

## Identificación de nuevos metabolitos secundarios en *Persea americana* Miller variedad Drymifolia

Héctor Guillén-Andrade<sup>1</sup>  
Ana Karen Escalera-Ordaz<sup>1§</sup>  
Guadalupe Torres-Gurrola<sup>2</sup>  
Yolanda Magdalena García-Rodríguez<sup>2</sup>  
Francisco Javier Espinosa García<sup>2</sup>  
Luis Mario Tapia-Vargas<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Unidad de Investigaciones Avanzadas en Agrobiotecnología-Facultad de Agrobiología 'Presidente Juárez'. Paseo Gral. Lázaro Cárdenas y Berlín s/n, Col. Viveros, Uruapan, Michoacán, México. CP. 60170. Tel. 4525236474. Fax. 4525236474. (hguillenandrade@gmail.com). <sup>2</sup>Centro de Investigaciones en Ecosistemas-Universidad Nacional Autónoma de México. Antigua carretera a Pátzcuaro núm. 8701, Col. ex-Hacienda de San José de la Huerta, Morelia, Michoacán, México. CP. 58190. Tel. 4433222777, ext. 42628. Fax. 4433222719. (pitagt@hotmail.com; ygarcia@cieco.unam.mx; espinosa@cieco.unam.mx). <sup>3</sup>Campo Experimental Uruapan-INIFAP. Av. Latinoamericana núm. 1101, Col. Revolución, Uruapan, Michoacán. CP. 60150. Tel. 4525237392. (mariotv60@hotmail.com).

§Autora para correspondencia: ana.karen.escalera.ordaz@gmail.com.

### Resumen

Las plantas han desarrollado diversas estrategias de defensa bajo condiciones de estrés biótico y abiótico, entre las principales, destaca la síntesis de metabolitos secundarios que actúan como herbicidas, larvicidas, repelentes, atrayentes, fungicidas, bactericidas, insecticidas, etc. En la presente investigación, se planteó la caracterización química de 54 colecciones de *P. americana* Miller variedad Drymifolia procedentes de la franja aguacatera del estado de Michoacán y conservadas en el banco de germoplasma de la Facultad de Agrobiología 'Presidente Juárez'. El estudio forma parte de una estrategia integral para evaluar el potencial de las colecciones como portainjertos con atributos de resistencia a plagas y enfermedades. Al analizar el perfil químico, se identificaron un total de 47 metabolitos secundarios, 16 de ellos, no han sido reportados en tejido foliar de *Persea*. Algunos compuestos como el  $\beta$ -pineno, cariofileno, estragol, ácido hexadecanoico, heptacosano y  $\alpha$ -tocoferol estuvieron presentes en las 54 colecciones analizadas. El estragol con actividad biológica antifúngica, larvicida, insecticida y genotóxica predominó con una concentración de 26.53%, respecto al total. Adicionalmente, se determinaron diferencias estadísticas significativas para 12 metabolitos secundarios. En contraste, no se identificó relación alguna entre la concentración de los metabolitos y el origen de las colecciones.

**Palabras clave:** aguacate, metabolitos secundarios, variabilidad.

Recibido: enero de 2019

Aceptado: abril de 2019

## Introducción

México se ubica como el principal productor de aguacate a nivel mundial, lugar que obtiene por las 149 185 ha plantadas, el estado de Michoacán se coloca como líder productor de este frutal con 195 042 t que representan 94.9% de la producción nacional (SIAP, 2019). En Michoacán el cultivo del aguacate se encuentra establecido en una región conocida como ‘la franja aguacatera del estado de Michoacán’ (Gutiérrez-Contreras *et al.*, 2010) en ella, existe una amplia diversidad genética de *P. americana* Miller variedad Drymifolia que se ha utilizado como portainjertos de la variedad Hass (Cuiris-Pérez *et al.*, 2009).

Por ser fuente de genes de resistencia a factores físicos, plagas y patógenos (Rincón-Hernández *et al.*, 2011); sin embargo, la enorme riqueza fitogenética es amenazada por la destrucción de ecosistemas y sustitución de cultivares tradicionales por cultivares mejorados (Lorea-Hernández, 2002). Consecuentemente, durante los últimos años, se han sumado esfuerzos para la conservación y caracterización de estos recursos genéticos (Gutiérrez-Diez *et al.*, 2009).

En particular, en el estado de Michoacán se ha trabajado en la caracterización del germoplasma de aguacate criollo; estos trabajos incluyen información genotípica (Cuiris-Pérez *et al.*, 2009) y fenotípica (Guillén-Andrade *et al.*, 2013). La importancia de estudiar la química de las plantas radica en que éstas han desarrollado diversas estrategias de defensa bajo condiciones de estrés biótico y abiótico; por ejemplo, la planta sintetiza metabolitos secundarios (MS) que provocan que las plantas sean desagradables o tóxicas para algunos herbívoros (Anaya-Lang y Espinoza-García, 2006).

Algunos con actividad biológica larvicida (Senthilkumar *et al.*, 2008), insecticida bactericida y fungicida (Khokra *et al.*, 2008; Moreno *et al.*, 2009; Hanamanthagouda *et al.*, 2010), además de su importancia ecológica al participar en los procesos de adaptación de las plantas, atracción de insectos polinizadores y dispersores de semillas (Sepúlveda-Jiménez *et al.*, 2003).

La variación de los perfiles químicos del género *Persea*, ha sido documentada en diversos estudios (Quing-Yi *et al.*, 2009; Torres-Gurrola *et al.*, 2009; Rincón-Hernández *et al.*, 2011) en el más (Torres-Gurrola *et al.*, 2016) informativo, se reporta un total de 363 MS identificados, que corresponden a 13 grupos químicos, del total, 258 se relacionan en diferentes tejidos de *Persea americana*: se han reportado 125 en pericarpio, 109 en tejido foliar, 17 en semilla, tres en corteza, dos en flor y dos en raíz. Debido a la importancia de conocer los perfiles químicos, como mecanismos de defensa, de los recursos genéticos de *P. americana* Miller variedad Drymifolia.

