.E. Schatz	Endémica	CHIS., TAB., MEX., VER.
<i>Stenanona flagelliflora</i> T. Wendt & G.E. Schatz	Endémica	OAX., VER.
<i>Stenanona humilis</i> (Miranda) G.E. Schatz ex Maas, E.A.Mennega & Westra	Endémica	OAX., VER.
<i>Stenanona migueliana</i> Ortiz-Rodr. & G.E. Schatz	Endémica	CHIS.,
<i>Stenanona monticola</i> Maas & G.E. Schatz	Endémica	CHIS., TAB., MEX., VER.
<i>Stenanona stenopetala</i> (Donn. Sm.) G.E. Schatz	Nativa	CHIS., TAB.
<i>Stenanona wendtii</i> G.E. Schatz & Maas	Endémica	OAX., VER.
<i>Tridimeris</i> Baill.		
<i>Tridimeris hahniana</i> Baill.	Endémica	OAX., QRO., SLP., VER.
<i>Tridimeris tuxtlensis</i> G.E.Sachtz	Endémica	TAB., MEX., VER.
<i>Unonopsis</i> R.E.Fr		
<i>Unonopsis mexicana</i> Maas & Westra	Endémica	OAX.
<i>Xylopia</i> L.		

Especie	Origen	Distribución
<i>Xylopia frutescens</i> Aubl.	Nativa	CAMP., CHIS., COL., OAX., QROO., TAB., VER.
<i>Xylopia sericophylla</i> Standl. & L.O. Williams	Nativa	CHIS., TAB., MEX., VER.

CUADRO 1 Géneros y especies de la familia Annonaceae en México

Géneros	Número de especies			
	Mundo	México	Endémicas	Chiapas
<i>Anaxagorea</i> A. St. Hill	25	1	0	0
<i>Annona</i> L.	166	18	4	13
<i>Cymbopetalum</i> Benth.	27	8	3	5
<i>Desmopsis</i> Saff.	27	6	5	2
<i>Guatteria</i> Ruiz-& Pav	254	8	1	6
<i>Mosannonna</i> Chatrou	13	1	0	1
<i>Oxandra</i> A. Rich.	27	2	0	2
<i>Sapranthus</i> Seem	9	4	1	3
<i>Stenanona</i> Standl.	14	7	6	4
<i>Tridimeris</i> Baill.	2	2	2	1
<i>Unonopsis</i> R.E.Fr	48	1	1	0
<i>Xylopia</i> L.	109	2	0	2
Total		60	23	37

CUADRO 2 Numeralia del estatus de la diversidad de Annonaceae en México

Especie	Vegetación reportada							
	BT	BMM	SAP	SM	SBC	SAB	VAI	C
<i>Anaxagorea guatemalensis</i>			x					
<i>Annona cherimola</i>	x							x
<i>Annona contrerasii</i>					x	x		
<i>Annona glabra</i>				x			x	
<i>Annona globiflora</i>					x			
<i>Annona holosericea</i>					x			
<i>Annona liebmanniana</i>		x						
<i>Annona longiflora</i>	x				x			
<i>Annona longipes</i>			x					
<i>Annona macrophyllata</i>				x	x			x
<i>Annona mucosa</i>			x					

Especie	Vegetación reportada							
	BT	BMM	SAP	SM	SBC	SAB	VAI	C
<i>Annona muricata</i>					X			x
<i>Annona palmeri</i>				X	X			
<i>Annona purpurea</i>				X	X	X	X	
<i>Annona rensoniana</i>		X						
<i>Annona reticulata</i>				X	X			x
<i>Annona scleroderma</i>			X	X				
<i>Annona spraguei</i>					X			
<i>Annona squamosa</i>				X	X			
<i>Cymbopetalum mayanum</i>			X					
<i>Cymbopetalum baillonii</i>			X					
<i>Cymbopetalum gracile</i>					X			
<i>Cymbopetalum hintonii</i>					X			
<i>Cymbopetalum mirabile</i>			X					
<i>Cymbopetalum parviflorum</i>								
<i>Cymbopetalum penduliflorum</i>			X					
<i>Cymbopetalum stenophyllum</i>			X					
<i>Desmopsis guerrerensis</i>				X				
<i>Desmopsis lanceolata</i>		X		X				
<i>Desmopsis mexicana</i>				X				
<i>Desmopsis schippii</i>		X	X					
<i>Desmopsis trunciflora</i>			X					
<i>Desmopsis uxpanapensis</i>			X	X				
<i>Guatteria amplifolia</i>			X					
<i>Guatteria anomala</i>			X					
<i>Guatteria diospyroides</i>			X					
<i>Guatteria dolichopoda</i>				X				
<i>Guatteria galeottiana</i>		X						
<i>Guatteria grandiflora</i>			X					
<i>Guatteria jurgensenii</i>				X				
<i>Guatteria oliviformis</i>			X					
<i>Mosannonna depressa</i>			X	X	X	X		
<i>Oxandra lanceolata</i>				X				
<i>Sapranthus campechianus</i>			X	X				
<i>Sapranthus chiapensis</i>				X				
<i>Sapranthus microcarpus</i>				X	X			

Especie	Vegetación reportada							
	BT	BMM	SAP	SM	SBC	SAB	VAI	C
<i>Sapranthus violaceus</i>				x	x			
<i>Stenanona cauliflora</i>			x					
<i>Stenanona flagelliflora</i>			x					
<i>Stenanona humilis</i>			x					
<i>Stenanona migueliana</i>				x				
<i>Stenanona monticola</i>			x					
<i>Stenanona stenopetala</i>			x					
<i>Stenanona wendtii</i>			x					
<i>Tridimeris hahniana</i>			x					
<i>Tridimeris tuxtlensis</i>			x					
<i>Unonopsis mexicana</i>			x	x				
<i>Xylopia frutescens</i>			x					
<i>Xylopia sericophylla</i>		x	x					

CUADRO 3

Tipo de vegetación registrado de las especies de la Familia Annonaceae. BT= Bosque templado, BMM= Bosque mesófilo de montaña, SAP= Selva alta perennifolia, SM= Selva mediana, SBC= Selva baja caducifolia, SAB= Sabana, MAT= Matorral, VAI= Vegetación acuática o inundable, C= cultivo

LITERATURA CITADA

- AGUSTIN, J.A. Y S.D. LEDESMA-SEGURA, 2014. Conservación y uso de los recursos genéticos de Annonaceae en México. *Revista Brasileira de Fruticultura*. 36 (Spe1): 118-124.
- ARROYO-RODRÍGUEZ, V., J.C. DUNN, J. BENÍTEZ-MALVIDO, & S. MANDUJANO, 2009. Angiosperms, Los Tuxtlas Biosphere Reserve, Veracruz, México. *Check List* 5 (4): 787-799.
- CHATROU, L.W., M.D. PIRIE, R.H.J. ERKENS, T.L.P. COUVREUR, K.M. NEUBIG, J.R. ABBOTT, J.B. MOLS, J.W. MAAS, R.M.K SAUNDERS & M.V. CHASE, 2012. A New Subfamilial and Tribal Classification of the Pantropical Flowering Plant Family Annonaceae Informed by Molecular Phylogenetics. *Botanical Journal of the Linnean Society* 169: 5-40.
- CORTES, D., L. MORENO, J. PÁRRAGA, A. GALÁN & N. CABEDO, 2014. Nuevos fármacos inspirados en Annonáceas. *Revista Brasileira de Fruticultura* 36 (Spe1): 22-31.
- COUVREUR, T.L.P., P.J.M. MAAS, S. MEINKE, D.M. JOHNSON & P.J.A. KEßLER, 2012. Keys to the genera of Annonaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society* 169: 74-83. doi:10.1111/j.1095-8339.2012.01230.x
- CUÉ-BÄR, E. M., J. L. VILLASEÑOR, L.D. ARREDONDO-AMEZCUA, G. CORNEJO-TENORIO, G. IBARRA-MANRÍQUEZ, 2006. La flora arbórea de Michoacán, México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 78: 47-81.

- ERKENS, R.H.J., E.A. MENNEGA & L.Y. WESTRA TH., 2012. A concise bibliographic overview of Annonaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society* 169: 41–73.
- GARCÍA, E.A.P., J.A. MEAVE Y C. GALLARDO, 2001. Vegetación y flora de la región de Nizanda, Istmo de Tehuantepec, Oaxaca, México. *Acta Botánica Mexicana* 56: 19-88.
- GONZÁLEZ-ESPINOSA, M., J.A. MEAVE, F.G. LOREA-HERNÁNDEZ, G. IBARRA-MANRÍQUEZ & A.C. NEWTON, 2011. *The Red List of Mexican Cloud Forest Trees*. Edic. Flora & Fauna International, Cambridge, R.U. 149 pp.
- GONZÁLEZ-ESQUINCA, A.R., 2001 *Contribución al estudio del género Annona (Annonaceae). Análisis fitoquímico de tres especies del estado de Chiapas*. Tesis Doctoral, Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- GONZÁLEZ-ESQUINCA, A.R., I. DE-LA-CRUZ-CHACÓN, M. CASTRO-MORENO, J.A. OROZCO-CASTILLO & C.A. RILEY-SALDAÑA, 2014. Alkaloids and Acetogenins in Annonaceae Development: Biological Considerations. *Revista Brasileira de Fruticultura*. 36 (SPE1): 01-16.
- GONZÁLEZ-ESQUINCA, A.R., I. DE-LA-CRUZ-CHACÓN, M. CASTRO-MORENO & C.A. RILEY-SALDAÑA, 2016. Phenological Strategies of *Annona* from Deciduous Forest of Chiapas, Mexico. *Botanical Sciences* 94 (3): 531-541.
- HERNÁNDEZ-NAJARRO, F., M.G. DIAZ MONTESINOS Y J.M. JONAPÁ-SOLÍS, 2011. Las Anonáceas de Chiapas en el Herbario CHIP. En: González-Esquinca *et al.* (Coord.) UNICACH (Edic.) *Anonáceas, plantas antiguas, estudios recientes*. Pág. 109-119.
- IUCN, 2016. *Red List of Threatened Species* Version 2016-2. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 28 September 2016.
- JIMÉNEZ-RAMÍREZ, J. y J.C. SOTO-NÚÑEZ. 2015. *Annona contrerasii* (Annonaceae), especie nueva del estado de Guerrero, México. *Acta Botánica Mexicana* 112: 37-43.
- JIMÉNEZ-RAMÍREZ, J., C.A. GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, 2016. Una nueva especie de *Desmopsis* (Annonaceae) endémica de Guerrero, México. *Brittonia* 68 (1): 51-54.
- KALACSKA, M., G.A. SÁNCHEZ-AZOFEIFA, J.C. CALVO-ALVARADO, M. QUESADA, B. RIVARD & D.H. JANZEN, 2004. Species Composition, Similarity and Diversity in Three Successional Stages of a Seasonally Dry Tropical Forest. *Forest Ecology and Management*, 200 (1): 227-247.
- MAAS, P.J., L.Y.T. WESTRA, H. RAINER, A.Q. LOBÃO & R.H. ERKENS, 2011. An Updated Index to Genera, Species, and Intraspecific Taxa of Neotropical Annonaceae. *Nordic Journal of Botany* 29 (3): 257-356.
- MARTÍNEZ G.M., R. CRUZ DURÁN, J. F. CASTREJÓN REYNA, S. VALENCIA ÁVALOS, J. JIMÉNEZ RAMÍREZ Y C.A. RUIZ-JIMÉNEZ, 2004. Flora vascular de la porción guerrerense de la Sierra de Taxco, Guerrero, México. *Anales del Instituto de Biología serie Botánica* 75 (2): 105-189.
- MARTINEZ-VAZQUEZ, M. & R. ESTRADA-REYES, 2014. Secondary Metabolism in Annonaceae: Potential Source of Drugs. *Revista Brasileira de Fruticultura* 36 (Spe1): 141-146.
- MICELI, M.A.L., O.L. GORDILLO, A.K.C. PÉREZ, J.A.P. HERNÁNDEZ, Y M.A. PÉREZ-FARRERA, 2011. Inventario florístico del Rancho de Villahermosa, municipio de Ocozocoautla, Chiapas, México. *LACANDONIA, rev. Ciencias UNICACH* 5 (1): 21-41.

- ORTIZ-RODRÍGUEZ, A.E., V. SOSA, E. RUIZ-SANCHEZ, 2015.** Flora del bajo y de regiones adyacentes: Familia Annonaceae. *Instituto de Ecología A.C. Fascículo 191*. 14 p.
- ORTIZ-RODRÍGUEZ, A.E., G.E. SCHATZ, Y. LICONA-VERA Y E. RUÍZ-SÁNCHEZ, 2014.** Una nueva especie de *Stenanona* (Annonaceae) endémica de Chiapas, México. *Botanical Sciences* 92 (1): 37-41.
- RAINER, H., 2007.** Monographic Studies in the Genus *Annona* L. (Annonaceae): Inclusion of the Genus *Rollinia* A. St.-Hil. *Annalen des Naturhistorischen Museums in Wien. Serie B für Botanik und Zoologie* 108: 191-205.
- SCHATZ, G. E. & P.J.M. MAAS, 2010.** Synoptic revision of *Stenanona* (Annonaceae). *Blumea-Biodiversity, Evolution and Biogeography of Plants* 55 (3): 205-223.
- SCHATZ, G.E. & T. WENDT, 2004.** A new flagelliflorous species of *Stenanona* (Annonaceae) from Mexico, with a review of the phenomenon of flagelliflory. *Lundellia* 7: 28-38.
- STEVENS, P.F., 2016.** Angiosperm Phylogeny Website. Version 12, July 2016. <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>.
- TACHER, S.I.L., J.R.A. RIVERA, M.M.M. ROMEROY & A.D. FERNÁNDEZ, 2002.** Caracterización del uso tradicional de la flora espontánea en la comunidad Lacandona de Lacanhá, Chiapas, México *Interciencia* 27(10): 512-520.
- THE PLANT LIST 2013** Version 1.1. Published on the Internet; <http://www.theplantlist.org/> (consultado; julio-septiembre de 2016).

APÉNDICE. SINONIMIA DE LAS ESPECIES DE ANNONACEAE EN MÉXICO

Anaxagorea guatemalensis Schltdl.
Annona cherimola Mill.

- Annona contrerasii* J. Jiménez Ram. & J.C. Soto
- Annona glabra* L.
- *Annona australis* A. St.-Hil.
 - *Annona chrysocarpa* Lepr. ex Guill. & Perr.
 - *Annona chrysocarpa* Leprieur Ex Guillemet
 - *Annona klainei* Pierre ex Engl. & Diels
 - *Annona klainii* Pierre ex Engl. & Diels
 - *Annona klainii* var. *moandensis* De Wild.
 - *Annona laurifolia* Dunal
 - *Annona palustris* L.
 - *Annona palustris* var. *grandifolia* Mart.
 - *Annona peruviana* Humb. & Bonpl. ex Dunal
 - *Annona uliginosa* Kunth
 - *Asimina arborea* Raf.
 - *Guanabanus palustris* M. Gómez
- Annona globiflora* Schldtl.
- *Annona fruticosa* Sessé & Moc.
- Annona liebmanniana* Baill.
- Annona longiflora* S. Watson
- Annona longipes* Saff.
- Annona macrophyllata* Donn. Sm
- *Annona diversifolia* Saff.
- Annona mucosa* (Jacq.) Baill.
- *Rollinia mucosa* (Jacq.) Baill.
- Annona muricata* L.
- *Annona bonplandiana* Kunth
 - *Annona cearaensis* Barb. Rodr.
 - *Annona macrocarpa* Wercklé
 - *Annona muricata* var. *borinquensis* Morales
 - *Annona muricata* f. *mirabilis* R.E. Fr.
 - *Guanabanus muricatus* M. Gómez
- Annona palmeri* Saff.
- Annona purpurea* Moc. & Sessé ex Dunal
- *Annona involucrata* Baill.
 - *Annona manirote* Kunth
 - *Annona prestoei* Hemsl.
- Annona rensoniana* Standl.
- *Rollinia cherimolioides* R.E. Fr.
 - *Rollinia membranacea* Planch. & Triana
 - *Rollinia mexicana* Standl.
 - *Rollinia rensoniana* Standl.
 - *Rollinia rensoniana* subsp. *granatensis* R.E. Fr.
 - *Rollinia standleyi* R.E. Fr.
- Annona reticulata* L.
- *Annona excelsa* Kunth
 - *Annona humboldtiana* Kunth
 - *Annona humboldtii* Dunal
 - *Annona laevis* Kunth
 - *Annona lutescens* Saff.
 - *Annona primigenia* Standl. & Steyererm.
 - *Annona reticulata* var. *primigenia* (Standl. & Steyererm.) Lundell
 - *Annona riparia* Kunth
- Annona scleroderma* Saff.
- *Annona testudinea* Saff.
- Annona spraguei* Saff.
- Annona squamosa* L.
- *Annona asiatica* L.
 - *Annona asiatica* Vahl
 - *Annona cinerea* Dunal
 - *Annona distincta* Raeusch.
 - *Annona forsckalii* DC.
 - *Annona forsskalii* DC.
 - *Guanabanus squamosus* M. Gómez
 - *Xylopia glabra* L.
- Cymbopetalum mayanum* Lundell
- Cymbopetalum baillonii* R.F. Fr.
- Cymbopetalum gracile* R.E. Fr.
- Cymbopetalum hintonii* Lundell
- *Cymbopetalum hintonii* subsp. *hintonii*
- Cymbopetalum mirabile* R.E. Fr.
- *Cymbopetalum longissimum* Lundell
- Cymbopetalum parviflorum* N.A. Murray
- Cymbopetalum penduliflorum* (Dunal) Baill.
- *Porcelia cinnamonema* G. Don
 - *Unona penduliflora* Dunal
- Cymbopetalum stenophyllum* Donn. Sm.
- Desmopsis guerrerensis* J. Jiménez Ram. & Gonz.-Martínez
- Desmopsis lanceolata* Lundell
- *Desmopsis guatemalensis* Standl. & Steyererm.
 - *Desmopsis izabelensis* Standl. & Steyererm.
- Desmopsis mexicana* R.F. Fr.
- Desmopsis schippii* Standl.
- *Desmopsis brevipes* R.E. Fr.
- Desmopsis trunciflora* (Schldtl. Cham) G.E. Sachtz ex Maas, E.A. Mennega & Westra
- *Annona bibracteata* Hook.
 - *Desmopsis galeottiana* (Baill.) Saff.
 - *Desmopsis galeottiana* var. *subnuda* R.E. Fr.
 - *Guatteria bibracteata* (Hook.) Hemsl.
 - *Trigynaea galeottiana* Baill.
 - *Unonopsis galeottiana* (Baill.) R.E. Fr.
 - *Unonopsis trunciflora* (Schldtl. & Cham.) R.E. Fr.
 - *Xylopia trunciflora* Schldtl. & Cham.
 - *Xylopicrum trunciflorum* (Schldtl. & Cham.) Kuntze
- Desmopsis uxpanapensis* G.E. Sachtz & N. Zamora
- Guatteria amplifolia* Triana & Planch
- *Guatteria inuncta* R.E. Fr.
 - *Guatteria inuncta* var. *caudata* R.E. Fr.
 - *Guatteria inuncta* var. *minor* R.E. Fr.

- *Guatteria platypetala* R.E. Fr.
- Guatteria anomala* R.E. Fr.
- Guatteria diospyroides* Baill.
 - *Guatteria diospyroides* subsp. *hondurensis* R.E. Fr.
- Guatteria dolichopoda* Donn. Sm
 - *Guatteria dolichopoda* var. *microsperma* R.E. Fr.
- Guatteria galeottiana* Baill.
- Guatteria grandiflora* Donn. Sm.
- Guatteria jurgensenii* Hemsl.
- Guatteria oliviformis* Donn. Sm.
- Mosannonna depressa* (Baill.) Chatrou
 - *Annona depressa* Baill.
 - *Duguetia leiophylla* Donn. Sm.
 - *Guatteria depressa* (Baill.) Saff.
 - *Guatteria gaumeri* Greenm.
 - *Guatteria leiophylla* (Donn. Sm.) Saff. ex Standl.
 - *Guatteria xalapensis* Baill. ex R.E. Fr. [Invalid]
 - *Malmea depressa* (Baill.) R.E. Fr.
 - *Malmea gaumeri* (Greenm.) Lundell
 - *Malmea leiophylla* (Donn. S m.) Lundell
- Oxandra lanceolata* (Sw.) Baill
 - *Bocagea virgata* (Sw.) Benth. & Hook.f.
 - *Cananga lancea* Poit. ex DC.
 - *Guatteria virgata* (A. Rich.) Dunal
 - *Oxandra virgata* A. Rich.
 - *Uvaria lanceolata* Sw.
- Oxandra maya* Miranda
- Sapranthus campechianus* (Kunth) Standl.
 - *Asimina campechiana* Kunth
 - *Asimina insularis* Hemsl.
- Sapranthus chiapensis* G.E. Schatz
- Sapranthus microcarpus* (Donn. SM.) R.Re. Fr.
 - *Asimina purpusii* Brandege
- Porcelia microcarpa* Donn. Sm.
- Sapranthus violaceus* (Dunal) Saff.
 - *Asimina nicaraguensis* (Seem.) Hemsl.
 - *Porcelia nicaraguensis* (Seem.) Benth. ex Ram. Goyena
 - *Sapranthus longepedunculatus* R.E. Fr.
 - *Sapranthus megistanthus* Standl. & Steyererm.
 - *Sapranthus nicaraguensis* Seem.
 - *Unona violacea* Dunal
 - *Uvaria nicaraguensis* (Seem.) Baill.
- Stenanona cauliflora* (J.W. Walker) G.E. Schatz
 - *Reedrollinsia cauliflora* J.W. Walker
- Stenanona flagelliflora* T. Wendt & G.E. Schatz
- Stenanona humilis* (Miranda) G.E. Schatz ex Maas, E.A. Menega & Westra
 - *Sapranthus humilis* Miranda
- Stenanona migueliana* Ortiz-Rodr. & G.E. Schatz
- Stenanona monticola* Maas & G.E. Schatz
- Stenanona stenopetala* (Donn. Sm.) G.E. Schatz
 - *Desmopsis stenopetala* (Donn.Sm.) R.E. Fr.
 - *Porcelia stenopetala* Donn. Sm.
 - *Sapranthus stenopetalus* (Donn. Sm.) P.J. Stafford ex Standl.
- Stenanona wendtii* G.E. Schatz & Maas
- Tridimeris hahniana* Baill.
- Tridimeris tuxtlensis* G.E. Sachtz
- Unonopsis mexicana* Maas & Westra
- Xylopia frutescens* Aubl.
 - *Diospyros xylopioides* Mart. ex Miq.
 - *Xylopia frutescens* var. *glabra* S. Watson
 - *Xylopia meridensis* Pittier
 - *Xylopia muricata* Vell.
 - *Xylopia setosa* Poir.
 - *Xylopicrum frutescens* (Aubl.) Kuntze
- Xylopia sericophylla* Standl. & L.O. Williams

APÉNDICE



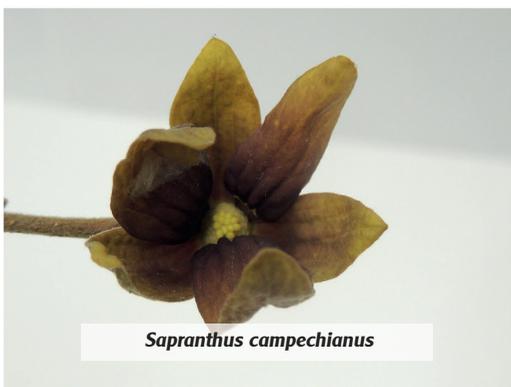
Cymbopetalum



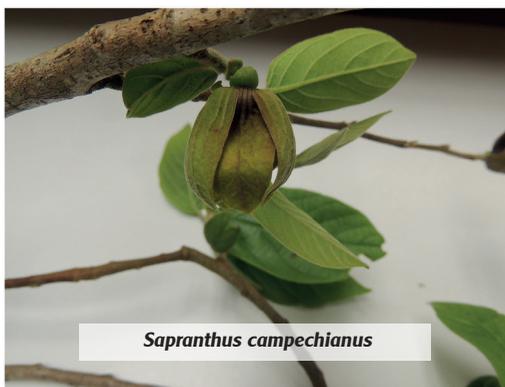
Cymbopetalum mayanum



Xylopia frutescens



Sapranthus campechianus



Sapranthus campechianus



Sapranthus microcarpus



Annona reticulata



Steannonna migueliana



Annona reticulata



Annona macrophyllata



Annona macrophyllata



Annona macrophyllata



Annona macrophyllata



Annona squamosa



Annona macrophyllata



Annona muricata



Annona purpurea



Annona purpurea fruto



Annona purpurea fruto

Desarrollo temprano y defensas químicas de *Annona macrophyllata* Donn. Smith. (Annonaceae)

Iván De-la-Cruz-Chacón¹
Alma Rosa González-Esquinca¹

¹Laboratorio de Fisiología y Química Vegetal, Instituto de Ciencias Biológicas, Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas, Libramiento Norte Poniente 1150. Col. Lajas Maciel. C.P. 29039. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México Email: ivan.cruz@unicach.mx, aesquinca@unicach.mx

RESUMEN

La germinación y el desarrollo de la plántula son las etapas iniciales para el establecimiento en el ecosistema de una nueva planta, durante ellas, los metabolitos secundarios (MS) son un factor clave que contribuye a la sobrevivencia vegetal. Escasas investigaciones analizan este fenómeno biológico. En este artículo se relata el estudio de MS en etapas tempranas de *Annona macrophyllata* (papaua o ilama), con miras a entender la dinámica de su biosíntesis-acumulación y su significado biológico.

PALABRAS CLAVE: Annonaceae, metabolismo secundario, desarrollo temprano vegetal.

ABSTRACT

Germination and seedling development are the initial stages for the establishment of new seedling in the ecosystem. During these stages, the secondary metabolites (SM) are a key factor to get the survival of the plant. Not many studies show the significance of this biological phenomenon. In this research, the production of SM in early development of *Annona macrophyllata* (papaua o ilama) is reported, in order to understand the dynamic of biosynthesis/accumulation of SM and its role to plants.

