



**UNIVERSIDAD JUÁREZ AUTÓNOMA DE TABASCO**  
División Académica de Ciencias Biológicas  
"Estudio en la duda. Acción en la fe"



---

---

**DIVERSIDAD GENÉTICA, ESTRUCTURA  
Y PERFIL FITOQUÍMICO DE  
*ANNONA MURICATA L.* EN EL SURESTE DE MÉXICO**

**Trabajo recepcional, en la modalidad de  
Tesis de Maestría**

**Para obtener el grado de:**

Maestría en Ciencias Ambientales

**Presenta**

Biol. Heidi Beatriz Montejo Méndez

**Directores:**

Dra. Julia María Leshner Gordillo

Dr. Carlos Ernesto Lobato García

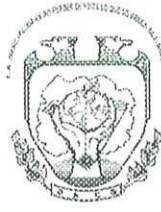
**Villahermosa, Tabasco, México**

**Mayo, 2023**



**UNIVERSIDAD JUÁREZ  
AUTÓNOMA DE TABASCO**

"ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE"



**DIVISIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DIRECCIÓN**

Villahermosa, Tab., a 23 de Mayo de 2023

**ASUNTO:** Autorización de Modalidad de Titulación

**C. LIC. MARIBEL VALENCIA THOMPSON  
JEFE DEL DEPTO. DE CERTIFICACIÓN Y TITULACION  
DIRECCIÓN DE SERVICIOS ESCOLARES  
P R E S E N T E**

Por este conducto y de acuerdo a la solicitud correspondiente por parte del interesado, informo a usted, que en base al reglamento de titulación vigente en esta Universidad, ésta Dirección a mi cargo, autoriza a la **C. HEIDI BEATRIZ MONTEJO MÉNDEZ** egresada de la Maestría en **CIENCIAS AMBIENTALES** de la División Académica de **CIENCIAS BIOLÓGICAS** la opción de titularse bajo la modalidad de Tesis de Maestría denominado: **"DIVERSIDAD GENÉTICA, ESTRUCTURA Y PERFIL FITOQUÍMICO DE ANNONA MURICATA L. EN EL SURESTE DE MÉXICO"**.

Sin otro particular, aprovecho la ocasión para saludarle afectuosamente.

A T E N T A M E N T E

  
**DR. ARTURO GARRIDO MORA  
DIRECTOR DE LA DIVISIÓN ACADÉMICA  
DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**U.J.A.T.  
DIVISIÓN ACADÉMICA  
DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



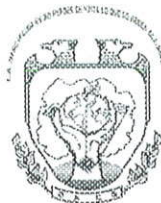
**DIRECCIÓN**

C.c.p. - Expediente Alumno de la División Académica  
C.c.p.- Interesado



**UNIVERSIDAD JUÁREZ  
AUTÓNOMA DE TABASCO**

"ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE"



**DIVISIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DIRECCIÓN**

**MAYO 23 DE 2023**

**C. HEIDI BEATRIZ MONTEJO MÉNDEZ  
PAS. DE LA MAESTRIA EN CIENCIAS AMBIENTALES  
P R E S E N T E**

En virtud de haber cumplido con lo establecido en los Arts. 80 al 85 del Cap. III del Reglamento de titulación de esta Universidad, tengo a bien comunicarle que se le autoriza la impresión de su Trabajo Recepcional, en la Modalidad de Tesis de Maestría en Ciencias Ambientales titulado: **"DIVERSIDAD GENÉTICA, ESTRUCTURA Y PERFIL FITOQUÍMICO DE ANNONA MURICATA L. EN EL SURESTE DE MÉXICO"**, asesorado por la Dra. Julia María Leshher Gordillo y Dr. Carlos Ernesto Lobato García sobre el cual sustentará su Examen de Grado, cuyo jurado integrado por la Dra. Salima Mchkour M'Rabet, Dr. Abraham Gómez Rivera, Dra. Julia María Leshher Gordillo, Dra. Claudia Villanueva García y Dr. Manuel Ignacio Gallardo Alvarez.

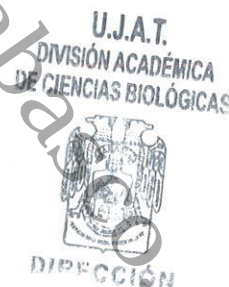
Por lo cual puede proceder a concluir con los trámites finales para fijar la fecha de examen.

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

**ATENTAMENTE  
ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE**

**DR. ARTURO GARRIDO MORA  
DIRECTOR**

C.c.p.- Expediente del Alumno.  
C.c.p.- Archivo





## CARTA AUTORIZACIÓN

El que suscribe, autoriza por medio del presente escrito a la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco para que utilice tanto física como digitalmente el Trabajo Recepcional en la modalidad de Tesis de Maestría denominado: "**DIVERSIDAD GENÉTICA, ESTRUCTURA Y PERFIL FITOQUÍMICO DE *ANNONA MURICATA* L. EN EL SURESTE DE MÉXICO**", de la cual soy autor y titular de los Derechos de Autor.

La finalidad del uso por parte de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco el Trabajo Recepcional antes mencionada, será única y exclusivamente para difusión, educación y sin fines de lucro; autorización que se hace de manera enunciativa más no limitativa para subirla a la Red Abierta de Bibliotecas Digitales (RABID) y a cualquier otra red académica con las que la Universidad tenga relación institucional.

Por lo antes manifestado, libero a la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco de cualquier reclamación legal que pudiera ejercer respecto al uso y manipulación de la tesis mencionada y para los fines estipulados en éste documento.

Se firma la presente autorización en la ciudad de Villahermosa, Tabasco el día 23 de Mayo del dos mil veintitrés

**AUTORIZO**



---

**HEIDI BEATRIZ MONTEJO MÉNDEZ**



UNIVERSIDAD JUÁREZ  
AUTÓNOMA DE TABASCO

"ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE"



División Académica  
de Ciencias Biológicas.

Jefatura de Posgrado.



Villahermosa, Tabasco a 22 de mayo de 2023

**C. HEIDI BEATRIZ MONTEJO MÉNDEZ**  
EGRESADA DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS AMBIENTALES  
PRESENTE

En cumplimiento de los lineamientos de la Universidad, y por instrucciones de la Dirección de Posgrado, se implementó la revisión de los documentos recepcionales (tesis), a través de la plataforma Turnitin iThenticate para evitar el plagio e incrementar la calidad en los procesos académicos y de investigación en esta División Académica. Esta revisión se realizó en correspondencia con el Código de Ética de la Universidad, el Reglamento General de Estudios de Posgrado, el Código Institucional de Ética para la Investigación y con los requerimientos para los posgrados en el SNP-CONACYT.

Por este conducto, hago de su conocimiento las observaciones y el reporte de originalidad de su documento de tesis. Con el objetivo de fortalecer y enriquecer el programa de posgrado, el responsable del programa realizó la revisión del documento en la plataforma iThenticate, obteniendo el reporte de originalidad, el índice de similitud y emitió las siguientes sugerencias y recomendaciones para dar seguimiento en el documento de tesis del proyecto de investigación: **"Diversidad genética, estructura y perfil fitoquímico de *Annona muricata* L. en el sureste de México"**.

OBSERVACIONES:

1. **El índice de similitud obtenido fue de 01%**, el cual se ubica dentro del estándar de tolerancia de acuerdo a las Políticas y Lineamientos para el uso y manejo del Software Antiplagio de la UJAT. Se demuestra el nivel de originalidad del documento y de la investigación.
2. **Se adjunta el informe de originalidad de la tesis** obtenido a través de la herramienta Turnitin iThenticate.

C.c.p. ARCHIVO





**UNIVERSIDAD JUÁREZ  
AUTÓNOMA DE TABASCO**

"ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE"



**División Académica  
de Ciencias Biológicas.**

**Jefatura de Posgrado.**



- Finalmente, se le solicita a la C. Heidi Beatriz Montejo Méndez, integrar en la versión final de tesis, este oficio y el informe de originalidad con el porcentaje de similitud de Turnitin iThenticate.

Sin otro particular al cual referirme, aprovecho la oportunidad para enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
"ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE"

~~DE ARTURO GARRIDO MORA~~  
~~DIRECTOR DACBIOL~~



**U.J.A.T.**  
**DIVISIÓN ACADÉMICA**  
**DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**DIRECCIÓN**

C.C.P. Dra. Julia María Leshner Gordillo. Directora de Tesis.

C.c.p. ARCHIVO

# Diversidad genética, estructura y perfil fitoquímico de *Annona muricata* L. en el sureste de México

INFORME DE ORIGINALIDAD

1 %

ÍNDICE DE SIMILITUD

## FUENTES PRIMARIAS

1	hdl.handle.net Internet	112 palabras — < 1%
2	www.researchgate.net Internet	99 palabras — < 1%
3	E. Giraldo, M.A. Viruel, M. López-corrales, J. I. Hormaza. " Characterisation and cross-species transferability of microsatellites in the common fig ( L.) ", The Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 2015 Crossref	46 palabras — < 1%
4	R.H. Boudchicha, J.I. Hormaza, H. Benbouza. "Diversity analysis and genetic relationships among local Algerian fig cultivars ( <i>Ficus carica</i> L.) using SSR markers", South African Journal of Botany, 2018 Crossref	42 palabras — < 1%
5	bvs.sld.cu Internet	24 palabras — < 1%
6	Nabila El Kadri, Mehdi Ben Mimoun, José Ignacio Hormaza. "Genetic diversity of Tunisian male date palm ( <i>Phoenix dactylifera</i> L.) genotypes using morphological descriptors and molecular markers", Scientia Horticulturae, 2019 Crossref	18 palabras — < 1%



## AGRADECIMIENTOS.

Quiero expresar mi profunda gratitud a aquellas personas que me brindaron su ayuda, apoyo y orientación durante la realización de mi maestría y en la investigación de mi trabajo de tesis.

En primer lugar, agradezco a mis directores de tesis, la Dra. Julia María Leshner Gordillo y el Dr. Carlos Ernesto Lobato García por sus enseñanzas, comprensión y apoyo a lo largo de mi posgrado. Especialmente, a la Dra. Julia por su apoyo incondicional, por creer en mí y por enseñarme todo lo que sé sobre genética hasta ahora.

También quisiera agradecer al Dr. Iñaki Hormaza Urroz y a la Dra. Nerea Larrañaga González por orientarme y brindarme el apoyo necesario para realizar los análisis pertinentes de mi investigación en el Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora". Además, a la Dra. Salima Christine Machkour M'Rabet por su valiosa orientación y comentarios en el análisis de datos.

Mi agradecimiento se extiende al grupo de investigación de productos naturales liderado por el Dr. Abraham Gómez Rivera y el Dr. Carlos Ernesto Lobato García en la DACB-UJAT, quienes me brindaron su apoyo y orientación en el procesamiento y análisis de los datos químicos de mi investigación. Además, agradezco su amable acogida en el grupo de trabajo.

También quiero agradecer a la Dra. Claudia Villanueva García por sus valiosos comentarios y observaciones en mis revisiones.

Asimismo, estoy agradecida con el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por otorgarme la beca de manutención para cursar mi maestría. También agradezco a la División Académica de Ciencias Biológicas por aceptarme como alumna en la Maestría en Ciencias Ambientales. A la Asociación Universitaria Iberoamericana de Postgrado (AUIP) por su apoyo financiero para realizar mis estancias de investigación en el extranjero en las convocatorias "Becaria





Movilidad CUMex-AUIP – 2021” y el “Programa de Movilidad entre Universidades Andaluzas 2022”.

No puedo dejar de agradecer a mis padres, Rosa María Méndez Díaz y Carmen Montejo, por su esfuerzo que me ha llevado a ser quien soy.

Por último, deseo expresar mi agradecimiento a mis compañeros, amigos y técnicos de los distintos laboratorios en los que tuve la oportunidad de estar, trabajar y convivir durante la realización de mi trabajo. Agradezco su apoyo, enseñanzas y orientación a todas estas personas en los laboratorios de Biología genómica en la DACBiol-UJAT, a mis compañeros del laboratorio de Química orgánica en la DACB-UJAT, y a mis compañeros en el departamento Fruticultura Subtropical y Mediterránea del IHSM la Mayora. En especial a Manuel Gallardo, Aminta Hernández y Alejandra Valdés por su gran apoyo y amistad.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.  
México.



## RESUMEN.

*Annona muricata* es una planta perenne neotropical que se cultiva en regiones tropicales de América Central y del Sur, África Occidental, África Central, Oriental y el Sudeste Asiático. En los últimos años ha adquirido gran importancia debido a su interés farmacéutico, especialmente por su contenido de antitumorales. En esta investigación se analizaron 191 muestras de esta especie provenientes de huertos familiares de 4 estados de la región Sur de México. El análisis de diversidad y estructura genética se realizó utilizando 10 marcadores microsatélites. Además, se determinó el contenido metabólico de flavonoides y polifenoles totales y se identificaron 34 compuestos por medio de HPLC. La diversidad genética encontrada se localizó en un rango de baja a moderada en las poblaciones analizadas con un valor de ( $H_e$ : 0.40). Se identificaron 3 grupos genéticos que no están ligados a un orden geográfico. En cuanto al contenido químico se encontraron variaciones en el contenido, posiblemente relacionados al grado de conservación de la región.





## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	<b>4</b>
<b>Lista de tablas</b> .....	<b>7</b>
<b>Lista de figuras</b> .....	<b>7</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>2. HIPOTESIS</b> .....	<b>3</b>
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>4</b>
3.1. Objetivo general .....	4
3.2. Objetivos específicos .....	4
<b>4. JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>5</b>
<b>5. ANTECEDENTES</b> .....	<b>7</b>
5.1. Taxonomía y distribución geográfica.....	7
5.2. Descripción botánica.....	8
5.3. Reproducción y dispersión.....	9
5.4. Usos e importancia.....	9
5.5. Situación del cultivo a nivel mundial.....	10
5.6. Situación del cultivo en México.....	10
5.7. Actividad anticancerígena.....	12
5.8. Actividad antioxidante.....	14
5.9. Fitoquímicos y propiedades medicinales de <i>Anonaceae</i> .....	14
5.10. Producción de metabolitos secundarios en plantas.....	15
5.11. Compuestos fenólicos.....	17
5.12. Flavonoides.....	18
5.12.1. Mecanismo de acción biológica de los flavonoides.....	19
5.13. Polifenoles.....	19
5.13.1. Mecanismo de acción biológica de los polifenoles.....	20
5.14. Factores que influyen en la síntesis de metabolitos secundarios. 20	
5.15. Diversidad y Estructura Genética.....	22
5.16. Diversidad y estructura genética en la familia <i>Annonaceae</i> .....	22
5.17. Diversidad y estructura genética de <i>Annonaceae</i> en México....	23
5.18. Marcadores moleculares para determinar la diversidad genética. • 24	
5.18.1. Microsatélites (SSR).....	24



<b>6. MATERIALES Y METODOS.....</b>	<b>25</b>
6.1. Área de estudio y material vegetal.....	25
6.2. Extracción de ADN y marcadores microsatélites (SSR).....	26
6.3. Análisis de datos moleculares.....	28
6.3.1. Diversidad genética.....	28
6.3.2. Estructura genética.....	28
6.4. Análisis de datos químicos.....	29
6.4.1. Preparación de extractos.....	29
6.4.2. Determinación de polifenoles y flavonoides totales mediante espectrofotometría UV-Vis.....	29
6.4.3. Análisis de HPLC-PDA de extractos de hojas de <i>A. muricata</i> .....	32
6.5. Determinación de la relación entre la diversidad genética y la cantidad de polifenoles y flavonoides en las diferentes regiones de muestreo en el Sureste de México.....	32
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>34</b>
<b>CAPITULO 1-ARTÍCULO.....</b>	<b>44</b>
<b>INFORMACIÓN REVISTA FITOTERAPIA.....</b>	<b>45</b>
<b>CARTA DE ENVIO DEL ARTICULO.....</b>	<b>47</b>
<b>Genetic analysis and phytochemical profiling of soursop (<i>Annona muricata</i> L.) in southeastern Mexico.....</b>	<b>48</b>
<b>CAPITULO 2. DISCUSIÓN GENERAL Y CONSIDERACIONES FINALES....</b>	<b>86</b>
<b>Diversidad y estructura genética en <i>A. muricata</i> en el Sureste de México.....</b>	<b>87</b>
<b>Perfil metabólico de extractos metanólicos de <i>A. muricata</i>.....</b>	<b>90</b>
<b>Contenido total de flavonoides y polifenoles totales.....</b>	<b>90</b>
<b>Análisis por HPLC de los extractos metanólicos de hojas de <i>A. muricata</i>.....</b>	<b>91</b>
<b>Relación entre la diversidad genética y la cantidad de polifenoles y flavonoides en las diferentes regiones de muestreo en el Sureste de México.....</b>	<b>92</b>
<b>CONCLUSIONES Y CONSIDERACIONES FINALES.....</b>	<b>95</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>96</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>97</b>





## Lista de tablas.

<b>Tabla 1.</b> Características de los loci SSR analizados, previamente informados (Escribano et al., 2004, 2008). .....	27
<b>Tabla 2.</b> Ubicación de los sitios de muestreo de las poblaciones de <i>A. muricata</i> L. con el número de individuos utilizados para los análisis y sus coordenadas.....	95

## Lista de figuras.

<b>Figura. 1</b> Partes de <i>Annona muricata</i> L. ....	8
<b>Figura. 2</b> Papel de <i>A. muricata</i> en la apoptosis según lo reportado por (Ilango et al., 2022). .....	13
<b>Figura. 3</b> Esquema general de la vías biosintéticas de metabolitos secundarios en plantas modificado de (Jan et al., 2021).....	16
<b>Figura. 4</b> Clasificación de compuestos fenólicos basado en Jan et al., 2021. 17	
<b>Figura. 5</b> Estructura molecular de rutina.....	18
<b>Figura. 6</b> Estructura molecular del ácido gálico (ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico). .....	20
<b>Figura. 7</b> Diversos factores que afectan la síntesis del contenido de metabolitos secundarios en las plantas modificado según (Verma & Shukla, 2015).....	21
<b>Figura. 8</b> Distribución de los sitios de muestreo de las poblaciones de <i>A. muricata</i> .....	26
<b>Figura. 9.</b> Curvas de calibración construidas para Flavonoides totales.....	30
<b>Figura. 10.</b> Curvas de calibración construidas para Polifenoles totales.....	31
<b>Figura. 11</b> Diagrama del flujo de los métodos implementados para la identificación de la diversidad, estructura y composición química de flavonoides y polifenoles en <i>A. muricata</i> L. ....	33
<b>Figura. 12.</b> Dispersión gráfica de 10 poblaciones de <i>A. muricata</i> a través de escalonamiento multivariado, basado en el contenido químico de polifenoles, flavonoides y estructura genética de plantas de guanábanas en la región Sur de México, llevado a cabo con el programa Statistica 13.3. CU: Cunduacán, CO: Comalcalco, PR: Paraíso, NJ: Nacajuca, CE: Centro, ST: Salto de Agua, PZ: Palizada, PA: Palenque, EZ: Emiliano Zapata, CH: Champotón, F25: Contenido de 25% de Flavonoides, F: Contenido de 50% de Flavonoides, F75%: Contenido de 75% de Flavonoides, P25: Contenido de 25% de Polifenoles, P: Contenido de 50% de Polifenoles, P75%: Contenido de 75% de Polifenoles, Ve: Grupo genético verde, Az: Grupo genético Azul. ....	94
<b>Figura. 13.</b> Cromatoplaqa fase normal de los extractos hexánico (A) Luz visible, (B) Onda larga en lámpara UV.....	103



## 1. INTRODUCCIÓN

*Annona muricata* L. comúnmente conocida como graviola, o guanábana, es una especie perteneciente a la familia de las *Annonaceae*, estas se encuentran distribuidas en la región tropical y subtropical de América, África, Asia y Australia (Pinto et al., 2005). Los frutos de *A. muricata* son consumidos frescos y byogures, mermeladas, licores, entre otros, siendo muy apreciados por sus excelentes propiedades organolépticas, contenido nutricional y energético.

Además, la planta *A. muricata* es utilizada ampliamente tanto en la medicina tradicional como en la farmacéutica, y se han confirmado varias propiedades biológicas. Algunas de estas propiedades demostradas, incluyen su efecto anticancerígeno, antioxidante, anticonvulsivo, antiartrítico, antiparasitario, antipalúdico, hepatoprotector, antidiabético, antimicrobiano y antifúngico (Moghadamtousi et al., 2015; Quítez et al., 2018). Estas propiedades se han verificado mediante la evaluación de la efectividad de los extractos, especialmente en lo que respecta a su efecto anticancerígeno y citotóxico. Estos efectos se atribuyen a la presencia de diversos compuestos bioactivos con propiedades medicinales, los cuales se han aislado de prácticamente todas las partes de la planta, desde las hojas, semillas, tallos, frutos hasta las raíces (Luis M. Hernández Fuentes et al., 2021). Entre los que podemos destacar su contenido en acetogeninas y polifenoles.

La explotación comercial a gran escala de esta especie se ve favorecida por las condiciones geográficas y ambientales de nuestro país. Sin embargo, enfrenta limitaciones debido a factores fitosanitarios, deficiencias en la tecnología de producción y la falta de establecimiento de variedades altamente productivas y resistentes a plagas, entre otros aspectos. Además, es común que los huertos sean establecidos con plantas de semillas, lo que resulta en frutos con una alta variación en forma, tamaño y un bajo rendimiento (Luis Martín Hernández Fuentes et al., 2013).





Por este motivo, los estudios sobre diversidad y estructura genética se consideran una herramienta para clasificar e identificar rasgos potencialmente valiosos. Esto incluye la búsqueda de plantas con una mayor producción de fitoconstituyentes con potenciales terapéuticos contra enfermedades de gran importancia, como el cáncer. Estos estudios nos ayudan a seleccionar variedades que puedan ser utilizadas en programas de conservación y mejora genética. Por otro lado, el conocimiento de la diversidad y estructura genética resulta fundamental para la conservación de los recursos genéticos de este cultivo, los cuales pueden estar sujetos a erosión genética debido a prácticas de cambios de uso de suelo, deforestación o por consecuencias del escenario actual de cambio climático (Larrañaga, 2016), haciendo fundamental la conservación de estos recursos. Si bien existen algunos estudios sobre diversidad genética en *A. muricata* en nuestro país (Lira-Ortiz, Cortés-Cruz, et al., 2022; Talamantes-Sandoval et al., 2019), estos han estado centrados en plantas provenientes exclusivamente de huertos comerciales, en la principal zona productora del país. Por lo que este trabajo tiene como finalidad determinar la diversidad y estructura genética de poblaciones de *A. muricata* en estados del Sur de México, por medio de marcadores moleculares tipo microsatélites (Simple Sequence Repeat -SSR), así como realizar la identificación y cuantificación de compuestos bioactivos presentes en plantas de los diferentes puntos de muestreo, y de esta forma estimar la relación entre ésta y la producción de dichos compuestos en plantas de la región.



## 2. HIPOTESIS.

Las poblaciones de *A. muricata* del Sureste de México presentan una alta diversidad genética. Sin embargo, la cantidad de metabolitos secundarios, específicamente de polifenoles y flavonoides, varía con relación a los genotipos encontrados por zona.

### Preguntas de investigación.

En el presente trabajo se propone responder a las siguientes preguntas con base en lo planteado sobre la situación actual de *A. muricata*:

- ¿La diversidad genética de las poblaciones de plantas de guanábana de la parte Sur de México influyen en la producción y cantidad de metabolitos secundarios de interés médico, como los polifenoles y flavonoides?
- ¿Existen genotipos en las plantas de guanábana en la parte Sur de México que producen mayor concentración de polifenoles y flavonoides?
- ¿En cuál de las poblaciones evaluadas por estado de la parte Sur de México se puede encontrar una mayor diversidad genética relacionada con la producción de polifenoles y flavonoides?





### 3. OBJETIVOS.

#### 3.1. Objetivo general

Determinar la diversidad genética de *A. muricata* en el Sureste de México, y su relación con el contenido de polifenoles y flavonoides.

#### 3.2. Objetivos específicos

- Determinar la diversidad y estructura genética en *A. muricata* en el Sureste de México.
- Identificar polifenoles y flavonoides en extractos de *A. muricata* en plantas del Sureste de México.
- Estimar la relación entre la estructura genética y la cantidad de polifenoles y flavonoides en las diferentes regiones de muestreo en el Sureste de México.



#### 4. JUSTIFICACIÓN.

El cultivo de *A. muricata* ha tomado importancia e interés debido a su potencial como agente antitumoral, anticancerígeno y antioxidante, siendo esto demostrado en diversos estudios *in vitro*. En México *A. muricata* es el cultivo más importante de la familia de las *Annonaceae*. Según información del Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) (SIAP, 2018), los estados con mayor superficie cultivada en el país fueron Nayarit, Michoacán y Colima, sin embargo, el potencial de cultivo en el país es mucho mayor, basado en las condiciones agroclimáticas privilegiadas con las que cuenta la parte Sur de México. Actualmente el 63% de los productores cultivan menos de cinco hectáreas agrícolas (Reyes-Montero et al., 2018).

Las escasas investigaciones realizadas para el cultivo, en materia de información técnico-científica, caracterización genética y el establecimiento de variedades comerciales, hacen que el cultivo se vea limitado. Por lo que el conocimiento de la diversidad, estructura genética y composición química de las poblaciones de guanábana en la zona Sur de México abre la posibilidad para el establecimiento de variedades comerciales con características no solo de importancia alimentaria, sino también medicinal, para la selección de aquellos genotipos con una producción de fitoconstituyentes de relevancia médica. De igual forma, investigaciones en esta especie en la región Sur fomentaría la conservación y uso sustentable de los recursos fitogenéticos de *A. muricata* para evitar la erosión genética del cultivo en el futuro, ya que existe la posibilidad de que el cultivo se encuentre en un latente peligro de pérdida de diversidad genética, debido a que muchos productores prefieren optar por los cambios en el uso de suelo por cultivos mucho más redituables o que representen menos esfuerzo de mantenimiento, ocasionando reemplazo y pérdidas de diversidad (Larrañaga, 2016). Otro aspecto importante que hace relevante conocer y mantener la diversidad genética es que los cultivos pueden llegar a presentar diferencias en la expresión de ciertas características importantes como la resistencia a plagas, temperatura, humedad o producción de frutos o metabolitos secundarios en los



árboles cultivados dependiendo del genotipo, condiciones ambientales, composición del suelo, ubicación geográfica, entre algunas otras. Estas variaciones han sido documentadas por (Valares Masa, 2011), en clones de plantas comerciales bajo diferentes condiciones agroclimáticas, encontrando diferencias significativas en la producción. En *A. muricata* dichas diferencias ya han sido documentadas para la producción de algunos metabolitos secundarios con importancia biológica para algunas poblaciones de los estados de Tabasco y Chiapas, mostrando áreas con mayor o menor producción según las condiciones de cada región (Montejo, 2020). Por lo que podemos pensar que en otras zonas del Sureste de México puedan presentar el potencial de producción de estos compuestos.

Debido a lo anterior, resulta de vital importancia conocer la diversidad y estructura genética de las poblaciones de *A. muricata* en la zona Sur de México, así como la determinación química de metabolitos secundarios de relevancia médica como lo son los polifenoles y flavonoides. Además, la generación de información sobre esta especie en la región puede ser importante para evitar la pérdida de diversidad genética en *A. muricata*, permitiendo así proponer programas de conservación y evitar el desplazamiento de líneas nativas por parte de productores.

Por lo que, en esta investigación, se propone determinar la diversidad y estructura genética de *A. muricata*, así como la cuantificación y determinación química de polifenoles y flavonoides, lo cual permitirá contar con un mejor conocimiento del estado genético y químico de las poblaciones de *A. muricata* en el Sureste de México que permitan el establecimiento de futuras estrategias de selección de genotipos con mejores características de producción de estos metabolitos secundarios.





## 5. ANTECEDENTES.

### 5.1. Taxonomía y distribución geográfica.

*Annona muricata* es comúnmente conocida por Soursop (inglés), graviola (portugués), munolla (India) y guanábana (español latinoamericano).

A continuación, se presenta su **clasificación taxonómica**:

Reino: Plantae

División: Angiospermas

Clase: Magnólidos

Orden: Magnoliales

Familia: Annonaceae

Género: *Annona*

Especie: *Annona muricata* L. (Pinto et al., 2005)

Al género *Annona* pertenecen 162 especies según lo reportado por Chatrou et al. (2012) y están distribuidas principalmente en las zonas tropicales y subtropicales del mundo, particularmente en América. Varias especies de este género son comestibles y de importancia para los mercados locales, entre estas especies se encuentran, *A. cherimola*, *A. reticulata*, *A. squamosa*, *A. macrophyllata*, *A. glabra*, *A. purpurea* y *A. muricata* (Larrañaga, 2016).

*A. muricata* se encuentra ampliamente distribuida en las regiones tropicales de América Central y del Sur, África Occidental, África Central, Oriental y el Sudeste Asiático (Pinto et al., 2005) ; esta especie se puede encontrar en altitudes por debajo de los 1, 200 m sobre el nivel del mar, con temperaturas entre 25 y 28 °C, humedad relativa entre 60% y 80%, y precipitación anual superior a 1, 500 mm (Gavamukulya et al., 2015).

En México se tienen registros de la presencia de 22 géneros y 73 especies según datos del Sistema Nacional de Información de la Biodiversidad (SNIB). En nuestro país las especies cultivadas de esta familia con fines económicos son *A. muricata*, *A. cherimola* Mill., y *A. squamosa*, según registros del SIAP (SIAP, 2018).