Con el objetivo de conocer la variabilidad química foliar de las 54 colecciones de esta especie, establecidas en el banco de germoplasma de la Facultad de Agrobiología, dependiente de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, como parte integral de una estrategia para evaluar su potencial como portainjertos con características de resistencia a plagas y enfermedades, entre otros atributos adicionalmente, se planteó la necesidad de establecer la posible relación de los MS presentes en las colecciones con su origen geográfico.

## Materiales y métodos

La investigación fue desarrollada en el Laboratorio de Recursos Fitogenéticos (LAREFI) de la Unidad de Investigaciones Avanzadas en Agrobiotecnología (UIAA) de la Facultad de Agrobiología 'Presidente Juárez', de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, ubicada en la ciudad de Uruapan Michoacán, México, en las coordenadas 19° 25' 10'' latitud norte y 102° 03' 30'' longitud oeste a 1 620 msnm. El proceso de extracción, identificación y cuantificación de MS se llevó a cabo en el Centro de Investigaciones en Ecosistemas (CIEco) de la Universidad Nacional Autónoma de México-Campus Morelia.

El material genético analizado consistió de 54 accesiones de *P. americana* Miller variedad *Drymifolia*, con cuatro individuos por accesión, las accesiones provienen de localidades pertenecientes a los municipios de Ario, Los Reyes, Salvador Escalante, Tacámbaro, Tingambato, Uruapan y Ziracuaretiro, todos ellos ubicados en la franja aguacatera de Michoacán entre las coordenadas 18° 45' y 20° 6' latitud norte y 101° 47' y 103° 13' de longitud oeste (Guillén-Andrade *et al.*, 2007; Gutiérrez-Contreras *et al.*, 2010).

El perfil químico de cada una de las accesiones fue determinado a partir de tejido foliar de hojas maduras y con el empleo de un cromatógrafo de gases (Agilent HP6890<sup>®</sup>), provisto con un detector de masas (Agilent 6890<sup>®</sup>). Los procedimientos para la obtención de extractos, las condiciones del cromatógrafo de gases para inyectar y analizar las muestras, la identificación de MS con base en la información contenida en la biblioteca de espectro de masas NIST 05 (National Institute of Standards and Technology) y la cuantificación de MS fueron hechos con base a lo descrito por Torres-Gurrola *et al.* (2009).

La base de datos de contenido y concentración (mg g<sup>-1</sup> de hoja seca) de cada uno de los MS identificados se sometió a un análisis de varianza en una vía, con base en un diseño experimental completamente al azar, con cuatro repeticiones, considerando a cada accesión como un tratamiento. Cada observación estuvo representada en el modelo estadístico correspondiente al diseño experimental, mediante la siguiente expresión:  $Y_{ij} = M + C_i + e_{ij}$ . Donde:  $Y_{ij}$  = concentración del MS en la colecta  $i$  y repetición  $j$ ;  $M$  = media general del experimento;  $C_i$  = efecto de la colecta  $i$ ;  $e_{ij}$  = error experimental en la colecta  $i$  y repetición  $j$ ;  $i = 1, 2, 3, \dots, 54$  y  $j = 1, 2, 3, 4$ .

Este análisis se hizo mediante el procedimiento Proc Anova del paquete estadístico SAS<sup>®</sup> versión 9.4 (SAS Institute Inc., 2012). Con base en el análisis de varianza se seleccionaron los MS para los cuales hubo diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ). Posteriormente, sobre el listado de esos MS seleccionados, se practicó un análisis discriminante de Stepwise (Romano y Wolf, 2005) para depurar y mantener únicamente aquellos MS que aportaban mayor información a la varianza total.

Adicionalmente, se practicó un análisis de correlación de Pearson y Filom (1898) para eliminar variables altamente correlacionadas, y evitar problemas de colinealidad en las matrices. Posteriormente, se obtuvo una matriz de promedios para llevar a cabo un análisis de componentes principales (ACP), utilizando la matriz de correlaciones; se calculó la matriz de distancias euclidianas (DE) entre accesiones y con ella, se hizo el análisis de conglomerados mediante el paquete estadístico Genalex (Peakall y Smouse, 2006).

Finalmente, se construyó el dendograma correspondiente utilizando el método de agrupamiento de Neighbor-Joining. Todos los análisis fueron hechos con el paquete estadístico SAS<sup>®</sup> versión 9.4 (SAS Institute Inc. 2012). Las coordenadas geográficas de los sitios de origen de las accesiones se convirtieron a decimales con el programa de la Comisión Federal de Comunicaciones, ([http://transition.fcc.gov/mb/audio/bickel/DDMMSS-decimal. HTML](http://transition.fcc.gov/mb/audio/bickel/DDMMSS-decimal.HTML)), con estos datos se construyó una matriz de Distancias Geográficas (DG), ésta fue correlacionada con una matriz de distancias euclidianas, mediante la prueba de Mantel con el paquete estadístico GenAlex (Peakall y Smouse, 2006; Flanagan, 2006).

## Resultados y discusión

En el análisis de 54 accesiones de establecidas en el banco de germoplasma de la Facultad de Agrobiología, los resultados obtenidos indican la presencia de 47 MS del total, existe un primer grupo de 31 que han sido reportados en *P. americana* Miller y especies afines:  $\alpha$ -pineno, sabineno,  $\beta$ -pineno, eucalipto,  $\beta$ -*cis*-ocimeno, estragol, óxido de cariofileno, limoneno,  $\alpha$ -cubebeno, fitol, heptacosano, escualeno, chavicol,  $\beta$ -cubebeno, cariofileno,  $\alpha$ -humuleno, germacreno D-4-ol, ácido tetradecanoico, copaeno, cubenol, decano, fenil etil alcohol, metileugenol, nerolidol (E), tetradecanal,  $\gamma$ -elemeno, linolenato de etilo, ácido hexadecanoico, hexadecanoato de metilo, el mirceno y ácido oleico (Quing-Yi *et al.*, 2009; Torres-Gurrola *et al.*, 2009; Rincón-Hernández *et al.*, 2011; Torres-Gurrola *et al.*, 2016).