KEYWORDS: Annonaceae, secondary metabolism, early development plant.

INTRODUCCION

El desarrollo temprano de las plantas abarca la germinación de las semillas y el establecimiento de las plántulas. La germinación inicia con la absorción de agua (imbibición) y termina en *sensu stricto* cuando una parte del eje embrionario (usualmente la radícula) se extiende y atraviesa las cubiertas seminales (emergencia) (Nonogaki *et al.*, 2007). Con la emergencia radicular comienza el desarrollo de la plántula sustentado primeramente en las reservas energéticas del endospermo o los cotiledones y después en la fotosíntesis (Bewley & Black, 1994; Nonogaki, 2010).

Estas fases ontogénicas han sido estudiadas en sus aspectos genéticos, fisiológicos, metabólicos y ecológicos (figura 1). Algunas revisiones actuales de los temas son los de Nonogaki, 2010; Weibrecht *et al.*, 2011 y Bewley *et al.*, (2013). Entre los sucesos metabólicos escasamente atendidos, está el relacionado con la presencia de moléculas del metabolismo secundario, que suelen desempeñar funciones ecológicas y por lo tanto intervienen en su

establecimiento y comunicación con el ambiente en el que crecerán (Hartmann, 2008). Los metabolitos secundarios (MS), son responsables de los olores, sabores, colores y sustancias tóxicas de las plantas. Su biosíntesis es regulada en espacio y tiempo, está asociada a la fenología de la planta, al grado de desarrollo del tejido, a su papel ecológico y a los factores abióticos.

La presencia de MS durante el desarrollo temprano constituyen aportes de la planta madre o son biosintetizados *de novo*, como quiera que sea, estas moléculas especializadas representan un recurso ventajoso para las plántulas en crecimiento.

Annona macrophyllata (\equiv *A. diversifolia*) es una especie nativa de Mesoamérica, produce frutos agradables al paladar humano y biosintetiza MS con una riqueza estructural diversa. De ella se han aislado algunos aceites fijos y esenciales, alcaloides, terpenos y policétidos con actividades sobre líneas de cáncer humano, neurofarmacológicas, insecticidas y antimicrobianas (Pérez-Amador *et al.*, 1997; González-Esquinca, 2001; De-la-Cruz, 2001,

Schlie-Guzmán *et al.*, 2009; Luna-Cazáres y González Esquina, 2010). En particular los alcaloides son detectados en individuos adultos y plántulas con capacidad fotosintética pero no en sus semillas, por lo que al no ser un aporte de la planta madre, deben biosintetizarse durante la germinación o el desarrollo de la plántula.

En la búsqueda de caracterizar este evento metabólico y sobre todo de encontrar la *razón de ser* de estos MS para la especie, se buscó su presencia durante el desarrollo temprano (figura 1), al mismo tiempo se realizaron bioensayos para elucidar su significado biológico.

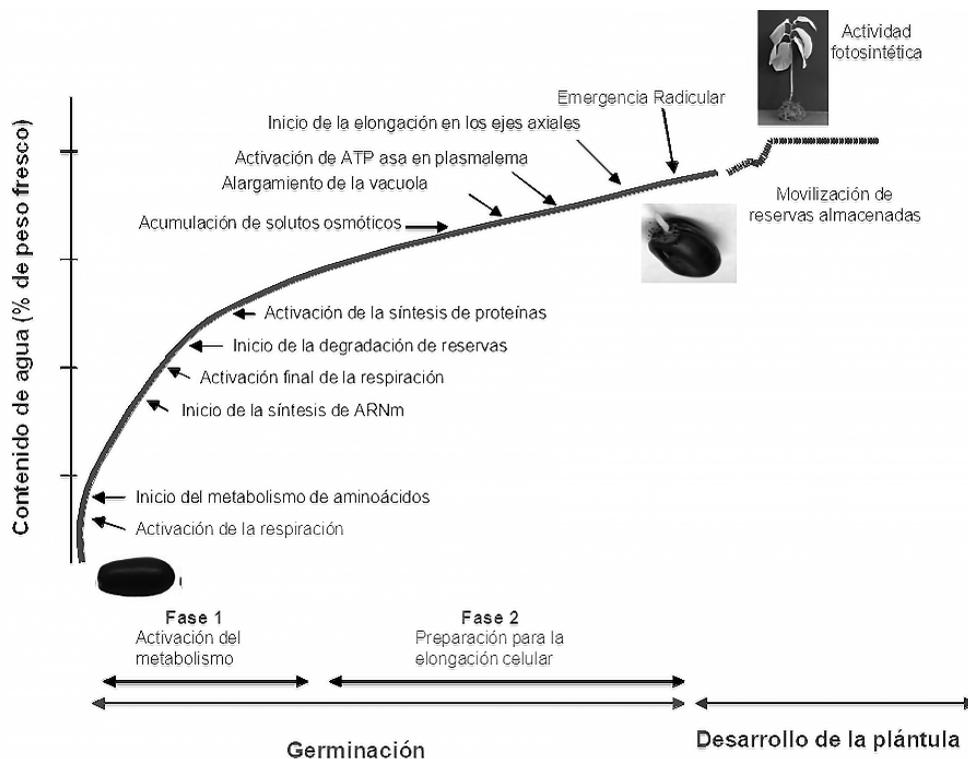


FIGURA 1

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

Metodología

El trabajo experimental está dividido en tres etapas: a) caracterización del desarrollo temprano de *A. macrophyllata*, b) determinación de las relaciones órgano-específicas de alcaloides durante las fases de desarrollo y c) evaluación del significado biológico de los MS.

Caracterización del desarrollo temprano de *A. macrophyllata*.

El desarrollo temprano se tipificó empleando la escala decimal BBCH (Biologische Bundesanstalt, Bundessortenamt and Chemical Industry) que codifica numéricamente las características fenológicas del crecimiento vegetal (Hess *et*

al., 1997). El código identifica 10 estadios de crecimiento principales (desde 0 hasta 9) divididos a su vez en 10 secundarios, la escala fue desarrollada inicialmente por Zadoks (1974) para describir la fenología de los cereales. En este trabajo se estudiaron 4 etapas fenológicas: *semillas secas*, *semillas en imbibición*, *emergencia radicular* y *plántulas en desarrollo*; éstas a su vez se dividieron en fases en función de la fisiología de la plántula, por lo que se estudiaron 11 fases de desarrollo y hasta 8 tejidos (embriones, hipocótilos, cotiledones, endospermos, testas, raíces, tallos y hojas).

Obtención y cuantificación de alcaloides

El perfil químico de alcaloides fue determinado en cada tejido de cada etapa, utilizando desde 1 hasta 5 gramos

de material vegetal; los alcaloides fueron obtenidos mediante la técnica ácido-base de González-Esquinca (2001) y cuantificados por espectrofotometría a 254 nm, utilizando como estándar una curva patrón de dilución con el alcaloide liriodenina (De-la-Cruz *et al.*, 2012). La presencia de liriodenina fue analizada con técnicas de cromatografía de HPLC de acuerdo con De-la-Cruz y González-Esquinca (2012). Para cada tejido se realizaron 10 repeticiones.

Cuantificación de aminoácido precursores

Los precursores biosintéticos (tirosina y fenilalanina) para alcaloides se extrajeron por el método de Brückner y Westhasur (2003) y se cuantificaron por cromatografía líquida adaptando los métodos de Holme & Woods (2002) y Perkin Elmer (2007). El análisis en HPLC se realizó en un equipo Perkin-Elmer serie 900 UV-Vis, en una columna de fase reversa spheri 5RP18 (de un tamaño de 100 x 4.6 mm y con un diámetro de partícula de 5 micras).

Evaluación del papel biológico de los MS de *A. macrophyllata*

Considerando los antecedentes antimicrobianos de los alcaloides y la observación de que las semillas en imbibición y sin germinar son infestadas por fitopatógenos, se aislaron e identificaron dos fitopatógenos de semillas contaminadas y sobre ellos se determinó la actividad antifúngica de extractos alcaloidales, así también se evaluó en concentraciones seriadas (desde 1 hasta 400 uM) al alcaloide liriodenina, constituyente mayoritario de los extractos. La actividad antifúngica de liriodenina se determinó mediante la técnica concentración mínima en macrodilución (NCCLS, 1997) y la de los extractos por inhibición del metabolismo de glucosa (Riesselman *et al.*, 2000).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización del desarrollo temprano

Las etapas evaluadas del desarrollo temprano abarcaron la germinación (BBCH: 0), en todas sus fases (BBCH: 00-09) y el desarrollo de plántulas con hojas (BBCH: 1) en las fases BBCH: 10 a 16 (cuadro 1).

Las **semillas secas** (BBCH: 00) son de 2 x 1 cm de largo por ancho con una cubierta dura formada por la testa, el tegmen y el tapón micropilar. El embrión es diminuto (3-5 mm), basal, localizado en la región micropilar, son distinguibles en él la radícula y los cotiledones (figura 2A). El endospermo es abundante y ruminado (González-Esquinca *et al.*, 2015).

La **imbibición** (ingesta de agua) sucede rápidamente por toda la testa y micrópilo (Ferreira *et al.*, 2014) (BBCH: 01 – 02; figura 2B-C), originando un incremento en el volumen de la semilla y una coloración oscura de la testa, los embriones permanecen sin cambio aparente. La fase I de la imbibición, es un fenómeno totalmente físico e independiente de la viabilidad de la semilla (Bewley & Black 1994; Ferreira *et al.*, 2014). A los **cinco días de la imbibición** (BBCH: 03; figura 11D) el embrión crece cerca de dos veces y algo del endospermo circundante a él se torna blando y blanquecino, una señal del inicio de la movilización de reservas, esta es la fase II de la imbibición (Bewley & Black 1994). A los **diez días de imbibición** (BBCH: 04; figura 2E), el crecimiento del embrión es muy visible (9 mm), la movilización de reservas se extiende a todo el plano del endospermo (aspecto blanquecino) que rodea el embrión. Exteriormente se observan rupturas en la cubierta de la semilla en la región micropilar sin que aún haya protrusión radicular, este punto es un marcador morfológico para señalar el inicio de la Fase III de la imbibición (Nonogaki *et al.*, 2007).

La **emergencia de la radícula** (raíz primaria) sucede entre los 12-15 días, a los 13 (en promedio), la radícula mide ~1 cm (BBCH: 05; figura 2F), esta emergencia es causada por el alargamiento de las células de la zona de elongación del embrión, cuya presión de turgencia permite la expulsión del tapón micropilar. El endospermo se hace blando en diferentes planos y los cotiledones todavía de color crema crecen longitudinalmente abarcando casi la totalidad de la semilla y al mismo tamaño que el eje embrionario. En este punto termina la germinación e inicia el desarrollo de las plántulas, un periodo de crecimiento vegetativo sustentado en las reservas del endospermo. Tres días después de la emergencia radicular (16 días desde la imbibición), la **radícula** alcanza **2-cm** de longitud (BBCH: 06; figura 2G), y se observa un color rosa-rojizo en el hipocótilo, los cotiledones ocupan gran parte del endospermo que a su vez reduce su volumen. Cuando la **radícula** tiene **5-cm** de longitud (20 días; BBCH: 07), el hipocótilo es totalmente rojizo y en la parte alta de la radícula se desarrollan entre tres y siete raíces secundarias (figura 2H). Los cotiledones siguen dentro del endospermo ocupando todo el plano horizontal.

A los ~25 días desde la imbibición se observan **plántulas con primordio foliar** (BBCH: 11; figura 2I), la germinación es epigea y curva según la clasificación de Duke (1969), además de criptocotiledonar (De Vogel, 1980), ya que los cotiledones no emergen totalmente de la envoltura seminal, la parte expuesta parece fotosintetizar. El hipocótilo (8-10 cm) es marrón en la parte superior y

rojizo en la media. La raíz es axonomorfa (raíz pivotante) de 8-10 cm, con varias raíces secundarias (15-30) que se extienden principalmente desde la base del cuello. Aún hay reservas energéticas en el endospermo.

A los ~30 días se observan **plántulas con 2-hojas** fotosintéticas (BBCHH: 12; figura 2J), el tallo presenta un epicótilo de ~3 cm, color verde, mientras que el hipocótilo no aumenta en longitud (8-10 cm), pero si en grosor (8 mm), con rastros de color rojo-marrón en su parte basal, se conservan parte de los cotiledones dentro del endos-

permo totalmente agotado, el sistema radicular aumenta en raíces terciarias (40-60), a su vez también ramificadas. Esta fase indica la independencia de la plántula de las reservas del endospermo.

A los ~60 días desde la imbibición se observan **plántulas con seis hojas** fotosintéticas (BBCHH: 16; figura 2K). La plántula alcanza una altura de ~16 cm. El sistema radicular presenta finas y abundantes raíces (60-80). Las hojas son solo una de las dos tipos de hojas de un individuo adulto. El endospermo junto con los cotiledones se ha desprendido.

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

CUADRO 1

Caracterización del desarrollo temprano de *A. macrophyllata* (De-la-Cruz, 2012)

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

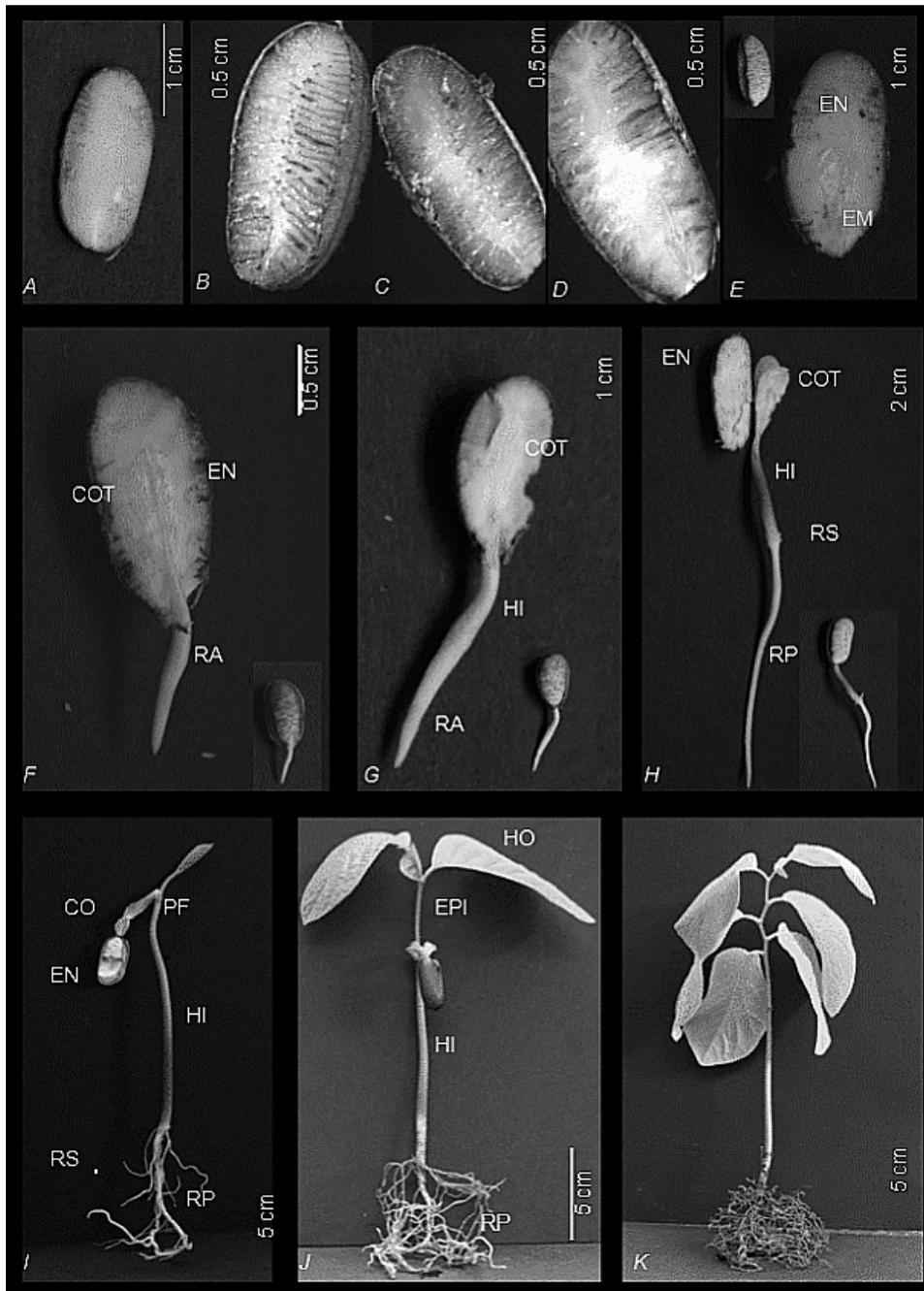


FIGURA 2

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

Alcaloides durante el desarrollo temprano de *A. macrophyllata*

No se encontraron alcaloides en las semillas secas, se detectan hasta avanzada la imbibición, su abundancia aumenta sustancialmente en las etapas de emergencia radicular y de plántula. Estos MS se presentan en diferentes órganos y en distintos tiempos (dinámica de acumulación) (cuadro 2).

La presencia de alcaloides es evidente en los endospermos a los cinco días de imbibición (0.05 mg.g^{-1}), la abundancia en este tejido aumenta progresivamente hasta alcanzar su punto más alto en la fase de radícula de 2 cm (0.673 mg.g^{-1}), para luego disminuir hasta 80% (0.133 mg.g^{-1}) durante las dos etapas subsecuentes (cuadro 2). En las radículas-raíces, los alcaloides aumentan constantemente a partir de que la radícula emerge y hasta que las plántulas desarrollan 6 hojas, con rendimiento de hasta 3.383 mg.g^{-1} . Esta dinámica progresiva sucedió también con los hipocótilos-tallos, desde que este tejido se diferencia

(2 cm de radícula) hasta las plántulas con 6 hojas (2.208 mg.g^{-1}). Algo similar fue observado en las hojas en las tres fases estudiadas, pero con cantidades veinte veces menores (0.05 mg.g^{-1}). Los cotiledones solo presentaron alcaloides en dos fases (5 cm de radícula y primordio foliar) y en proporciones desde 16 hasta 37 veces menos (0.20 y 0.09 mg.g^{-1} respectivamente) que los otros tejidos.

La producción de alcaloides se caracterizó por presentar dominancias temporales en los distintos tejidos; inicialmente los endospermos (fases de 1 y 2 cm de radícula) tuvieron la abundancia más alta, cerca de dos veces más que los otros; después los hipocótilos en las fases de 5 cm de radícula y primordio foliar acumularon hasta casi dos y nueve veces más que los endospermos y radículas respectivamente; finalmente las raíces en las plántulas con 2 y 6 hojas contuvieron hasta dos y veinte mayor proporción de alcaloides que los tallos y hojas respectivamente. Los cotiledones y las hojas siempre tuvieron menos cantidad de alcaloides.

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

CUADRO 2

Producción de alcaloides (mg.g^{-1} de mat. seca) durante el desarrollo temprano de *A. macrophyllata*

Los valores se representan como el promedio de 10 repeticiones y su desviación estándar.

Las letras en minúsculas señalan diferencias en las cantidades de alcaloides de un mismo tejido entre las etapas evaluadas (arreglo en filas). Mientras que las letras

en mayúsculas señalan diferencias entre los tejidos de una misma etapa (arreglo en columnas). Las medias fueron separadas con la prueba de Tukey 95%.

Los alcaloides se incrementan de manera proporcional al desarrollo de los tejidos con asociaciones lineales,

excepto en cotiledones (cuadro 3). Por ejemplo, en los endospermos la acumulación es directamente proporcional entre los 5 días de imbibición y la fase de 2 cm de radícula, en las radículas-raíces entre la fase de 1 cm de

radícula y la de plántulas con 6 hojas. Si se considera a la pendiente del modelo lineal como una velocidad de acumulación, se observa que las raíces son las que más aportan a la abundancia de alcaloides en las plántulas.

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

CUADRO 3 Relación de la producción de alcaloides en el desarrollo temprano de *A. macrophyllata*

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

Relaciones órgano-específicas en el perfil de alcaloides

El perfil de alcaloides en el desarrollo de las plántulas incluye hasta cinco moléculas, tres de ellas fueron identificadas: lisicamina, atherospermidina y liriodenina (figura 3). Estos alcaloides son muy comunes en la familia Annonaceae, aunque se extienden a otros taxa (cuadro 4).

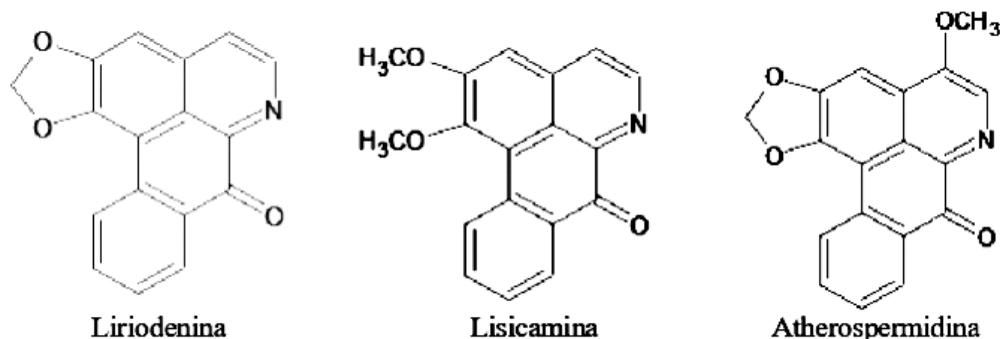


FIGURA 3 Alcaloides producidos durante el desarrollo temprano de *Annona macrophyllata*.

Familias (número de géneros y especies)	Géneros (Número de especies)
	Liriodenina
Annonaceae (48, 143)	<i>Alphonsea</i> (2), <i>Annona</i> (23), <i>Artabotrys</i> (4), <i>Asimina</i> , <i>Cananga</i> (2), <i>Cardiopetalum</i> , <i>Cleistopholis</i> , <i>Cyathostema</i> , <i>Cymbopetalum</i> , <i>Disepalum</i> , <i>Desmos</i> (2), <i>Duguettia</i> (3), <i>Enicosanthum</i> , <i>Enantia</i> (2), <i>Eupomatia</i> (2), <i>Fissistigma</i> , <i>Fusaea</i> , <i>Goniothalamus</i> (4), <i>Guatteria</i> (21), <i>Guatteriopsis</i> , <i>Hexalobus</i> , <i>Hornschuchia</i> , <i>Lettowianthus</i> , <i>Isolona</i> , <i>Meiogyne</i> , <i>Melodorum</i> , <i>Milusa</i> (3), <i>Mitrella</i> , <i>Mitrephora</i> , <i>Monodora</i> , <i>Oncodostigma</i> , <i>Oxandra</i> (2), <i>Oxymitra</i> , <i>Papualthia</i> , <i>Pachypodanthium</i> , <i>Polyalthia</i> (13), <i>Pseudomalmea</i> , <i>Pseudovoricia</i> (4), <i>Popowia</i> , <i>Rollinia</i> (7), <i>Saphranthus</i> , <i>Saccopetalum</i> , <i>Schefferomitra</i> , <i>Trivalvaria</i> , <i>Unonopsis</i> (4), <i>Uvaria</i> (3), <i>Uvariopsis</i> , <i>Xylopia</i> (9)

Familias (número de géneros y especies)	Géneros (Número de especies)
Eupomatiaceae (1, 2)	<i>Eupomatia</i>
Hernandiaceae (1, 1)	<i>Illigera</i>
Lauraceae (5, 6)	<i>Litsea</i> (2), <i>Neolitsea</i> , <i>Cryptocarya</i> , <i>Lindera</i> , <i>Neolitsea</i>
Magnoliaceae (8, 35)	<i>Aromadendron</i> , <i>Elmerrillia</i> , <i>Liriodendron</i> , <i>Kmeria</i> , <i>Magnolia</i> (18), <i>Michelia</i> (8), <i>Paramichelia</i> , <i>Talauma</i> (4)
Menispermaceae (8, 17)	<i>Anisochyla</i> , <i>Chamasenthra</i> (2), <i>Cissampelos</i> , <i>Pachygone</i> , <i>Pycnarhea</i> , <i>Rhigiocarya</i> , <i>Sinomenium</i> (2), <i>Stephania</i> (4)
Monimiaceae (7, 18)	<i>Atherosperma</i> , <i>Doryphora</i> , <i>Dryadodaphne</i> , <i>Glossocalyx</i> , <i>Laurelia</i> , <i>Mollinedia</i> (5), <i>Siparuna</i> (7)
Nelumbonaceae (1, 1)	<i>Nelumbo</i>
Papaveraceae (2, 2)	<i>Roemeria</i> , <i>Papaver</i>
Ranunculaceae (2, 4)	<i>Thalictrum</i> (3), <i>Xanthorhiza</i> (1)
Rhamnaceae (2, 2)	<i>Colubrina</i> , <i>Zyziphus</i>
Rutaceae (1,4)	<i>Zanthoxylum</i> (4)
Thymelaeaceae (1, 1)	<i>Aquillaria</i>
Moraceae (1, 1)	<i>Broussonetia</i>
Lisicamina	
Annonaceae (17, 34)	<i>Annona</i> (4), <i>Artabotrys</i> (2), <i>Cananga</i> , <i>Duguetia</i> , <i>Enantia</i> (2), <i>Fissistigma</i> , <i>Guatteria</i> (8), <i>Heteropetalum</i> , <i>Oncodostigma</i> , <i>Oxandra</i> (2), <i>Polyalthia</i> (4), <i>Rollinia</i> (2), <i>Trivalvaria</i> , <i>Unonopsis</i> , <i>Uvaria</i> , <i>Uvariopsis</i> , <i>Xylopia</i>
Hernandiaceae (1, 1)	<i>Illigera</i>
Lauraceae (3, 3)	<i>Cassytha</i> , <i>Cryptocarya</i> , <i>Lindera</i>
Magnoliaceae (2, 2)	<i>Liriodendron</i> , <i>Michelia</i>
Menispermaceae (4, 5)	<i>Abuta</i> (2), <i>Chamasenthra</i> , <i>Limacia</i> , <i>Stephania</i> , <i>Telotoxicum</i>
Rhamnaceae	<i>Zyziphus</i>
Atherospermidina	
Annonaceae (12, 15)	<i>Artabotrys</i> (3), <i>Desmos</i> , <i>Duguetia</i> , <i>Enantia</i> , <i>Fissistigma</i> , <i>Guatteria</i> (2), <i>Polyalthia</i> , <i>Popowia</i> , <i>Pseudomalmea</i> , <i>Pseudovoria</i> , <i>Rollinia</i> (2), <i>Oxandra</i>
Monimiaceae	<i>Atherosperma</i>

CUADRO 4

Distribución de liriodenina, lisicamina y atherospermidina (De-la-Cruz, 2012)

Fue posible caracterizar la dinámica de acumulación de liriodenina (figura 5), el primer sitio en donde aparece el alcaloide es el endospermo durante la imbibición (BBCH: 03), luego en las radículas, hipocótilos y cotiledones (BBCH: 05-07), consecuentemente se encuentra en las raíces, tallos y hojas de las plántulas (BBCH: 11-16). Las raíces son el sitio con mayor abundancia del alcaloide, las hojas las menos. El endospermo es desprendido (BBCH: 16) con cierta cantidad del MS. La abundancia del alcaloide en las plántulas con seis hojas (BBCH: 16) es similar a la de un adulto (~ 1.0 mg.g⁻¹ MV).