## 5.2. Descripción botánica.

*A. muricata* es un árbol perenne, erecto, muy ramificado, el cual puede alcanzar de entre 3 a 8 m de altura; sus ramificaciones suelen ser glabras con coloraciones marrones, presentando un dosel abierto y redondeado de hojas grandes con formas ovadas-oblongas de coloraciones verde brillante, con ápices acuminados (Patel & Patel, 2016). Las flores suelen ser solitarias y presentar coloración entre verde a amarillo, estas presentan tres sépalos deltoides ovados, y seis pétalos de base coriáceos (tres externos y tres internos). Los frutos de *A. muricata* son grandes, con forma oblonga o algo curva, con espinas blandas en el exterior por una cascara coriácea. El peso de los frutos puede llegar a oscilar entre 4 a 8 kg. La pulpa de los frutos se caracteriza por ser jugosa, blanca y fibrosa. Las semillas son numerosas, ovoides y aplanadas, de color marrón oscuro a negro, glabra y brillante, incrustadas en la pulpa (Lim, 2012).

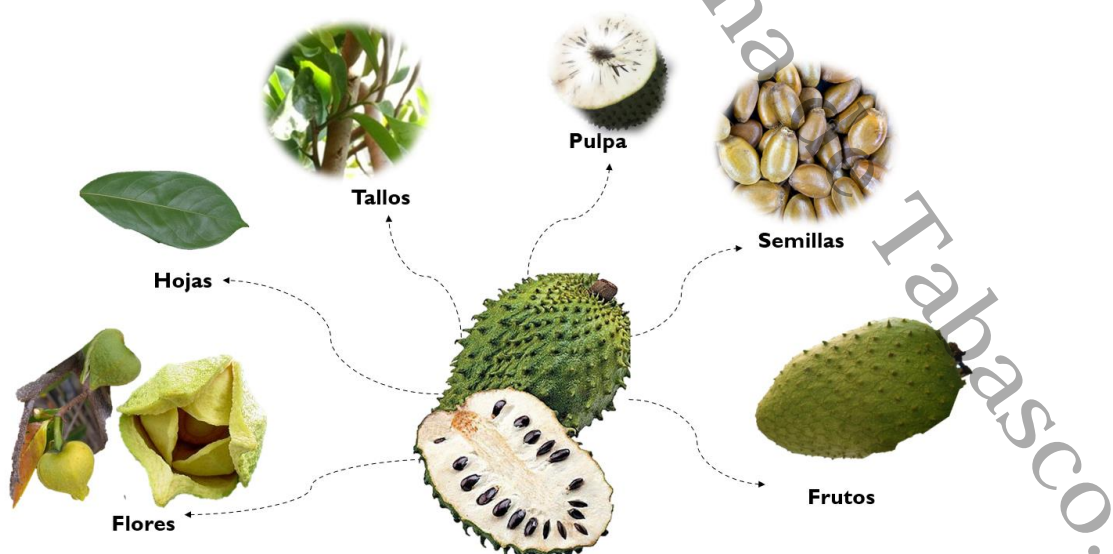


Figura. 1 Partes de *Annona muricata* L.



### 5.3. Reproducción y dispersión.

La guanábana es un árbol que puede propagarse por clonación, mediante técnicas de brote e injerto, sin embargo, la reproducción por semillas es la práctica más común (Morton & Dowling, 1987). La guanábana produce frutos durante todo el año, sin embargo, se tiene una producción más pronunciada durante la primavera y hasta inicios del otoño.

La propagación de *A. muricata* se realiza comúnmente mediante injerto o siembra por semillas (Morton & Dowling, 1987). La polinización y fecundación de la planta, por otro lado, dependen del viento o de polinizadores como los nitidulidae, los cuales son atraídos por medio de fragancias para llevar a cabo la polinización (Nakasone & Paull, 1998), aunque este proceso se ve afectado por varios factores relacionados con las estructuras florales, como la protoginia. En las etapas tempranas de la preantesis y antesis, las estructuras morfológicas cerradas pueden dificultar la polinización por el viento o por insectos de ciertos tamaños. Además, la heterostilia (Pinto & GENU, 1984), la cual consiste en las diferencias estructurales en la posición de los órganos sexuales, hace más difícil el proceso de autofecundación. Aunado a esto, según observaciones realizadas por (Podoler et al., 1985) se necesitan de al menos cuatro polinizadores en la flor, para poder formar frutos regulares. De manera silvestre la polinización inadecuada parece ser uno de los principal factores que limitan el rendimiento y formación de frutos (Anaya-Dyck et al., 2021), por lo que en cultivos con periodos de floración definidos la polinización manual es una práctica estandarizada para la producción comercial (Paull & Duarte, 2012).

### 5.4. Usos e importancia.

La guanábana es importante para la industria alimentaria ya que sus frutos son muy apreciados para la elaboración de yogures, helados y bebidas entre otros productos de interés comercial (Hernández Fuentes et al., 2021). En la medicina tradicional, se tienen registros de su uso en diferentes partes del mundo para combatir múltiples padecimientos, en los que se utilizan todas las partes de la





planta. Entre los padecimientos destacan el uso para el tratamiento de diarrea, gripe, escalofríos, diabetes, fiebre, asma, entre otras (Coria-Téllez et al., 2018a; Patel & Patel, 2016).

También se tienen reportes de que los frutos verdes, las semillas, las hojas y las raíces se utilizan como biopesticidas, bioinsecticidas y repelentes tópicos de insectos (Coria-Téllez et al., 2018a). Todos estos reportes han contribuido con el auge en investigaciones para descifrar los compuestos que le confieren todas sus propiedades.

### 5.5. Situación del cultivo a nivel mundial.

En los últimos años, el cultivo de guanábana ha experimentado un crecimiento constante debido a la alta demanda en el mercado internacional impulsada por su valor nutricional y propiedades medicinales previamente mencionadas, además, de la creciente aceptación por parte de los consumidores de productos no tradicionales. Actualmente, esta fruta se cultiva ampliamente en las regiones tropicales de América Central y del Sur, así como en África Occidental, Central y Oriental, así como en el Sudeste Asiático (Pinto et al., 2005). La guanábana es considerada una de las especies más importantes en términos económicos dentro de la familia *Annonaceae*, siendo los principales países productores Brasil, México y Venezuela, (Strijk et al., 2021).

### 5.6. Situación del cultivo en México.

La guanábana es una de las especies dentro de la familia de las *Annonaceas*, que produce frutos que son explotados por la industria alimentaria. En México, *A. muricata* y *A. chirimola* son las dos especies de esta familia con mayor importancia económica. En 2018, entre los estados productores más importantes se encontraba Nayarit, Puebla, Veracruz, Colima y Michoacán y en menor medida en Guerrero, Tabasco y Campeche.



De acuerdo con datos estadísticos reportados por SAGARPA (2018), en el país se sembró una superficie total de 2702 hectáreas, cosechándose 2198 ha. Con una producción de 22660.95 toneladas de fruta con rendimientos que varían de entre 9 a 38 toneladas/hectáreas. Con un promedio nacional de 11.3 t./ha. Destacando los estados de Nayarit, Puebla, Veracruz. Sin embargo, aunque Nayarit es el estado con los mejores números en cuanto a producción de guanábana, este panorama se debe a que es el estado que posee una mayor superficie de cultivo; en comparación a otros estados, Veracruz, Colima y Tabasco tienen una superficie de siembra mucho menor y a pesar de ello, presentan un mejor rendimiento del cultivo por hectárea sembrada. Esto debido a que en México existe zonas con un mayor potencial de distribución de cultivo. Algunos de los estados en los que se reportan condiciones favorables son Veracruz, Tabasco, Campeche, Yucatán, Quintana Roo y Chiapas.

Sin embargo, su cultivo aún se ve limitado, a pesar de la existencia del gran potencial de cultivo. Si bien existen varios cultivos comerciales establecidos, la mayoría aún se encuentra en huertos familiares de traspatio.

Algunas cuestiones que limitan el crecimiento del cultivo en nuestro país son la variante en los precios de comercialización que hacen que los productores replacen sus cultivos por otros más rentables y aquellos relacionados con aspectos fitosanitarios como el daño por plagas, deficiencias en el desarrollo en la tecnología de producción y el establecimiento de cultivos con plantas con semillas, lo cual produce frutos con alta variabilidad en forma y el tamaño de los frutos; también existen deficiencias en el manejo de huertos, en los que sin polinización manual, el rendimiento se ve limitado.

Además de esto, otro aspecto que contribuye a estas limitaciones es que en México no existían hasta 2021 selecciones o líneas genéticas de guanábana establecidas. Si bien algunos sitios de cultivo cuentan con clones provenientes de Costa Rica y líneas regionales de Veracruz, la producción comercial se encuentra basada en plantas obtenidas con semillas (Hernández Fuentes et al.,



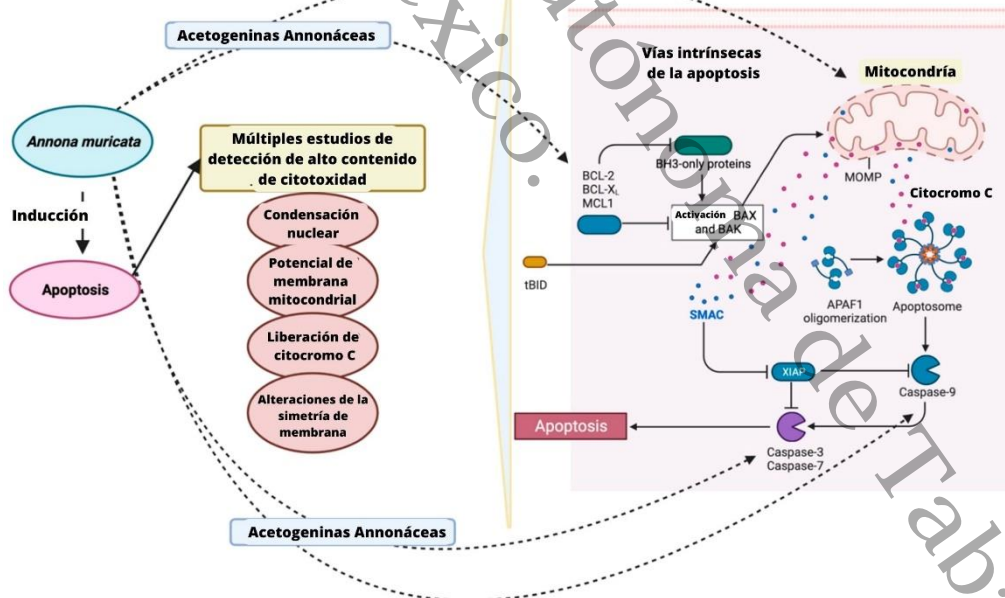
2013). Para solucionar esta situación en el cultivo, algunas instituciones como el Instituto Nacional de Investigación Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) en Nayarit, han fomentado estudios para el establecimiento de líneas genéticas altamente productivas caracterizando y registrando variedades clonales de *A. muricata* (títulos de obtentor: Guanay-1, Guanay-2 y Guanay-3) (Luis M Hernández Fuentes et al., 2021). Sin embargo, estos estudios han estado centrados en procesos de selección manual, mediante cruzamientos basados exclusivamente en la diferenciación visual de características fenotípicas, este tipo de prácticas presentan mucha variación en la forma en la que se establecen las líneas genéticas altamente productivas así como una mayor inversión de tiempo de identificación, ya que se debe esperar a tener individuos adultos, en comparación con métodos moleculares que son más eficientes y puede llevarse a cabo con individuos jóvenes completos, o solo con una parte de la planta.

#### 5.7. Actividad anticancerígena.

Múltiples investigaciones realizadas con extractos de *Annona* han confirmado tener efectiva actividad antitumoral y anticancerígena contra varios tipos de células cancerosas específicas, entre algunos de los estudios se encuentran los realizados en líneas celulares de cáncer de piel (Chamcheu et al., 2018), cáncer de próstata (Foster et al., 2020), cáncer colorrectal (Mesas et al., 2021), cáncer de mama (Najmuddin et al., 2016), células tumorales de pulmón, colon, riñón, próstata y páncreas (Luis M Hernández Fuentes et al., 2021; Schlie-Guzmán et al., 2009). Las propiedades mencionadas anteriormente se deben a su contenido metabólico, en particular a la presencia de acetogeninas. La inclusión del grupo metilo en el resto  $\gamma$ -lactona de su estructura es responsable de su bioactividad, la cual se relaciona con la inhibición de la enzima NADH ubiquinona reductasa. Esta enzima es esencial en el complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial (Makabe et al., 2004; Zeng et al., 1996), lo que permite que estas sustancias inhiban selectivamente el crecimiento de células cancerígenas y células resistentes a fármacos (He et al., 1997). (Chamcheu et al., 2018; Foster et al., 2020; Mesas et al., 2021; Najmuddin et al., 2016)



La interacción de las células con las proteínas Bax y Bcl-2 es crucial para determinar su respuesta antitumoral. Se ha encontrado que los cambios en la permeabilidad de la membrana mitocondrial y la liberación de citocromo c pueden ser atribuidos a la proteína Bcl-2. Cuando la liberación mitocondrial de citocromo c ya no está bloqueada debido a una disminución en la expresión de Bcl-2, se induce la apoptosis y se activan las vías de caspasa para generar caspasa-3 como ejecutores apoptóticos (Elmore, 2007; Ilango et al., 2022). La apoptosis puede ser inducida por las acetogeninas, que disminuyen la expresión de proteínas antiapoptóticas como Bcl-2 y Bcl-xL, lo que a su vez aumenta la expresión de proteínas pro-apoptóticas como Bax y Bad (Ilango et al., 2022; Yuan et al., 2006). Además, las acetogeninas también aumentan la expresión de caspasa 3/7 y caspasa 9, como se muestra en la Figura 2.



**Figura. 2** Papel de *A. muricata* en la apoptosis según lo reportado por (Ilango et al., 2022).



### 5.8. Actividad antioxidante.

Las *Annonaceae* han demostrado tener una alta capacidad antioxidante. Específicamente *A. muricata* ha presentado una potente actividad *in vitro* en comparación con las hojas de otros miembros de la familia, lo que sugiere un papel eficaz como eliminador de radicales libres involucrados en el desarrollo de muchas enfermedades como el cáncer, afecciones cardiovasculares, artritis, así como enfermedades degenerativas como el Parkinson y el Alzheimer (Nandhakumar & Indumathi, 2013). Se ha realizado una compilación de estudios sobre la actividad antioxidante de *A. muricata* teniendo en cuenta diferentes ensayos, las distintas partes de la planta y los diversos tipos de disolventes utilizados (Correa Gordillo et al., 2012). De igual forma se han obtenido reportes de la variación en la composición del extracto según el disolvente utilizado (Gavamukulya et al., 2015).