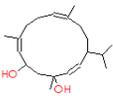
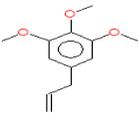
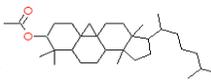
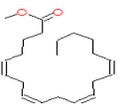
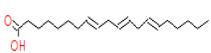
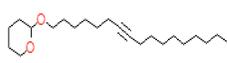
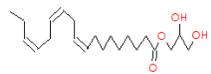
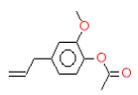
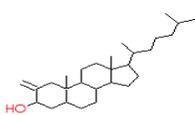
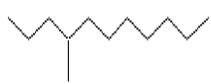
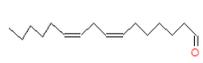
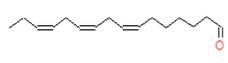
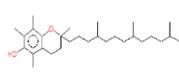
Un segundo grupo, constituido por 11 MS, no han sido reportados para *P. americana* y especies afines; sin embargo, para estos existen reportes de su presencia en otras especies vegetales. El 4,8,13-duvatrien-1,3-diol se ha identificado en tabaco como inhibidor de crecimiento el 8,11,14 ácido eicosatrienoico (*z,z,z*-) en *Melittis melissophyllum* (Velasco-Negueruela *et al.*, 2004), el acetato de eugenol, se ha reportado como componente principal en el aceite esencial de *Syzigium aromaticum* y con actividad antioxidante; el *cis,cis,7,10*-hexadecadienal en *Euphorbia heterophylla* con actividad citotóxica, antioxidante y antimicrobial el *cis,cis,cis-7,10,13*-hexadecatrienal en *Azadirachta indica* y *Allamanda cathartica* con actividad larvicida.

El elemicin en *Myristica fragrans* y *Daucus carota* con actividad tóxica y antibacterial y en *Syzigium aromaticum* con actividad antioxidante la palmitona en *Annona diversifolia* actuando como anticonvulsivo (Cano-Europa *et al.*, 2010), el  $\alpha$ -tocoferol en *Elaeis oleifera* y *Vaccinium meridionale* con actividad antioxidante el cicloartenol acetato en propoleo con actividad antimicrobial el 2H-pireno, 2-(7-heptadeciniloxi) tetrahydro- se identificó en la planta medicinal *Andrographis paniculata* el 2-metilenecholestan-3-ol, se reportó como componente del aceite esencial de las flores de *Artemisia austro-yunnanensis* con actividad antioxidante (Chen-xing *et al.*, 2014) y en *Alstonia scholaris*: planta utilizada en la medicina herbaria por sus propiedades medicinales (Islam *et al.*, 2013).

Finalmente, se identificó un tercer grupo de cinco MS para los cuales no existen reportes de su presencia en especies vegetales: el undecano y el tridecano han sido reportados como compuestos defensivos en *Loxa deducta* y *Pellaea stictica* el metil araquidonato como factor de crecimiento en animales el  $\alpha$ -gliceril linolenato, es utilizado como solvente industrial, el undecano 4-metil se ha identificado en aguas residuales y en petróleo crudo.

Con base en los trabajos, que sobre este tema se han publicado, en esta investigación se identificaron un total de 16 nuevos metabolitos presentes en tejido foliar de *P. americana* Miller variedad *Drymifolia* y que pertenecen a nueve grupos químicos: ésteres (4), alcoholes (2), compuestos fenólicos (1) ácidos; (1) éter; (1) alcanos; (3) aldehídos; (2) acetona; (1); y politerpenos (1). En el Cuadro 1, se presenta el nombre del metabolito y su estructura química.

**Cuadro 1. Estructuras químicas de 16 nuevos metabolitos secundarios identificados en tejido foliar de *Persea americana* Miller variedad *Drymifolia*.**

4,8,13-Duvatrien-1,3-diol <sup>c</sup>	Elemicin <sup>3</sup>	Cicloartenol acetato <sup>1</sup>	Metil araquidonato <sup>1</sup>
			
8,11,14-ácido eicosatrienoico (z,z,z)- <sup>4</sup>	Palmitona <sup>8</sup>	2H-pireno, 2-(7-heptadeciniloxi) tetrahidro <sup>5</sup>	$\alpha$ -gliceril linolenato <sup>1</sup>
			
Acetato de eugenol <sup>1</sup>	Undecano <sup>6</sup>	2-metilencholestan-3-ol <sup>2</sup>	Undecano, 4-metil <sup>6</sup>
			
Cis,cis-7,10-hexadecadienal <sup>7</sup>	Cis,cis,cis-7,10,13-hexadecatrienal <sup>7</sup>	$\alpha$ -tocoferol <sup>9</sup>	Tridecano <sup>6</sup>
			

<sup>1</sup>= ésteres, <sup>2</sup>= alcoholes, <sup>3</sup>= compuestos fenólicos, <sup>4</sup>= ácidos, <sup>5</sup>= éter, <sup>6</sup>= alcanos, <sup>7</sup>= aldehídos, <sup>8</sup>= acetona y <sup>9</sup>= politerpenos.

Al analizar la concentración y frecuencia a la que fueron identificados los 47 MS en las 54 accesiones, se determinó que el  $\beta$ -pineno, estragol, cariofileno, ácido hexadecanoico, heptacosano y  $\alpha$ -tocoferol, fueron identificados en todas las accesiones y, de estos últimos, el estragol destacó por presentar los mayores valores de porcentaje (26.5327 mg g<sup>-1</sup> de hoja) de concentración. En contraste, el chavicol y el acetato de eugenol se presentaron en solo cinco de las 54 accesiones analizadas. Por otra parte, el fenil etil alcohol fue el que menor porcentaje (0.0164 mg g<sup>-1</sup> de hoja) de concentración mostró en las colecciones analizadas. En el Cuadro 2, se presenta la información del metabolito secundario, tiempo de retención, índice Kovats, concentración (%) y frecuencia de cada uno de los MS identificados en las 54 accesiones.