Papel biológico de los alcaloides de *A. macrophyllata*. Utilizando los hongos *Aspergillus glaucus* y *Rhizopus stolonifer* responsables de la pudrición de las semillas, se encontró que varios de los extractos alcaloidales de las plántulas en desarrollo inhiben en alta proporción su crecimiento (figura 4). El alcaloide liriodenina detiene el crecimiento de ambos fitopatógenos a 100 y 200 µM, respectivamente. La actividad de los extractos, la de liriodenina pura y la proporción de ésta en los extractos señalan la importancia del alcaloide como sustancia responsable de la actividad que muestran los extractos. Existe al menos otro alcaloide, en menor concentración, en las raíces de las plántulas que

podiera contribuir a la actividad antifúngica. Con estos datos se puede señalar que la proporción de alcaloides en los tejidos parecen ser suficiente barrera para impedir el crecimiento de estos fitopatógenos (figura 4).

Finalmente, los alcaloides provienen de los aminoácidos tirosina y fenilalanina, durante la germinación y el

desarrollo de la plántula son obtenidos de la degradación de las proteínas de reservas, su cuantificación permite señalar que para la biosíntesis de alcaloides, la plántula utiliza hasta 1.0% de los aminoácidos precursores. Gasto energético justificable por la función que desempeñan estas moléculas especializadas (figura 5).

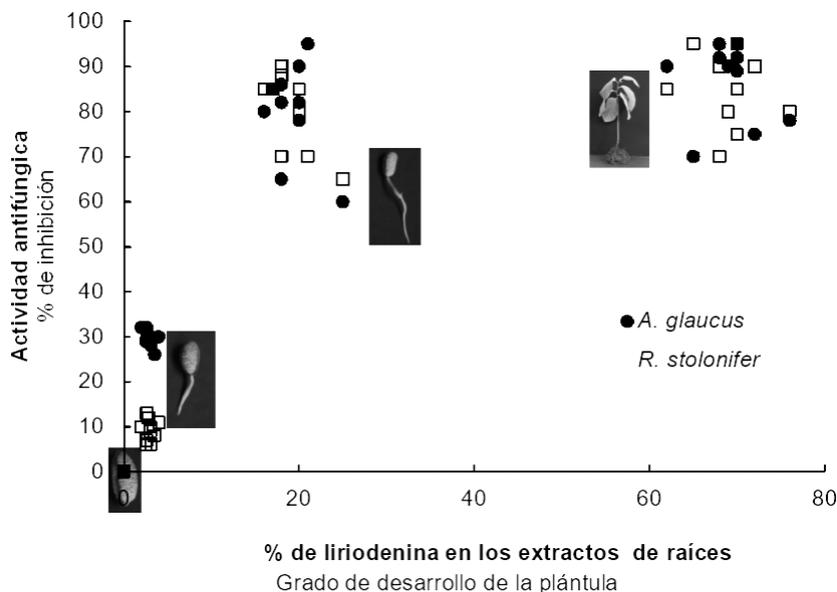


FIGURA 4

Correlación entre la actividad antifúngica de extractos de raíces de plántulas en desarrollo y la abundancia de liriodenina en ellos (n= 10).

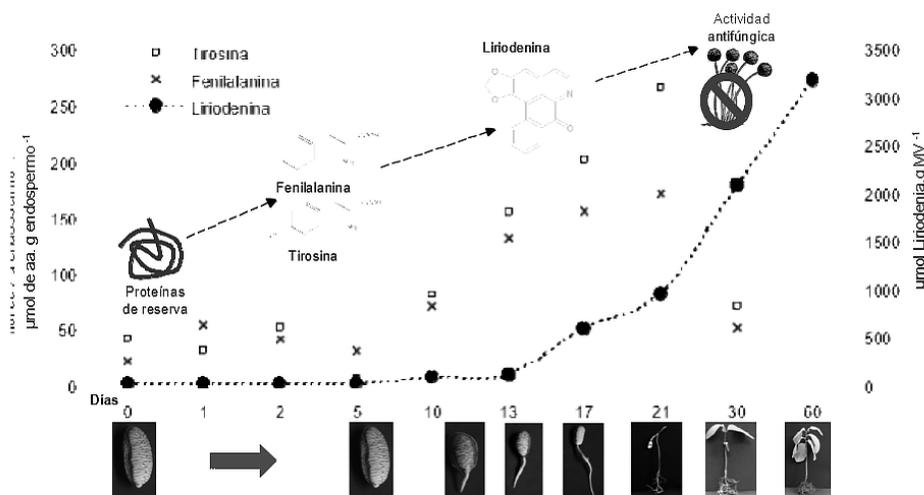


FIGURA 5

Figura 5. Abundancia de aminoácidos aromáticos y del alcaloide liriodenina durante el desarrollo temprano de *Annona macrophyllata*.

CONCLUSIÓN

Los alcaloides constituyen recursos de defensa durante el desarrollo temprano de *Annona macrophyllata*.

LITERATURA CITADA

- BEWLEY J.D. & M. BLACK, 1994.** *Seeds: Physiology of Development Germination*. New York: Plenum. 445 p.
- BEWLEY, J.D., K. BRADFORD, & H. HILHORST, 2013.** *Seeds: Physiology of Development, Germination and Dormancy*. Edic. Springer Science & Business Media. 392 p.
- BRÜCKNER H. & T. WESTHAUSER, 2003.** Chromatographic Determination of L- and D-amino Acids in Plants. *Amino Acids* 24: 43–55.
- BOVE, J., M. JULLIEN & P. GRAPPIN, 2001.** Functional Denomics in the Study of Seed Germination. *Genome Biology* 3(1): 1002.1–1002.5
- DE-LA-CRUZ-CHACÓN, I., 2001.** *Acetogeninas bioactivas de Annona diversifolia Safford*. Tesis de Licenciatura en Ingeniería Bioquímica. Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez. México. 75 p.
- DE-LA-CRUZ-CHACÓN, I., 2012** *Alcaloides bencilisoquinolínicos y su relación órgano-específica en las primeras fases de desarrollo de Annona diversifolia*. Tesis Doctoral, Universidad Nacional Autónoma de México, México. 175 p.
- DE-LA-CRUZ-CHACÓN, I. & A.R. GONZÁLEZ-ESQUINCA, 2012.** Liriodenine Alkaloid in *Annona diversifolia* During Early Development. *Natural Product Research* 26 (1): 42-49.
- DE VOGEL, E.F., 1980.** Seedlings of Dicotyledons. Structure, Development, Types. Agricultural Publishing and Documentation (PUDOC), Wageningen, p. 168-181.
- DUKE, J.A., 1969.** On Tropical Tree Seedlings. I. Seeds, Seedlings, Systems and Systematic. *Ann. Missouri Bot. Garden* 56 (2): 154-161.
- FERREIRA, G., A.R. GONZÁLEZ-ESQUINCA & I. DE-LA-CRUZ-CHACÓN, 2014.** Water Uptake by *Annona diversifolia* Saff. and *A. purpurea* Moc. & Sessé ex dunal Seeds (Annonaceae). *Revista Brasileira de Fruticultura* 36 (SPE1): 288-295.
- GONZÁLEZ-ESQUINCA, A.R., 2001.** *Contribución al estudio del género Annona (Annonaceae). Análisis fitoquímico de tres especies del estado de Chiapas*. Tesis Doctoral, Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- GONZÁLEZ-ESQUINCA, A.R., I. DE-LA-CRUZ-CHACÓN & L.M. DOMÍNGUEZ-GUTÚ, 2015.** Dormancy and Germination of *Annona macrophyllata* (Annonaceae): the Importance of the Micropylar Plug and Seed Position in the Fruits. *Botanical Sciences* 93 (3): 509-515.
- HARTMANN, T., 2008.** The Lost Origin of Chemical Ecology in the Late 19th Century. *PNAS* 105 (12): 4541–4546
- HESS, M., G. BARRALIS, H. BLEIHOLDER, L. BUHR, T. EGGERS, H. HACK, & R. STAUSS, 1997:** Use of the Extended BBCH Scale—General for the Descriptions of the Growth Stages of Mono and Dicotyledonous Weed Species. *Weed Research* 37: 433-441.

- HOLME, P.C. & K.A. WOODS, 2002. Measurement of Plasma Tyrosine by HPLC-UV or LC-MS-MS for Assessing Chemically Induced Tyrosinaemia. *Chromatographia* 55 (1): S193-S194.
- LUNA-CAZARES, L.M. & A.R. GONZÁLEZ-ESQUINCA, 2010. Susceptibility of Complete Bacteria and Spheroplasts of *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella typhi* to Rolliniastatin-2. *Natural Product Research* 24 (12): 1139-1145.
- NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards), 1997. *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. Approved Standard*, NCCLS Document M27-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA, USA.
- NONOGAKI, H., F. CHEN, & K.J. BRADFORD, 2007. Mechanisms and Genes Involved in Germination *Sensu stricto*. Chapter 11. In: *Seed Development, Dormancy and Germination*. Kent Bradford and Hiroyuki Nonogaki. (Ed.) Annual Plant Reviews. Vol. 27, Blackwell Publishing Ltd.
- NONOGAKI, H., 2010. MicroRNA Gene Regulation Cascades During Early Stages of Plant Development. *Plant and Cell Physiology*, 51 (11): 1840-1846.
- PÉREZ-AMADOR, M.C., A.R. GONZÁLEZ-ESQUINCA, A. GARCIA-ARGAEZ, E. BRATOEFF & C. LABASTIDA, 1997. Oil Composition and Flavonoid Profiles of the Seeds of Three *Annona* Species. *Phyton* 61: 77-80.
- PERKIN E., 2007. *Catálogo de métodos. Aromatic Amino Acids on C18 (Fast Analysis)*. LC_307.
- RIESELNAN, M.H., K.C. HAZEN, & J.E. CUTLER, 2000. Determination of Antifungal MICs by a Rapid Susceptibility Assay. *J. Clin. Microbiol.* 38: 333 – 340.
- SCHLIE-GUZMÁN, M.A., A. GARCÍA-CARRANCÁ & A.R. GONZÁLEZ-ESQUINCA, 2009. *In vitro* and *in vivo* Antiproliferative Activity of Laherradurin and Cherimolin-2 of *Annona diversifolia* S12aff. *Phytotherapy Research* 23: 1128–1133.
- WEITBRECHT, K., K. MÜLLER & G. LEUBNER-METZGER, 2011. First off the Mark: Early Seed Germination. Darwin Review. *Journal of Experimental Botany* 62 (10): 3289–3309.
- ZADOKS, J.C., T.T. CHANG & C.F. KONZAK, 1974. A Decimal Code for the Growth Stages of Cereals. *Weed Research* 14: 415-421.

Inducción fúngica de defensas químicas en *Annona muricata* L. (Anonaceae)

Christian Anabí Riley-Saldaña
Alma Rosa González-Esquinca

Laboratorio de Fisiología y Química Vegetal. Instituto de Ciencias Biológicas, Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. Libramiento Norte Poniente núm. 1150, colonia Lajas Maciel, C.P. 29039. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México. E-mail: christian.riley@unicach.mx.

RESUMEN

Annona muricata es la especie de Anonaceae más cultivada en México, debido a sus frutos son apreciados por su agradable sabor, es una planta capaz de producir 16 alcaloides y 90 acetogeninas. En este artículo se relata un método para inducir respuestas químicas en esta planta. Se usan como modelo de estudio plantas con 6 hojas infectadas con el hongo *Colletotrichum gloeosporioides*. Los resultados señalan que el método es eficiente y que permite estudiar a la especie sin necesidad de utilizar ejemplares adultos.

Palabras Clave: *Colletotrichum gloeosporioides*, antracnosis, *Annona muricata*.

ABSTRACT

Annona muricata is the most important crop species of Annonaceae family because its fruits are appreciated by their tasty flavor. It is able to produce almost 16 alkaloids and 90 acetogenins. In this research a method to induce chemical responses in this plant is reported using 6-leave-plants as a model of infected plant with the fungus *Colletotrichum gloeosporioides*. This method result very efficient to study chemical induction in seedling.

Keywords: *Colletotrichum gloeosporioides*, antracnosis, *Annona muricata*.

INTRODUCCIÓN

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

Las plantas producen metabolitos secundarios, también llamados metabolitos especializados (Pichersky *et al.*, 2011) que constituyen una de las formas de defensa química ante el ataque de diversos organismos, en general, pueden ser constitutivos o inducidos. Los constitutivos son producidos (biosintetizados) por la planta, previo a

la presencia de un patógeno o herbívoro, aminorando o deteniendo el posible daño a los tejidos de la planta. Son barreras químicas preformadas cuya información genética ha sido heredada resultando una diversidad de moléculas entre ellas alcaloides, fenoles, polifenoles, aceites esenciales y terpenos (Dixon, 2003).

Si a pesar de las barreras constitutivas el patógeno se establece, las plantas pueden activar mecanismos de defensa con el fin de detener la infección, a través de los llamados mecanismos de defensa inducidos, que involucran reacciones de biosíntesis o activación de moléculas que se inducen por los tejidos en contacto con el o los patógenos o herbívoros, en las que también intervienen los tejidos no infectados, las moléculas producidas como respuesta al ataque de patógenos, son comúnmente llamadas fitoalexinas (fenoles, flavonoides, alcaloides, terpenos) (Müller & Börges, 1941). En contraste con la resistencia constitutiva, la resistencia inducida se basa en el reconocimiento del invasor y un evento subsecuente de transducción de señales que conduce a la activación de las defensas.

Estas señales involucran en primer lugar una respuesta denominada respuesta hipersensitiva o hipersensible (HR), que implica el colapso de las células dañadas; en segundo lugar se da la producción de especies de oxígeno reactivas (ROS); la activación de genes relacionados con la defensa, síntesis de fitoalexinas y cambios estructurales de las paredes celulares y la. Esta respuesta localizada ocurre en el sitio de ataque del patógeno y el resultado son lesiones claramente delimitadas y circundadas por tejido sano (Boljakova & Hadjilvakova, 2001, Chisholam *et al.*, 2006, Castro & García, 2009).

Un patógeno habitual de la guanábana (*Annona muricata*) es *Colletotrichum gloeosporioides*, que provoca una enfermedad denominada antracnosis, la cual se caracteriza por atacar hojas, botones florales, frutos y tallos. Por ello el objetivo de este trabajo es dar a conocer uno de los métodos que pueden ser utilizados para inducir metabolitos secundarios en plantas.

MÉTODO

Aislamiento de *Colletotrichum gloeosporioides*

Colletotrichum gloeosporioides se aisló de hojas jóvenes de *Annona muricata* infectadas; se hicieron cortes de tejido infectado de 5 x 5 mm que se desinfectaron con hipoclorito al 1.5 % por tres minutos y posteriormente se lavaron 3 veces con agua destilada estéril, se dejaron secar sobre papel filtro estéril en una campana de flujo laminar durante 15 minutos, cada sección de tejido fue sembrada en cajas petri con agar dextrosa-papa (PDA, Bioxon®) e incubada $27^{\circ}\text{C} \pm 2$ en una incubadora marca RIOSSA™, al cuarto día, de las cajas con crecimiento micelial semejante al de *C. gloeosporioides*, se tomaron muestras y se resembraron tres veces en agar PDA; una vez verificada la pureza se tomó una porción de PDA con hifas, los trozos fueron transferidos a cajas petri con este medio de cultivo y fueron incubados a 27°C durante 7 días (Agostini *et al.*, 1992).

Obtención de cultivos monospóricos

Para la obtención de cultivos monospóricos se siguió el método propuesto por Manadhar *et al.*, 1995 modificado por Santos, 2006 (Santos, 2006). Para ello, en condiciones de esterilidad, se tomaron colonias de ocho días de edad desarrolladas en cajas petri con PDA, se depositó al centro de cada caja 200 μL de agua destilada estéril con una micropipeta. Con la ayuda de una aguja de disección previamente se mezclaron los micelios y conidios con el agua; posteriormente se recuperó la solución que se ajustó a 5 mL con agua estéril. Se tomaron 500 μL de la suspensión conidial y se distribuyeron en las cajas con PDA, este cultivo fue incubado

a 27°C durante 24 h. De cada aislamiento y con la ayuda de un microscopio estereoscópico se seleccionó un conidio individual germinado y se transfirió a medio de cultivo PDA. Los aislamientos con características de *C. gloeosporioides* fueron seleccionados y se mantuvieron en PDA a 27°C . La especie fue identificada por la doctora Graciela Huerta Palacios, del Departamento de Fitopatología del Colegio de la Frontera Sur. Y verificada frente a una cepa NCBI HM562712 adquirida del laboratorio GeMBio del Centro Investigaciones Científicas de Yucatán.

Inoculación de plántulas con *Colletotrichum gloeosporioides*.

Para establecer las condiciones adecuadas para la inoculación. Se seleccionaron 75 plántulas de *Annona muricata* con 6 hojas. Mediante aspersión se inoculó cada planta, con caldo dextrosa papa (5 mL) con 1×10^6 conidios mL^{-1} , cerciorándose que la aspersión fuera homogénea en todas las hojas, la aspersión se llevó a cabo con un aspersor manual. Cada plántula se cubrió con una bolsa de plástico transparente para crear un ambiente húmedo (figura 1). Se colocaron en una germinadora Conviron® con condiciones controladas (27°C , 50 % de humedad relativa, 12 h luz/12 h oscuridad). Se monitorearon los síntomas todos los días. Una vez que se observaron los síntomas característicos de la patología en las hojas, se colectaron las hojas, tallos y raíces, se dejaron secar a temperatura ambiente y se procedió a la extracción de acetogeninas y alcaloides (González-Esquinca, 2001). Tras la obtención de los extractos se realizó el análisis de esto bajo técnicas químicas y cromatográficas usuales para comparar lo perfiles químicos.



FIGURA 1

Plántulas de *A. muricata*. A. Tratamiento. B. Control

RESULTADOS

La inoculación por aspersión de cultivos monospóricos a 1×10^6 esporas de *C. gloeosporioides* en las hojas de plántulas con 6 hojas de *A. muricata* resulta ser un método eficaz para inducir la aparición de síntomas de antracnosis, tales como necrosis foliar en los ápices, haz y bordes, necrosis en el cuello del tallo, así como deformaciones de las hojas (figura 2). El 60 % de las plantas presentaron estos síntomas 8 días posteriores a la inoculación.

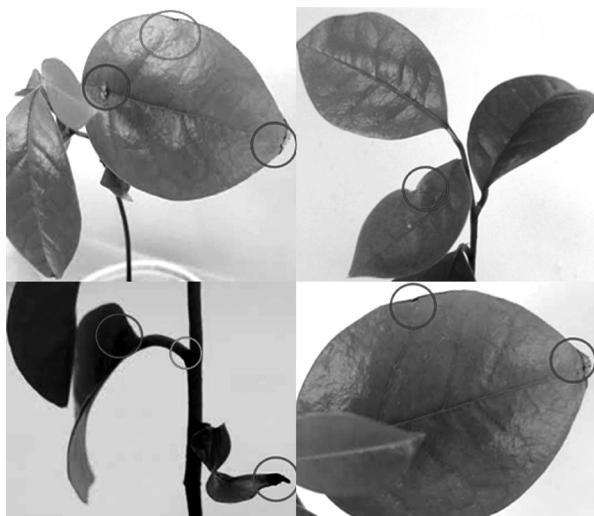


FIGURA 2

Síntomas característicos de antracnosis en *A. muricata* causada por *C. gloeosporioides*

El análisis del perfil químico de las plantas sanas vs infectadas de *A. muricata* mediante este método permitió determinar la inducción de un nuevo alcaloide en las hojas el cual se identificará por métodos químicos y espectrofotométricos (cuadro 1).

LITERATURA CITADA

- AGOSTINI J.P., L.W. TIMMER & D.J. MITCHELL, 1992. Morphological and Pathological Characteristics of Strains of *Colletotrichum gloeosporioides* Citrus. *Etiology* 82 (11): 1377-1382.
- BOUÉ S. M., C. H CARTER, K. C. EHRLICH & T.E. CLEVELAND, 2000. Induction of the Soybean Phytoalexins Coumestrol and Glyceollin by *Aspergillus*. *Journal Agricultur Food Chemical*. 48 (6): 2167-2172.
- CASTRO M.E. Y P.E. GARCÍA, 2009. La inmunidad innata en las plantas: una batalla Molecular entre receptores y estimuladores. *Biológicas* 11: 43-47.

Alcaloides	Abundancia relativa (%)	
	Control	Inoculadas
A	93 ± 3a	100 ± 1a
B	100 ± 7a	96.3 ± 2a
C	100 ± 2a	95.2 ± 3a
D	100 ± 2a	98.5 ± 3 ^a
E	0	100 ± 2a

CUADRO 1

Alcaloides en hojas de plantas control e inoculadas con *C. gloeosporioides*.

Los métodos llevados a cabo para la inducción fúngica de fitoalexinas en su mayoría son realizados en cultivos celulares, en los cuales interaccionan las células con inductores de respuesta implicados en la vía de señalización por el ejemplo el Ca^{+} , ácido jasmónico y ácido salicílico, también son frecuentemente utilizados elicitores fúngicos que son compuestos señal que estimulan la aparición de cualquier respuesta defensiva que incluyen componentes de las superficies celulares entre ellos oligosacáridos, glicoproteína proteica o lipídica (Nef *et al.*, 1991, Boué, 2000, Hahlbrock *et al.*, 2003, Conciencao *et al.*, 2006, Robles-Zepeda *et al.*, 2009).

El método por aspersión supone varios escenarios más allá de la búsqueda de moléculas de respuesta ante un ataque o infección por hongos, este método puede, además ser utilizado en biotecnología para el estudio del metabolismo secundario con la finalidad de diseñar estrategias para incrementar la resistencia de cultivos importantes y asegurar una mejor de producción.

CONCLUSIÓN

La aspersión de esporas es una buena opción para inoculación de plántulas para evaluar la expresión de metabolitos secundarios en plantas.

- CHISHOLM S.T., G. COAKER, B. DAY & B.J. STASKAWICZ, 2006.** Host—Microbe Interactions Shaping the Evolution of the Plant Immune Response. *Cell*. 124: 803-814.
- CONCEICAO, L. F. R., FERRERE, F., R.M. TAVARES & A.C.P DIAS, 2006.** Induction of Phenolic Compounds in *Hypericum perforatum* L. cells by *Colletotrichum gloesporioides* elicitation. *Phytochemistry*. 67: 149-155.
- DIXON R.A. 2003.** Natural Products and Plant Disease Resistance. *Nature* 411: 843-847.
- HAHLBROCK, K., P. BEDNAREK, I. CIOLKOWSKI, B. HAMBERGER, A. HAMBERGE, H. LIEDGENS, E. LOGEMANN, I. SCHMELZER, I. SOMSSICH & J. TAN, 2003,** Non-Self Recognition, Transcriptional Reprogramming, and Secondary Metabolite Accumulation During Plant/Pathogen Interactions 100 (2): 14569-14576.
- MÜLLER K.O & H. BÖRGER, 1941,** Experimentelle untersuchungen uber die phytophthora-resistenz der kartoffel. *Arb Biol Reichsanstalt Landw Forstw*. 23:189-2317.
- ODJAKOVA M., Y C. HADJIIVANOVA, 2001.** The Complexity of Pathogen Defense in Plants. *Bulgarian Journal of Plant Physiology* 27 (1-2): 101-109.
- PICHERSKY E Y E. LEWINSOHN 2011.** Convergent Evolution in Plant Specialized Metabolism. *Ann. Rev. Plant Biol.* 62: 549-66.
- ROBLES-ZEPEDA R.E., M. JIMENEZ-ESTRADA, A. NAVARRO-OCAÑA, I. SAAD-VILLEGAS, I. BRUNNER & E. RUIZ BUSTOS, 2009.** Secondary Metabolites Induction in *Mammillaria huitzilopochtli* (cCactaceae) and Evaluation of the Fungicidal Activity. *African Journal of Biotechnology*. 8 (16): 3874-3878.
- SANTOS-OROZCO, M., 2006.** *Patogenicidad, variabilidad morfológica y genética de Colletotrichum acutatum Simmonds de cítricos en México.* Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Colima, México. 106 p.
- WHENHAM R.J., R.S.S FRASER, L.P. BROWN & J.A. PAYNE, 1986.** Tobacco Mosaic Virus-Induced Increase in Absicic Acid Concentration in Tobacco Leaves: Intracellular Location in Light and Dark-Green Areas, and Relationship to Symptom Development. *Planta* 168: 592-598.

El género *Bephratelloides* Girault (Insecta: Hymenoptera: Eurytomidae), parásitos de semillas de la familia Annonaceae Juss.