### 5.9. Fitoquímicos y propiedades medicinales de *Anonaceae*.

Desde hace mucho tiempo, la familia de las *Annonaceae* ha sido ampliamente utilizada en la medicina tradicional, incluso por los pueblos prehispánicos (Colunga-GarcíaMarín & Zizumbo-Villarreal, 2004), gracias a sus numerosas propiedades biológicas asociadas con su contenido metabólico. A través de diversas investigaciones, se ha logrado identificar diferentes fitoconstituyentes que respaldan sus atributos medicinales y nutricionales, tales como carbohidratos, azúcares, vitaminas C, B1 y B2, potasio, fibra dietética, así como compuestos volátiles como ésteres y metilo 2-hexanoato, entre otros. Sin embargo, se ha centrado particularmente en la identificación de ciertos metabolitos secundarios con propiedades medicinales, como los compuestos fenólicos, que cumplen diversas funciones en la planta como nutrición, síntesis proteica, actividad enzimática, fotosíntesis, formación de componentes estructurales y defensa contra factores adversos del ambiente como la agresión por patógenos e insectos (Manach et al., 2004; Valencia-Avilés et al., 2017). En la medicina tradicional, se caracterizan principalmente por tener actividad

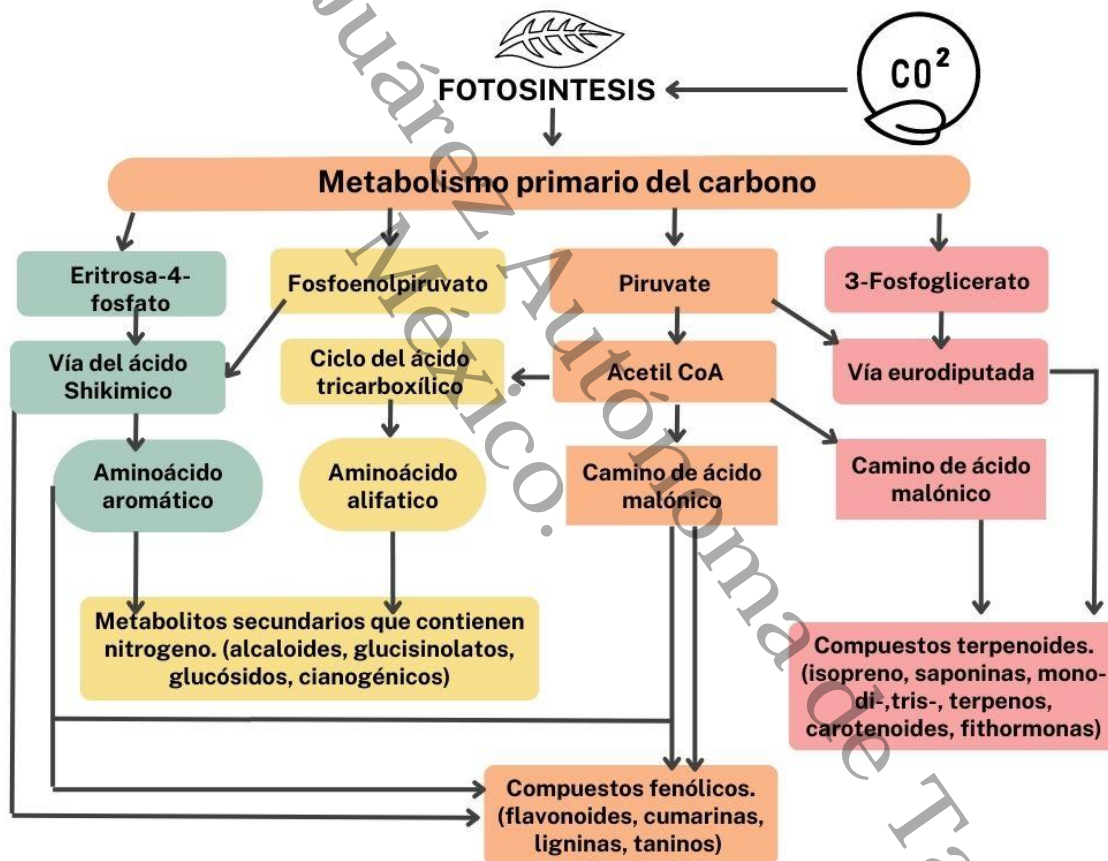


antioxidante, ya que tienen la capacidad para eliminar radicales libres como las especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (NOS) e inhibir enzimas prooxidantes, contribuyendo a la disminución de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo como enfermedades cardiovasculares, el cáncer y neurodegenerativas (Gómez et al., 2016; Sunkireddy et al., 2013; Valencia-Avilés et al., 2017). Además de esta actividad principal, también se le atribuyen propiedades antiinflamatorias (Moreno-Jimenez et al., 2015), antialérgica, antitrombóticas, antimicrobianas, antineoplásicas y anticancerígenas (Valencia-Avilés et al., 2017). Entre los metabolitos secundarios predominantes en los integrantes de la familia *Annonaceae*, destacan los polifenoles y flavonoides. En las hojas de *A. glabra* y *A. senegalensis*, por ejemplo, se ha identificado la presencia de quercetina y otros flavonoides. Además, se han encontrado flavanonas C-benciladas y dihidrochalconas C-benciladas, derivadas de la flavanona pinocembrina, en varias especies del género *Uvaria*, que han demostrado presentar propiedades citotóxicas, antitumorales y antimicrobianas (Leboeuf et al., 1980). Entre algunos de los polifenoles encontrados en *A. muricata* se encuentran el ácido clorogénico, el ácido ferúlico, el ácido p-hidroxibenzoico, el ácido cafeico, el ácido gálico y la epicatequina (Luis M Hernández Fuentes et al., 2021).

#### 5.10. Producción de metabolitos secundarios en plantas.

Las plantas sintetizan una amplia variedad de compuestos químicos esenciales para su mantenimiento, crecimiento, desarrollo y reproducción. Estos compuestos son producidos por diferentes rutas metabólicas y están involucrados en los principales procesos bioquímicos de las células. Los metabolitos primarios son fundamentales para el correcto desarrollo de la planta y se clasifican en carbohidratos, aminoácidos, lípidos, ácidos nucleicos y vitaminas (Jan et al., 2021). Por otro lado, los metabolitos secundarios, aunque no son esenciales, cumplen una variedad de funciones, como la defensa contra depredadores y patógenos, la atracción de polinizadores y la adaptación al ambiente (Kliebenstein, 2013). Estos compuestos se producen a través de vías

metabólicas que responden eficazmente a las condiciones de estrés y se pueden acumular condicionalmente en varias partes de la planta (Jan et al., 2021). Las vías de biosíntesis de los metabolitos secundarios (Figura 3) se clasifican en terpenos, compuestos fenólicos y compuestos que contienen nitrógeno, tales como alcaloides, glucosinolatos y glucósidos cianogénicos (Fang et al., 2011; Verma & Shukla, 2015). Es importante destacar que muchos de estos compuestos son exclusivos de ciertos taxones específicos, como es el caso de las acetogeninas en la familia de las *Annonaceas*.



**Figura. 3** Esquema general de la vías biosintéticas de metabolitos secundarios en plantas modificado de (Jan et al., 2021).





### 5.11. Compuestos fenólicos.

Los compuestos fenólicos constituyen un grupo de metabolitos secundarios esenciales para la defensa de las plantas contra parásitos y plagas (Wuyts et al., 2006). Su estructura química se caracteriza por incluir al menos un anillo fenólico y, según su composición, se pueden clasificar en diferentes tipos (Figura 4). Hasta la fecha se han identificado alrededor de 8.000 estructuras distintas de compuestos fenólicos (Balasundram et al., 2006), y este número sigue en aumento gracias a las investigaciones constantes de nuevos genes y mutaciones como respuesta a los cambios en el entorno (González Barraza et al., 2017; Kiemlian Kwee, 2016).

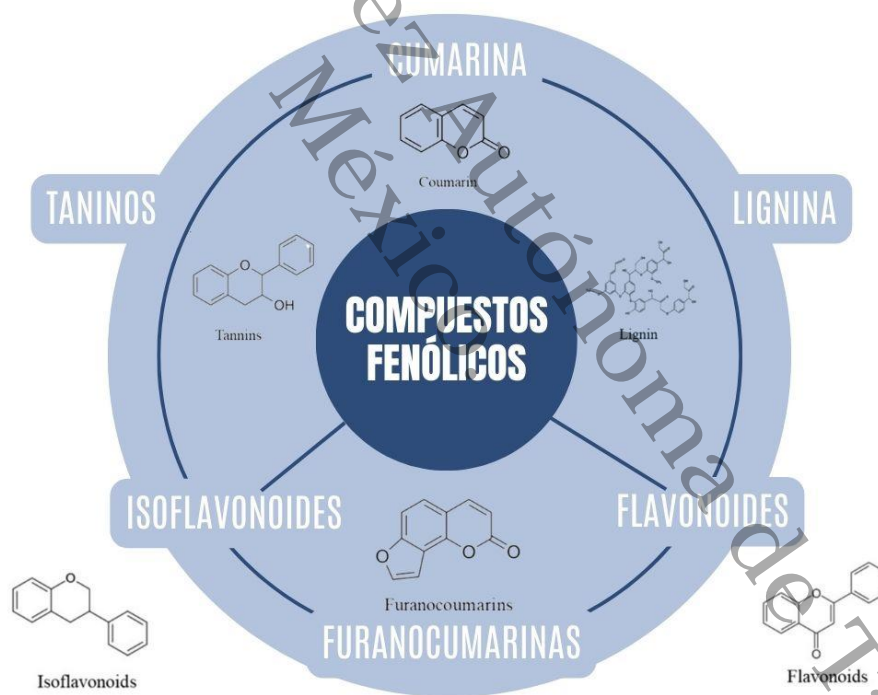


Figura. 4 Clasificación de compuestos fenólicos basado en Jan et al., 2021.



### 5.12. Flavonoides.

Los flavonoides son pigmentos naturales presentes en los vegetales, estos compuestos responden a la luz y controlan los niveles de las auxinas; reguladoras del crecimiento y diferenciación de las plantas, además de cumplir un papel importante en los procesos de polinización y defensa contra depredadores.

Estructuralmente son compuestos de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común de difenilpiranos (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>), conformados por dos anillos de fenilos (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano (heterocíclico). Los átomos de carbono en los anillos C y A se numeran del 2 al 8, y los del anillo B desde el 2' al 6'. La actividad de los flavonoides como antioxidantes depende de las propiedades redox de sus grupos hidroxifenólicos y de la relación estructural entre las diferentes partes de la estructura química (Limón et al., 2010), (Figura 5).

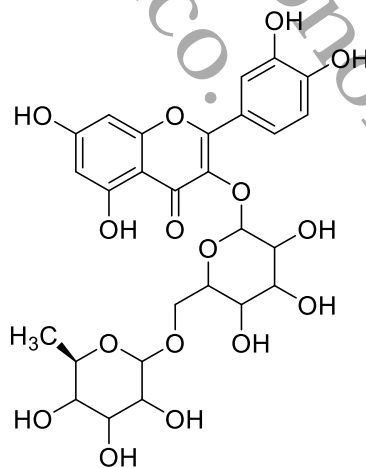


Figura. 5 Estructura molecular de rutina.



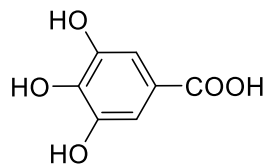
### 5.12.1. Mecanismo de acción biológica de los flavonoides.

Los flavonoides presentan variadas propiedades biológicas, debido a su capacidad de unirse a enzimas, transportadores de hormonas y ADN, así como poseer capacidad de quelación de iones metálicos transitorios, como  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ , y actuar en la depuración de radicales libres (Russo et al., 2000).

Como se había mencionado anteriormente, actúan en la inhibición de oxidasas, evitando la generación de especies reactivas del oxígeno e inhibiendo enzimas involucradas indirectamente en los procesos oxidativos, como la fosfolipasa A2 (Kim et al., 2001) al mismo tiempo que estimulan otras con reconocidas propiedades antioxidantes, como la catalasa y el superóxido dismutasa (Sudheesh et al., 1999).

### 5.13. Polifenoles.

Los polifenoles son un conjunto heterogéneo de moléculas que comparten la característica de poseer en su estructura varios grupos bencénicos que son sustituidos por funciones hidroxílicas (Hernández Ángel & Prieto González, 1999). La biosíntesis de los polifenoles como producto del metabolismo secundario de las plantas tiene lugar a través de dos importantes rutas primarias: la ruta del ácido shikímico y la ruta de los poliacetatos (Bravo, 1998). La ruta del ácido shikímico proporciona la síntesis de los aminoácidos aromáticos (fenilalanina o tirosina) y la síntesis de los ácidos cinámicos y sus derivados (fenoles sencillos, ácidos fenólicos, cumarinas, lignanos y derivados del fenilpropano). La ruta de los poliacetatos proporciona las quinonas y las xantonas (Quiñones et al., 2012), (Figura 6).



**Figura. 6** Estructura molecular del ácido gálico (ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico).

#### 5.13.1. Mecanismo de acción biológica de los polifenoles.

Los polifenoles presentan propiedades biológicas basadas principalmente en su efecto antioxidante, vasodilatador, vasoprotector, antitrombótico, antilipémico, antiaterosclerótico, antiinflamatorio y antiapoptótico (Quiñones et al., 2012). Los polifenoles son los principales antioxidantes de la dieta cotidiana (Rice-Evans & Miller, 1996). Estos pueden interferir con los sistemas de detoxificación celular, como el superóxido dismutasa, la catalasa o la glutatión peroxidasa (Nijveldt et al., 2001). Además, estos compuestos pueden inhibir enzimas generadoras de especies de oxígeno reactivo (EOR o ROS como sus siglas en inglés, reactive oxygen species), como la xantina oxidasa (XOR) y la nicotinamida-adenina dinucleótido fosfato (NADPH) (Orallo et al., 2002).

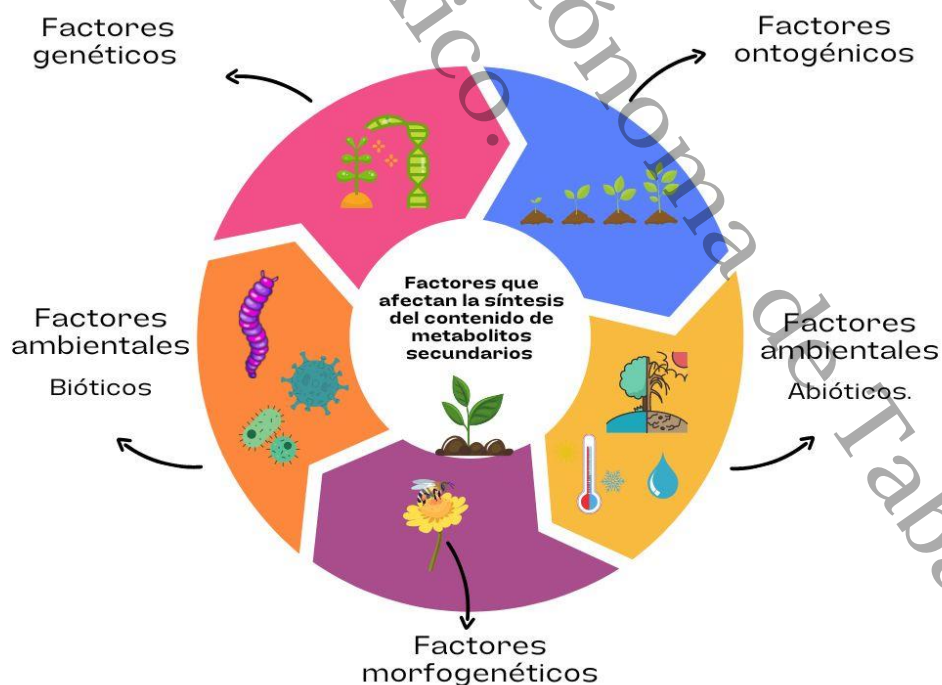
#### 5.14. Factores que influyen en la síntesis de metabolitos secundarios.