**Cuadro 2. Metabolito secundario, tiempo de retención, índice Kovats, concentración (%) total y frecuencia de los 47 metabolitos secundarios identificados en 54 accesiones de *Persea americana* Miller variedad *Drymifolia* del banco de germoplasma de la Facultad de Agrobiología.**

Metabolito secundario	TR <sup>1</sup>	IK <sup>2</sup>	[%] <sup>3</sup>	F <sup>4</sup>	Metabolito secundario	TR <sup>1</sup>	IK <sup>2</sup>	[%] <sup>3</sup>	F <sup>4</sup>
$\alpha$ -pineno <sup>A</sup>	2.79	942	0.982	12	Nerolidol (E)- <sup>E</sup>	7.2	1 577	0.6543	49
Sabineno <sup>A</sup>	3.11	986	0.02	7	Germacreno D-4-ol <sup>E</sup>	7.37	1 606	0.0403	17
$\beta$ -pineno <sup>A</sup>	3.15	993	4.7539	54	Óxido de cariofileno <sup>E</sup>	7.44	1 618	0.5922	46
Mirceno <sup>A</sup>	3.2	1 000	0.5881	49	Tetradecanal <sup>L</sup>	8.1	1 732	1.73	49
Decano <sup>N</sup>	3.26	1 007	0.0933	28	Ácido tetradecanoico <sup>F</sup>	8.3	1 766	0.0583	26
Limoneno <sup>A</sup>	3.5	1 038	0.0213	8	<i>Cis,cis,7,10</i> - hexadecadienal <sup>L</sup>	9.09	1 903	0.1906	41
Eucalipto <sup>A</sup>	3.54	1 043	0.7361	53	<i>Cis,cis,cis-7,10,13</i> - hexadecatrienal <sup>L</sup>	9.12	1 909	4.4192	52
$\beta$ - <i>cis</i> -ocimeno <sup>A</sup>	3.63	1 056	0.3887	39	Hexadecanoato de metilo <sup>G</sup>	9.28	1 936	1.7413	40
Undecano <sup>N</sup>	4.01	1 107	0.5654	44	Ácido hexadecanoico <sup>F</sup>	9.46	1 967	4.6696	54
Fenil etil alcohol <sup>J</sup>	4.21	1 134	0.0164	9	Fitol <sup>B</sup>	10.37	2 125	4.7608	53
Undecano, 4-metil <sup>N</sup>	4.75	1 206	2.7795	43	Ácido oleico <sup>F</sup>	10.43	2 137	3.6279	50
Estragol <sup>J</sup>	4.83	1 217	26.5327	54	Linolenato de etilo <sup>G</sup>	10.72	2 189	0.8929	23
Chavicol <sup>K</sup>	5.14	1 262	0.077	5	Metil araquidonato <sup>G</sup>	11.16	2 268	3.3274	48
Tridecano <sup>N</sup>	5.45	1 306	0.09388	28	8,11,14-ácido eicosatrienoico ( <i>z,z,z</i> )- <sup>F</sup>	11.86	2 398	0.6953	21
$\tau$ -elemeno <sup>E</sup>	5.81	1 359	0.0783	10	4,8,13-Duvatrien-1,3-diol <sup>M</sup>	11.91	2 406	1.1932	28
$\alpha$ -cubebeno <sup>E</sup>	5.89	1 370	0.0389	15	2H-pireno,2-(7-heptadeciniloxi) tetrahydro- <sup>I</sup>	12.49	2 519	2.1822	46
Copaeno <sup>E</sup>	6.09	1 400	0.398	44	2-metilenecholestan-3-ol <sup>M</sup>	13.02	2 626	1.5813	34
$\beta$ -cubebeno <sup>E</sup>	6.17	1 414	0.251	20	Heptacosano <sup>N</sup>	13.4	2 705	3.9402	54
Metileugenol <sup>K</sup>	6.2	1 418	3.5294	49	$\alpha$ -gliceril linolenato <sup>G</sup>	13.65	2 763	2.9127	45
Cariofileno <sup>E</sup>	6.41	1 451	5.852	54	Cicloartenol acetato <sup>G</sup>	13.84	2 805	0.8669	30
$\alpha$ -humuleno <sup>E</sup>	6.62	1 484	0.6148	49	Escualeno <sup>C</sup>	14.03	2 848	3.5109	52
Acetato de eugenol <sup>G</sup>	6.98	1 541	0.0518	5	$\alpha$ -tocoferol <sup>D</sup>	15.76	3 170	5.6894	54
Cubanol <sup>E</sup>	6.99	1 543	0.6123	48	Palmitona <sup>H</sup>	16.72	3 301	1.5751	34
Elemicin <sup>K</sup>	7.14	1 568	0.0708	17					

<sup>1</sup>= tiempo de retención; <sup>2</sup>= índice Kovats; <sup>3</sup>= porcentaje de concentración en relación al total; <sup>4</sup>= frecuencia número de colectas en las que se identificó cada MS; <sup>A</sup>= monoterpeno; <sup>B</sup>= diterpeno; <sup>C</sup>= triterpeno; <sup>D</sup>= politerpeno; <sup>E</sup>= sesquiterpeno; <sup>F</sup>= ácidos; <sup>G</sup>= ésteres; <sup>H</sup>= acetona; <sup>I</sup>= éter; <sup>J</sup>= compuestos aromáticos; <sup>K</sup>= compuestos fenólicos; <sup>L</sup>= aldehídos; <sup>M</sup>= alcoholes; <sup>N</sup>= alcanos.

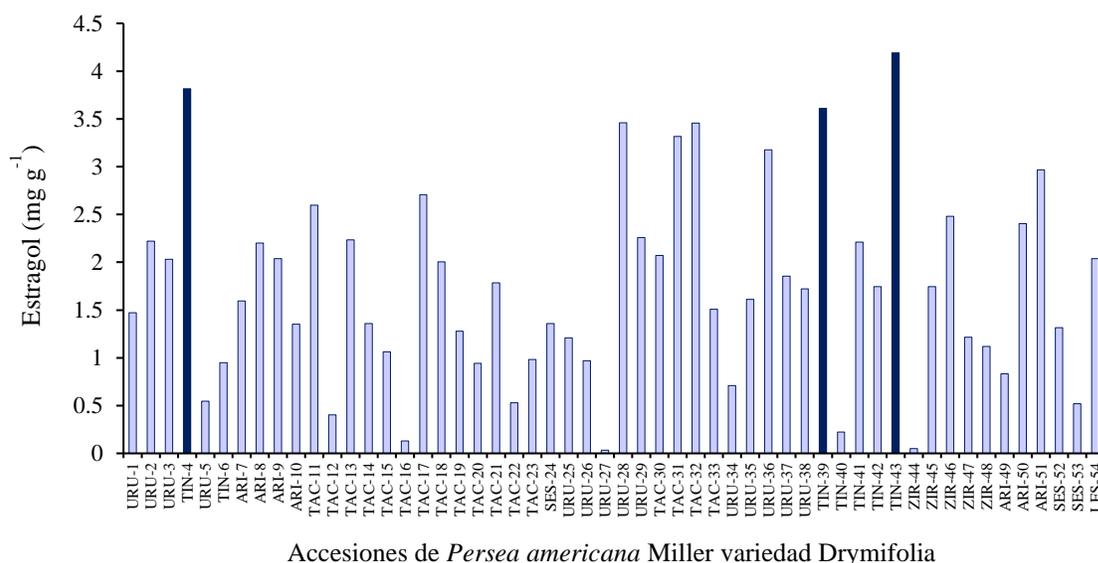
El estragol fue el metabolito secundario destacado por estar presente en mayor concentración y en las 54 colectas analizadas. Estos resultados son similares a los reportados en trabajos similares en germoplasma distintas especies de *Persea* procedentes de diferentes regiones de México (Rincón-