Claudia Azucena Durán-Ruiz¹
Alma Rosa González-Esquinca¹

¹Laboratorio de Fisiología y Química Vegetal, Instituto de Ciencias Biológicas, Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas, Libramiento Norte Poniente núm. 1150. Col. Lajas Maciel C.P. 29039. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México. e-mail: claudia.duran.ex@unicach.mx; aesquinca@unicach.mx

RESUMEN

Debido a la importancia económica y ecológica que representa la interacción *Bephratelloides*-Annonaceae, en este artículo se documenta el estado actual del conocimiento acerca de la relación entre estos organismos. Se documentan 4 géneros y 13 especies de anonáceas hospederas: *Annona* (10 especies), *Cymbopetalum* (1), *Duguetia* (1) y *Xylopia* (1). *Bephratelloides cubensis* es la especie más estudiada.

Palabras clave: plaga, avispa barrenadora de semillas, *Bephratelloides* sp., Annonaceae.

ABSTRACT

Due to the economical and ecological relevance of the significance of *Bephratelloides*-Annonacea interaction, this paper describes the current knowledge about the relation between these organisms. 4 genera in 13 host plant are reported here: *Annona* (10 species), *Cymbopetalum* (1), *Duguetia* (1) *Xylopia* (1). *B. cubensis* is the main studied specie.

Keywords: pest, seed borer wasp, *Bephratelloides* sp., Annonaceae.

INTRODUCCIÓN

La familia Annonaceae pertenece al Orden Magnoliales y se encuentran entre las plantas más primitivas de las angiospermas (Cronquist, 1968). Está conformada por cuatro subfamilias, 14 tribus y 108 géneros que contienen alrededor de 2,400 especies (Chatrou *et al.*, 2012; Chatrou, 2013; Couvreur *et al.*, 2012), distribuidos en su mayoría en selvas tropicales en las regiones Neotropicales, en África y Asia-Australasia (Couvreur *et al.*, 2012).

El género *Annona* tiene especies de importancia económica, por sus frutos comestibles ocupan un lugar destacado en la agricultura, como el caso de *Annona muricata* (guanábana), *Annona cherimolia* (chirimoya) y, más regionalmente, *A. macrophyllata* (papausa). Estas especies, junto con otras, están relacionadas con una avispa que parasita sus semillas que, por la afinidad que tiene hacia este género, se le conoce como la *avispa de las anonáceas* (Hernández-Fuentes *et al.*, 2010). Estos insectos pertenecen al género *Bephratelloides* y provocan la pérdida hasta del 100% de la cosecha (Bruner & Acuña, 1967; Nadel & Peña, 1991; Castañeda-Vildózola *et al.*, 2010;

Hernández-Fuentes *et al.*, 2010). Debido a la importancia económica y ecológica que representa la interacción Annonaceae-*Bephratelloides*, a la falta de sistematización y actualización de la información sobre este tema, en este artículo se documenta el estado actual del conocimiento acerca de la relación entre estos organismos.

RESULTADOS

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

Orden Hymenoptera
Superfamilia Chalcidoidea
Familia Eurytomidae
Subfamilia Eurytominae
Género *Bephratelloides* Girault, 1913

Especies del género *Bephratelloides*

El género *Bephratelloides* Girault, 1913, está constituido por avispas barrenadoras de semillas, de acuerdo a Noyes (2014) este género incluye ocho especies: *B. ablusus* Grissell & Foster, *B. cubensis* Ashmead, *B. duguetiphagus*

Chang, *B. limai* Bondar, *B. melleus* Westwood, *B. paraguayensis* Crawford, *B. petiolatus* Grissell & Schauff y *B. pomorum* (sin. *B. maculicollis* Cameron) Fabricius (figura 1).

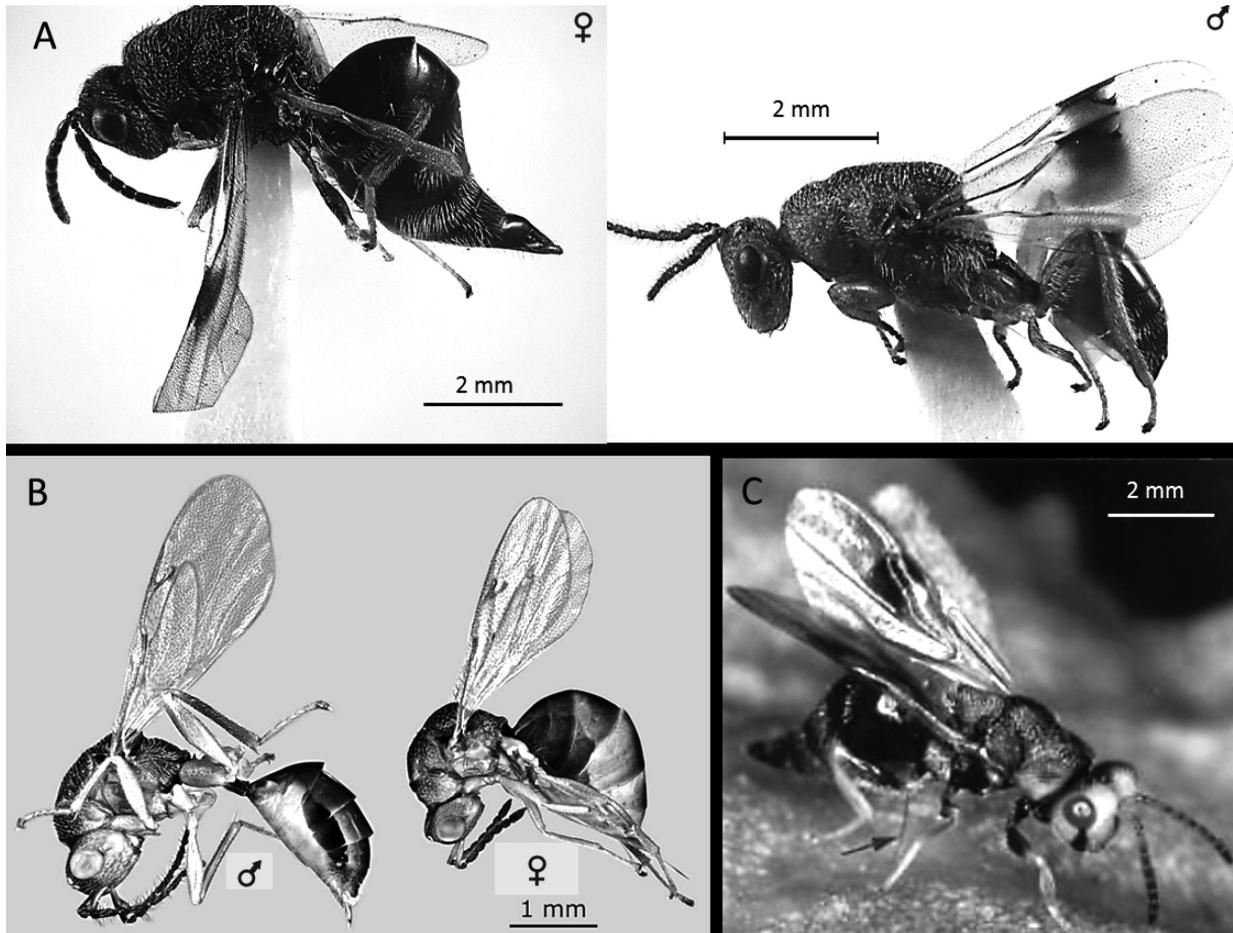


FIGURA 1

Algunas especies del género *Bephratelloides*. A) *B. cubensis*, B) *B. ablusus*, C) *B. pomorum*. A) Fotografía de los autores, B) Castañeda-Vildózola *et al.*, (2011), C) Pereira *et al.*, 2003.

Distribución y especies hospederas

La presencia de *B. cubensis* se ha documentado especialmente en el género *Annona*, probablemente porque son las que tienen mayor interés comercial. Hasta el momento, se ha reportado que la avispa parasita a 10 especies del género *Annona* (Korytkowski & Ojeda, 1966; Heu, 1988; Grissell & Schauff, 1990; Nadel & Peña, 1991; Peña &

Bennet, 1995; González-Sánchez, 2014) de 18 especies que se distribuyen en México (De la Cruz *et al.*, en prensa) (Figura 2, Cuadro 1). Pero también se conoce que *Cymbopetalum mayanum* (Grissell & Foster, 1996), *Xylopiia aromatica* (Perioto, 1997) y *Duguetia panamensis* (Chang, 1998) son plantas hospederas (cuadro 1).

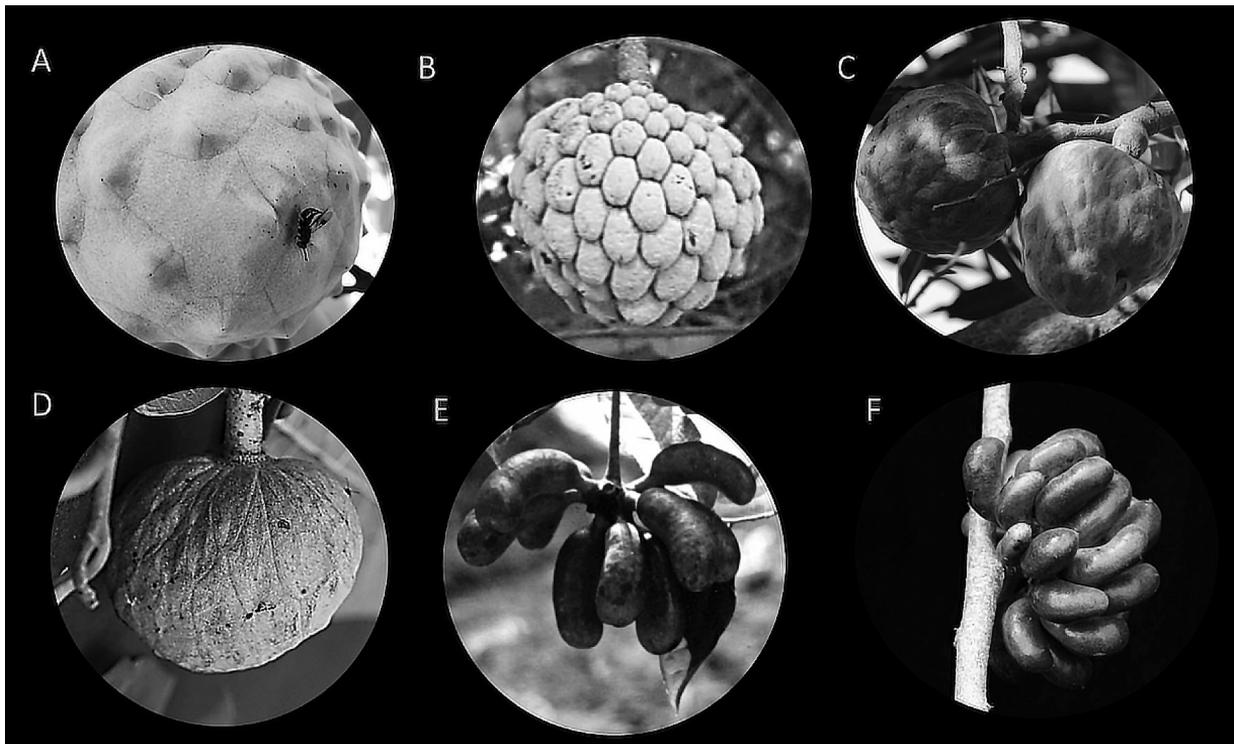


FIGURA 2

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

Las especies de *Bephratelloides* se encuentran únicamente en el Continente Americano y su distribución abarca países desde Norte América hasta Sudamérica (figura 3, cuadro 1). De acuerdo a los reportes de estas avispa, *B. cubensis* es la que se encuentra más ampliamente distribuida, seguida por *B. pomorum*.

De las ocho especies, dos de ellas se han registrado en México (figura 3): *B. ablusus* y *B. cubensis*; ésta última se localiza en Nayarit (Rodríguez *et al.*, 1980; Hernández-Fuentes, 2008), Guerrero, Morelos, Puebla, Veracruz, Yucatán (Castañeda-Vildózola, 2010) y Chiapas (González-Sánchez, 2014); mientras que *B. ablusus* se ha registrado únicamente en Chajul, Chiapas, en semillas de *C. mayanum* (Grissell & Foster, 1996).



FIGURA 3

Distribución del género *Bephratelloides*.

Especie	Distribución	Especie hospedera	Referencias
<i>Bephratelloides</i> sp.		<i>Xylopia aromatica</i>	Perioto (1997)
<i>B. ablusus</i>	México	<i>Cymbopetalum mayanum</i>	Grissell & Foster (1996)
<i>B. cubensis</i>	Brasil Colombia Costa Rica Cuba Guatemala Haiti Hawaii Honduras Florida Jamaica México Panamá Perú Puerto Rico República Dominicana Venezuela	<i>Annona bullata</i> <i>A. cherimola</i> <i>A. glabra</i> <i>A. lutescens</i> <i>A. macrophyllata</i> <i>A. montana</i> <i>A. muricata</i> <i>A. reticulata</i> <i>A. squamosa</i> <i>A. squamosa</i> × <i>cherimola</i>	Korytkowski & Ojeda (1966) Heu (1988) Grissell & Schauff (1990) Nadel & Peña (1991) Nadel & Peña (199b) Peña & Bennet (1995) González-Sánchez (2014)
<i>B. duguetiphagus</i>	Panamá	<i>Duguetia panamensis</i>	Chang (1998)
<i>B. limai</i>	Brasil	<i>Annona</i> sp. <i>A. muricata</i>	Grissell & Schauff (1990b) Noyes (2014)

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

CUADRO 1 Distribución y especies hospederas de *Bephratelloides*.

CICLO DE VIDA

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

Los huevos, larvas, pupas y adultos se desarrollan en el interior de semillas de frutos en crecimiento (Nadel & Peña, 1991) (figura 4). Las larvas se alimentan del endospermo de las semillas, afectando la viabilidad de éstas. Los individuos adultos al salir de los frutos forman galerías a través de la pulpa que permiten la entrada de insectos necrófagos y hongos fitopatógenos, dañando totalmente a los frutos (Nadel & Peña, 1991; Castañeda-Vildózola *et al.*, 2010; Hernández-Fuentes *et al.*, 2010).

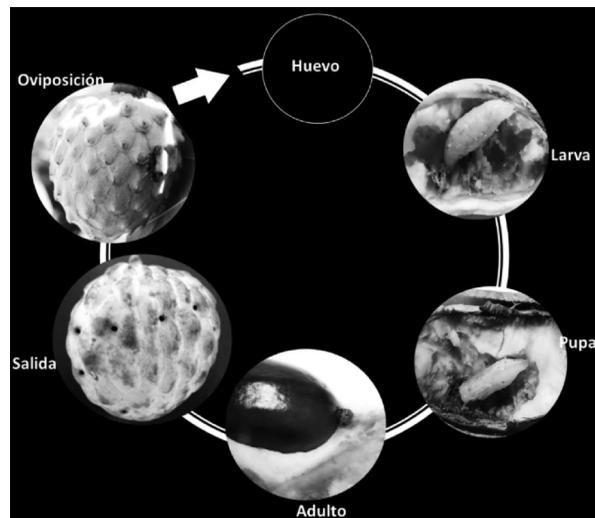


FIGURA 4

Ciclo de vida de *B. cubensis* en *A. macrophyllata*. Fotografías de los autores.

La avispa más estudiada es *B. cubensis*, su ciclo de vida oscila entre ~86 y 100 días (Bruner & Acuña, 1967; Nadel & Peña, 1991; Veloza, 1991 en Murcia, 2006; Evangelista *et al.*, 1999b), otro reporte señala que tiene una duración de ~30 a 45 días (Korytkowski & Ojeda, 1966) (Figura 5).

Tomando en cuenta el tiempo de duración de los diferentes estados de desarrollo, los huevos eclosionan ~12-24 días después de la puesta, el periodo larvario

tiene una duración de ~23-55 días, las pupas de ~9-34 días y los adultos ~11-24 días (figura 5). Esta variación depende de la especie de *Bephratelloides* y de la planta hospedera, de las condiciones ambientales (temperatura y humedad) y del tipo de estudio (campo o laboratorio) (Bruner & Acuña, 1967; Korytkowski & Ojeda, 1966; Nadel & Peña, 1991; Veloza, 1991 en Murcia, 2006; Evangelista *et al.*, 1999).

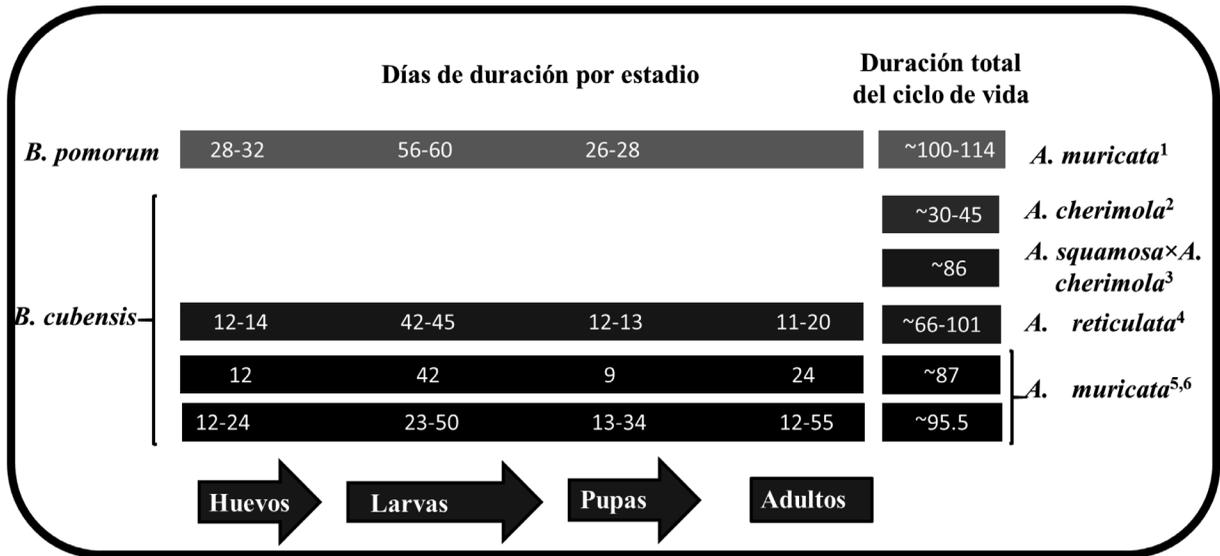


FIGURA 5

Duración del ciclo de vida de *B. cubensis* y *B. pomorum* en diferentes especies de *Annona*. ¹ Veloza (1991) en Murcia & Salamanca (2006); ² Korytkowski & Ojeda (1966); ³ Nadel & Peña (1991a); ⁴ Bruner & Acuña (1967); ⁵ Evangelista *et al.*, (1999); ⁶ Hernández-Fuentes *et al.*, (2010).

Métodos de control de la plaga

Métodos químicos, físicos y biológicos han sido sugeridos para el control de *Bephratelloides*. En 1988, Peña y Nagel realizaron un análisis utilizando dos insecticidas químicos comerciales y a diferentes concentraciones frente a *B. cubensis*: Malatión y Permetrina. En condiciones de laboratorio, estos compuestos provocaron, después de 24 horas del tratamiento tópico, el 100% y 95% de mortalidad a $0.57 \text{ g ai} \cdot \text{L}^{-1}$ y $0.256 \text{ g ai} \cdot \text{L}^{-1}$, respectivamente. En condiciones de campo, la menor infestación se produjo después de la aspersión de $0.36 \text{ lb ai} / 100 \text{ gal}$ de una mezcla de Malatión, Metil tiofanato y Mancozeb. Hernández-Fuentes *et al.*, (2008) también evaluó diferentes insecticidas, de los cuales el Dimetoato fue el mejor tratamiento (0.75 y 5.9% de infestación).

Con la finalidad de buscar métodos amigables con el ambiente que permitan controlar a la plaga, Murcia y

Salamanca (2006) sugieren un método de control biológico, utilizando al hongo *Paecilomyces lilacinus*, en cuyo ensayo provocó el 100% de mortalidad en *B. pomorum* a una concentración de 6.4×10^7 conidios/mL.

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

CONCLUSIÓN

Las especies del género *Bephratelloides* tienen una afinidad especial hacia las integrantes de la familia Annonaceae, especialmente con el género *Annona*. En

este trabajo se documentan cuatro géneros y 13 especies de anonáceas hospederas: *Annona* (10 especies), *Cymbopetalum* (1), *Duguetia* (1) y *Xylopia* (1). De las ocho especies de avispas que existen, *B. cubensis* es, sin duda, la más estudiada.

LITERATURA CITADA

- BRUNER, S. & J. ACUÑA, 1967. Sobre la biología de *Bephrata cubensis* Ahsm., el insecto perforador de las frutas de anonáceas. Academia Ciencias Cuba. *Inst. Agrono. Ser. Agr. 1: 14*.
- CASTAÑEDA-VILDÓZOLA, A., C. NAVA-DÍAZ, J. VÁLDEZ-CARRASCO, C. RUIZ-MONTIEL, L. VIDAL-HERNÁNDEZ & S. BARRIOS-MATÍAS, 2010. Distribution and Host Range of *Bephratelloides cubensis* Ashmead (Hymenoptera: Eurytomidae) in Mexico. *Neotropical Entomology 39 (6): 1053-1055*.
- CHANG, R., 1998. Descripción de *Bephratelloides duguetiphagus* n. sp (Hymenoptera: Eurytomidae) criados de frutos de *Duguetia panamensis* Standl. (Annonaceae). Tesis de maestría. Universidad de Panamá. Panamá, República de Panamá. 38 p.
- CHATROU, L., 2013. Annonaceae, a Model Group for Plant Evolution in the Tropics. In: V International Congress & Brazilian Meeting about Annonaceae: from gene to exportation. Brazil. P. 11.
- CHATROU, L., M. PIRIE, R. ERKENS, T. COUVREUR, K. NEUBIG, J. ABBOTT, J. MOLS, J. MAAS, R. SAUNDERS & M. CHASE, 2012. A new Subfamilial and Tribal Classification of the Pantropical Flowering Plant Family Annonaceae Informed by Molecular Phylogenetics. *Botanical Journal of the Linnean Society 169: 5-40*.
- COUVREUR, T., P. MAAS, S. MEINKE, D. JOHNSON & P. KEBLER, 2012. Keys to the Genera of Annonaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society 169: 74-83*.
- CRONQUIST, A., 1968. *The Evolution and Classification of Florewing Plants*. Nelson and Sons. London. P. 135.
- DE LA CRUZ, I., M. CASTRO-MORENO, L. LUNA-CÁZARES & A.R. GONZÁLEZ-ESQUINCA., 2016. Título? *EN PRENSA*.
- EVANGELISTA, L.S., E.M.E. VALDÉS & L.A. LLANOS, 1999. Tabla de vida de *Bephratelloides cubensis* (Hymenoptera: Eurytomidae) bajo condiciones de laboratorio. *Memorias del II Congreso Internacional de Anonáceas*. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. México. Pp. 209-216.
- GONZÁLEZ-SÁNCHEZ, J.N., 2014. *Interacción de Bephratelloides cubensis con frutos de Annona macrophyllata* Donn Sm. Tesis de licenciatura. Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México. 57 p.
- GRISSELL, E. & M. FOSTER., 1996. A new *Bephratelloides* (Hymenoptera: Eurytomidae) from Seed of *Cymbopetalum* (Annonaceae) in Mexico. *Proceedings of the Entomological Society of Washington 98 (2): 256-263*.
- GRISSELL, E. & M. SCHAUFF, 1990. A Sinopsis of the Seed-Feeding Genus *Bephratelloides* (Chalcidoidea: Eurytomidae). *Proceedings of the Entomological Society of Washington 92 (2): 177-187*.
- HERNÁNDEZ-FUENTES, L.M., M.A. URIAS-LÓPEZ & N. BAUTISTA-MARTÍNEZ, 2010. Biología y hábitos del barrenador de la semilla *Bephratelloides cubensis* Ashmead (Hymenoptera: Eurytomidae). *Neotropical Entomology 39 (4): 527-534*.