La síntesis, acumulación y producción de metabolitos secundarios es muy compleja y están influenciadas por diversos factores tanto genéticos como ambientales, tales como la cantidad de luz, temperatura, disponibilidad de agua, salinidad, suelo y factores estresantes como periodos de sequía, inundaciones, o suelos empobrecidos, entre otros (Li et al., 2020; Verma & Shukla, 2015).

Las vías de producción de metabolitos secundarios son altamente sensibles a las variaciones ambientales, lo que puede provocar la expresión de diferentes genes (Sharma, 2018). Se estima que entre el 15% y el 25% de los genes presentes en el genoma de las plantas están involucrados en la inducción de la síntesis de metabolitos secundarios (Verma & Shukla, 2015). Estos genes son



regulados por diversos factores de transcripción que afectan el proceso metabólico y, por lo tanto, influyen en la expresión génica (Broun et al., 2006). También se pueden encontrar variaciones en la producción, almacenamiento y propiedades medicinales según la parte de la planta (raíces, tallos, hojas, flores, frutos y semillas), así como en tejidos especializados que realizan funciones de secreción, almacenamiento, soporte mecánico, como el tejido laticífero, nectario, glándulas de sal, hidátodos, células secretoras de mucílago, células secretoras de enzimas, células oleosas, tricomas secretoras de aceite, tejidos secretores de flavonoides, etc. (Fahn, 1988). También influye la etapa de desarrollo en la que se encuentre la planta (Broun et al., 2006), así como por el origen geográfico (Li et al., 2020). Podemos clasificar todos los factores mencionados anteriormente en cuatro grupos generales que pueden influir en la síntesis, acumulación y fluctuación de la producción de metabolitos secundarios en las plantas, factores genéticos, ontogénicos, morfogenéticos y ambientales (bióticos y abióticos) (Jan et al., 2021; Verma & Shukla, 2015) (Figura 7).



**Figura. 7** Diversos factores que afectan la síntesis del contenido de metabolitos secundarios en las plantas modificado según (Verma & Shukla, 2015).



### 5.15. Diversidad y Estructura Genética.

Los estudios sobre diversidad y estructura genética son fundamentales para la conservación de los recursos genéticos de las especies, ya que estos pueden verse amenazados por la erosión genética, causada por prácticas de cambio de uso de suelo, deforestación y el cambio climático actual. De igual manera la diversidad genética de las plantas medicinales es crucial para la adaptación a diferentes condiciones ambientales y para la resistencia a enfermedades y plagas (Chen et al., 2021). Además, la estructura genética de las poblaciones de plantas medicinales puede indicar su historia evolutiva y su capacidad para mantener una variabilidad genética adecuada para la supervivencia a largo plazo (Eriksson, 2000).

### 5.16. Diversidad y estructura genética en la familia *Annonaceae*.

La mayoría de los estudios relacionados con especies de la familia de las *Annonaceae* están orientados al aislamiento de compuestos bioactivos, o ensayos biomédicos, sin embargo, pocos estudios abordan el ámbito de diversidad genética en la familia de las *Annonaceae*. La mayoría de ellos se han centrado en el diseño de marcadores moleculares, en la determinación de la variabilidad genética de diferentes zonas, en especies con una relevancia económico comercial como lo son *A. cherimola*, *A. squamosa*, y *A. muricata*, siendo más abundantes en *A. cherimola*.

Uno de estos estudios es el realizado por Brown et al. (2003) en *A. muricata* en el cual estimaron la variabilidad genética entre muestras de Venezuela y Brasil, utilizando marcadores tipo RAPD, siendo las accesiones pertenecientes a Venezuela las más diversas. Entre otros estudios relevantes se encuentran los realizados por Escibano et al. (2004, 2008), los cuales están centrados en el desarrollo de marcadores microsatélites polimórficos de un solo locus utilizando dos bibliotecas genómicas con la especie *A. cherimola*. En este estudio ellos detectaron un total de 222 alelos, siendo la mayoría transferibles a otras especies de *Annonaceae*.



En estudios orientados a la búsqueda del centro de origen, diversidad genética y conservación de los recursos genéticos de plantas tropicales podemos mencionar los trabajos realizados por Larranaga et al. (2017) y Van Zonneveld et al. (2012), los cuales se han basado en la especie *A. cherimola* utilizando marcadores SSR.

Por otro lado Aguilar et al. (2022) realizaron estudios para conocer la diversidad genética de *A. muricata* en Colombia, e identificar cultivares base para el establecimiento preliminar de un programa de mejoramiento genético, evaluando 102 materiales de *A. muricata* colectados en los departamentos de Caldas y Risaralda, mediante 16 marcadores moleculares SSR, encontrando deficiencia de heterocigotos en sus muestras evaluadas.

#### 5.17. Diversidad y estructura genética de *Annonaceae* en México.

En el ámbito Nacional se puede mencionar el realizado por Salazar et al. (2010) en plantas de huertos familiares de Yucatán y Quintana Roo en la especie *A. squamosa*, en el cual ellos evaluaron la distribución de la variabilidad genética, mediante el uso de marcadores isoenzimáticos.

Así también se ha reportado un estudio realizado por Talamantes-Sandoval et al. (2019) en la especie *A. muricata* en el cual se evaluó la capacidad de los marcadores moleculares SRAP (Polimorfismos Amplificados Relacionados con las Secuencias) para determinar la diversidad genética de *A. muricata* en cinco huertos comerciales en la zona de Nayarit, estado que figura como principal productor a nivel nacional, obteniendo resultados favorables para el uso de este tipo de marcadores en la especie. Se ha analizado (Lira-Ortiz, Cortes-Cruz, et al., 2022) la diversidad genética de guanábana de las principales zonas productoras de Compostela, Nayarit, mediante SSR y SRAP, obteniendo una alta homocigosidad y baja diversidad genética de guanábana entre las zonas y poblaciones estudiadas.



### 5.18. Marcadores moleculares para determinar la diversidad genética.

La estructura genética y la distribución de la diversidad genética tanto dentro como entre poblaciones está dada por el flujo genético entre las mismas, la deriva genética y la selección natural (Rao & Hodgkin, 2002). Anteriormente la mayoría de los estudios para la identificación genética en plantas con interés comercial se llevaban a cabo con marcadores morfológicos y caracterización fenotípica, sin embargo, este proceso marca una serie de complicaciones como los tiempos de espera y los costos, lo que restringen el número de genotipos y la precisión en las observaciones. No obstante, la identificación con marcadores morfológicos resultada adecuado para la asociación y complementación en la identificación de fenotipos con genotipos, por lo que es necesario acompañar estas técnicas de estudios con técnicas moleculares (Wünsch & Hormaza, 2002). Los marcadores moleculares, permiten la estimación acertada de la diversidad genética a nivel de individuos, población o grupo de poblaciones. Estos se dividen en dominantes (RAPDs o AFLPs) o codominantes (RFLPs, SNPs o SSR) dependiendo de si los genotipos pueden ser diferenciados entre homocigotos y heterocigotos.

#### 5.18.1. Microsatélites (SSR).

Los marcadores de tipo microsatélite (SSR o STR, Simple Sequence Repeats o Short Tandem Repeats) son marcadores codominantes, y de naturaleza multialélica, los cuales están ampliamente extendidos y son relativamente abundantes, altamente polimórficos, reproducibles y con buenos rendimientos en genotipados. La acción de los SSR se basa en la presencia de secuencias cortas de ADN repetidas y flanqueadas por regiones específicas que permiten su amplificación por PCR. Este tipo de marcadores tienen su fundamento en las diferencias de tamaño de los alelos con los que se asocia a la variación del número de motivos repetidos en tándem (Larranaga et al., 2017). Debido a que las repeticiones no codifican para ninguna proteína estas pueden recombinarse y expandirse con mayor frecuencia en estas regiones, lo que hace que sean a





menudo altamente variables y útiles para medir el polimorfismo entre especies o variedades muy relacionadas (Azofeifa-Delgado, 2006). Estos marcadores son ideales para el estudio de ligamiento genético en planta y el mapeo físico, los estudios poblacionales y la identificación de variedades.

## 6. MATERIALES Y METODOS.

### 6.1. Área de estudio y material vegetal.

Se realizaron muestreos de tejido foliar de 310 árboles, de los cuales se seleccionaron 191 muestras de árboles de *A. muricata* en huertos de traspatio en diferentes municipios ubicados en los estados de Veracruz, Tabasco, Chiapas y Campeche (Figura 8). Cada árbol fue etiquetado con un código único basado en el sitio de recolección y número de muestra, de igual forma se documentaron las coordenadas geográficas con la ayuda de un Sistema de Posicionamiento Global (GPS) en grados, minutos y segundos, descripciones detalladas de los municipios considerados para los análisis en la Tabla 2 ubicada en la sección de anexos. Se colectaron hojas que no presentaran ningún tipo de daño físico, plagas o enfermedades, siendo almacenadas en bolsas de sílica gel para su posterior procesamiento con la finalidad de usarlas en los análisis de diversidad genética. Para el análisis químico se colectó un equivalente a 1 kg. de tejido foliar fresco por cada población evaluada de los estados de Tabasco, Chiapas y Campeche. El tejido vegetal fue secado en una estufa (RSU Labsupply, CD, MEX) a una temperatura no mayor a 45°C y triturado con la ayuda de un molino Pulvex MPP300.

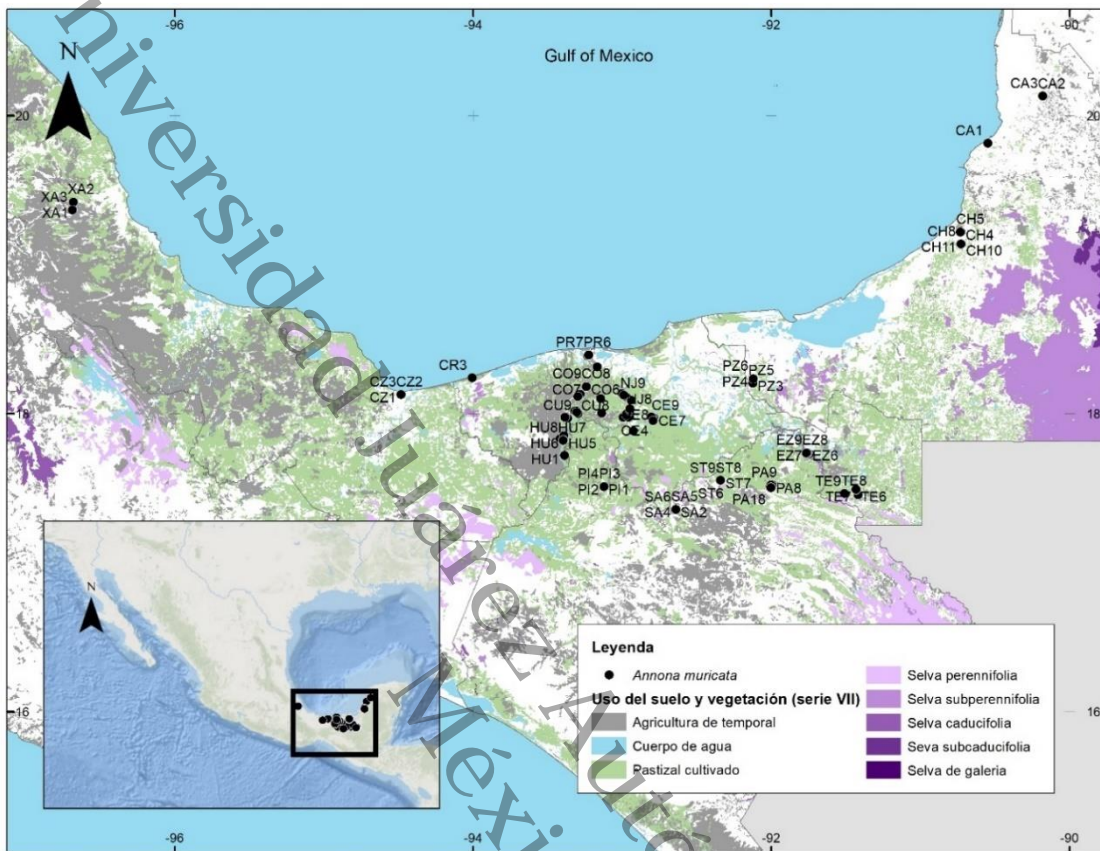


Figura. 8 Distribución de los sitios de muestreo de las poblaciones de *A. muricata*.

## 6.2. Extracción de ADN y marcadores microsatélites (SSR).

Las extracciones de ADN genómico se realizaron siguiendo la metodología citada por Viruel & Hormaza (2004). El cual consiste en un tampón de extracción a base de CTAB y  $\beta$ -mercaptoetanol. La calidad y concentración del ADN extraído se determinó mediante un espectrofotómetro NanoDrop™ One (Thermo Scientific, 17 Waltham, MA, USA) a una longitud de onda de A260/280 nm y A260/230 nm. Se seleccionaron 10 microsatélites diseñados y evaluados para el género de *Annonaceae* por Escribano et al. (2004, 2008), 8 de los cuales ya habían sido probados en la especie de *A. muricata* (Tabla 1) y dos marcadores no probados en previamente en *A. muricata* según reportes de (Escribano et al., 2008). La reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador T100 Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE. UU.) utilizando el siguiente



programa de temperaturas: un paso inicial de 1 min a 94°C, 35 ciclos de 30 seg a 94 ° C, 30 seg a 55 ° C, 1 min a 72 ° C, y una extensión final de 5 min a 72 ° C. Los marcadores forward se marcaron con fluorescencia en el extremo 5, y los productos de PCR se detectaron y dimensionaron con un sistema de análisis de ADN capilar GeXp (Beckman Coulter Genome Lab). Las muestras se desnaturalizaron a 90 °C durante 120 s, se inyectaron a 2,0 kV durante 30 s y se separaron a 6,0 kV durante 35 min. Se utilizaron muestras con alelos previamente identificados como controles positivos para garantizar la precisión del tamaño y minimizar la variación de una serie a otra. Cada reacción de PCR y electroforesis capilar se repitió al menos dos veces para asegurar la reproducibilidad de los resultados.