Hernández *et al.*, 2011). La evaluación del contenido de este MS en cada una de las colectas resulta interesante, por ejemplo, se ha evaluado la interacción aguacate criollo-*Trioza anceps*, los árboles con mayor concentración de estragol presentaron menor presencia de agallas foliares (Torres-Gurrola *et al.*, 2009).

Además, se ha identificado al estragol como principal componente en otras especies y, con actividades biológicas de defensa importantes, como insecticida (López *et al.*, 2008) en *Ocimum basilicum* indujo mortalidad por contacto al gorgojo del arroz (*Sitophilus oryzae*) también se ha utilizado contra el escarabajo rojo de la harina (*Tribolium castaneum* Herbst) y el barrenador de grano (*Rhyzopertha dominica*) en *Pimpinella anisum*, se reportó con efecto bactericida, se le ha relacionado con actividad antifúngica (Fontenelle *et al.*, 2008), larvicida (Senthilkumar *et al.*, 2008) y genotóxica (Zani *et al.*, 1991).

En el presente estudio, tres colectas precedentes del municipio de Tingambato, Michoacán, México, fueron las que presentaron mayor concentración de estragol, por lo que se esperaba, que estas colecciones pudieran presentar mejores atributos de defensa para ser utilizados como portainjertos selectos.

En la Figura 1, se representa la variación determinada en el contenido de estragol en las 54 colectas analizadas.



**Figura 1. Histograma para concentración de estragol en 54 accesiones de *Persea americana* Miller variedad Drymifolia colectadas en los municipios de Ario (ARI), Los Reyes (LES), Salvador Escalante (SES), Tacámbaro (TAC), Tingambato (TIN), Uruapan (URU) y Ziracuaretiro (ZIR) establecidas en el banco de germoplasma de la Facultad de Agrobiología.**

Los valores del coeficiente de determinación ( $R^2$ ) oscilaron entre 0.33 y 0.46, con relación a los coeficientes de variación (CV), los valores fluctuaron entre 98.13 y 896.43. El mayor valor de CV fue para el acetato de eugenol en contraste con el *Cis, cis, cis* 7, 10, 13-hexadecatrienal. Asimismo, los valores promedio oscilaron de 0.00108 a 0.28877 en por ciento de concentración total.

Posteriormente, en el análisis discriminante Stepwise, se identificó el tridecano como uno de los MS que no aportó información para explicar la variación en concentración de MS y al revisar los valores de correlación de Pearson, el decano se mostró altamente correlacionado ( $<0.0001$ ) con el tridecano.

Estos resultados se explican por que las colecciones presentan diferencias en su expresión génica y el perfil químico esté sujeto a un fuerte control genético, así como lo está en otras especies arbóreas (Langenheim y Stubblebine 1983; Gershenzon *et al.*, 2000; McConkey *et al.*, 2000).

Los resultados obtenidos del análisis de varianza en una vía, practicados para contenido de 47 MS identificados al analizar 216 individuos de 54 colectas de *P. americana* Miller variedad *Drymifolia*, indicaron diferencias estadísticas significativas ( $p < 0.05$ ) para concentración para diez de ellos y diferencias altamente significativas ( $p < 0.01$ ) para fenil etil alcohol y el 8,11,14-ácido eicosatrienoico (z,z,z)-. En el Cuadro 3 se presentan los estadísticos simples obtenidos para los 12 metabolitos secundarios que presentaron diferencias estadísticas significativas.

**Cuadro 3. Estadísticos simples, cuadrados medios del error y probabilidad de 12 MS con diferencias estadísticas significativas obtenidas del análisis de varianza practicado para concentración de 47 MS identificados en 54 colecciones de *P. americana* Miller variedad *Drymifolia* del banco de germoplasma de la Facultad de Agrobiología.**