- HERNÁNDEZ-FUENTES, L.M., N. BAUTISTA-MARTÍNEZ, J.L. CARRILLO-SÁNCHEZ, H. SÁNCHEZ, M.A. URÍAS-LÓPEZ Y M.D. SALAS-ARAIZA, 2008. Control del barrenador de las semillas, *Bephratelloides cubensis* Ashmead (Hymenoptera: Eurytomidae) en guanábana, *Annona muricata* L. (Annonales: Annonaceae). *Acta Zoológica Mexicana* 24 (1): 199-206.
- HEU, R., 1988. *Bephratelloides* (= *Bephrata*) *cubensis*. *Proceedings of the Hawaiian Entomological Society* 28: 4.
- KORYTKOWSKI, G. Y D. OJEDA, 1966. *Bephrata cubensis* Ashmead (Hym.: Eurytomidae), una nueva especie dañina a las anonáceas en el Perú. *Rev. Per. de Ent.* 9 (1): 56-60.
- MICHELETTI, S., M.F. BROGLIO, A.G.S.D.M. AGRA, G.V.S. BARBOSA Y F.L. GOMES, 2001. Control of *Cerconota anonella* (Sepp.) (Lep.: Oecophoridae) and *Bephratelloides pomorum* (Fab.) (Hymenoptera: Eurytomidae) in Soursop (*Annona muricata* L.). *Revista Brasileira de Fruticultura* 23 (3): 722-725.
- MURCIA, D.A. Y M. F. SALAMANCA, 2006. *Búsqueda de microorganismos potenciales controladores de Bephratelloides maculicollis* plaga de *Annona muricata* L., en algunos cultivos de los departamentos del Tolima y Cundinamarca. Tesis de Posgrado. Pontificia Universidad Javeriana. 61 p.
- NADEL, H. & J. PEÑA, 1991. Hosts of *Bephratelloides cubensis* (Hymenoptera: Eurytomidae) in Florida. *Florida Entomologist*, 74 (3): 476-479.
- NOYES, J.S., 2014. *Universal Chalcidoidea Database*. Publicación electrónica. <http://www.nhm.ac.uk/chalcidoids>
- PEÑA, J.E. & F.D. BENNETT, 1995. Arthropods Associated with *Annona* in the Neotropics. *Florida Entomologist* 7 (2): 329-349.
- PEÑA, J. & J. NAGEL, 1988. Effectiveness of Pesticides Against two Tropical Fruit Pests. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society* 101: 249-251.
- PEREIRA, M.J.B., N. ANJOS & A.E. EIRAS, 2003. Oviposição da broca-da-semente de graviola *Bephratelloides pomorum* (Fabricius, 1908) (Hymenoptera: Eurytomidae). *Arquivos do Instituto Biológico* 70 (2): 221-224.
- PERIOTO, N., 1997. Emergence of *Bephratelloides* sp. (Hymenoptera: Eurytomidae) from Seeds Collected in Dregs of *Xylopia aromatica* (Annonaceae). *Arquivos do Instituto Biológico* 64: 135-137.
- RODRÍGUEZ, G., J. VELASCO & M. VELASCO, 1980. Producción de guanábano (*Annona muricata*) en el estado de Nayarit). En: *III Simposium de la Investigación, Desarrollo Experimental y la Docencia en CONAFRUT durante 1979*. Xalapa, Veracruz. Pp: 141-153.
- SILVA, L.S.D., S.M.F. BROGLIO, E.E.P.D. LEMOS, T.D.L. SALVADOR & M.I.R.D. NEVES, 2014. Control of *Cerconota anonella* (Sepp.) (Lep.: Oecophoridae) and *Bephratelloides pomorum* (Fab.) (Hym.: Eurytomidae) in Sugar Apple (*Annona squamosa* L.). *Revista Brasileira de Fruticultura* 36 (SPE1): 305-309.
- TROPICOS.ORG. *Missouri Botanical Garden*. 30 Sep 2016
<http://www.tropicos.org/Image/80145>,<http://www.tropicos.org/Image/100160484>;<http://www.tropicos.org/Image/82738>;<http://www.tropicos.org/Image/100129788>

Actividad inhibitoria de la liriodenina en la linea celular de adenocarcinoma de mama MCF-7

María Adelina Schlie-Guzmán¹
Nelsi Alejandra Burguete A.¹
Alma Rosa González-Esquinca¹

¹ Instituto de Ciencias Biológicas, Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas, Libramiento Sur Poniente número 1150, colonia Lajas Maciel, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, C.P. 29000. adelina.schlie@unicach.mx

RESUMEN

El alcaloide oxoaporfínico liriodenina presenta actividad citotóxica en líneas celulares cancerosas y ha sido señalado como un buen candidato para el desarrollo de nuevos fármacos antineoplásicos, sin embargo su efecto en las células normales no ha sido aún reportado. Utilizando ensayos *in vitro* de la proliferación celular, en este estudio se comparó la actividad de la liriodenina aislada de *A. lutescens* Saff. sobre la línea cancerosa de mama MCF-7 y en cultivos primarios de linfocitos de bazo murinos, utilizando la doxorubicina como fármaco antineoplásico de referencia. Los resultados muestran que la liriodenina y la doxorubicina inhiben la proliferación de las células MCF-7 de manera dosis dependiente con una DI_{50} para ambos compuestos de 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Interesantemente, la menor concentración del alcaloide que produjo una inhibición significativa ($P \leq 0.05$) fue de 0.001 $\mu\text{g}/\text{mL}$ la cual fue 10 veces menor a la encontrada para el fármaco de referencia. Estadísticamente, las concentraciones menores de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de liriodenina muestran un efecto menor en los linfocitos murinos que en las células transformadas. Estos datos permiten conocer en las células MCF-7 los rangos seguros de la posible administración del alcaloide, sin comprometer excesivamente a las células normales.

Palabras clave: liriodenina, antiproliferativo, cáncer.

ABSTRACT

The alkaloid oxoaporfine liriodenine shows a cytotoxic activity on neoplastic cells lines and is pointed out as a good candidate for the development of new anti cancer drugs. However its effect on normal cells has not yet been reported. In this study the activity of the isolated liriodenine from *A. lutescens* Saff. on breast cancer line MCF-7 and in primary cultures of murine spleen lymphocytes using *in vitro* cell proliferation assays was compared; the doxorubicin as an antineoplastic reference drug was used. Our results show that the liriodenine and the doxorubicin inhibit both the proliferation of MCF-7 cells, with a DI_{50} of 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Interestingly the lowest alkaloid concentration that produced a significant inhibition ($P \leq 0.05$) was 0.001 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and it is 10 times lower than that found for the reference drug. Concentrations below 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of liriodenine statistically have less effect in murine lymphocytes than in the transformed cells. These data allow knowing in MCF-7 cells, the safe ranges of its possible administration, without excessively compromising normal cells.

Keywords: liriodenine, antiproliferative, cancer.

INTRODUCCIÓN

Las propiedades medicinales de las plantas son atribuidas a la producción de moléculas de bajo peso molecular denominadas metabolitos secundarios (fenoles, flavonoides, taninos, cumarinas, esteroides, alcaloides y otros compuestos) cuya función se ha relacionado con la interacción de las plantas con su entorno; sin embargo al ser químicamente activos, pueden actuar en otros sistemas biológicos modificando sus procesos fisiológicos y exhibiendo de manera natural actividades biológicas como la antifúngica, antimicrobiana, insecticida, citotó-

xica etc. (Anaya y Espinosa-García, 2006). Por ello, estos compuestos son una de las fuentes más importantes en la búsqueda de moléculas activas para el desarrollo de nuevos medicamentos.

Se ha documentado que los alcaloides derivados de isoquininas, como los aporfinoideos presentan un rango amplio de actividades como antiparasitaria, antimicrobiana, antifúngica, antitumoral y sobre el sistema nervioso central (Muñoz *et al.*, 2006). Dentro de este grupo se encuentra la oxoaporina denominada liriodenina que es una molécula plana, de color amarillo y fluorescente que ha sido aislada de diversas familias de plantas y es

el alcaloide apofinico más abundante en la familia Annonaceae (González-Esquinca, 2005)

Diversos estudios señalan que este alcaloide tiene efectos inhibitorios sobre la proliferación de células cancerosas de pulmón, hígado y mama (Wu *et al.*, 1990; Chang *et al.*, 2004; Hsieh *et al.*, 2005), y su actividad se ha relacionado con la inhibición de la topoisomerasa II (Woo *et al.*, 1979; Li *et al.*, 2009) lo que llevaría al bloqueo del ciclo celular. Por lo anterior se le ha señalado como un buen candidato para el desarrollo de nuevos fármacos antineoplásicos; sin embargo un compuesto para ser considerado como de uso potencial debe presentar una adecuada selectividad sobre las células cancerosas sin afectar de manera excesiva a las normales. Utilizando ensayos de proliferación celular en este estudio se comparó la actividad *in vitro* de la liriodenina aislada de extractos alcaloidales de *Annona lutescens* Saff. (Annonaceae) en la línea de adenocarcinoma humano de mama MCF-7 y en cultivos primarios de linfocitos de bazo de ratones normales, utilizando como fármaco antineoplásico de referencia la doxorubicina.

MÉTODO

Aislamiento de la liriodenina

Se molió hasta polvo fino 50 g de raíces de *Annona lutescens* Saff. que se saturaron con una solución concentrada de Na_2CO_3 . El polvo se secó a temperatura ambiente y se extrajo con CHCl_3 . El extracto se refinó en tres ocasiones mediante una extracción ácido-base con CHCl_3 siguiendo el método reportado por de la Cruz y González-Esquinca (2012). Se obtuvo 23 g de extracto alcaloidal, del que se precipitó un sólido amarillo que se purificó por medio de recristalizaciones con CHCl_3 -MeOH hasta obtener 4.3 mg de liriodenina (p.f. 280-282 °C) (figura 1).

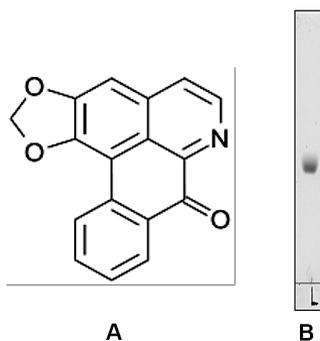


FIGURA 1

Liriodenina, A. Estructura química. B. Cromatografía en placa fina corrida con CHCl_3 -MeOH 9:1 y revelado con el reactivo de Dragendorff.

Líneas celulares

La línea humana de adenocarcinoma mamario MCF-7 (ATCC Manassas, VA, USA) fue mantenida con medio de cultivo D-MEM/F12 (Invitrogen, México) suplementado con 10% de suero fetal bovino (medio completo). Los linfocitos murinos se obtuvieron de ratones Balb/c normales, sacrificados humanitariamente de acuerdo a las normas de la Asociación Mexicana para Animales de Laboratorio (AMCAL). Asépticamente el bazo fue removido y las células disociadas mediante su paso por una malla. Las células se recolectaron en un tubo cónico y los eritrocitos presentes se lisaron con una solución 0.15 M NH_4Cl , 1.0 mM KHCO_3 y 0.1 mM Na_2EDTA ; los linfocitos resultantes fueron lavados por centrifugación con una solución amortiguada de fosfatos pH 7.2 y finalmente resuspendidos en medio completo. Todo el procedimiento se realizó en condiciones de esterilidad (Kruisbeek, 1994).

Ensayos en los cultivos celulares

Las células fueron sembradas en 100 μL de medio de cultivo completo en placas de 96 pozas a una densidad de 1×10^4 células MCF-7 o 4×10^6 linfocitos murinos por poza y mantenidas a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO_2 durante toda la noche. Al día siguiente se añadió liriodenina o el fármaco de referencia doxorubicina a concentraciones finales de 20, 10, 1, 0.1, 0.001 y 0.0001 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La viabilidad (linfocitos) o la proliferación (células MCF-7) celular fue analizada después de 48 h de exposición, utilizando 10 μL de MTT (5mg/mL) de acuerdo al método reportado por Mosmann (1983) y la absorbancia medida con un lector de microplacas (Biorad, Hércules CA, USA) a 570 nm de longitud de onda. Cada prueba se realizó por triplicado y en cuatro ensayos independientes. El porcentaje de proliferación o viabilidad se calculó considerando como 100% el valor obtenido en las células control (sin tratamiento). La concentración de liriodenina o doxorubicina que redujo al 50% la proliferación o viabilidad celular en relación a las células control (dosis inhibitoria media o DI_{50}) fue determinada gráficamente mediante curvas de dosis-respuesta.

Análisis estadístico

La diferencia estadística entre los tratamientos y las células control fue calculado mediante el análisis de varianza (ANDEVA) de una sola vía y la prueba *a posteriori* de Bonferroni en donde $P < 0.05$ fue considerado significativo

RESULTADOS

Los resultados indican que la liriodenina y el fármaco antineoplásico de referencia afectan a los linfocitos normales

murinos únicamente en concentraciones altas aunque la viabilidad celular nunca fue menor a 50% respecto de las células control. Así en las concentraciones más altas (10 y 20 µg/mL), la lirioidenina permitió un 51% de viabilidad celular en tanto que la doxorubicina el 69% (tratadas vs controles); en el rango desde 1.0 hasta 0.0001 µg/mL el efecto de la lirioidenina y la doxorubicina fue desde moderado hasta nulo (desde 90.1 hasta 100% y 87.4 a 99.8%, respectivamente). Estos ensayos permiten conocer el rango de concentración del alcaloide en donde menos se perturba a las células normales así como registrar las concentraciones donde pueden producirse los efectos indeseables.

Por otro lado, en la línea celular de adenocarcinoma mamario MCF-7 se encontró una reducción de la proliferación dependiente de la concentración de los compuestos. Así, en la menor concentración (0.0001

µg/mL), la lirioidenina permitió 91% de proliferación y la doxorubicina el 87% (tratadas vs controles), en tanto que a la mayor concentración (20 µg/mL), la proliferación se redujo hasta el 29.5% en las células expuestas a lirioidenina y 35% con doxorubicina (cuadro 1). Aunque para ambos compuestos la DI_{50} es aproximadamente de 4 µg/mL, es importante señalar que la concentración mínima que produjo una inhibición significativa de la proliferación ($P \leq 0.05$) fue de 0.001 µg/mL en el caso de la lirioidenina, y de 0.01 µg/mL para la doxorubicina; es decir la lirioidenina fué 10 veces más activa en las células cancerosas que el fármaco control (cuadro 1). Utilizando lirioidenina extraída de *Zanthoxylum nitidum* (Rutaceae) y esta misma línea neoplásica, Yang *et al.* (2009), encontraron una DI_{50} de 2.19 µg/mL, por lo que ambos estudios son coincidentes.

		0.0001	0.001	0.01	0.1	1	10	20
Viabilidad de linfocitos murinos (%)	Lirioidenina	100.0	96.8	91.4	91.2	90.1	51.2	53.7
	Doxorubicina	99.8	90.3	84.7	94.1	87.4	75.5	69.1
Proliferación de las células MCF-7 (%)	Lirioidenina	91.1	75.7	75.6	68.0	60.5	32.1	29.5
	Doxorubicina	87.0	89.8	80.1	83.2	63.6	42.8	34.9

CUADRO 1 Efecto de las concentraciones de lirioidenina y del doxorubicina (µg/mL) en los cultivos celulares

Diferencias estadísticas respecto a las células control ($P \leq 0.05$).

El efecto comparativo de la lirioidenina entre ambos tipos celulares muestra que existen diferencias importantes y en donde es posible separar dos rangos de afectación a las células. En el primero con concentraciones bajas del alcaloide (0.0001 a 1 µg/mL), la proliferación celular de las células transformadas MCF-7 es abatida a medida que se incrementa la concentración, en tanto que la viabilidad en las células normales se conserva. y la diferencia entre ambas líneas celulares es significativa ($P \leq 0.05$) especialmente de 0.001 a 1 µg/mL. Lo anterior pudiera indicar el rango donde la lirioidenina ejerce su mayor efecto en las células neoplásicas sin afectar excesivamente a las normales. En el segundo rango con concentración alta del compuesto (1 a 20 µg/mL), se compromete la sobrevivencia no solo de las células transformadas sino también de las normales, por lo que podrían descartarse en trabajos futuros, especialmente en ensayos con modelos *in vivo* (figura 2). Una alternativa para buscar una menor toxicidad a las células normales y una mayor solubilidad del compuesto podría ser la modificación estructural del compuesto posiblemente a partir de los átomos N-7 y O-8 carbonilo (Liu *et al.*, 2009).

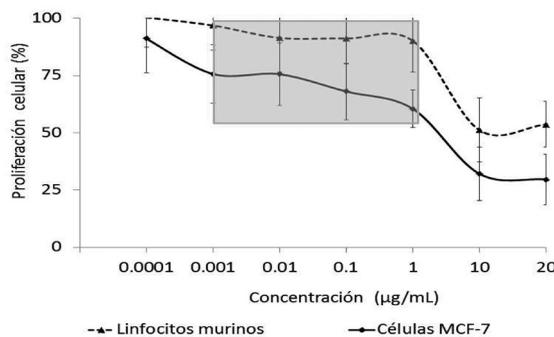


FIGURA 2 Efecto de las concentraciones de la lirioidenina en los linfocitos normales murinos y la línea celular neoplásica MCF-7. Diferencias estadísticas entre ambas líneas celulares.

En la línea de células de cáncer de pulmón A549 y mediante análisis de citometría de flujo Chang *et al.* (2004) reportaron que la lirioidenina bloqueó la progresión del ciclo celular durante la transición de G2/ M y condujo a

la activación de las proteínas caspasas mediadoras de la inducción de la apoptosis o muerte celular programada. Estas características deseables en un fármaco antineoplásico además del conocimiento de las dosis terapéuticas lejanas de las nocivas, abre la posibilidad de iniciar los trabajos *in vivo* con modelos animales, a fin de conocer su efecto e interacción en los múltiples sistemas que integran al organismo.

CONCLUSIONES

Annona lutescens (anona amarilla) es un recurso natural de México y Centroamérica con abundante produc-

ción de lirioidenina y otros compuestos activos, que pudieran servir para el desarrollo de nuevos fármacos. La lirioidenina posee actividad antiproliferativa a diferentes concentraciones sobre la línea celular cancerosa MCF-7 y es más activa que el fármaco de referencia doxorubicina; de manera importante las concentraciones menores de 1 µg/mL del alcaloide presentan una adecuada especificidad hacia las células transformadas sin comprometer excesivamente a las normales, lo que permite visualizar a la lirioidenina como un candidato importante para el desarrollo de nuevos fármacos antineoplásicos.

LITERATURA CITADA

- ANAYA, A.L. Y F.J. ESPINOSA-GARCÍA, 2006. La química que entreteje a los seres vivos. *Ciencias* 83: 4-13.
- CHANG, H.C., F.R. CHANG., WU, Y.C., LAI & Y.C., 2004. Anti-Cancer Effect of Lirioidenine on Human Lung Cancer Cells. *Kaohsiung J Med Sci.* 20:365-71.
- DE-LA-CRUZ-CHACÓN, I. & A.R. GONZÁLEZ-ESQUINCA, 2012. Lirioidenine Alkaloid in *Annona diversifolia* During Early Development. *Nat Prod Res.* 26 (1): 42-49.
- GONZÁLEZ-ESQUINCA A.R, 2005. Familia Annonaceae en Chiapas y sus metabolitos. *Ciencia y Tecnología de la Frontera.* 3: 41-51.
- HSIEH, T.J., T.Z. LIU., C.L. CHERN., D.A. TSAO., F.J. LU., Y.H. SYU., P.Y. HSIEH., H.S. HU., T.T. CHANG. & C.H. CHEN, 2005. Lirioidenine 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.
- KRUISBEEK, A.M., 1994. Isolation of Mouse Mononuclear Cells. En: Coligan JE *et al.* (eds) *Current Protocols in Immunology.* 3.1.1-3.1.5 p.
- LIU, Y.C., Z.F. CHEN., L.M. LIU., Y. PENG., X. HONG., B. YANG., H.G. LIU., H. LIANG. & C. ORVIG, 2009. Divalent Later Transition Metal Complexes of the Traditional Chinese Medicine (TCM) Lirioidenine: Coordination Chemistry, Cytotoxicity and DNA Binding Studies. *Dalton Trans.* 48: 10813-10823.
- MOSMANN, T., 1983. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J Immunol Methods* 65 (1-2): 55-63.
- MUÑOZ, V., M. SAUVAIN., A. FOURMET., B. WENIGER., A. VALENTIN., M. MALLIÉ., J. CALLAPA., E. DEHARO Y P. DURET, 2006. Actividad antipalúdica y potenciación de la cloroquina con alcaloides aporfínicos *in vitro*. *Cuadernos del hospital de clínicas* 47 (1): 87-91.
- WOO, S.H., M.C. REYNOLDS., N.J. SUN., J.M. CASSADY & R.M. SNAPKA, 1997. Inhibition of Topoisomerase II by Lirioidenine. *Biochem Pharmacol.* 54: 467-473.
- WU, Y.C., C.Y. DUH., S.K. WANG., K.S. CHEN & T.H. YANG, 1990. Two New Natural Azafluorene Alkaloids and a Cytotoxic Aporphine Alkaloid from *Polyalthia longifolia*. *J. Nat Prod.* 53: 1327-1331.
- YANG, C.H., M.J. CHENG., S.J. LEE., C.W. YANG, H.S. CHANG & I.S. CHEN, 2009. Secondary Metabolites and Cytotoxic Activities from the Stem Bark of *Zanthoxylum nitidum*. *Chem Biodivers.* 6 (6): 846-857.

Efecto depresor del extracto alcaloidal de *Annona macrophyllata* Donn. Sm. (Annonaceae)

José del Carmen Rejón-Orantes^{1*} Samantha Stefany Coutiño-Ochoa¹,
Nataly Jiménez-García¹, Zally Patricia Mandujano Trujillo¹,
María Teresa Dávila Esquivel¹, Dolores G. Vidal-López², Miguel Pérez de la Mora³

¹Laboratorio Experimental de Farmacobiología, Facultad de Medicina Humana, Universidad Autónoma de Chiapas.* rejonjose@hotmail.com | ²Laboratorio Experimental y Bioterio, Instituto de Ciencias Biológicas, Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas, | ³Departamento de Biofísica, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México

RESUMEN

En este estudio se señalan los efectos depresores del extracto alcaloidal total extraído de la raíz de la *Annona macrophyllata*. Dado que se ha demostrado en experimentos *in vivo*, que la administración de extractos de anonas causa efectos sobre el sistema nervioso central (SNC). Se consideró importante estudiar el efecto del extracto alcaloidal total de la *A. macrophyllata* en algunas conductas que exploran efectos depresores del SNC. Los resultados mostraron que la administración sistémica del extracto alcaloidal total a dosis de 100 y 200 mg/kg en ratones, produce sedación, un efecto cataleptogénico claro, pero de poca duración, medido en la prueba de la barra. De la misma manera, una disminución de la hiperactividad motora inducida por anfetamina. Finalmente se encontró una disminución de la actividad motora espontánea en la prueba de campo abierto. Los resultados anteriores sugieren que el extracto alcaloidal total de *A. macrophyllata* posee efectos depresores del SNC. Sin embargo, se requieren más estudios para establecer con precisión el perfil farmacológico y el sitio de acción de este extracto alcaloidal y el o los alcaloides responsables de los efectos.

Palabras clave: *Annona macrophyllata*, extracto alcaloidal total, sedación.

ABSTRACT

In this study the depressant effects of total extract alkaloidal extracted from the root of the *Annona macrophyllata* is reported. Since it has been shown in experiments *in vivo* that the administration of anona extracts produced effect on the central nervous system (CNS). It was considered important to study the effects of total extract alkaloidal *A. macrophyllata* in some behaviors that explore CNS depressant effects. The results showed that systemic administration of total alkaloidal extract at doses of 100 and 200 mg / kg in mice, produce sedation, a clear cataleptogenic effect, but of short duration, measured in the bar test. Similarly, a decrease in motor amphetamine-induced hyperactivity. Finally a decrease in spontaneous motor activity in the open field test was found. The above results suggest that alkaloidal extract has total *A. macrophyllata* have depressant CNS effects. However, further studies are required to accurately establish the pharmacological profile and the site of action of this alkaloidal extract and/or alkaloids responsible for the effects.

Keywords: *Annona macrophyllata*, alkaloidal total extract, sedation.

INTRODUCCIÓN

La papaya, (*Annona macrophyllata*) es un árbol nativo de México (Ruiz y Morett, 1997). Los frutos de esta planta se utilizan como alimento y las hojas tienen uso popular atribuyéndoles propiedades antiinflamatorias y analgésicas. Sin embargo, los estudios farmacológicos de esta planta son escasos.

Los extractos de anonas tienen un amplio uso en la medicina tradicional de muchos países alrededor del mundo. Se les atribuye una variedad de propiedades, entre ellas, efectos sobre el sistema nervioso central, donde se

reportan actividad anticonvulsivante (Okoye *et al.*, 2013), sedativa (Bourne & Egbe, 1979; Tortoriello & Romero, 1992), hipnótica (Gupta, 1995), ansiolítica (Hasrat *et al.*, 1997) y antidepresiva (Martínez-Vázquez *et al.*, 2012).

De los estudios de extractos obtenidos de anonas con efectos sobre el sistema nervioso central (SNC) se encuentran; los etanólicos de *A. diversifolia* y *A. muricata* y los hexánicos y alcaloidales totales de *A. Cherimolia* y *A. purpurea*, mostrando actividades sedantes, depresoras, antidepresivas anticonvulsivantes y ansiolíticas en modelos conductuales con roedores (Bourne & Egbe, 1979; Gouemo *et al.*, 1997; González-Trujano *et al.*, 1998;

López-Rubalcaba *et al.*, 2006; González-Trujano *et al.*, 2009; Rejón-Orantes *et al.*, 2011; Martínez-Vázquez *et al.*, 2012). Los resultados de estas investigaciones han sugerido que algunos metabolitos producidos por estas plantas pudieran ejercer efectos que implicarían los sistemas de receptores GABAérgicos, serotoninérgicos, así como acciones sobre el sistema adrenérgico y dopaminérgico (Hasrat *et al.*, 1997; Gouemo *et al.*, 1997; Morais *et al.*, 1998; González-Trujano *et al.*, 1998, 2001; López-Rubalcava *et al.*, 2006; Rejón-Orantes *et al.*, 2011).

Previamente González-Trujano *et al.* (1998) ha reportado efectos en el SNC del extracto etanólico de las hojas de la *Annona diversifolia*. En este trabajo, estudiamos las propiedades depresoras en el SNC del extracto alcaloidal total obtenido de la raíz de esta planta.

METODOLOGÍA

Materiales

La Raíz de *A. macroprophyllata* fue recolectada en la finca rural Montaña Azul, municipio de Ocozocoautla, Chiapas, México. El espécimen se depositó con el No. 30260 en el herbario Eazi Matuda (HEM) de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas.

Extracción del extracto alcaloidal total

La extracción de alcaloides totales se realizó de acuerdo al procedimiento reportado por González-Esquinca (2001). Para este propósito se secaron a temperatura ambiente y molieron finamente 100 g de raíces. El material obtenido se impregnó con una solución saturada de Na_2CO_3 , y se le permitió secar a temperatura ambiente. Los alcaloides fueron extraídos agitando este material por una hora con 100 mL de CHCl_3 . El proceso de extracción fue repetido una vez más y al final ambas extracciones combinadas fueron filtradas y concentradas a un volumen de 50 mL. El extracto clorofórmico concentrado fue lavado con agua destilada (50 mL/3 veces) y extraído dos veces con 50 mL de HCl 1N en cada ocasión. La fase ácida resultante de ambas extracciones fue alcalinizada (pH 9.5) con una solución saturada de Na_2CO_3 y extraída nuevamente con 100 mL de CHCl_3 .