**Tabla 1.** Características de los loci SSR analizados, previamente informados (Escribano et al., 2004, 2008).

SSR	Secuencia (5´-3´)	Repetición	Temp. (°C)	Tamaño	Tamaño esperado
LMCH5	F: CCCACTCTTCTACCCTCAAC R: CAAGTCCCTGTAAGAATCAGA	(CT)10	55	152-166	155-160
LMCH6	F: GGCATCCTATATTCAGGTTT R: TTAAACATTTTGGACAGACC	(CT)14	55	204-224	220-254
LMCH12	F: TATCTGCTTGAAACCAAAC R: GCATTAGATGAGAAGGACTC	(CT)17	55	152-167	152-168
LMCH21*	F: TTTTATAGGAGGGGAGAGTAGA R: AAAACGACAACATTCCACAC		55	159-172	
LMCH29	F: GTACCATCTTTTAGGAAATC R: TGCAATCTATGTTAGTCAC	(GA)9	55	189-193	185-195
LMCH39	F: AATTTGTATGGTGGTTGACAG R: AGTTGTAGGTGGTTTAAGTTC	(CT)11	55	119-123	187-195
LMCH42	F: TTTATCATTACGAGAGTTATCA R: AAAGTTGTCCTTTTACTCCT	(GA)11	55	175-187	198-202
LMCH79	F: GAAGCAAGTAGACACGTAGTA R: AGGGTTGGTATTTCTTTATAGT	(CT)12	55	206-210	207
LMCH87	F: AGTTAAGACACGAGATGATAAA	(GA)15	55	103-107	133-152



R: CAAGTAAAGACTGAAAGGTTG  
LMCH118\* F: AAAACTATAACCAGGAAGTAAA 55 221-239  
R: AGACTGATGGTCTTTTTCTC

---

\*Reportado previamente para *A. Cherimolla*

---

### 6.3. Análisis de datos moleculares

#### 6.3.1. Diversidad genética

La diversidad genética de las diferentes poblaciones de *A. muricata* fueron determinadas por medio del cálculo de parámetros como la riqueza alélica ( $N_a$ ), número efectivo de la población ( $N_e$ ), heterocigosidad observada ( $H_o$ ), heterocigota esperada ( $H_e$ ), coeficiente de fijación ( $F$ ), utilizando el programa de GenAlex 6.502 (Peakall & Smouse, 2012). El cálculo del equilibrio de Hardy-Weinberg ( $HWE$ ) para el cálculo de déficit de heterocigotos se llevó a cabo usando el programa GENEPOP 4.0.10 (Raymond y Rousset, 1995; Rousset, 2008). Para el cálculo del contenido polimórfico ( $PIC$ ) se utilizó el programa CERVUS 3.0.7. La presencia de alelos nulos por locus fue verificada mediante el uso del programa FreeNa (Chapuis & Estoup, 2007).

#### 6.3.2. Estructura genética

La estructura genética se estimó por medio de varios parámetros de diferenciación, identificación de subestructuras y distancia genética entre las distintas poblaciones analizadas. La diferenciación genética se llevó a cabo mediante el cálculo de los valores de  $F_{ST}$ , así como un análisis de varianza molecular ( $AMOVA$ ) con la ayuda del programa GenAlex 6.502. Para realizar la identificación de la estructura de la población se utilizó el software STRUCTURE v2.3.1 (Pritchard et al. 2000). Aplicando el modelo de ADMIXTURE el cual asume que cada individuo tiene ascendencia de uno o más de  $K$  fuentes genéticamente distintas según los parámetros de corrida mencionados por (Wang, 2017) el





número de poblaciones ( $K$ ) se establecieron de 1 a 20 con un período de inicio de 100,000 reiteraciones seguidas de 1,000,000 iteraciones de cadena de Markov Monte Carlo (MCMC) y un alfa individual para cada población de 0.06 (Pritchard et al., 2000; Wang, 2017). La identificación del número más probable de poblaciones  $K$  según nuestros datos, se determinó usando el método Evanno (Evanno et al., 2005) implementado en el sitio web STRUCTURE HARVESTER (Earl & VonHoldt, 2012). La distancia genética se evaluó por medio de la estimación del coeficiente de  $Nei$  utilizando el software GenAlex y se construyó el Dendrograma con el método de grupos de pares no ponderados con media aritmética (UPGMA) por medio del programa R y posteriormente fue editado con la ayuda del programa Interactive Tree Of Life (iTOL) (Letunic & Bork, 2021).

#### **6.4. Análisis de datos químicos.**

##### **6.4.1. Preparación de extractos**

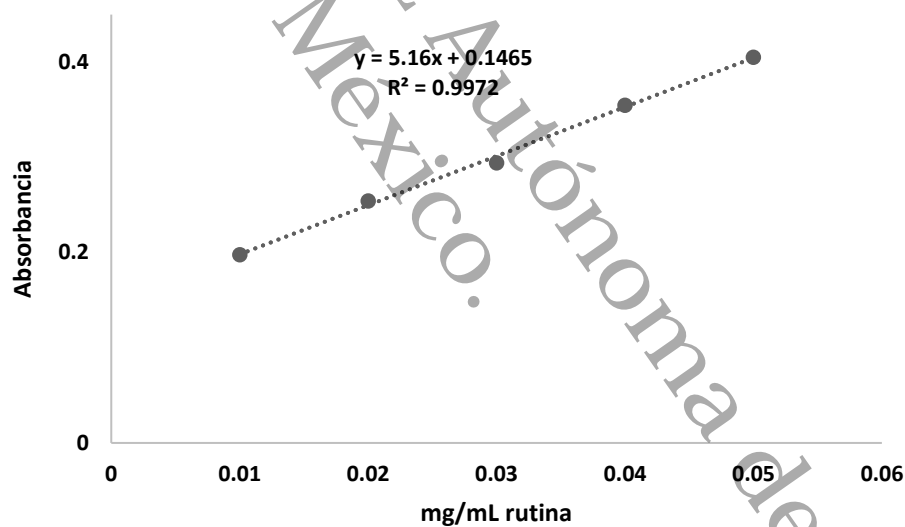
Los extractos fueron preparados mediante maceración exhaustiva de 100 g. del triturado de hojas de *A. muricata* secas de cada uno de los municipios muestreados en matraces Erlenmeyer agregando metanol hasta cubrirlo por completo, y se dejó macerar durante 24 h posteriormente se filtró y se concentró en un rotavapor marca Buchi modelo R300, hasta llegar a sequedad a una temperatura de 59 ° C. Este proceso se realizó dos veces utilizando el mismo material vegetal (Beltrán Villanueva et al., 2013).

##### **6.4.2. Determinación de polifenoles y flavonoides totales mediante espectrofotometría UV-Vis**

Se realizaron ensayos para determinar el contenido total de flavonoides utilizando un método colorimétrico descrito previamente por Zhu et al. (2010). Para cada extracto evaluado, se preparó una curva de calibración utilizando concentraciones de 0.01, 0.02, 0.03, 0.04 y 0.05 mg/mL del estándar rutina. Se disolvieron 10 mg de cada extracto en 2 mL de metanol. A partir de la muestra,



se realizaron diluciones y se tomó una alícuota de 100  $\mu$ L de la disolución resultante. Luego se añadieron 1250  $\mu$ L de agua, seguidos de 75  $\mu$ L de  $\text{NaNO}_2$  al 5%. Después de 5 minutos, se agregaron 150  $\mu$ L de  $\text{AlCl}_3$  al 10%. Pasados 6 minutos, se añadieron 500  $\mu$ L de  $\text{NaOH}$  1M, lo que resultó en la formación de un complejo de color rojo. Las lecturas de absorbancia se realizaron dentro de los primeros 15 minutos después de agregar el  $\text{NaOH}$ . Se preparó un blanco utilizando 100  $\mu$ L de metanol en lugar de la muestra. Para elaborar la curva de calibración, se leyeron las absorbancias a 510 nm del estándar rutina. Luego se tomaron las lecturas de absorbancia de la muestra a la misma longitud de onda que el estándar, lo que representó el contenido total de flavonoides. Cada ensayo se realizó por triplicado y se expresó en mg equivalentes de rutina RE/g de extracto metanólico.

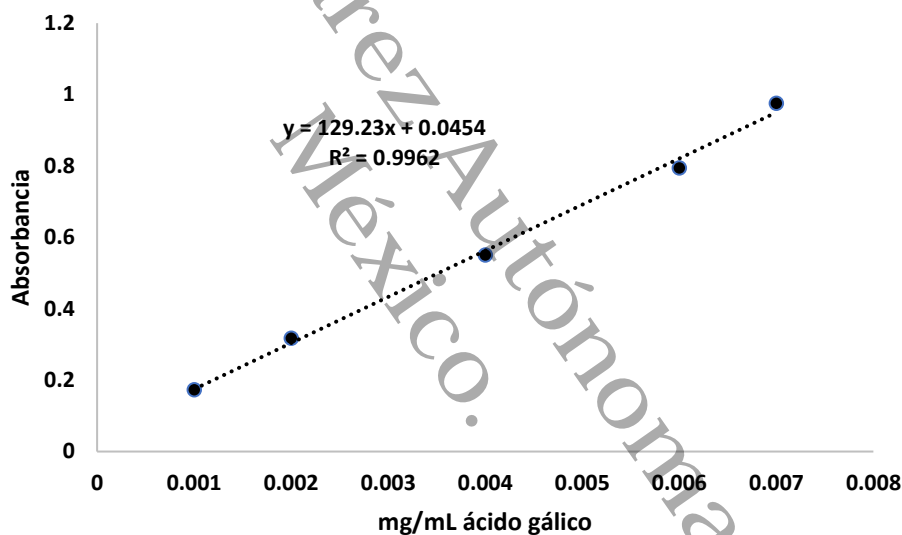


**Figura. 9.** Curvas de calibración construidas para Flavonoides totales.

La determinación de polifenoles totales se realizó utilizando la metodología citada por Rojas et al. (2015). En la cual se elaboró una curva de calibración para determinar los polifenoles totales utilizando concentraciones de 0.001, 0.002, 0.004, 0.006 y 0.007 mg/mL del patrón ácido gálico. Se disolvieron 10 mg de cada extracto en 10 mL de metanol. A partir de la muestra, se realizaron diluciones y se tomó una alícuota de 100  $\mu$ L de la disolución resultante. Luego



se añadieron 1400  $\mu\text{L}$  de agua, seguidos de 250  $\mu\text{L}$  de reactivo de Folin-Ciocalteu 1N. Después de 5 minutos, se agregaron 250  $\mu\text{L}$  de carbonato de sodio al 20%, lo que resultó en la formación de un complejo de color azul. El complejo se dejó reposar durante 2 horas antes de realizar las lecturas. Se preparó un blanco utilizando 100  $\mu\text{L}$  de metanol en lugar de la muestra. Para elaborar la curva de calibración, se leyeron las absorbancias a 760 nm del estándar ácido gálico. Luego se tomaron las lecturas de absorbancia de la muestra a la misma longitud de onda que el estándar, lo que representó el contenido total de polifenoles. Cada ensayo se realizó por triplicado, y fue reportado en mg equivalentes de ácido gálico GAE/g de extracto metanólico.



**Figura. 10.** Curvas de calibración construidas para Polifenoles totales.

Para ambos procesos se utilizó un espectrofotómetro GENESYS™ 10 UV-Vis (Thermo Scientific, 17 Waltham, MA, USA) con celdas de vidrio cilíndricas de 10 mm de diámetro por 100 mm de altura y con una capacidad de 4 mL. Para determinar las diferencias estadísticamente significativas en la cantidad de metabolitos secundarios por población analizada se empleó una prueba estadística de ANOVA. Los contrastes múltiples de rangos se realizaron empleando la prueba de Tukey/Kramer. Las diferentes pruebas estadísticas se



realizaron mediante el software Statgraphics Centurion® V18. El límite confianza de las pruebas estadísticas empleadas fue de  $\alpha = 0.05$ .

#### **6.4.3. Análisis de HPLC-PDA de extractos de hojas de *A. muricata*.**

El análisis cromatográfico se llevó a cabo en un sistema de módulo de separación Waters 2695 con un detector de matriz de fotodiodos Waters 2695 y el software Empower Pro (Waters Corporation, Milford, MA, EE. UU.). La separación química se realizó utilizando una columna Supelcosil LC-F (4,6 mm×250 mm de, tamaño de partícula 5µm) (Sigma-Aldrich, Bellefonte, Pensilvania, EE. UU.). Los parámetros empleados estuvieron basados en los descritos previamente por Gallegos-García et al., 2022, los cuales se describen a continuación, para la fase móvil se realizaron utilizando una solución acuosa de trifluoroacético al 0,5 % (disolvente A) y acetonitrilo (disolvente B) en gradiente: 0-1 min, 0 % de B; 2-3 min, 5% de B; 4-20 min, 30% de B; 21-23 min, 50% de B; 24-25 min, 80% de B; 26-27 min, 100% de B; 28-30 min, 0 % de B. El flujo se bombeo a una velocidad de 0,9 ml/min con un volumen de muestra de 10 µl y la absorbancia se midió a 270 nm. Finalmente se realizó una identificación preliminar de los picos por medio de comparaciones con bandas características de tR y UV-Vis de estándares conocidos y datos de la literatura.