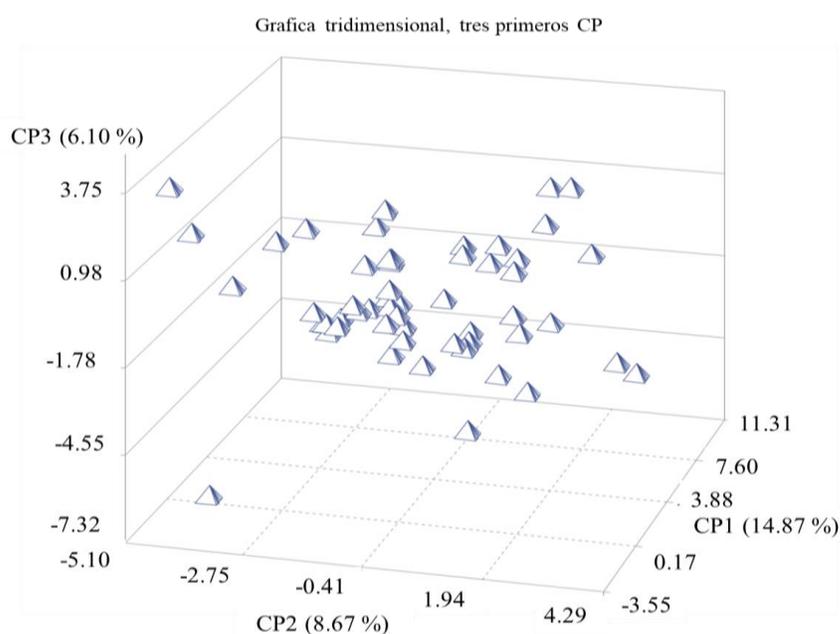
Metabolitos secundarios	R <sup>2</sup> *	CV <sup>1</sup>	DE <sup>2</sup>	Media	CME <sup>3</sup>	Pr> F
Decano	0.34	196.54	0.01199	0.0061	0.00014	0.0131
Fenil etil alcohol	0.46	473.28	0.00509	0.00108	0.00003	<0.0001
Undecano 4 metil	0.41	128.08	0.23263	0.18162	0.05411	0.0002
Tridecano	0.38	198.86	0.0122	0.00613	0.00015	0.0019
β-cubebeno	0.41	341.69	0.05605	0.0164	0.00314	0.0002
Acetato de eugenol	0.4	896.43	0.03039	0.00339	0.00092	0.0004
Óxido de cariofileno	0.33	170.22	0.06588	0.0387	0.00434	0.028
<i>Cis,cis</i> 7,10 hexadecadienal	0.33	271.52	0.03382	0.01246	0.00114	0.0341
<i>Cis,cis,cis</i> -7,10,13 Hexadecatrienal	0.34	98.13	0.28338	0.28877	0.0803	0.019
8,11,14-ácido eicosatrienoico (z,z,z)-	0.43	299.19	0.13595	0.04544	0.01848	<0.0001
4,8,13-duxatrien 1,3-diol	0.34	222.07	0.17315	0.07797	0.02998	0.0184
2-metilencholestan-3-ol	0.39	175.88	0.18174	0.10333	0.03303	0.0009

\*= coeficiente de determinación; <sup>1</sup>= coeficiente de variación; <sup>2</sup>= desviación estándar; <sup>3</sup>= cuadrado medio del error.

Para reducir el número de variables a considerar para la explicación de la variabilidad en relación a la concentración de metabolitos secundarios, se practicó un análisis de componentes principales (ACP). Los resultados indicaron que los primeros tres componentes principales (CP), explican en conjunto 29.64% de la varianza que existe entre las accesiones, mientras que con 17 se logra explicar 80%.

Resultados similares se han obtenido en trabajos de caracterización morfológica *in situ* de *Persea* y otras especies, ya que se ha observado que en este tipo de trabajos no se logra más de 80% de la varianza explicada con los tres primeros componentes (Tofiño *et al.*, 2012; López-Guzmán *et al.*, 2012; Guillén-Andrade *et al.*, 2013; Medina-Torres *et al.*, 2015; Montes-Hernández *et al.*, 2017).

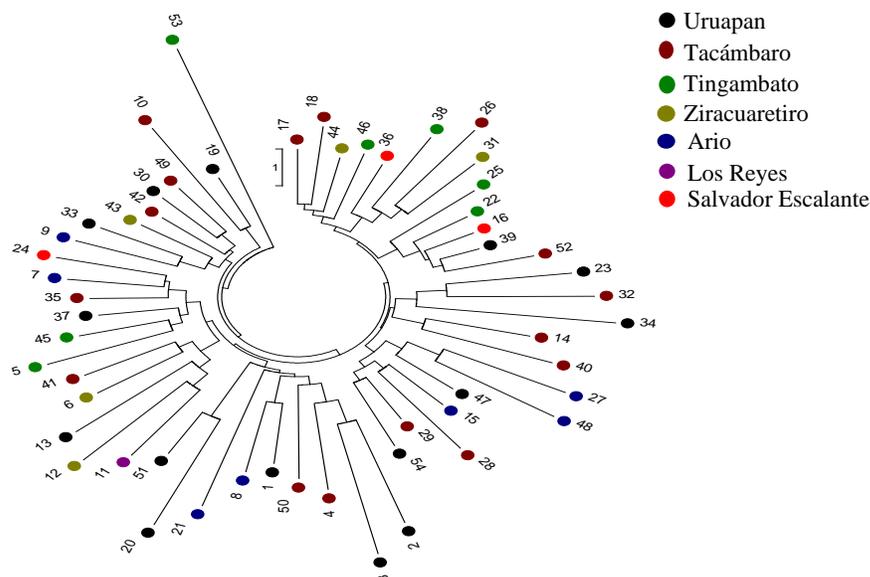
En la Figura 2, se muestra la distribución de las 54 colecciones en función de tres componentes principales. Al analizar los vectores propios con valores arriba de 0.3, se determinó que el CP1 está en función de la presencia del eucalipto, cariofileno y  $\alpha$ -humuleno, el CP2 se determinó en función del decano, undecano,4-metil y tridecano. finalmente, el CP3 está en función del chavicol y  $\tau$ -elemeno. Es importante señalar, que el tridecano y el undecano,4-metil con mayor peso en el CP2 son reportados por primera vez en *Persea americana* Miller variedad *Drymifolia*.



**Figura 2.** Dispersión de 54 colecciones de *P. americana* Miller variedad *Drymifolia* del banco de germoplasma de la Facultad de Agrobiología, en función de tres componentes principales.

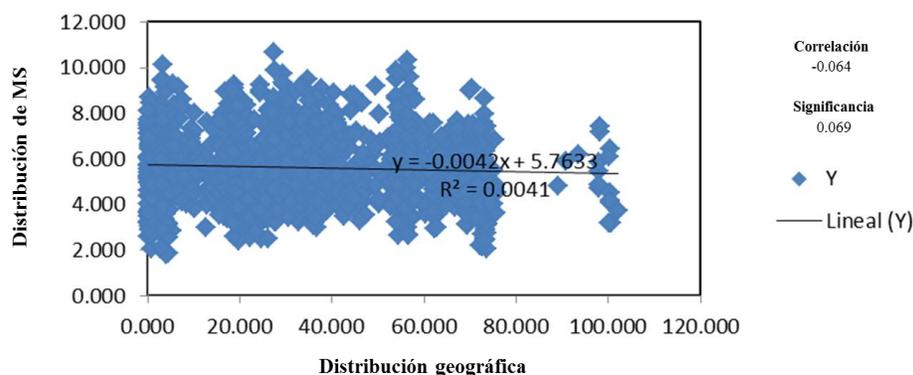
Por otro lado, el dendograma presentado en la Figura 3, generado del análisis clúster con base en el método de agrupamiento de Ward, mostró que las accesiones no se asocian de manera lógica con relación a su origen geográfico. Estos resultados fueron corroborados al efectuar la prueba de Mantel, el valor de correlación obtenido fue de  $r = -0.064$  y una significancia de .069, lo que confirmó la no relación entre el origen geográfico de las colectas y el contenido de MS identificados en 54 colectas.