Finalmente, el extracto clorofórmico obtenido en esta última extracción fue secado con Na_2SO_4 anhidro y concentrado a 10 mL por evaporación a 45°C. El extracto clorofórmico fue agitado con movimientos giratorios suaves dentro de un recipiente con agua y hielo, obteniéndose por precipitación cristales amarillos en forma de agujas. El rendimiento obtenido fue de 300 mg de alcaloides totales. Todos los pasos fueron monitoreados con el reactivo de Dragendorff.

EVALUACIÓN FARMACOLÓGICA

Animales

Se utilizaron ratones machos BALB/c (25 a 30 g), hospedados en grupos de 6 en cajas de polisulfonato (44/21/21cm) y puestos en un medio ambiente controlado (temperatura 25°C, iluminación 06:00-18:00 h) con agua y alimento (2018 Laboratorios Harlan, Harlan México) disponible *at libitum*.

Los animales fueron donados por el Bioterio del Instituto de Ciencias Biológicas de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. El protocolo experimental se basó en las recomendaciones establecidas por la guía para el cuidado y uso de los animales de laboratorio del Instituto de Recursos Animales de Laboratorio, Consejo Nacional de Investigación, Washington, DC (Clark *et al.*, 1996).

Fármacos

El extracto alcaloidal total (EAT) fue disuelto en aceite de sésamo (Holm *et al.*, 2014), el diazepam (Hoffmann-La Roche, México), el sulfato de anfetamina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) y el haloperidol (Haldol, JANSSEN-CILAG, S.A. DE C.V, México) fueron disueltos en una mezcla de polietilenglicol/ácido cítrico (4g/5mg) en 10 mL de agua estéril. Todos los compuestos utilizados en este estudio fueron inyectados por vía intraperitoneal (i.p.), con excepción del EAT y el grupo control con aceite de sésamo que fue administrado por vía subcutánea (s.c.), en un volumen total de 10 mL/kg.

Evaluación conductual

Los experimentos conductuales fueron llevados a cabo en ausencia del experimentador en un cuarto aislado de ruido, iluminado con luz roja a 40 w (Vasconcelos *et al.*, 2004) y equipado con equipo de video filmación. La evaluación conductual fue conducida entre las 10:00–14:00 h.

Prueba de campo abierto

La prueba se realizó en una caja de vidrio (con paredes y piso transparente de 48 x 48 x 30 cm) cuyo piso se dividió con líneas pintadas de color negro formando cuadros de 12 x 12 cm. La prueba tuvo una duración de 5 minutos durante los cuales se evaluaron la distancia total recorrida (número de líneas cruzadas marcadas en el piso, considerada como la actividad locomotriz horizontal) y los alzamientos (número de veces en que el ratón se extendió apoyando sus patas delanteras en las paredes de la caja, representando la actividad locomotriz vertical) (Vasconcelos *et al.*, 2004). El EAT se administró a dosis de 50, 100 y 200 mg/kg y el diazepam usado como control positivo a 2 mg/kg.

Prueba de la barra

Para esta prueba, se administró EAT a 200 mg/kg y como control positivo haloperidol (0.05 mg/kg). Las patas delanteras de los ratones se colocaron suavemente en una barra horizontal de metal con diámetro de 2 milímetros y puesta a 4 centímetros sobre el nivel del suelo y se midió el lapso de tiempo que el ratón mantenía esta postura anormal. La prueba termina cuando la pata del animal toca el suelo. Si el animal no se aferra a la barra después de que tres intentos, recibieran la cuenta de 0 segundos, se regresa a su caja. La observación se efectuó a los 1, 2, 3 y 4 horas después de la administración del EAT y en grupos de 5 ratones (Sousa & Almeida, 2005).

Prueba de hiperactividad inducida por amfetamina

La prueba se efectuó con tres grupos de 6 ratones, cada grupo fue tratado con EAT a 200 mg/kg s.c., el control negativo (aceite de sésamo) a 0.1 ml /10 g s.c. y haloperidol a 5 mg/kg i.p., una hora después de administradas estas dosis los tres grupos recibieron sulfato de amfetamina a 3 mg/kg i.p. e inmediatamente fueron colocados en la caja de prueba de campo abierto, la prueba fue registrada en tres intervalos de 10 minutos, durante una hora (Morais *et al.*, 1998).

Análisis estadístico

Los resultados fueron evaluados usando la prueba de ANOVA de una vía, seguida de la prueba poshoc de Newman-Keuls para comparaciones múltiples y ANOVA de dos vías seguida de la prueba de Bonferroni para comparaciones múltiples. Los resultados son expresados como la media \pm SEM de 5-6 ratones por grupo. Un valor de alfa de $P < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo. Los parámetros estadísticos fueron procesados usando el software GraphPad Prism statistical.

RESULTADOS

Toxicidad

Diferentes dosis del EAT (50, 100 y 200 mg/kg, s.c.) fueron administradas a ratones y su mortalidad registrada por 48 h (Morais *et al.*, 1998). No se registraron muertes en las 48 h subsecuentes a la administración de las distintas dosis de este extracto.

Prueba de campo abierto

Se observaron diferencias significativas tanto en el número de líneas cruzadas ($F_{4,20} = 1.084$; **** $P < 0.0001$) como en el número de alzamientos ($F_{4,20} = 3.912$; *** $P < 0.0001$) entre los ratones tratados con EAT (100 y 200 mg/kg; s.c.) y diazepam (2mg/kg; i.p.) cuando fueron

comparados con aquellos a los que solo se les administró el vehículo (figura 1).

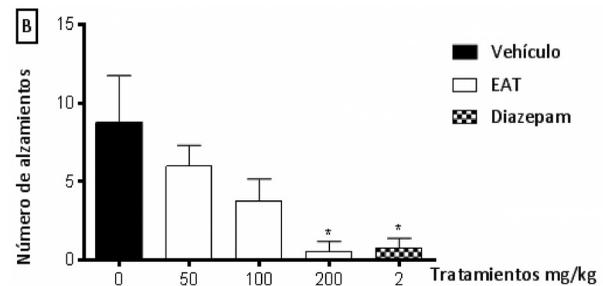


FIGURA 1

Efecto del extracto alcaloidal total de *A. macrophyllata* (EAT) sobre la actividad locomotriz horizontal (A) y vertical (B) en la prueba de campo abierto. Se representa la media \pm EEM. El EAT y el diazepam usado como control positivo, disminuyeron el número de alzamientos (A) y el número de líneas cruzadas (B), representando inhibición de la actividad locomotriz espontánea. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$. ANOVA de una vía seguida de la prueba de Newman-Keuls para comparaciones múltiples. N= 5 ratones por grupo.

Prueba de la barra

El EAT a 200 mg/kg, s.c. prolongó el tiempo de permanencia de las patas anteriores del ratón sobre la barra de esta prueba en comparación al grupo del vehículo ($F_{2,9} = 1.849$; * $P < 0.05$) (figura 2). El haloperidol a 0.05 mg/kg, i.p. careció de efecto cataleptogénico.

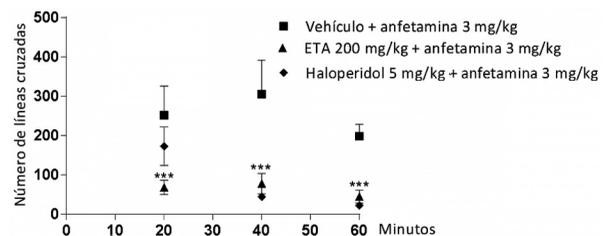


FIGURA 2

Efecto del extracto alcaloidal total de *A. macrophyllata* (EAT) sobre la duración de la catalepsia medida en la prueba de la barra. Se representa la media \pm EEM. El EAT prolonga la duración de la catalepsia con respecto al grupo del vehículo. El haloperidol usado como control positivo no modificó esta conducta a la dosis empleada. ** $P < 0.01$, ANOVA de dos vías seguida de la prueba de Bonferroni. N= 5 ratones por grupo.

Prueba de hiperactividad inducida por anfetamina

El EAT administrado a dosis de 200 mg/kg, s.c. al igual que el haloperidol (5 mg/kg, i.p.) inhibieron la hiperactividad inducida por anfetamina (3 mg/kg, i.p.) ($F_{2,42} = 16.09; ***P < 0.0001$) (figura 3).

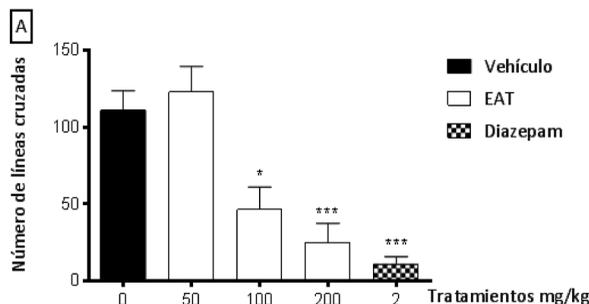


FIGURA 3

Efecto del extracto alcaloidal total de *A. macrophyllata* (EAT) sobre la actividad locomotriz en la prueba de la hiperactividad locomotriz inducida por anfetamina. Se representa la media \pm EEM. El EAT al igual que el haloperidol usado como control positivo, disminuyeron el número de líneas cruzadas en comparación al grupo del vehículo, representando inhibición de la hiperactividad inducida por anfetamina. *** $P < 0.001$, ANOVA de dos vías seguida de la prueba de Bonferroni. N= 6 ratones por grupo.

CONCLUSIONES

En nuestra primera aproximación en el estudio del extracto alcaloidal total extraído de la raíz de la *A. macrophyllata* (EAT), los resultados mostraron una disminución de la actividad motora indicando efecto depresor sobre el SNC (Morais *et al.*, 1998). Además, se observó ptosis palpebral, y una acentuada sedación que facilitaba la manipulación de los animales. Coincidente con el efecto depresor en SNC reportado por González-Trujano *et al.* (1998) con el extracto etanólico de las hojas de esta planta.

Aproximadamente 99 alcaloides aislados de la familia Annonaceae han demostrado actividades biológicas (Conserva *et al.*, 2005). Los alcaloides más frecuentemente aislados corresponden a los bencilisoquinolinicos (BIQ) (Leboeuf *et al.*, 1982), en los cuales se ha reportado actividad en el SNC; la anonaina, la liriodenina, (Jin *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2008; Rejón-Orantes *et al.*, 2011), la glaucina y la reticulina (Zetler, 1998; Morais *et al.*, 1998), entre otros.

De los alcaloides presentes en el extracto alcaloidal total de *A. macrophyllata*, la liriodenina es el de

mayor presencia (González-Esquinca *et al.*, 2005). Está documentado que la liriodenina y la anonaina, tiene una afinidad variable por los receptores dopaminérgicos D_1 y D_2 (Protais *et al.*, 1995), lo que posibilita un efecto de antagonismo dopaminérgico en este sistema, no obstante, la actividad antidopaminérgica podría darse por mecanismos indirectos, ya que también la liriodenina y la anonaina inhiben *in vitro* la actividad de las enzimas hidroxilasa de tirosina (TH), descarboxilasa de ácidos aromáticos (DAA) y también disminuye la liberación de dopamina (Jin *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2008).

La TH cataliza la conversión de L-tirosina a DOPA, que es el primer paso y limitante en la síntesis de las catecolaminas (Fujisawa *et al.*, 2005); por lo consiguiente, la regulación de la actividad de esta enzima es muy importante. Estos resultados, convergen con nuestras observaciones obtenidas en la prueba de campo abierto, donde los efectos motores se presentaron tras los primeros minutos de la administración sistémica del EAT.

En virtud que alcaloides BIQ interfieren con el sistema dopaminérgico, en este trabajo estudiamos los efectos conductuales del EAT en relación a la inhibición de la síntesis de dopamina, por lo que efectuamos las pruebas de la barra (catalepsia) y la de hiperactividad inducida por anfetamina (Morais *et al.*, 1998). Se ha demostrado que la catalepsia está principalmente mediada por receptores dopaminérgicos postsinápticos localizados en el estriado (Sanberg, 1980) y la anfetamina (b-fenilisopropilamina) es una de las aminas simpaticomiméticas de acción indirecta más potente para estimular el SNC (Fleckenstein *et al.*, 2007).

La catalepsia, es una conducta de inmovilidad que está asociada con grados de rigidez muscular (Klemm, 1985). Este estado es inducido en ratones que reciben antagonistas dopaminérgicos D_1 y D_2 (Sanberg, 1980), como fármacos neurolépticos, entre ellos el haloperidol, el cual es conocido por inducir parkinsonismo en la práctica clínica. Se estudió si la administración sistémica del EAT generaba el fenómeno de catalepsia. La generación de este fenómeno se cuantificó por el tiempo que el ratón permaneció inmóvil cuando fue colocado con sus patas delanteras apoyadas en una barra de 2mm a 4 cm de altura. Los resultados de catalepsia de poca duración en la prueba de la barra con dosis de 200 mg/kg, sugirieron que el EAT se comportó como antagonista dopaminérgico.

La conducta de hiperactividad inducida por la anfetamina (AMPH) es consecuencia de la liberación de dopamina desde las terminaciones nerviosas dopaminérgicas del estriado en el sistema mesolímbico. Esta respuesta de la AMPH puede ser enmascarada por antagonistas

dopaminérgicos como el haloperidol (Morais *et al.*, 1998). Nosotros la evaluamos por el número de líneas cruzadas en el piso de la caja de campo abierto. Se observó una inhibición significativa de esta conducta tanto con EAT a 200 mg/kg como con haloperidol 5 mg/kg en comparación al grupo que recibió el vehículo.

Estos resultados sugieren que la inhibición de la síntesis y liberación de dopamina *in vitro* provocada por la presencia de alcaloides BIQ como la liriodenina en el EAT podría causar la interferencia con la neurotransmisión dopaminérgica central cuando se administró por vía sistémica en ratones, confiriéndole al EAT potenciales propiedades neurolépticas. La liriodenina es el alcaloide más abundante en este extracto (González-Esquinca *et al.*, 2005), y están reportados efectos conductuales (Rejón-

Orantes *et al.*, 2011) que podrían explicar parcialmente lo observado con el EAT de la raíz de la *A. macrophyllata*, sin embargo se requieren más estudios para establecer con precisión el perfil farmacológico y el sitio de acción de este extracto alcaloidal y el o los alcaloides responsables de los efectos.

AGRADECIMIENTO

Estamos en deuda con el Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México y en particular con Minerva Crespo Ramírez de la División de Neurociencias por su asistencia técnica, así como a Ana María Escalante Gonzalbo y Francisco Pérez-Eugenio de la Unidad de Informática por su apoyo durante este trabajo.

LITERATURA CITADA

- BOURNE R.K. & P.C. EGBE, 1979.** A Preliminary Study of the Sedative Effects of *Annona muricata* (sour sop). *West Indian Med. J.* 28: 106–110.
- CONSERVA, L.M., B.P. CYNARA DE ARAÚJO & J.M. BARBOSA-FILHO, 2005.** Alkaloids of the Hernandiaceae: Occurrence and a Compilation of their Biological Activities. *The Alkaloids: Chemistry and Biology* 62: 175-243.
- FLECKENSTEIN, A.E., T.J. VOLZ, E.L. RIDDLE, J.W. GIBB & G.R. HANSON, 2007.** New Insights Into the Mechanism of Action of Amphetamines. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 47: 681-698.
- FUJISAWA, H. & S. OKUNO, 2005.** Regulatory Mechanism of Tyrosine Hydroxylase Activity. *Biochemical and biophysical research communications* 338 (1): 271-276.
- GOUEMO, P., B. KOUDOGBO, H.P. TCHIVOUNDA, C. AKONO-NGUEMA & M.M. ETOUA, 1997.** Effects of Ethanol Extract of *Annona muricata* on Pentylentetrazol-Induced Convulsive Seizures in Mice. *Phytother Res* 11 (3): 243-245.
- GONZÁLEZ-ESQUINCA, A.R., L.M. LUNA-CAZÁRES & CH.I. DE LA CRUZ, 2005.** The Alkaloid Liriodenine During Germination of *Annona diversifolia* Saff. XVII. International Botanical Congress, International Association of Botanical and Mycological Societies, July 17 to 23, 2005, Vienna, Austria.
- GONZÁLEZ-ESQUINCA, A.R., 2001.** *Contribución al estudio del género Annona (Annonaceae) análisis fitoquímico de tres especies del estado de Chiapas.* Tesis Doctoral. Universidad Nacional Autónoma de México.
- GONZÁLEZ-TRUJANO, M.E., L. LÓPEZ-MERAZ, A. REYES-RAMÍREZ, M. AGUILLÓN & A. MARTÍNEZ, 2009.** Effect of Repeated Administration of *Annona diversifolia* Saff. (ilama) Extracts and Palmitone on Rat Amygdala Kindling. *Epilepsy & Behavior* 16 (4): 590-595.
- GONZÁLEZ-TRUJANO, M.E., A. NAVARRETE, B. REYES & E. HONG, 1998.** Some Pharmacological Effects of the Ethanol Extract of Leaves of *Annona diversifolia* on the Central Nervous System in Mice. *Phytotherapy Research* 12 (8): 600-602.

- HASRAT, J.A., T.D. BRUYNE, J.P. BACKER, G. VAUQUELIN & A.J. VLIETINCK, 1997. Isoquinoline Derivatives Isolated from the Fruit of *Annona muricata* as 5-HT_{1A} Receptor Agonists in Rats: Unexploited Antidepressive (Lead) Products. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 49 (11): 1145-1149.
- HOLM, L., W. LIANG, A. THORSELL & S. HILKE, 2014. Acute Effects on Brain Cholecystokinin-like Concentration and Anxiety-like Behaviour in the Female Rat upon a Single Injection of 17 β -estradiol. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 122: 222-227.
- JIN, C.M., J.J. LEE, Y.J. YANG, Y.M. KIM, Y.K. KIM, S.Y. RYU & M.K. LEE, 2007. Liriodenine Inhibits Dopamine Biosynthesis and L-DOPA-induced Dopamine Content in PC12 Cells. *Archives of Pharmacal Research* 30 (8): 984-990.
- KLEMM, W.R., 1985. Evidence for a Cholinergic Role in Haloperidol-induced Catalepsy. *Psychopharmacology* 85 (2): 139-142.
- LEE, J.J., C.M. JIN, Y.K. KIM, S.Y. RYU, S.C. LIM & M.K. LEE, 2008. Effects of Anonaine on Dopamine Biosynthesis and L-DOPA-induced Cytotoxicity in PC12 Cells. *Molecules* 13 (2): 475-487.
- LEBOEUF, M., A. CAVÉ, P.K. BHAUMIK, B. MUKHERJEE & R. MUKHERJEE, 1982. The Phytochemistry of the Annonaceae. *Phytochemistry* 21: 2783-813.
- LÓPEZ-RUBALCAVA, C., B. PINA-MEDINA, R. ESTRADA-REYES, G. HEINZE & M. MARTÍNEZ-VÁZQUEZ, 2006. Anxiolytic-like Actions of the Hexane Extract from Leaves of *Annona cherimolia* in Two Anxiety Paradigms: Possible Involvement of the GABA/Benzodiazepine Receptor Complex. *Life Sciences* 78 (7): 730-737.
- MARTÍNEZ-VÁZQUEZ, M., R. ESTRADA-REYES, A.A. ESCALONA, I.L. VELÁZQUEZ, L. MARTÍNEZ-MOTA, J. MORENO & G. HEINZE, 2012. Antidepressant-like Effects of an Alkaloid Extract of the Aerial Parts of *Annona cherimolia* in Mice. *Journal of Ethnopharmacology* 139 (1): 164-170.
- MORAIS, L.C.S.L., J.M. BARBOSA-FILHO & R.N. ALMEIDA, 1998. Central Depressant Effects of Reticuline Extracted from *Ocotea duckei* in Rats and Mice. *Journal of Ethnopharmacology* 62 (1): 57-61.
- OKOYE, T.C., P.A. AKAH, E.O. OMEJE, F.B. OKOYE & C.S. NWORU, 2013. Anticonvulsant Effect of Kaurenoic Acid Isolated from the Root Bark of *Annona senegalensis*. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 109: 38-43.
- SOUSA, D.P.D. & R.N.D. ALMEIDA, 2005. Neuroleptic-like Properties of the Chloroform Extract of *Maytenus obtusifolia* Mart. Roots. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 28 (2): 224-225.
- PROTAIS, P., J. ARBAOUI, E.H. BAKKALI, A. BERMEJO & D. CORTES, 1995. Effects of Various Isoquinoline Alkaloids on in vitro 3H-Dopamine Uptake by Rat Striatal Synaptosomes. *Journal of Natural Products* 58 (10): 1475-1484.
- REJÓN-ORANTES, J.D.C., A.R. GONZÁLEZ ESQUINCA, M. PÉREZ DE LA MORA & G. ROLDÁN ROLDÁN, 2011. *Efectos ansiolíticos de la annomontina y la liriodenina, alcaloides aislados del género Annona*. Catálogo de tesis. TESIUNAM.
- RUIZ, S.E. & A.L. MORETT, 1997. Las Anonas en el México Prehispánico. *Memorias Congreso Internacional de Annonáceas*. Chapingo, estado de México 12-14 Noviembre pp. 169-186.

- SANBERG, P.R., 1980.** Haloperidol-induced Catalepsy is Mediated by Postsynaptic Dopamine Receptors. *Nature* 284: 472 – 473.
- SMITH, O.A., 1996.** *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. Washington, DC. Institute of Laboratory Animal Resources, National Research Council: 125.
- TORTORIELLO, J. & O. ROMERO, 1992.** Plants Used by Mexican Traditional Medicine with Presumable Sedative Properties: an Ethnobotanical Approach. *Archives of Medical Research* 23 (3): 111.
- VASCONCELOS, S.M., D.S. MACEDO, C.T.V. MELO, A.P. MONTEIRO, G. CUNHA, F.C.F. SOUSA & E.R. SILVEIRA, 2004.** Central Activity of Hydroalcoholic Extracts from *Erythrina velutina* and *Erythrina mulungu* in Mice. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 56 (3): 389-393.
- ZETLER, G., 1987.** Neuroleptic-like, anticonvulsant and antinociceptive effects of aporphine alkaloids: bulbocapnine, corytuberine, boldine and glaucine. *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie* 296: 255-281.

Rolliniastatina-2, molécula aislada de *Annona macrophyllata* Donn. Sm. (Annonaceae) inhibe protoplastos de bacterias

Lorena Mercedes Luna-Cazáres^{1*}

Alma Rosa González-Esquinca¹

¹Laboratorio de Fisiología y Química Vegetal. Instituto de Ciencias Biológicas. Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. Libramiento Norte-Poniente No. 1150. Colonia Lajas Maciel. C.P. 29039. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México. E-mail: *lorena.luna@unicach.mx

RESUMEN

Se evaluó la toxicidad de la acetogenina rolliniastatina-2 (bullatacina) sobre protoplastos (bacterias sin pared celular) obtenidos de las cepas Grampositivas *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*. Los resultados obtenidos indican un mayor efecto sobre los protoplastos de *S. aureus* a los 10 y 30 minutos de exposición, la acetogenina también afectó a *B. subtilis* y *S. epidermidis* con la menor concentración solo a los 10 minutos de exposición. La toxicidad de la rolliniastatina-2 sobre las bacterias libres de pared puso en evidencia que las membranas citoplasmáticas son sensibles a su acción biológica.

Palabras clave: acetogenina de anonácea, Complejo I, bacterias Grampositivas, rolliniastatina-2, protoplastos

ABSTRACT

Acetogenin rolliniastatin-2 (bullatacin) toxicity on protoplasts (bacteria without cell wall) derived from Gram-positive *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* strains was evaluated. The results showed a greater effect on protoplasts of *S. aureus* at 10 and 30 minutes of exposure, the acetogenin also affected *B. subtilis* and *S. epidermidis* protoplasts with the lowest concentration only 10 minutes of exposure. Rolliniastatin-2 toxicity on wall free bacteria revealed that the cytoplasmic membranes are sensitive to their action biological.

Keywords: anonaceous acetogenin, Complex I, Grampositive bacteria, rolliniastatin-2, protoplasts

INTRODUCCIÓN

Las bacterias son organismos cosmopolitas, microscópicos y unicelulares, pueden ser móviles o inmóviles, aerobias o anaerobias. Las células individuales tienen diferentes morfología y capacidad de agruparse. Son procariontes con una “cubierta” constituida por pared celular, membrana citoplasmática y en ocasiones cápsula de secreción (Parés y Juárez, 1997). La pared bacteriana es permeable a la sal y a muchas sustancias de bajo peso molecular. La tinción diferencial de Gram las divide en Gramnegativas y Grampositivas, las primeras se tiñen con safranina y las segundas con cristal violeta. Esta coloración es un criterio de clasificación importante correlacionable con otras propiedades bacterianas.

Las bacterias Grampositivas tienen una capa gruesa del peptidoglucano unido a ácidos teicoicos que forman la pared. En muchas bacterias la red de mureína (peptidoglucano) está muy desarrollada, llegando a tener hasta 40

capas (Raisman, 2005). Esta envoltura externa restringe el acceso a la membrana citoplasmática, estructura estructural ya que en el caso de las bacterias aerobias, en ella se encuentran las enzimas de la cadena respiratoria, la que es bastante similar a la de las mitocondrias (Kita *et al.*, 1989; Parés y Juárez, 1997; Voet *et al.*, 2006), lo que no es sorprendente ya que una de las teorías evolutivas indica la factibilidad de que los ancestros de las bacterias aeróbicas dieron lugar a las mitocondrias.

Friedrich y Scheide (2000) señalan que existen homólogos del Complejo I no sólo en bacterias sino también en arqueobacterias, cloroplastos de plantas y la mayoría de eucariotes. La homología de secuencias, función y grupo prostético señalan un ancestro común. Hirst (2005) señala que todos los Complejos I tienen en común 14 subunidades, este núcleo de subunidades es considerado suficiente para la transducción de energía. Aunque de manera general, hasta hoy el de las bacterias es mucho más pequeño y simple, generalmente constituido

por 14 subunidades (Marreiros *et al.*, 2014), además de menos conocido que el de la mitocondria (de 44 o más subunidades) (Vartak *et al.*, 2014) (figura 1).