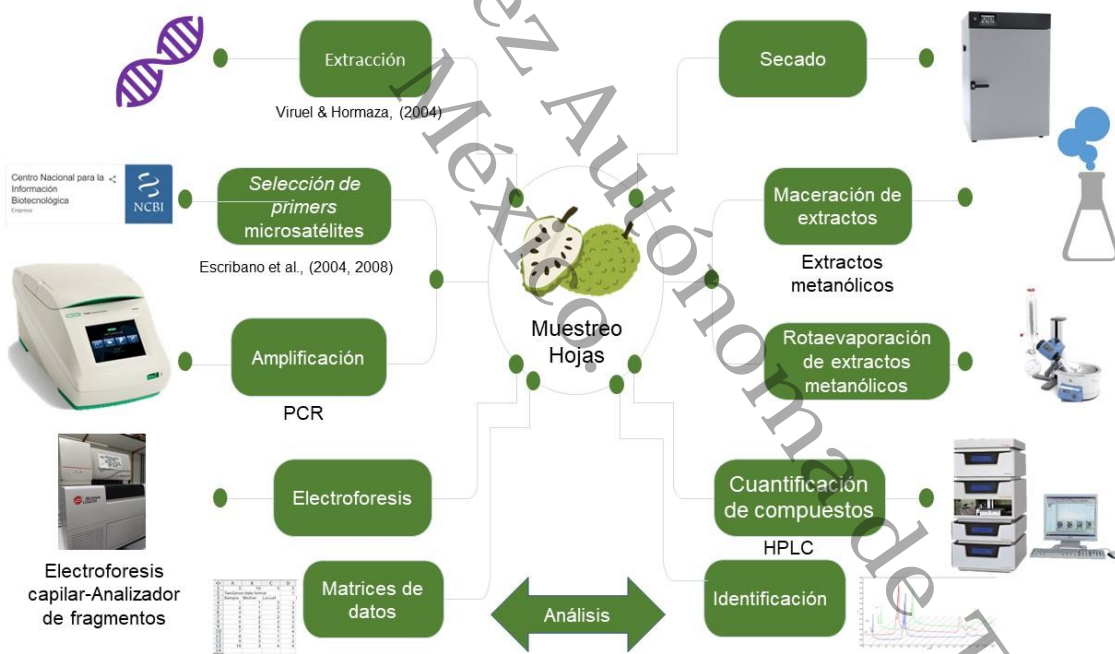
#### **6.5. Determinación de la relación entre la diversidad genética y la cantidad de polifenoles y flavonoides en las diferentes regiones de muestreo en el Sureste de México.**

Para determinar la relación entre la estructura genética y el contenido de polifenoles y flavonoides en las plantas de *A. muricata* de las distintas regiones del Sureste de México, se empleó el método de escalamiento multidimensional basado en una matriz de correlación usando el software Statistica 13.3. (Barroso et al., 2019). Mediante este análisis, se generó una representación gráfica en dos dimensiones que muestra las correlaciones entre los contenidos químicos de polifenoles y flavonoides, considerando diferentes categorías de producción de metabolitos secundarios las cuales fueron de 25%, 50% y 75%, así como la



pertenencia de los diferentes grupos genéticos identificados mediante el programa Structure, considerando datos de las 10 poblaciones evaluadas en el estudio de la identificación fitoquímica de *A. muricata*.

También generamos mapas de distribución para inferir las posibles condiciones ambientales que podrían relacionar los grupos genéticos con el contenido fitoquímico. Los mapas fueron elaborados utilizando el programa QGIS 3.30, se utilizaron datos del Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI, 2009) que incluyen información sobre el uso del suelo y el tipo de suelo en las zonas de estudio. Esta estrategia permitió obtener una visión espacial de las variables ambientales relevantes y su distribución en el área de investigación.



**Figura. 11** Diagrama del flujo de los métodos implementados para la identificación de la diversidad, estructura y composición química de flavonoides y polifenoles en *A. muricata L.*



## BIBLIOGRAFÍA.

- Aguilar, S. B., Kogson, J. F., & Sánchez, C. F. B. (2022). *Annona muricata* L., 1753. Magnoliales. Annonaceae: evaluación preliminar de su diversidad genética en Colombia, mediante marcadores moleculares microsatélites. *Boletín Científico Centro de Museos Museo de Historia Natural*, 26(2), 37–51.
- Agustín, J. A., & Ledesma, S. D. S. (2014a). Conservación y uso de los recursos genéticos de Annonaceae en México. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 36, 118–124.
- Agustín, J. A., & Ledesma, S. D. S. (2014b). Conservation and use of genetic resources of Annonaceae in Mexico. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 36(SPE1), 118–124.
- Amato, K. R., Chaves, Ó. M., Mallott, E. K., Eppley, T. M., Abreu, F., Baden, A. L., Barnett, A. A., Bicca-Marques, J. C., Boyle, S. A., & Campbell, C. J. (2021). Fermented food consumption in wild nonhuman primates and its ecological drivers. *American Journal of Physical Anthropology*, 175(3), 513–530.
- Anaya-Dyck, J. M., Hernández-Oñate, M. Á., Tafolla-Arellano, J. C., Báez-Sañudo, R., Gutiérrez-Martínez, P., & Tiznado-Hernández, M. E. (2021). La cadena productiva de guanábana: una opción para el desarrollo económico en Compostela, Nayarit. *Estudios Sociales. Revista de Alimentación Contemporánea y Desarrollo Regional*, 31(57).
- Anderson, J. T., Saldaña Rojas, J., & Flecker, A. S. (2009). High-quality seed dispersal by fruit-eating fishes in Amazonian floodplain habitats. *Oecologia*, 161, 279–290.
- Balasundram, N., Sundram, K., & Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99(1), 191–203.
- Barroso, P. A., Medeiros, A. M., dos Santos, N. P. S., Silva, D. C. Q., Silva, S. da C., & Gomes, R. L. F. (2019). Phenotypic dispersion of Landrace lima bean varieties using multidimensional scaling. *Journal of Agricultural Science*, 11(13), 178.
- Beltrán Villanueva, C. E., Díaz Castillo, F., & Gómez Estrada, H. (2013). Tamizaje fitoquímico preliminar de especies de plantas promisorias de la costa atlántica colombiana. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 18(4), 619–631.
- Bhandari, H. R., Bhanu, A. N., Srivastava, K., Singh, M. N., & Shreya, H. A. (2017). Assessment of genetic diversity in crop plants-an overview. *Adv. Plants Agric. Res*, 7(3), 279–286.
- Bimmoy, E. D., Ngohayon, J. L., & Valdez, C. C. (2014). *Inspection Chart*



*Mapping of National Power Corporation Watershed Agroforestation Areas.*

- Bravo, L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, 56(11), 317–333.
- Broun, P., Liu, Y., Queen, E., Schwarz, Y., Abenes, M. L., & Leibman, M. (2006). Importance of transcription factors in the regulation of plant secondary metabolism and their relevance to the control of terpenoid accumulation. *Phytochemistry Reviews*, 5, 27–38.
- Cabrera, F. A. V. (2016). *Mejoramiento genético de plantas: Segunda Edición*. Universidad Nacional de Colombia.
- Chamcheu, J., Rady, I., Chamcheu, R.-C., Siddique, A., Bloch, M., Banang Mbeumi, S., Babatunde, A., Uddin, M., Noubissi, F., & Jurutka, P. (2018). Graviola (*Annona muricata*) exerts anti-proliferative, anti-clonogenic and pro-apoptotic effects in human non-melanoma skin cancer UW-BCC1 and A431 cells in vitro: Involvement of hedgehog signaling. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(6), 1791.
- Chapuis, M.-P., & Estoup, A. (2007). Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular Biology and Evolution*, 24(3), 621–631.
- Chatrou, L. W., Pirie, M. D., Erkens, R. H. J., Couvreur, T. L. P., Neubig, K. M., Abbott, J. R., Mols, J. B., Maas, J. W., Saunders, R. M. K., & Chase, M. W. (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(1), 5–40.
- Chen, L., Pan, T., Qian, H., Zhang, M., Yang, G., & Wang, X. (2021). Genetic Diversity and Population Structure Revealed by SSR Markers on Endemic Species *Osmanthus serrulatus* Rehder from Southwestern Sichuan Basin, China. *Forests*, 12(10), 1365.
- Colunga-GarcíaMarín, P., & Zizumbo-Villarreal, D. (2004). Domestication of plants in Maya lowlands. *Economic Botany*, 58(1), S101–S110.
- Coria-Téllez, A. V, Montalvo-González, E., Yahia, E. M., & Obledo-Vázquez, E. N. (2018a). *Annona muricata*: A comprehensive review on its traditional medicinal uses, phytochemicals, pharmacological activities, mechanisms of action and toxicity. *Arabian Journal of Chemistry*, 11(5), 662–691.
- Coria-Téllez, A. V, Montalvo-González, E., Yahia, E. M., & Obledo-Vázquez, E. N. (2018b). *Annona muricata*: A comprehensive review on its traditional medicinal uses, phytochemicals, pharmacological activities, mechanisms of action and toxicity. *Arabian Journal of Chemistry*, 11(5), 662–691.
- Correa Gordillo, J., Ortiz, D., Larrahondo, J. E., Sanchez Mejia, M., & Pachon, H. (2012). Soursop (*Annona muricata* L.) antioxidant activity: a literature review. *Boletín Latinoamericano y Del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas*, 11(2), 111–126.
- Earl, D. A., & VonHoldt, B. M. (2012). STRUCTURE HARVESTER: a website and



- program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*, 4(2), 359–361.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495–516.
- Eriksson, G. (2000). Red europea de conservación de recursos genéticos de frondosas nobles. *Invest. Agr.: Sist. Recur. For.: Fuera de Serie*, 2, 59–69.
- Escribano, P., Viruel, M. A., & Hormaza, J. I. (2004). Characterization and cross-species amplification of microsatellite markers in cherimoya (*Annona cherimola* Mill., Annonaceae). *Molecular Ecology Notes*, 4(4), 746–748.
- Escribano, P., Viruel, M. A., & Hormaza, J. I. (2008). Development of 52 new polymorphic SSR markers from cherimoya (*Annona cherimola* Mill.): transferability to related taxa and selection of a reduced set for DNA fingerprinting and diversity studies. *Molecular Ecology Resources*.
- Escribano, P., Viruel, M. A., & Hormaza, J. I. (2007). Establishment of a core collection to optimise the conservation of cherimoya (*Annona cherimola* Mill.) genetic resources using SSR information. *XII EUCARPIA Symposium on Fruit Breeding and Genetics* 814, 67–70.
- Evanno, G., Regnaut, S., & Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14(8), 2611–2620.
- Fahn, A. (1988). Secretory tissues in vascular plants. *New Phytologist*, 108(3), 229–257.
- Fang, X., Yang, C., Wei, Y., Ma, Q., Yang, L., & Chen, X. (2011). Genomics grand for diversified plant secondary metabolites. *Plant Diversity and Resources*, 33(1), 53–64.
- Foster, K., Oyenih, O., Rademan, S., Erhabor, J., Matsabisa, M., Barker, J., Langat, M. K., Kendal-Smith, A., Asemota, H., & Delgoda, R. (2020). Selective cytotoxic and anti-metastatic activity in DU-145 prostate cancer cells induced by *Annona muricata* L. bark extract and phytochemical, annonacin. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 20(1), 1–15.
- Frankham, R., Ballou, J. D., & Briscoe, D. A. (2004). *A primer of conservation genetics*. Cambridge University Press.
- Gallegos-García, A. J., Lobato-García, C. E., González-Cortazar, M., Herrera-Ruiz, M., Zamilpa, A., Álvarez-Fitz, P., Pérez-García, M. D., López-Rodríguez, R., Ble-González, E. A., & Medrano-Sánchez, E. J. (2022). Preliminary Phytochemical Profile and Bioactivity of *Inga jinicuil* Schitdl & Cham. ex G. Don. *Plants*, 11(6), 794.
- Galluzzi, G., Eyzaguirre, P., & Negri, V. (2010). Home gardens: neglected hotspots of agro-biodiversity and cultural diversity. *Biodiversity and Conservation*, 19, 3635–3654.





- García Martínez, E. M., Fernández Segovia, I., & Fuentes López, A. (2015). *Determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu*.
- Gavamukulya, Y., Abou-Elella, F., Wamunyokoli, F., & El-Shemy, H. A. (2015). GC-MS analysis of bioactive phytochemicals present in ethanolic extracts of leaves of *Annona muricata*: A further evidence for its medicinal diversity. *Pharmacognosy Journal*, 7(5).
- George, V. C., Kumar, D. R. N., Suresh, P. K., & Kumar, R. A. (2015). Antioxidant, DNA protective efficacy and HPLC analysis of *Annona muricata* (soursop) extracts. *Journal of Food Science and Technology*, 52, 2328–2335.
- González Barraza, L., Díaz Godínez, R., Castillo Guevara, C., Nieto Camacho, A., & Méndez Iturbide, D. (2017). Compuestos fenólicos: presencia, identificación y propiedades antioxidantes en plantas y frutos. *Mexican Journal of Biotechnology*, 2(1), 46–64.
- Havsteen, B. (1983). Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochemical Pharmacology*, 32(7), 1141–1148. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(83\)90262-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(83)90262-9)
- Hernández-Fuentes, Luis M, Bautista-Martínez, N., Carrillo-Sánchez, J. L., Sánchez Arroyo, H., Urias-López, M. A., & Salas Araiza, M. D. (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.
- Hernández-Fuentes, Luis Martín, Nolasco-González, Y., Orozco-Santos, M., & Montalvo-Gonzalez, E. (2021). Toxicidad de insecticidas contra (*Optatus palmaris* Pascoe) en guanábana. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 12(1), 49–60.
- Hernández Ángel, M., & Prieto González, E. A. (1999). Plantas que contienen polifenoles: Antioxidantes dentro del estilo de vida. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 18(1), 12.
- Hernández Fuentes, Luis M, Montalvo González, E., García Magaña, M. de L., Anaya Esparza, L. M., Nolasco González, Y., Villagrán, Z., González Torres, S., Velázquez Monreal, J. J., & Morelos Flores, D. A. (2021). Current Situation and Perspectives of Fruit Annonaceae in Mexico: Biological and Agronomic Importance and Bioactive Properties. *Plants*, 11(1), 7. <https://doi.org/10.3390/plants11010007>
- Hernández Fuentes, Luis Martín, Gómez Jaimes, R., & Andrés Agustín, J. (2013). *Importancia, plagas insectiles y enfermedades fungosas del cultivo del guanábano* (Primera). Instituto Nacional de Inestigaciones forestales, agricolas y pecuarias.
- Ilango, S., Sahoo, D. K., Paital, B., Kathirvel, K., Gabriel, J. I., Subramaniam, K., Jayachandran, P., Dash, R. K., Hati, A. K., & Behera, T. R. (2022). A review on *annona muricata* and its anticancer activity. *Cancers*, 14(18), 4539.