Estos resultados pueden estar enmascarados debido a que las muestras de tejido foliar fueron aisladas de las colecciones establecidas en el banco de germoplasma; es decir, se encuentran en un solo ambiente.



**Figura 3.** Dendrograma de agrupamiento completo de 54 colecciones de *Persea americana* Miller variedad *Drymifolia*, con base en datos de concentración de 47 metabolitos secundarios. Los círculos de colores indican el lugar de procedencia del germoplasma.

Los resultados de la prueba antes indicada son presentados en la Figura 4.



**Figura 4.** Correlación lineal entre el contenido de metabolitos secundarios y distribución geográfica de 54 colectas de colecciones de *Persea americana* Miller variedad *Drymifolia*.

## Conclusiones

Las 54 colecciones establecidas en el banco de germoplasma de la Facultad de Agrobiología de *Persea americana* Miller variedad *Drymifolia*, son contrastantes en el tipo y concentración de 47 metabolitos secundarios identificados. El estragol fue una constante en cuanto al contenido y mayor concentración en todo el germoplasma analizado. La identificación de 16 nuevos metabolitos secundarios en el germoplasma evaluado es una importante contribución del presente trabajo.

Finalmente, no se determinó relación alguna entre el perfil químico y el origen geográfico de procedencia de las colecciones analizadas.

## Agradecimientos

Al CONACYT, CIECO-UNAM y UIAA-Facultad de Agrobiología-UMSNH, por la beca para estudios de maestría y por las instalaciones respectivamente, para la ejecución de las actividades de investigación. Asimismo, a los doctores que aportaron ideas y colaboraron con su conocimiento, en especial al doctor Pedro Antonio López por su enorme asesoría en la parte estadística.

## Literatura citada

- Anaya-Lang, A. L. y Espinoza-García, F. J. 2006. La química que entreteje a los seres vivos. *Ciencias*. 83(1):4-13.
- Cano-Europa, E.; González-Trujano, M. E.; Reyes-Ramírez, A.; Hernández-García, A.; Blas-Valdivia, V. and Ortiz-Butrón, R. 2010. Palmitone prevents pentylenetetrazole-caused neuronal damage in the CA3 hippocampal region of prepubertal rats. *Neuroscience Letters* 470(2):111-114.
- Chen-Xing, Z.; Zhang, Mi.; Jing, He.; Ya-Fang, and Bao-Cai, Li. 2014. Chemical composition and antioxidant activity of the essential oil from the flowers of *Artemisia austro-yunnanensis*. *J. Chem. Pharmaceutical Res.* 6(7):1583-1587.
- Cuiris-Pérez, H.; Guillén-Andrade, H.; Pedraza-Santos, M. E.; López-Medina, J. and Vidales-Fernández, I. 2009. Genetic variability withing mexican race avocado (*Persea americana* Miller.) germoplasm collections determined by ISSRs. *Rev. Chapingo Ser. Hortic.* 15(2):169-175.
- Flanagan, N. S. 2006. A guide to GenAlex 6. Genetic analysis in Excel. Australian National University.
- Fontenelle, R. O. S.; Orais, S. M.; Rito, E. H. S.; Rilhante, R. S. N.; Ordeiro, R. A.; Nascimento, N. R. F.; Erntopf, M. R.; Idrim, J. J. C. and Ocha, M. F. G. 2008. Antifungal activity of essential oils of Croton species from the Brazilian Caatinga biome. *J. Appl. Microbiol.* 104(5):1383-1390.
- Gershenson, J.; McConkey, M. and Croteau, R. B. 2000. Regulation of monoterpene accumulation in leaves of peppermint. *Plant Physiol.* 122(1):205-213.
- Guillén-Andrade, H.; Lara-Chávez, M. B. N.; Gutiérrez-Contreras, M.; Ortiz-Catón, M. y Angel-Palomares, M. E. 2007. Cartografía agroecologica del cultivo del aguacate en Michoacán. Morevallado (Ed.). ISBN 9789707035669. 140 p.
- Guillén-Andrade, H.; Lara-Chávez, M. B. N.; Torres-Gurrola, G., Escalera-Ordaz, A. K. y Tapia-Vargas, L. M. 2013. Caracterización fenotípica de germoplasma de aguacate (*Persea americana* Miller) criollo de Michoacán. *Rev. Inter. Contam. Amb.* 29(4):212-212.
- Gutiérrez-Contreras, M.; Lara-Chávez, M. B. N.; Guillén-Andrade, H. y Chávez-Barcenas, A. T. 2010. Agroecología de la franja aguacatera en Michoacán, México. *Interciencia.* 35(9):647-653.
- Gutiérrez-Diez, A.; Martínez-de la Cerda, J.; García-Zambrano, E. A.; Iracheta-Donjuan, L.; Ocampo-Morales, J. D. y Cerda-Hurtado, I. M. 2009. Estudio de la diversidad genética del aguacate nativo en Nuevo León, México. *Rev. Fitotec. Mex.* 32(1):9-18.
- Hanamanthagouda, M. S.; Kakkalameeli, S. B.; Naik, P. M.; Nagella, P.; Seetharamareddy, H. R. and Murthy, H. N. 2010. Essential oils of *Lavandula bipinnata* and their antimicrobial activities. *Food Chem.* 118(3):836-839.