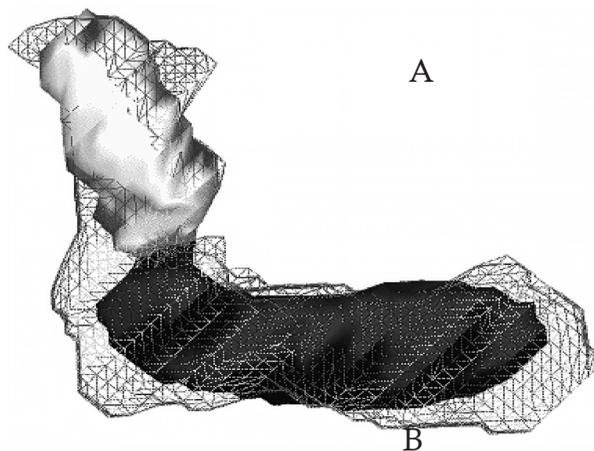


FIGURA 1

Reconstrucción electromicroscópica del Complejo I (NADH: Ubiquinona óxido-reductasa). A, Bacteriano; B, Mitocondrial (Hofhaus *et al.*, 1991)

Debido a que en la actualidad muchas de las bacterias que causan padecimientos infecciosos se han vuelto multirresistentes a los antibióticos o de sensibilidad reducida a los mismos, es importante evaluar nuevos compuestos obtenidos de plantas, entre ellos están las acetogeninas (ACG) de anonáceas, en este caso particular se trata de rolliniastatina-2.

Estas moléculas obtenidas de diversas estructuras botánicas de diferentes especies de la familia Annonaceae son metabolitos citotóxicos con efecto antimicrobiano, antihelmíntico, antivírico, entre otros, se han estudiado con relación a la actividad biológica en células cancerosas de distintos tipos, así como su efecto insecticida, antiparasitario y antialimentario. Además, esta es una de las más potentes sobre el Complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial de acuerdo a diferentes investigaciones realizadas sobre mitocondrias de insectos, de bovino, de pollo y ratón, también sobre partículas submitocondriales (PSM) de corazón de bovino (Londershausen *et al.*, 1991; Lewis *et al.*, 1993; Tormo *et al.*, 1999; Miyoshi, 2005).

El efecto que esta ACG presenta sobre diversos modelos biológicos en concentraciones muy bajas, justifican el hecho de ser señalada como una de las más potentes inhibidoras del Complejo I, aún más potente que rotenona, el clásico inhibidor del Complejo I mitocondrial. Pero en pocos trabajos se ha determinado su acción sobre

bacterias y, todavía más escasas son las investigaciones sobre la actividad de las ACG en bacterias Grampositivas sin pared celular (protoplastos).

Valorar el efecto de las ACG sobre protoplastos es importante debido que tanto la membrana citoplasmática como los mesosomas, en donde se encuentra la enzima NADH: Ubiquinona óxido-reductasa (NADH deshidrogenasa, también llamada Complejo I), quedan expuestos a cualquier sustancia disuelta en el medio en que estos se encuentren y, por tanto, valorar el efecto sobre la enzima.

Las evidencias experimentales señalan la acción de las ACG sobre el transporte de electrones en la membrana interna mitocondrial, con acción específica sobre la NADH: Ubiquinona óxido-reductasa de manera similar a como lo hacen los inhibidores clásicos como la rotenona y la piericidina A (Londershausen *et al.*, 1991; Degli Esposti *et al.*, 1994; Guadaño *et al.*, 2000; Tormo *et al.*, 2003; Chahbourne *et al.*, 2006). Por ello, el propósito de este trabajo fue el de evaluar la toxicidad de la rolliniastatina-2 aislada de semillas de *Annona macrophyllata* Donn. Sm. sobre los protoplastos de *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*.

METODOLOGÍA

Recolección del material vegetal

Se obtuvieron semillas de frutos maduros de *A. macrophyllata* (papaua) provenientes de la Delegación de Copoya, municipio de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. Éstas se secaron a la sombra y temperatura ambiente en el laboratorio de Fisiología y Química Vegetal del Instituto de Ciencias Biológicas de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas (UNICACH).

Obtención del compuesto puro

Se separó la testa del endospermo, este último se molió hasta obtener un polvo fino, este material se extrajo con hexano en un equipo soxhlet por ocho horas tres veces. El extracto se concentró por destilación al vacío en un rotaevaporador. El extracto formó un precipitado que se filtró y se fraccionó en una columna abierta que se eluyó con una mezcla de disolventes con gradientes de polaridad creciente, y se obtuvieron 65 fracciones. La fracción S4 presentó un precipitado que se filtró y recristalizó varias veces para su purificación y posterior elucidación estructural.

Obtención de protoplastos y evaluación biológica

Los protoplastos se obtuvieron de cepas de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) *Bacillus subtilis* (ATCC 6051), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) y

Staphylococcus epidermidis (ATCC 12228) provenientes del Cepario de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, se prepararon usando el método de Padilla *et al.* (2002) utilizando lisozima (Sigma®) y el ensayo de toxicidad de la ACG frente a los protoplastos de acuerdo a los métodos de Abriouel *et al.* (1998) y Codling *et al.* (2003). Se ensayaron concentraciones de 0.00160 nmol.mL⁻¹ (1 ng.mL⁻¹), 0.00643 nmol.mL⁻¹ (4 ng.mL⁻¹), 0.02572 nmol.mL⁻¹ (16 ng.mL⁻¹) y 0.10286 nmol.mL⁻¹ (64 ng.mL⁻¹) de la acetogenina frente a inóculos de las tres cepas bacterianas con absorbancia desde 0.35 hasta 625 nm durante 30 minutos de exposición, todas las pruebas se hicieron por duplicado.

El porcentaje de inhibición se determinó con relación al control (protoplastos) sin compuesto y corresponde al promedio de dos repeticiones. Todos los ensayos se realizaron en el Laboratorio de Fisiología y Química Vegetal del Instituto de Ciencias Biológicas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El compuesto obtenido (15 mg) con punto de fusión de 69 a 71°C, fue identificado por el doctor Diego Cortés Martínez del Departamento de Farmacología, Laboratorio de Farmacognosia de la Universidad de Valencia, España como rolliniastatina-2 (figura 2).

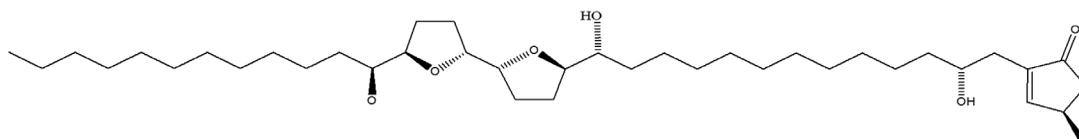


FIGURA 2

Estructura de rolliniastatina-2 o bullatocina

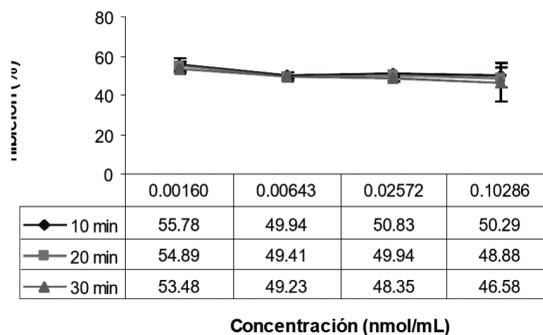
La eliminación de la pared celular de las cepas Grampositivas deja al protoplasma de las bacterias rodeado únicamente por la membrana celular (protoplasto), lo que convierte a la bacteria en un microorganismo extraordinariamente sensible (Raisman, 2005). La acción inhibitoria de rolliniastatina-2 se evaluó en tres tipos de protoplastos utilizando cuatro concentraciones diferentes durante 30 minutos de exposición, destacando que en ellos la mayor inhibición se produce en los primeros 10 minutos con la menor concentración (0.00160 nmol.mL⁻¹ = 1 ng.mL⁻¹), excepto en *S. aureus*.

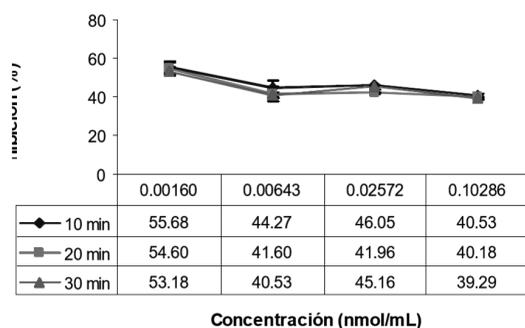
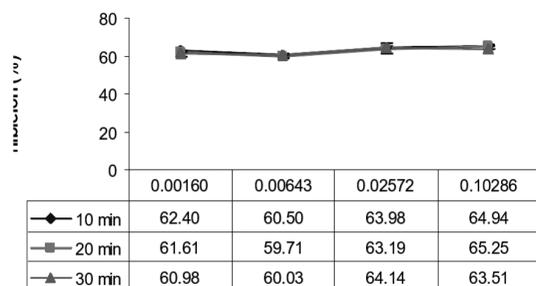
El efecto de la rolliniastatina-2 en *B. subtilis* en los primeros 10 minutos presenta un máximo inhibitorio del 55.78% con la menor concentración nmol.mL⁻¹ (pero disminuye ligeramente conforme se incrementa la concentración y el tiempo (gráfica 1A), mientras que el efecto es mayor sobre los protoplastos de *S. aureus* debido a que la inhibición aumenta del 62.40% en los primeros 10 minutos de exposición al 64.94% de acuerdo al aumento de la concentración, sin embargo no hay tiempo ni concentración dependencia (gráfica 1B); mientras que, también en *S. epidermidis* el efecto es mayor a los 10 minutos de exposición (0.00160 nmol.mL⁻¹ = 55.68%) para después tener un ligero decremento al aumentar la concentración y el tiempo (gráfica 1C).

El análisis estadístico de ANDEVA y de muestras pareadas al 95% de confiabilidad a los 10 minutos de ex-

posición no revela diferencias significativas en la actividad de la ACG. Es decir, en los protoplastos de *B. subtilis*, *S. aureus* y *S. epidermidis* el efecto de la ACG fue independiente de la concentración y del tiempo de exposición.

Los resultados obtenidos con los protoplastos de *B. subtilis* y *S. epidermidis*, en los que el mayor valor de inhibición se obtuvo con la menor concentración, coincide con el reporte de Teuber (1969) cuando utilizó polimixina B sobre *Proteus mirabilis* resistente al antibiótico, al que le eliminó la pared celular, la mayor actividad la obtuvo con las dosis más bajas probadas.





GRAFICA 1

Efecto de la rolliniastatina-2 sobre protoplastos de bacterias Grampositivas. A, *B. subtilis*; B, *S. aureus*; C, *S. epidermidis*.

LITERATURA CITADA

- ABRIOUEL, H.E., A. VALDIVIA, A. GÁLVEZ & M. MAQUEDA, 1998. Response of *Salmonella choleraesuis* LT2 Spheroplast and Permeabilized Cells to the Bacteriocin AS-48. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 4623-4626.
- CHAHBOUNE, N., I. BARRACHINA, I. ROYO, V. ROMERO, J. SÁEZ, J.R. TORMO, N. DE PEDRO, E. ESTORNELL, M.C. ZAFRA-POLO, F. PELÁEZ & D. CORTES, 2006. Guanacetonins, New Antitumoracetogenins, Mitochondrial Complex I and Tumor Cell Growth Inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 14 (4): 1089-1094.
- CODLING, C.E., J.Y. MAILLARD & A.D. RUSSELL, 2003. Aspects of Antimicrobial Mechanisms of Action of a Polyquaternium and an Amidoamine. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 51: 1153-1158.
- DEGLI ESPOSTI, M., A. GHELLI, M. RATTI, M., D. CORTES & E. ESTORNELL, 1994. Natural Substances (acetogenins) from the Family Annonaceae are Powerful Inhibitors of Mitochondrial NADH Dehydrogenase (Complex I). *Biochemical Journal* 301: 161-167.
- FRIEDRICH, T. & D. SCHEIDE, 2000. The Respiratory Complex I of Bacteria, Archae and Eucarya and its Module Common with Membrane-Bound Multisubunit Hydrogenases. *FEBS Letters* 479: 1-5.

Los resultados obtenidos con los protoplastos bacterianos coinciden con lo que reportan Gumpert *et al.* (1982) al señalar que representan un sistema de ensayo adecuado y eficaz para detectar sustancias activas y para obtener más información acerca de su modo de acción. Ello debido a que la rolliniastatina-2 tuvo efecto inhibitorio sobre bacterias libres de pared a diferencia de lo reportado por Riley Saldaña (2007) con bacterias completas y la misma acetogenina.

CONCLUSIONES

La rolliniastatina-2, tiene efecto inhibitorio sobre las tres bacterias ensayadas.

El porcentaje de inhibición es variable de acuerdo a la especie bacteriana.

Despliega un potente efecto en concentraciones micromolares.

Los resultados sugieren que al igual que en otros sistemas biológicos, el sitio blanco de la rolliniastatina-2 es el Complejo I bacteriano.

Este es el primer reporte en el que se investiga la actividad de ACG sobre protoplastos aportando las primeras evidencias que la pared celular de las bacterias constituye una barrera que impide la interacción de la ACG con el sitio blanco en las bacterias.

- GUADAÑO, A., C. GUTIÉRREZ, E. DE LA PEÑA, D. CORTES & A. GONZÁLEZ-COLOMA, 2000.** Insecticidal and Mutagenic Evaluation of Two Annonaceous Acetogenins. *Journal of Natural Products* 63: 773-776.
- GUMPERT, J., K. DORNBERGER & T.H. SMITH, 1982.** Antimicrobial Activities of Daunorubicin and Adriamycin Derivatives on Bacterial and Protoplast Type L-Form Cells of *Bacillus subtilis* 170, *Escherichia coli* B, and *Proteus mirabilis* VI. Structure-activity relationship. *Z Allg Mikrobiol* 22 (10): 687-692.
- HIRST, J., 2005.** Energy Transduction by Respiratory Complex I—an Evaluation of Current Knowledge. *Biochemical Society Transactions* 33 (3): 525-529.
- HOFHAUS, G., H. WEISS & K. LEONARD, 1991.** Electron Microscopic Analysis of the Peripheral and Membrane Parts of Mitochondrial NADH Dehydrogenase (complex I). *Journal of Molecular Biology* 221: 1027-1043.
- KITA, K., R.C.T. VIBAT, S. MEINHARDT, J.R. GUEST & R.B. GENNIS, 1989.** One-Step Purification from *Escherichia Coli* of Complex II (Succinate:ubiquinoneoxidoreductase) Associated with Succinate-Reducible Cytochrome b556. *Journal of Biological Chemistry* 264 (5): 2672-2677.
- LEWIS, M.A., J.T. ARNASON, B.J.R. PHILOGENE, J.K. RUPPRECHT & J.L. MCLAUGHLIN, 1993.** Inhibition of Respiration at Site I by Asimicin, an Insecticidal Acetogenin of the Paw Paw, *Asimnatriloba* (Annonaceae). *Pesticide Biochemistry and Physiology* 45: 15-23.
- LONDERSHAUSEN, M., W. LEICHT, F. LIEB, H. MOESCHLER & H. WEISS, 1991.** Molecular Mode of Action of Annoninas. *Journal of Pest Science* 33 (4): 427-433.
- MARREIROS, B.C., A.P. BATISTA & M.M. PEREIRA, 2014.** Respiratory Complex I from *Escherichia coli* does not Transport Na⁺ in the Absence of its NuoL Subunit. *FEBS Letters* 588 (23): 4520-4525.
- MIYOSHI, H., 2005.** Inhibitors of Mitochondrial Respiratory Enzymes. *Journal of Pest Science* 30 (2): 120-121.
- PADILLA, C., O. LOBOS, P. BREVIS, P. ABACA & E. HUBERT, 2002.** Effects of the Bacteriocin PsVP-10 produced by *Pseudomonas* sp. on Sensitive Bacterial Strains. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 44 (1): 19-23.
- PARÉS-JUÁREZ, A.R., 1997.** *Bioquímica de los microorganismos*. Editorial Reverté. España. Pp. 182, 183, 187.
- RAISMAN, J.S., 2005.** *La pared bacteriana*. Hipertextos del área de Biología. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad del Nordeste. Corrientes, República Argentina. [en línea] <http://www.biologia.edu.ar/bacterias/micro4.htm> (Consulta: 23-agosto-2016).
- RILEY-SALDAÑA, C.A., 2007.** *Actividad citotóxica y antibacteriana de Annona diversifolia Saff.* Tesis de licenciatura. Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. México. 82 p.
- TEUBER, M., 1969.** Susceptibility Ospamix B of Penicillin G-Induced *Proteus mirabilis* L forms and Spheroplasts. *Journal of Bacteriology* 98 (2): 347-350.
- TORMO, J.R., M.C. GONZÁLEZ, D. CORTÉS & E. ESTORNELL, 1999.** Kinetic Characterization of Mitochondrial Complex I in Inhibitors Using Annonaceous Acetogenins. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 369 (1): 119-126.

- TORMO, J. R., I. ROYO, T. GALLARDO, M.C. ZAFRA-POLO, P. HERNÁNDEZ, D. CORTES, D. & F. PELÁEZ, 2003.** In Vitro Antitumor Structure-Activity Relationships of the Threo/Trans/Threo Mono-tetrahydrofuranic Acetogenins: Correlations with their Inhibition of Mitochondrial Complex I. *Oncology Research* 14 (3): 147-154.
- VARTAK, R.S., M.K. SEMWAL & Y. BAI, 2014.** An Update on Complex I Assembly: the Assembly of Players. *Journal Bioenergetics and Biomembrane* 46 (4): 323-328.
- VOET, D., J.G. VOET & C.W. PRATT, 2006.** *Fundamentos de bioquímica*. 2a edición. Editorial Médica Panamericana. Argentina. Pp. 551, 553.

Evaluación de extractos acuosos de *Annona lutescens* Safford (Annonaceae) contra *Escherichia coli* Escherich, 1885 (Enterobacteriaceae)

Javier Gutiérrez-Jiménez¹

Ulises Alberto Santiago-Vázquez¹, Lorena Mercedes Luna-Cazáres²

¹Laboratorio de Biología Molecular y Genética, Instituto de Ciencias Biológicas, Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas, Libramiento Norte Poniente núm. 1150, col. Lajas Maciel, CP 29039, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. Tel. 961-6170440, ext. 4303, E-mail: javier.gutierrez@unicach.mx | ²Laboratorio de Fisiología y Química Vegetal, Instituto de Ciencias Biológicas, Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas, Libramiento Norte Poniente núm. 1150, col. Lajas Maciel, CP 29039, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. Tel. 961-6170440, ext. 4311, E-mail: lorena.luna@unicach.mx

RESUMEN

Annona lutescens Safford es un árbol con diversas actividades biológicas tales como: analgésico, antitumoral, vermífugo, insecticida y antibacteriana; sin embargo, se desconoce si muestra actividad sobre las variantes patógenas de *E. coli*, un bacilo Gramnegativo que causa diarrea. Los ensayos *in vitro* mostraron que *E. coli* ATCC 25922 fue inhibida de manera dosis dependiente con los extractos acuosos de hojas de *A. lutescens*. Dichos extractos no inhibieron las variantes patógenas de *E. coli* EAEC, DAEC o EPEC, que causan diarrea; tampoco degradó a la proteína Pic, un factor de virulencia de EAEC.

Palabras clave: *Annona lutescens*, extracto acuoso, *Escherichia coli*, diarrea.

ABSTRACT

Annona lutescens Safford is a small tree in which crude extracts have demonstrated biological activities including analgesic, anti-tumoral, vermifuge, insecticide and antibacterial; however, this biological activity against diarrheagenic *E. coli* strains have not been evaluated. *In vitro* assays performed in this study demonstrate that leaf crude aqueous extracts of *A. lutescens* exhibited antibacterial activity against the non-pathogenic *E. coli* strain ATCC 25922 in a dose-dependent manner. The extracts, however, were unable to inhibit the bacterial growth when incubated with diarrheagenic pathotypes EAEC, DAEC, or EPEC. The crude extract was tested for protease activity on secreted virulence factors. A secreted autotransporter protein, Pic, an important virulence factor from EAEC, was used as a surrogate for this studies but Pic remained intact after incubation.

Keywords: *Annona lutescens*, aqueous extract, *Escherichia coli*, diarrhea.

INTRODUCCIÓN

Annona lutescens es un árbol pequeño perteneciente a la familia Annonaceae, conocida vernáculamente como *anona amarilla* o *anona*. En América se distribuye al sur de México, Guatemala y Cuba. En México crece en el bosque tropical seco, florece al comenzar la temporada de seca y los frutos de desarrollan al terminar esta (Miranda y Hernández, 1963; Borchert, 1983). Los tejidos y órganos de las plantas de este género presentan distintas propiedades biológicas; la corteza de muchas de estas especies es aromática, estimulante y astringente; las semillas pueden actuar como vermífugas y/o bien como insecticidas; las hojas frescas contienen propiedades analgésicas por lo que muchas de estas especies han sido utilizadas en la medicina tradicional.

Entre estas plantas, se han descrito metabolitos secundarios como los alcaloides, siendo la liriodenina

uno de los más abundantes en *A. lutescens* (De la Cruz Chacón y González-Esquinca, 2012). En esta planta, este metabolito participa en el metabolismo del nitrógeno así como en la defensa contra hongos fitopatógenos (De la Cruz-Chacón *et al.*, 2011). En este rubro, los extractos acuosos de *A. lutescens* también han mostrado actividad antibacteriana contra bacterias Gramnegativas como *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella* Typhi, *Shigella flexneri* y el Grampositivo *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, todas causantes de infecciones gastrointestinales (Luna-Cazáres *et al.*, 1999).

En el caso de *E. coli*, bacilo Gram-negativo anaerobio facultativo, es una bacteria que se encuentra normalmente en el intestino grueso del ser humano. Sin embargo, existen clonas patógenas que causan diarrea y muerte infantil en los países en vías de desarrollo. Así, se han definido seis grupos patógenos que ocasionan este padecimiento: *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva

(EIEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* con adherencia difusa (DAEC), *E. coli* enteropatógena (EPEC) y *E. coli* enteroagregativa (EAEC) (Kaper *et al.*, 2004).

La patogénesis de la infección por DAEC ha sido poco estudiada; se ha descrito la fimbria de superficie F1845 involucrada en la adherencia difusa, además de una proteína de membrana externa de 100 kDa, sin embargo, solo se ha reportado en una minoría de cepas aisladas (Rodríguez-Angeles, 2002).

EPEC es un patógeno que produce diarrea aguda, con vómito, fiebre y mala absorción; se adhiere a las células mediante fimbrias llamadas Bfp, cuyos genes se localizan en el plásmido EAF. Esta bacteria exhibe un fenotipo localizado, donde las bacterias forman agregados que se adhieren a los polos de células en cultivo (*idem*).

EAEC tiene un fenotipo de adherencia agregativo, donde las bacterias forman empalizadas en forma de “panal de abeja”, que se adhieren sobre sustratos animados e inanimados. EAEC coloniza la mucosa del intestino grueso y delgado y en niños se presenta diarrea líquida, de color verde, con moco, sin sangre, pudiendo llegar a ser severa y requerir rehidratación intravenosa (Kaper *et al.*, 2004).

EPEC coloniza el intestino delgado mediante las fimbrias CFA y después secreta las enterotoxinas termolábil (LT) y/o termoestable (ST), codificadas en plásmidos o transposones. (Rodríguez-Ángeles, 2002). EIEC es una bacteria invasiva, que penetra el epitelio celular y escapa del proceso de fagocitosis celular para infectar células adyacentes del epitelio (*Idem*). EHEC provoca cólicos abdominales y diarrea acuosa con sangre; estas bacterias se adhieren al epitelio intestinal y lo destruyen (*Idem*).

Aunque se han descrito actividades antibacterianas en esta planta, se desconoce si son capaces de inhibir a las variantes patógenas de *E. coli*. El propósito de este trabajo fue evaluar el efecto de extractos obtenidos de hojas y semillas de *A. lutescens* sobre cepas prototipo de *E. coli* que causan diarrea, así como sobre la proteína Pic de *E. coli* enteroagregativa, un factor de virulencia que favorece la colonización.

METODOLOGÍA

Obtención de extractos de hojas y semillas de *A. lutescens*
Se molieron 100 g de hojas secas y de semillas y se hirvieron; se filtró la mezcla, se dejó secar y se almacenaron a temperatura ambiente.

Cepas bacterianas

Se utilizaron las cepas prototipo de EAEC 042, EPEC E2348/69 (O127:H6), DAEC E66438, *E. coli* ATCC 25922 y la clona recombinante secretora de la proteína Pic. *E. coli* HB101/pPic1; todas de la colección de cultivos bacterianos de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas (Gutiérrez-Jiménez *et al.*, 2015). Se analizó la capacidad de adhesión a células epiteliales en cultivo así como la presencia de genes específicos de estos patotipos.

Ensayo de adherencia a células epiteliales (Cravioto *et al.*, 1979)

Se cultivó la línea celular CaCO₂, proveniente de adenocarcinoma colon, en medio mínimo esencial de Dulbecco (DMEM), suplementado con suero fetal de bovino al 10%, bicarbonato de sodio (1.5 g/L) y penicilina-estreptomomicina (10,000 U/10,000 mg/ml) a 37° C con 5% de CO₂. Cuando se alcanzó el 100% de confluencia, las células se disgregaron con tripsina (0.5%) y se resuspendieron con 25 ml de DMEM. Se transfirió 1 ml de la suspensión celular a una microplaca de 24 pozos, a los que previamente se colocaron cubreobjetos circulares de 13 mm de diámetro; se incubó bajo las condiciones citadas arriba hasta un 70% de confluencia.

Las bacterias se cultivaron en caldo Luria Bertani (LB) toda la noche a 37°C bajo condiciones estáticas. El paquete celular bacteriano se obtuvo por centrifugación y se resuspendió en 1 ml de PBS IX pH 7. Se reemplazó el medio de las células por DMEM sin antibióticos ni suero fetal de bovino y con D-manosa al 1% y cada pozo se inoculó con 10⁷–10⁸ UFC/ml de bacterias (50 µl del paquete bacteriano) y se incubó a 37°C durante 3 h. Se hicieron dos lavados con PBS IX, las células se fijaron con metanol al 70% y se tiñeron con colorante de Giemsa durante 15 minutos. Los patrones de adhesión se evaluaron con microscopía óptica (Primostar, Zeiss®).

Detección de genes de virulencia en patotipos de *E. Coli*

Mediante PCR multiplex se amplificaron los genes AA Probe, *agg* y *aap* de EAEC, así como *eaeA* y *bfpA* de EPEC. Las mezclas de reacción se prepararon con 13.5 µL de Master mix (DNAtaq, dNTP's y MgCl₂, Promega), 3.5 mL de la mezcla de iniciadores (cuadro 1), 2 µL de lisado bacteriano (ADN muestra) y 7 µL de agua estéril libre de nucleasas (USB Corp.®).

Patotipo/locus	Secuencia (5'-3')	Conc. (pMol)	Tamaño (pb)	Referencia
EAEC				Cerna <i>et al.</i> (2003)
AA Probe	CTG GCG AAA GAC TGT ATC AT	20	629	
	CAA TGT ATA GAA ATC CGC TGT T			
aggR	CTA ATT GTA CAA TCG ATG TA	15	457	
	AGA GTC CAT CTC TTT GAT AAG			
aap	CTT GGG TAT CAG CCT GAA TG	10	310	
	AAC CCA TTC GGT TAG AGC AC			
EPEC				López-Saucedo <i>et al.</i> (2003)
eaeA	GAC CCG GCA CAA GCA TAA GC	3.8	384	
	CCA CCT GCA GCA ACA AGA GG			
bfpA	ATT GGT GCT TGC GCT TGC TGC	2.5	324	
	GCC GCT TTA TCC AAC CTG GTA			

CUADRO 1

Oligonucleótidos utilizados en este estudio.

Las reacciones se procesaron en un termociclador (Eppendorf®) bajo las condiciones descritas en la literatura (López-Saucedo *et al.*, 2003, Cerna *et al.*, 2003). Los productos de PCR se resolvieron con electroforesis en agarosa al 2.3 % en regulador TAE 1X (Promega®), durante 45 min a 100 V. Las bandas de ADN se visualizaron luego de la tinción con bromuro de etidio (10 µg/mL) y se digitalizaron con un fotodocumentador de luz UV (Enduro GDS™, Labnet International, Inc). Como marcador de peso molecular se usó la escalera de 100 pb (Fermentas®).

Actividad antimicrobiana de los extractos (Bauer *et al.*, 1966)

Se construyeron discos de papel filtro Whatman No. 2 de 5 mm de diámetro y se esterilizaron. Los extractos acuosos de hojas y semillas se prepararon a 2.5, 5, 10, 15 y 20 mg/disco y con ellos se impregnaron los discos de papel filtro. Las cepas microbianas fueron sembradas en 3 mL de caldo Müeller Hinton (excepto *E. coli* HB101/pPic1) e incubadas a 37°C hasta alcanzar una $D_{0.590} = 0.08 - 0.1$; las cepas se sembraron masivamente en agar Müeller Hinton y se depositaron los discos; se incubaron a 37°C por 18 h y se examinaron en búsqueda de halos de inhibición. Los ensayos se hicieron por triplicado.

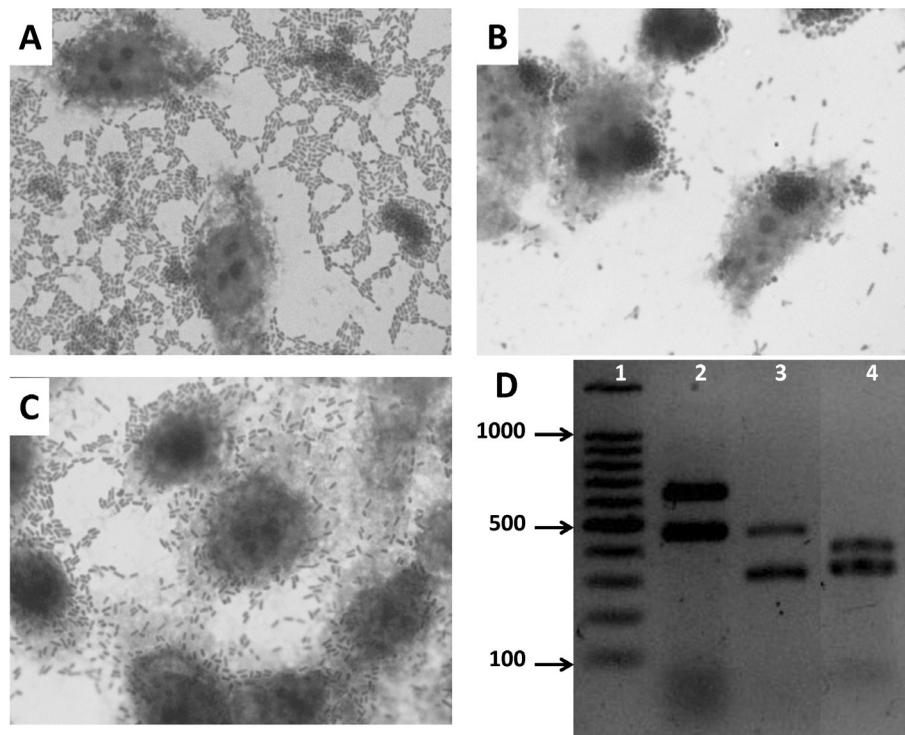
Obtención de la proteína Pic recombinante. La cepa *E. coli* HB101/pPic1 se sembró en caldo LB con tetraciclina (10 g/mL), se incubó a 37°C por 16 h y el sobrenadante

(conteniendo a la proteína Pic) se concentró en filtros con un valor de corte de 100 KDa. La proteína se resolvió mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 10%, en condiciones desnaturalizantes.

Interacción de extractos vegetales con la proteína Pic (Stabach *et al.*, 1997). Se mezclaron 2 µg de proteína Pic con 5, 10, 15 y 20 mg/mL del extracto acuoso de hojas de *A. lutescens*; la mezcla se incubó a 30°C por 1 y 2 h. Para buscar productos de degradación de la proteína Pic, las muestras se analizaron con electroforesis en gel de poliacrilamida al 10%.

RESULTADOS

La cepa prototipo de *E. coli* enteroagregativa (EAEC) exhibió un fenotipo agregativo, donde grupos de bacilos en empalizadas se adhirieron al cristal en forma de “panal de abeja”; la cepa de *E. coli* enteropatogena (EPEC) mostró un fenotipo localizado, en el que se observaron microcolonias de bacterias adheridas en los polos de las células epiteliales, en tanto que la cepa *E. coli* con adherencia difusa (DAEC) se observó el fenotipo difuso, donde las bacterias se adhieren sobre las células de forma azarosa (figura 1A-C); la cepa de *E. coli* ATCC 25922 no exhibió capacidad de adhesión a las células CaCO₂. La caracterización genotípica reveló los genes AA probe, *aggR* y *aap* en la cepa EAEC, en tanto que en la cepa EPEC los genes *bfpA* y *eaeA* (figura 1D).



CUADRO 1

Patrones de adhesión y genes típicos en variantes patógenas de *E. coli*. A, fenotipo agregativo en EAEC 042; B, fenotipo localizado en EPEC E2348/69; C, fenotipo difuso en DAEC E66438; D, genes AA probe y *aggR* (carril 2), genes *aggR* y *aap* (carril 3) de EAEC; genes *eaeA* y *bfpA* (carril 4) de EPEC; MPM (carril 1).

El ensayo de difusión para evaluar la actividad antibacteriana, reveló que los extractos acuosos de hojas de *A. lutescens* inhibieron el crecimiento de *E. coli* ATCC 25922 de manera dosis-dependiente, exhibiendo halos de 6, 7.6, 8.3 y 8.3 mm con 5, 10, 15 y 20 mg/disco, res-

pectivamente. Sin embargo, estos extractos no mostraron actividad contra los patotipos EAEC, DAEC ni EPEC (tabla 1). Los extractos acuosos de semillas de *A. lutescens* no manifestaron actividad antibacteriana contra ninguna bacteria (datos no mostrados).

Extracto acuoso de hojas de <i>A. lutescens</i> (mg/d)	Halo de inhibición (mm)			
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	EAEC 042	EPEC E2348/69	DAEC E66438
	Media (± DE)			
5	6 (0.05)	Neg	Neg	Neg
10	7.6 (1.5)	Neg	Neg	Neg
15	8.3 (0.81)	Neg	Neg	Neg
20	8.3 (0.3)	Neg	Neg	Neg

TABLA 1

Actividad antibacteriana de extractos acuosos de hojas de *A. lutescens* sobre *E. coli*.

Los ensayos de interacción entre la proteína Pic de EAEC y los extractos acuosos de hojas de esta proteína bacteriana (figura 2). de *A. lutescens* (10 y 20 mg) durante 1 y 2 h, no mostraron subproductos de degradación.

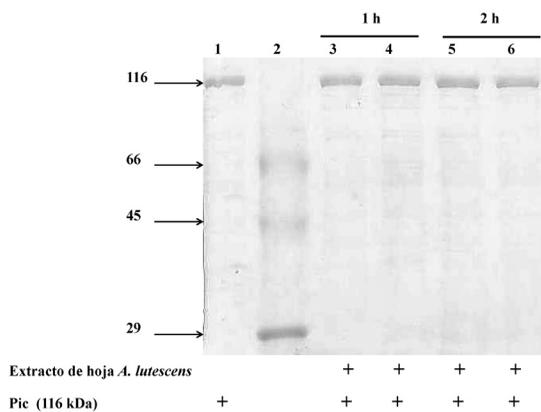


FIGURA 2

Interacción entre extractos acuosos de *A. lutescens* y la proteína Pic de *E. coli* enteroagregativa. Carril: 1, proteína Pic de EAEC; 2, MPM; 3-4; Proteína Pic mas 10 y 20 mg de extracto acuoso de hojas de *A. lutescens*, respectivamente (1 hora); 5-6, Proteína Pic mas 10 y 20 mg de extracto acuoso de hojas de *A. lutescens*, respectivamente (2 horas). MPM: marcador de peso molecular: albúmina sérica bovina, ovoalbúmina y anhidrasa carbónica (66, 45 y 29 kDa, respectivamente).

CONCLUSIONES

Desde tiempo remoto, el hombre ha utilizado las plantas como un recurso medicinal. Ello ha impulsado la investigación farmacológica y el desarrollo de nuevas drogas a partir de compuestos activos presentes en ellas (Arun *et al.*, 2015). Entre las actividades biológicas descritas en compuestos obtenidos de plantas de la familia Annonaceae están la citotóxica, biopesticida, antitumoral, vermífugo, inmunosupresora, anti-emética, inhibidor del apetito, antimalaria, insecticida y antibacteriana (Krinski *et al.*, 2014).

La actividad antibacteriana del extracto acuoso de hojas de *A. lutescens* sobre *E. coli* ATCC 25922 reportada aquí, quizá obedezca a que esta bacteria no posee elementos genéticos que codifiquen factores de virulencia, tales como las fimbrias que fomentan la capacidad de adhesión

de las bacterias a las células epiteliales. Por otro lado, también podrían participar los diterpenos descritos en *Annona*, dado que se ha reportado que estos compuestos presentes en extractos metanólicos de *A. squamosa* inhibieron el crecimiento de patógenos como *S. aureus* y *S. pneumoniae* (Wiar *et al.*, 2005); los diterpenos fomentan la lisis de la membrana celular bacteriana, actividad debida a su estructura lipofílica (Urzúa *et al.*, 2008).

Un estudio reportó que los extractos acuosos obtenidos de la corteza de raíz de *Annona senegalensis* no exhibieron actividad contra *E. coli* ATCC 25922 (Lino y Deogracious, 2006), esto quizá porque en esta estructura de la planta no se encuentran presentes moléculas con actividad bactericida. También se observó que los extractos acuosos de hojas y semillas de *A. lutescens* no inhibieron, en condiciones *in vitro*, el crecimiento de las cepas prototipo EAEC, DAEC y EPEC que causan diarrea (tabla 1). Dicho fenómeno puede obedecer a que en dichas variantes patógenas hay elementos genéticos extracromosomales como los plásmidos; por ejemplo, la cepa EAEC 042 posee un plásmido de 60-65 MDa en el que están codificadas las fimbrias de adherencia agregativa (AAF), las enterotoxinas Pet y EAST, así como una proteína antiagregante (Cerna *et al.*, 2003).

Las fimbrias participan en la formación de biopelículas en EAEC, lo que puede explicar la resistencia de esta bacteria ante agentes biocidas como los presentes en los extractos vegetales de *Annona* (Shamir *et al.*, 2010). Además de los factores de virulencia codificados en el plásmido de EAEC, en su cromosoma está codificada la proteína Pic, que favorece la colonización de la bacteria en el intestino degradando el moco intestinal (Gutiérrez-Jiménez *et al.*, 2008). Los resultados mostraron que dichos extractos no degradaron a la proteína Pic de EAEC, probablemente por la carencia de afinidad de los compuestos vegetales con esta proteína bacteriana. En cuanto a la variante EPEC, ésta posee el plásmido EAF en cuyo material genético está codificada la fimbria Bfp que participa en la adherencia localizada de esta bacteria (Donnenberg *et al.*, 1992); así, la capacidad de formar microcolonias por esta fimbria en EPEC podría explicar la falta de actividad antibacteriana de los extractos de *A. lutescens*. Aunque los extractos acuosos de esta planta no inhibieron estos patotipos de *E. coli* en particular. Se ha reportado su actividad antibacteriana contra otros patógenos intestinales como *Salmonella* serovar Typhi o *Shigella flexneri* (Luna-Cazares *et al.*, 1999), lo que revalida su uso como parte de la medicina tradicional en México.

AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen los apoyos otorgados durante el 2014, por parte de la Dirección de Investigación y Posgrado de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas, para el proyecto titulado *Evaluación de extractos de Annona lutescens sobre Escherichia coli*.

LITERATURA CITADA

- ARUN, R., A. PHILIP, P. KANNANMON & J. NIMISHA, 2015. Screening of Anti Cancer and Antibacterial Activity of Methanolic Extracts of *Annona muricata* Leaf and Bark. *Innoriginal International Journal of Sciences* 2: 1-4.
- BAUER, A.W., W.M. M.KIRBY, J.C. SHERRIS & M. TURCK, 1966. Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disk Method. *American journal of clinical pathology* 45: 493.
- BORCHERT, R., 1983. Phenology and control of Flowering Tropical Trees. *Biotropica* 81-89.
- CERNA, J.F., J.P. NATARO & T. ESTRADA-GARCIA, 2003. Multiplex PCR for Detection of Three Plasmid-Borne Genes of Enteroaggregative *Escherichia coli* strains. *J Clin Microbiol* 41: 2138-40.
- CRAVIOTO, A., R.J. GROSS, S.M. SCOTLAND & B. ROWE, 1979. An Adhesive Factor Found in Strains of *Escherichia coli* Belonging to the Traditional Infantile Enteropathogenic Serotypes. *Current Microbiology* 3: 95-99.
- DE LA CRUZ-CHACÓN, I., A.R. GONZÁLEZ-ESQUINCA, P. GUEVARA FEFER & L.F. JÍMENEZ GARCÍA, 2011. Liriodenine, Early Antimicrobial Defence in *Annona diversifolia*. *Zeitschrift für Naturforschung C* 66: 377-384.
- DE LA CRUZ CHACÓN, I. & A.R. GONZÁLEZ-ESQUINCA, 2012. Liriodenine Alkaloid in *Annona diversifolia* During Early Development. *Natural product research* 26: 42-49.
- DONNENBERG, M.S., J.A. GIRON, J.P. NATARO & J.B. KAPER, 1992. A Plasmid-Encoded Type IV Fimbrial Gene of Enteropathogenic *Escherichia coli* Associated with Localized Adherence. *Molecular microbiology* 6: 3427-3437.
- GUTIÉRREZ-JIMÉNEZ, J., I. ARCINIEGA & F. NAVARRO-GARCÍA, 2008. The Serine Protease Motif of Pic Mediates a Dose-Dependent Mucolytic Activity After Binding to Sugar Constituents of the Mucin Substrate. *Microbial Pathogenesis* 45: 115-123.
- GUTIÉRREZ-JIMÉNEZ, J., L.M. LUNA-CAZÁRES, M.I. MENDOZA-OROZCO, G.J. DÍAZ-MARINA, J.C. BURGUETE-GUTIÉRREZ & J.M. FELICIANO-GUZMÁN, 2015. Organización, mantenimiento y preservación de la colección de cultivos bacterianos del Instituto de Ciencias Biológicas de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas (UNICACH), México. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología* 35: 95-102.
- KAPER, J. B., J.P. NATARO & H.L. MOBLEY, 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* 2: 123-40.
- KRINSKI, D., A. MASSAROLI & M. MACHADO, 2014. Potencial inseticida de plantas da família Annonaceae. *Revista Brasileira de Fruticultura* 36: 225-242.
- LINO, A. & O. DEOGRACIOUS, 2006. The *in-vitro* Antibacterial Activity of *Annona senegalensis*, *Securidacca longipendiculata* and *Steganotaenia araliacea*-Ugandan Medicinal Plants. *African Health Sciences* 6: 31-35.
- LUNA-CAZÁRES, L.M., M.G. MARTÍNEZ-SANTIAGO, I. DE LA CRUZ CHACÓN & A.R. GONZÁLEZ-ESQUINCA, 1999. Inhibición de cepas abcterianas por extractos acuosos de *Annona lutescens* Saff. *II Congreso Internacional de Anonáceas*. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México.

- LÓPEZ-SAUCEDO, C., J.F. CERNA, N. VILLEGAS-SEPULVEDA, R. THOMPSON, F.R. VELAZQUEZ, J. TORRES, P.I. TARR & T. ESTRADA-GARCÍA, 2003. Single Multiplex Polymerase Chain Reaction to Detect Diverse Loci Associated with Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Emerg Infect Dis* 9: 127-31.
- MIRANDA, F. & X.E. HERNÁNDEZ, 1963. *Los tipos de vegetación de México y su clasificación*. México, D.F.: Colegio de Postgraduados.
- RODRÍGUEZ-ANGELES, G, 2002. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud Pública de México* 44: 464-475.
- SHAMIR, E. R., M. WARTHAN, S. P.BROWN, J.P. NATARO, R. L.GUERRANT & P.S. HOFFMAN, 2010. Nitazoxanide Inhibits Biofilm Production and Hemagglutination by Enteroaggregative *Escherichia coli* Strains by Blocking Assembly of AafA Fimbriae. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54: 1526-1533.
- STABACH, P. R., C.D. CIANCI, S.B. GLANTZ, Z. ZHANG & J.S. MORROW, 1997. Site-Directed Mutagenesis of α II Spectrin at Codon 1175 Modulates its μ -Calpain Susceptibility. *Biochemistry* 36: 57-65.
- URZÚA, A., M.C. REZENDE, C. MASCAYANO & L. VÁSQUEZ, 2008. A Structure-Activity Study of Antibacterial Diterpenoids. *Molecules* 13: 882-891.
- WIART, C., T.S. AU, Y. MOHD, H. HAMIMAH & M. SULAIMAN, 2005. 16 Hydroxy-(-)-Kauran-19-oic acid: an Antibacterial Diterpene from Sweet Apple (*Annona squamosa* L., Annonaceae). *International journal of Pharmacology* 1: 296-298.

NORMAS EDITORIALES

REVISTA LACANDONIA

UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES DE CHIAPAS

Los trabajos que aquí se publican son inéditos, se relacionan con temas de actualidad e interés científico. Tendrán prioridad para su publicación aquellos artículos generados por miembros de la comunidad de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas (UNICACH). Pueden ser artículos científicos, técnicos, ensayos o notas escritos en un lenguaje claro y accesible, en tercera persona, en español o inglés y que se ajusten a las siguientes Normas Editoriales:

El manuscrito será arbitrado por dos revisores especializados en el tema para su aceptación y publicación. El dictamen del Comité Editorial de esta revista de ciencias será inapelable.

Se entregará el original con dos copias, en papel tamaño carta, escrito a doble espacio y con un margen de 3 cm a cada lado y páginas numeradas y guardado en un CD.

Es responsabilidad del autor realizar las correcciones a que haya lugar después de la evaluación, para lo cual se le devolverá el manuscrito y el CD. La versión definitiva se entrega tanto en CD como impresa a más tardar 15 días hábiles de que haya sido devuelta.

El documento se captura en Word 6.0 para Windows 95 o posterior, con letra Calibri o Times New Roman 12 y con el texto justificado. Los dibujos, figuras, mapas y cuadros se entregarán en CD o en original en tinta china; las fotografías a color o en blanco y negro, en papel brillante y con alto contraste. Todos éstos, claros y pertinentes, con pie de figura y con el correspondiente señalamiento del sitio donde irán insertados en el texto.

La extensión deseable de los trabajos será desde 5 hasta 20 cuartillas, cuando sea necesario se podrán extender más. El orden de las secciones para los manuscritos es:

- TÍTULO
- AUTOR(ES)
- RESUMEN
- INTRODUCCIÓN
- METODOLOGÍA
- RESULTADOS
- CONCLUSIONES
- LITERATURA CITADA

Título: corto e informativo de acuerdo con lo expresado en el texto. Escrito en mayúsculas y negritas.

Autores: nombre y apellidos, centro de trabajo, dirección, teléfono y fax y correo electrónico para facilitar la comunicación. El número de autores por artículo no debe pasar de seis.

Resumen: describe brevemente el diseño metodológico, los resultados y conclusiones del trabajo en forma concisa. Deberá acompañarse del mismo traducido de preferencia al inglés o a alguna otra lengua. Inmediatamente después del Resumen, se incluirán las Palabras Clave y también se traducirán al idioma en el que esté el Resumen en otra lengua.

Introducción: se presenta el tema enmarcando brevemente las cuestiones planteadas, justificación, razones para exponerlas, objetivos e impacto social o científico del trabajo y el orden en que se desarrollarán las ideas. Se describe brevemente la metodología empleada.

Resultados o cuerpo del texto: desarrolla las ideas planteadas al inicio de manera organizada. Se recomienda utilizar subtítulos. Esta sección incluye el análisis y la discusión de las ideas.

Se concluye resaltando en pocas palabras el mensaje del artículo: qué se dijo, cuál es su valor, para terminar con lo que está por hacer.

Las citas en el texto se escriben de acuerdo con los siguientes ejemplos: Rodríguez (1998) afirma..., Rodríguez y Aguilar (1998); Rodríguez *et al.* (1998) cuando sean tres o más autores; si sólo se menciona su estudio, escribir entre paréntesis el nombre y año de la publicación: (Rodríguez, 1998) o (Rodríguez, 1998: 35).

Al finalizar el texto se describe la literatura citada en el texto, de acuerdo con los siguientes ejemplos, si se trata del artículo publicado en una revista, tanto el título como el volumen, número y páginas, deberán escribirse en cursivas; en el caso de libros, el título de los mismos deberán ir en cursivas, de acuerdo con los siguientes ejemplos:

Para un artículo de revista:

VERDUGO-VALDEZ, A.G. y A.R. GONZÁLEZ-ESQUINCA, 2008. Taxonomía tradicional y molecular de especies y cepas de levaduras. *Lacandonia, Rev. Ciencias UNICACH 2 (2): 139-142.*

Para un libro:

HÁGSATER, E., M.A. SOTO ARENAS, G.A. SALAZAR CH., R. JIMÉNEZ M., M.A. LÓPEZ R. Y R.L. DRESSLER, 2005. *Las orquídeas de México.* Edic. Productos Farmacéuticos, S.A. de C.V. 302 p.

El material ilustrativo –dibujos y fotografías– deberán ser de calidad, es decir, deberán enviarse en el máximo formato que puedan capturarse; en el caso de los dibujos –figuras morfológicas, mapas y gráficas– deberán hacerse en tinta china y arreglados en láminas que permitan su adecuada reducción en la imprenta, así como el aprovechamiento del espacio; los números que contengan, deberán ser en Letraset, plantilla y Leroy y en tinta china. Las fotografías serán de preferencia en blanco y negro, pero también –si es necesario– podrán ser en color, bien contrastadas e impresas en papel brillante, o de preferencia digitalizadas. Todo el material gráfico deberá presentarse digitalizado en un CD, en una carpeta distinta a la del texto y con los datos escritos sobre el mismo del título, del artículo, así como del (o los) autor(es). Títulos y subtítulos de cada uno de los artículos se debe escribir con mayúsculas y minúsculas; el subtema del subtítulo con negritas, también con altas y bajas.

En el caso de las notas, no requieren de resumen ni de bibliografía, y si se hace alusión a alguna publicación, ésta deberá ser citada dentro del propio texto.

Los originales no serán devueltos.

Enviar sus contribuciones al Dr. Carlos R. Beutelspacher, editor de la revista *Lacandonia* de la UNICACH romme-lbeu@gmail.com o bien al miembro del Comité Editorial de la respectiva escuela:

BIOLOGÍA: Dr. Miguel Ángel Pérez-Farrera y Dr. Gustavo Rivera Velázquez

INGENIERÍA AMBIENTAL: Dr. Raúl González Herrera

INGENIERÍA TOPOGRÁFICA: Dr. Guillermo Ibáñez Duharte

NUTRICIÓN: Dra. Adriana Caballero Roque

PSICOLOGÍA: Dr. Germán Alejandro García Lara

UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES DE CHIAPAS, diciembre de 2016.

Rectoría

Not. Adolfo Antonio Guerra Pérez
RECTOR

Lic. Juan José Solórzano Marcial
SECRETARIO GENERAL

Dr. Ernesto Velázquez Velázquez
SECRETARIO ACADÉMICO

Lic. Luis Alfredo Sierra Sánchez
ABOGADO GENERAL

Lic. Rosemberg Maldonado Ortiz
DIRECTOR DE EXTENSIÓN UNIVERSITARIA

Dra. María Adelina Schlie Guzmán
DIRECTORA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO



Producción Editorial
Universitaria 2016