- Islam, F.; Islam, S.; Nandi, N. C. and Satter, M. A. 2013. Essential oil composition from the flowers of *alstonia scholaris* of Bangladesh. *Inter. Food Res. J.* 20(6):3185-3188.
- Khokra, S. L.; Prakash, O.; Jain, S.; Aneja, K. R. and Dhingra, Y. 2008. Essential oil composition and antibacterial studies of *Vitex negundo* linn. extracts. *Indian J. Pharmaceutical Sci.* 70(4):522-526.
- Langenheim, J. H. and Stubblebine, W. H. 1983. Variation in leaf resin composition between parent tree and progeny in *Hymenaea*: Implications for herbivory in the humid tropics. *Bio. Systematic Ecol.* 11(2):97-106.
- López, M. D.; Jordan, M. J. and Pascual-Villalobos, M. J. 2008. Toxic compounds in essential oils of coriander, caraway and basil active against stored rice pests. *J. Stored Products Res.* 44(3):273-278.
- López-Guzmán, G.; Medina, T. R.; Guillén-Andrade, H.; Ramírez, G. L.; Aguilar, C. J. y Valdivia, R. M. 2012. Características fenotípicas de hoja y fruto en selecciones de aguacate criollo de clima subtropical en el estado de Nayarit. *Revista Fuente.* 4(10):56-62.
- Lorea-Hernández, F. G. 2002. La familia Lauraceae en el sur de México: diversidad, distribución y estado de conservación. *Boletín de la Sociedad Botánica de México.* 71(1):59-70.
- McConkey, M. E.; Gershenzon, J. and Croteau, R. B. 2000. Developmental regulation of monoterpene biosynthesis in the glandular trichomes of peppermint. *Plant Physiol.* 122(1):215-223.
- Medina-Torres, R.; Juárez-López, P.; Salazar-García, S.; López-Guzmán, G. G.; Ibarra-Sanchez, L. S.; Arrieta-Ramos, B. G. y Martínez-Moreno, E. 2015. Evaluación de calidad en frutos de 41 genotipos de nanche (*Byrsonima crassifolia* L. HBK) de Nayarit, México. *Rev. Mex. Cienc. Agríc.* 16(2):253-264.
- Montes-Hernández, S.; de la Torre-Vizcaino, J. D.; Heredia-García, E.; Hernández-Martínez, M. y Camarena-Hernández, M. G. 2017. Caracterización morfológica de germoplasma de aguacate mexicano (*Persea americana* var. *Drymifolia*, lauraceae). *Interciencia.* 42(3):175-180.
- Moreno, H. P. R.; Leite-Lima, M. E.; Rossi-Caruzo, M. B.; Carneiro-Torres, D. S.; Cordeiro, I. and Marx, M. C. 2009. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil from croton heterocalyx Baill. (*Euphorbiaceae* s.s.) Leave. *J. Essential Oil Res.* 21(2):190-192.
- Peakall, R. and Smouse, P. E. 2006. Genalex 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol. Ecol. Notes.* 6(1):288-295.
- Pearson, K. and Filon, L. N. G. 1898. Contributions to the mathematical theory of evolution, IV: on the probable errors of the frequency constants and on the influence of random selection on variation and correlation. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London A.* (191):229-311.
- Quing-Yi, L.; Zang, Y.; Wang, Y.; Wang, D.; Ru-Po, L.; Gao, K.; Birns, R. and Heber, D. 2009. California Hass avocado: profiling of carotenoids, tocopherol, fatty acid, and fat content during maturation and from different growing areas. *J. Agric. Food Chem.* 57(21):10408-10413.
- Rincón-Hernández, C. A.; Sánchez-Pérez, J. y Espinoza-García, F. J. 2011. Caracterización química foliar de los árboles de aguacate criollo (*Persea americana* variedad *Drymifolia*) en los bancos de germoplasma de Michoacán, México. *Rev. Mex. Biod.* 82(2):395-412.
- Romano, J. P. and Wolf, M. 2005. Stepwise multiple testing as formalized data snooping. *Econometrica.* 73(4):1237-1282.

- SAS Institute Inc. 2012. Introduction to bayesian analysis procedures. *In: SAS/STAT 9.2 User's Guide*, Ch. 7. SAS Institute, Inc., Cary, NC. 141-179 pp.
- Senthilkumar, A.; Kannathasan, K. and Venkatesalu, K. 2008. Chemical constituents and larvicidal property of the essential oil of *Blumea mollis* (D. Don) Merr. against *Culex quinquefasciatus*. *Parasitol. Res.* 103(4):959-962.
- Sepúlveda-Jiménez, G.; Porta-Ducoing, H. y Rocha-Sosa, M. 2003. La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Rev. Mex. Fitopatol.* 21(3):355-363.
- SIAP. 2019. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, México. Boletín mensual de producción de aguacate. <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/438986/Bolet-n-mensual-de-la-producci-n-de-aguacate-enero-2019.pdf>.
- Tofiño, A.; Cabal, D. y Gil, L. F. 2012. Análisis de componentes del sistema productivo de aguacate, con incidencia probable de *Phytophthora* en Cesar, Colombia. *Avances en Investigación Agropecuaria.* 06(2):69-90.
- Torres-Gurrola, G.; Montes-Hernández, S. y Espinoza-García, F. J. 2009. Patrones de variación y distribución geográfica en fenotipos químicos foliares de *Persea americana* variedad *Drymifolia*. *Rev. Fitotec. Mex.* 32(1):19-30.
- Torres-Gurrola, G.; García-Rodríguez, Y. M.; Lara-Chávez, Ma. B. N.; Guillén-Andrade, H.; Delgado, G. y Espinosa-García, F. J. 2016. Ecología química y alelopatía: avances y perspectivas. Capítulo 5: análisis de la riqueza de metabolitos secundarios de *Persea* spp. Bajo algunas hipótesis que proponen explicar la función de la diversidad fitoquímica. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Primera edición. ISBN: 978-607-402-912-3. 195-292 pp.
- Velasco-Negueruela, A.; Sanz, J.; Pérez-Alonso, M. J. and Palá-Paúl, J. 2004. The volatile components of the aerial parts of *Melittis melissophyllum* L. subsp. *melissophyllum* gathered in Spain. *Botanica Complutensis.* 28(1):133-136.
- Zani, F.; Massimo, G.; Benvenuti, S.; Bianchi, A.; Albacini, A.; Melegari, M.; Vampa, G.; Belloti, A. and Mazza, P. 1991. Studies on the genotoxic properties of essential oils with *Bacillus subtilis* rec-assay and *Salmonella/microsome* reversion assay. *Planta Medica* 57(03):237-241.