- Jan, R., Asaf, S., Numan, M., & Kim, K.-M. (2021). Plant secondary metabolite biosynthesis and transcriptional regulation in response to biotic and abiotic stress conditions. *Agronomy*, 11(5), 968.
- Karlsson, S., & Mork, J. (2005). Deviation from Hardy–Weinberg equilibrium, and temporal instability in allele frequencies at microsatellite loci in a local population of Atlantic cod. *ICES Journal of Marine Science*, 62(8), 1588–1596. <https://doi.org/10.1016/j.icesjms.2005.05.009>
- Kiemlian Kwee, J. (2016). Yin and Yang of polyphenols in cancer prevention: a short review. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, 16(7), 832–840.
- Kliebenstein, D. J. (2013). Making new molecules—evolution of structures for novel metabolites in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 16(1), 112–117.
- Kurepin, L. V, Ivanov, A. G., Zaman, M., Pharis, R. P., Hurry, V., & Hüner, N. P. A. (2017). *Interaction of Glycine Betaine and Plant Hormones: Protection of the Photosynthetic Apparatus During Abiotic Stress BT - Photosynthesis: Structures, Mechanisms, and Applications* (H. J. M. Hou, M. M. Najafpour, G. F. Moore, & S. I. Allakhverdiev (eds.); pp. 185–202). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-48873-8\\_9](https://doi.org/10.1007/978-3-319-48873-8_9)
- Larrañaga, N. (2016). *Origen, dispersión y diversidad del chirimoyo (Annona cherimola Mill.) en el continente americano*. Universidad Politécnica de Madrid.
- Larranaga, N., Albertazzi, F. J., Fontecha, G., Palmieri, M., Rainer, H., Van Zonneveld, M., & Hormaza, J. I. (2017). A Mesoamerican origin of cherimoya (*Annona cherimola* Mill.): Implications for the conservation of plant genetic resources. *Molecular Ecology*, 26(16), 4116–4130.
- Letunic, I., & Bork, P. (2021). Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic Acids Research*, 49(W1), W293–W296. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab301>
- Li, Y., Kong, D., Fu, Y., Sussman, M. R., & Wu, H. (2020). The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 148, 80–89. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.01.006>
- Lim, T. K. (2012). *Annona muricata*. In *Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants* (pp. 206–209). Springer. <https://doi.org/DOI 10.1007/978-90-481-8661-7>
- Limón, D., Díaz, A., Mendieta, L., Luna, F., Zenteno, E., & Guevara, J. (2010). Los flavonoides: mecanismo de acción, neuroprotección y efectos farmacológicos. *Mensaje Bioquímico*, 34(1), 143–155.
- Lira-Ortiz, R., Cortes-Cruz, M. A., Lopez-Guzman, G. G., Palomino-Hermosillo, Y. A., Sandoval-Padilla, I., Ochoa-Jimenez, V. A., Sanchez-Herrera, L. M., Balois-Morales, R., & Berumen-Varela, G. (2022). Genetic diversity of



- soursop populations (*Annona muricata* L.) in Nayarit, Mexico using SSR and SRAP markers. *Acta Biológica Colombiana*, 27(1), 104–112.
- Lira-Ortiz, R., Cortés-Cruz, M. A., López-Guzmán, G. G., Palomino-Hermosillo, Y. A., Sandoval-Padilla, I., Ochoa-Jiménez, V. A., Sánchez-Herrera, L. M., Balois-Morales, R., & Berumen-Varela, G. (2022). Diversidad Genética de poblaciones de guanábana (*Annona muricata* L.) en Nayarit, México mediante marcadores SSR y SRAP. *Acta Biológica Colombiana*, 27(1), 104–112.
- Liu, M., Li, X. Q., Weber, C., Lee, C. Y., Brown, J., & Liu, R. H. (2002). Antioxidant and antiproliferative activities of raspberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(10), 2926–2930.
- Mabry, T., Markham, K. R., & Thomas, M. B. (2012). *The systematic identification of flavonoids*. Springer Science & Business Media.
- Makabe, H., Hattori, Y., Kimura, Y., Konno, H., Abe, M., Miyoshi, H., Tanaka, A., & Oritani, T. (2004). Total synthesis of cis-solamin and its inhibitory action with bovine heart mitochondrial complex I. *Tetrahedron*, 60(47), 10651–10657. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2004.09.011>
- Mesas, C., Martínez, R., Ortiz, R., Quinonero, F., Prados, J., Porres, J. M., & Melguizo, C. (2021). Antioxidant and antiproliferative potential of ethanolic extracts from *Moringa oleifera*, *Tropaeolum tuberosum* and *Annona cherimola* in colorectal cancer cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 143, 112248.
- Moreno-Jimenez, M. R., Trujillo-Esquivel, F., Gallegos-Corona, M. A., Reynoso-Camacho, R., González-Laredo, R. F., Gallegos-Infante, J. A., Rocha-Guzmán, N. E., & Ramos-Gomez, M. (2015). Antioxidant, anti-inflammatory and anticarcinogenic activities of edible red oak (*Quercus* spp.) infusions in rat colon carcinogenesis induced by 1, 2-dimethylhydrazine. *Food and Chemical Toxicology*, 80, 144–153.
- Morton, J. F., & Dowling, C. F. (1987). *Fruits of warm climates* (Vol. 20534). JF Morton Miami, FL.
- Najmuddin, S. U. F. S., Romli, M. F., Hamid, M., Alitheen, N. B., & Rahman, N. M. A. N. A. (2016). Anti-cancer effect of *Annona Muricata* Linn Leaves Crude Extract (AMCE) on breast cancer cell line. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 16(1), 311.
- Nakasone, H. Y., & Paull, R. E. (1998). *Tropical fruits*. Cab International.
- Nam, J.-S., Park, S.-Y., Jang, H.-L., & Rhee, Y. H. (2017). Phenolic compounds in different parts of young *Annona muricata* cultivated in Korea and their antioxidant activity. *Applied Biological Chemistry*, 60(5), 535–543.
- Nandhakumar, E., & Indumathi, P. (2013). In vitro antioxidant activities of methanol and aqueous extract of *Annona squamosa* (L.) fruit pulp. *Journal of Acupuncture and Meridian Studies*, 6(3), 142–148.



- Nawwar, M., Ayoub, N., Hussein, S., Hashim, A., El-Sharawy, R., Wende, K., Harms, M., & Lindequist, U. (2012). Flavonol triglycoside and investigation of the antioxidant and cell stimulating activities of *Annona muricata* Linn. *Archives of Pharmacal Research*, 35, 761–767.
- Nijveldt, R. J., Van Nood, E. L. S., Van Hoorn, D. E. C., Boelens, P. G., Van Norren, K., & Van Leeuwen, P. A. M. (2001). Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 74(4), 418–425.
- Orallo, F., Álvarez, E., Camiña, M., Leiro, J. M., Gómez, E., & Fernández, P. (2002). The possible implication of trans-resveratrol in the cardioprotective effects of long-term moderate wine consumption. *Molecular Pharmacology*, 61(2), 294–302.
- Pant, P., Pandey, S., & Dall'Acqua, S. (2021). The influence of environmental conditions on secondary metabolites in medicinal plants: A literature review. *Chemistry & Biodiversity*, 18(11), e2100345.
- Patel, M. S., & Patel, J. K. (2016). A review on a miracle fruits of *Annona muricata*. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 5(1), 137.
- Peakall, R., & Smouse, P. E. (2012). GenAlEx Tutorials-Part 2: Genetic distance and analysis of molecular variance (AMOVA). *Bioinformatics*, 28, 2537–2539.
- Pinto, A. C. de Q., Cordeiro, M. C. R., De Andrade, S. R. M., Ferreira, F. R., Filgueiras, H. A. de C., Alves, R. E., & Kinpara, D. I. (2005). *Annona species*.
- Podoler, H., Galon, I., & Gazit, S. (1985). The effect of atemoya flowers on their pollinators: nitidulid beetles [*Annona squamosa* x *Annona cherimola*]. *Acta Oecologica Oecologia Applicata (France)*.
- Pritchard, J. K., Stephens, M., & Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155(2), 945–959.
- Quiñez, A. M., Fernández-Arche, M. A., García-Giménez, M. D., & De la Puerta, R. (2018). Potential therapeutic applications of the genus *Annona*: Local and traditional uses and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*, 225, 244–270.
- Quiñones, M., Miguel, M., & Aleixandre, A. (2012). The polyphenols, naturally occurring compounds with beneficial effects on cardiovascular disease. *Nutrición Hospitalaria*, 27(1), 76–89.
- Rao, V. R., & Hodgkin, T. (2002). Genetic diversity and conservation and utilization of plant genetic resources. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 68(1), 1–19.
- Reyes-Montero, J. A., Aceves-Navarro, E., Caamal-Velázquez, J. H., & Alamilla-Magaña, J. C. (2018). Producció de guanábana (*Annona muricata* L.) en alta densidad de plantacion, como alternativa para productores con superficies reducidas soursop (*Annona muricata* L.) production in high density planting



- as alternative for producers with reduced surfaces. *PROCESSED CHAYOTE*, 11(9), 37–42.
- Rice-Evans, C. A., & Miller, N. J. (1996). Antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of food. *Biochemical Society Transactions*, 24(3), 790–795.
- Rojas, L., Jaramillo, C., & Lemus, M. (2015). Métodos analíticos para la determinación de metabolitos secundarios de plantas. *Universidad Machala, Ecuador*.
- Rousset, F. (2008). genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, 8(1), 103–106.
- Salazar, C., Vargas-Mendoza, C. F., & Flores, J. S. (2010). Estructura y diversidad genética de *Annona squamosa* en huertos familiares mayas de la península de Yucatán. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 81(3), 759–770.
- Sánchez, J. Á. (2001). Descomposición y ciclo de nutrientes en ecosistemas terrestres de México. *ACTA ZOOLOGICA MEXICANA (NS)*, 11–27.
- Schlie-Guzmán, M. A., González-Esquinca, A. R., & Luna-Cazáres, L. M. (2009). Las acetogeninas de Annonaceae: efecto antiproliferativo en líneas celulares neoplásicas. *Boletín Latinoamericano y Del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 8(4), 245–257.
- Sharma, A. (2018). Gene expression analysis in medicinal plants under abiotic stress conditions. In *Plant metabolites and regulation under environmental stress* (pp. 407–414). Elsevier.
- SIQUEIRA, A. D. M. O., MOREIRA, A. C. C. G., MELO, E. D. A., STAMFORD, T. C. M., & STAMFORD, T. L. M. (2015). DIETARY FIBRE CONTENT, PHENOLIC COMPOUNDS AND ANTIOXIDANT ACTIVITY IN SOURSOPS (*Annona muricata* L.). *Revista Brasileira de Fruticultura*, 37(4), 1020–1026. <https://doi.org/10.1590/0100-2945-211/14>
- Spencer, H. J., & Fleming, T. H. (1989). Roosting and Foraging Behavior of the Queensland Tube-Nosed Bat, *Nyctimene-Robinsoni* (Pteropodidae)-Preliminary Radio-Tracking Observations. *Wildlife Research*, 16(4), 413–420.
- Strijk, J. S., Hinsinger, D. D., Roeder, M. M., Chatrou, L. W., Couvreur, T. L. P., Erkens, R. H. J., Sauquet, H., Pirie, M. D., Thomas, D. C., & Cao, K. (2021). Chromosome-level reference genome of the soursop (*Annona muricata*): A new resource for Magnoliid research and tropical pomology. *Molecular Ecology Resources*, 21(5), 1608–1619.
- Talamantes-Sandoval, C. A., Cortés-Cruz, M., Balois-Morales, R., López-Guzmán, G. G., & Palomino-Hermosillo, Y. A. (2019). ANÁLISIS MOLECULAR DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA EN GUANÁBANA (*Annona*





- muricata* L.) MEDIANTE MARCADORES SRAP. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 42(3), 209–214.
- Tóth, E. G., Tremblay, F., Housset, J. M., Bergeron, Y., & Carcaillet, C. (2019). Geographic isolation and climatic variability contribute to genetic differentiation in fragmented populations of the long-lived subalpine conifer *Pinus cembra* L. in the western Alps. *BMC Evolutionary Biology*, 19, 1–17.
- Valares Masa, C. (2011). *Variación del metabolismo secundario en plantas debida al genotipo y al ambiente*. Universidad de Extremadura. Servicio de Publicaciones.
- Valencia-Avilés, E., Ignacio-Figueroa, I., Sosa-Martínez, E., Bartolomé-Camacho, M. C., Martínez-Flores, H. E., & García-Pérez, M.-E. (2017). Polifenoles: propiedades antioxidantes y toxicológicas. *Revista de La Facultad de Ciencias Químicas*, 16, 15–29.
- Verma, N., & Shukla, S. (2015). Impact of various factors responsible for fluctuation in plant secondary metabolites. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 2(4), 105–113. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2015.09.002>
- Viruel, M. A., & Hormaza, J. I. (2004). Development, characterization and variability analysis of microsatellites in lychee (*Litchi chinensis* Sonn., Sapindaceae). *Theoretical and Applied Genetics*, 108(5), 896–902.
- Wang, J. (2017). The computer program structure for assigning individuals to populations: easy to use but easier to misuse. *Molecular Ecology Resources*, 17(5), 981–990.
- Wu, J., Yu, Y., Wang, Y., Bao, M.-F., Shi, B.-B., Schinnerl, J., & Cai, X.-H. (2019). Four yellow monoterpenoid quinoline alkaloids from the stem of *Tabernaemontana bovina*. *Organic Letters*, 21(12), 4554–4558.
- Wuyts, N., De Waele, D., & Swennen, R. (2006). Extraction and partial characterization of polyphenol oxidase from banana (*Musa acuminata* Grande naine) roots. *Plant Physiology and Biochemistry*, 44(5–6), 308–314.
- Young, A., Boyle, T., & Brown, T. (1996). The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. *Trends in Ecology & Evolution*, 11(10), 413–418.
- Yuan, S.-S. F., Chang, H.-L., Chen, H.-W., Kuo, F.-C., Liaw, C.-C., Su, J.-H., & Wu, Y.-C. (2006). Selective cytotoxicity of squamocin on T24 bladder cancer cells at the S-phase via a Bax-, Bad-, and caspase-3-related pathways. *Life Sciences*, 78(8), 869–874.
- Zeng, L., Ye, Q., Oberlies, N. H., Shi, G., Gu, Z.-M., He, K., & McLaughlin, J. L. (1996). Recent advances in annonaceous acetogenins. *Natural Product Reports*, 13(4), 275–306. <https://doi.org/10.1039/NP9961300275>
- Zhang, Q., & Huang, Q. (2018). Revised method for determining *Ganoderma lingzhi* terpenoids by UV-Vis spectrophotometry based on colorimetric





vanillin perchloric acid reaction. *Mycosystema*, 37(12), 1792–1801.

Zhu, H., Wang, Y., Liu, Y., Xia, Y., & Tang, T. (2010). Analysis of flavonoids in *Portulaca oleracea* L. by UV–vis spectrophotometry with comparative study on different extraction technologies. *Food Analytical Methods*, 3, 90–97.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.  
México.



Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.

**CAPITULO 1-ARTÍCULO**  
**Genetic diversity, structure, and**  
**phytochemical profiling of *Annona muricata***  
**L. in southeastern Mexico.**



## INFORMACIÓN REVISTA FITOTERAPIA.



ScienceDirect

Fitoterapia	
Supports open access	
5.4 CiteScore	3.204 Impact Factor
<a href="#">Submit your article ↗</a>	<a href="#">Guide for authors ↗</a>
<a href="#">Menu</a>	<input type="text" value="Search in this journal"/>

### Journal Insights

#### Aims & scope

*Fitoterapia* is a Journal dedicated to **medicinal plants and fungi** and to the **bioactive natural products** produced by these organisms. It publishes original contributions in seven major areas:

1. Characterization of **active ingredients** of medicinal plants and fungi
2. Development of standardization ...

[View full aims & scope](#)

#### ISSN

Online ISSN: 1873-6971 | Print ISSN: 0367-326X

#### Subject areas

Pharmacology

#### Impact

5.4

CiteScore [i](#)

3.204

Impact Factor [i](#)

[FEEDBACK](#)



#### Abstracting and indexing

- Scopus
- Cambridge Scientific Abstracts
- Chemical Abstracts
- Embase
- International Pharmaceutical Abstracts
- Science Citation Index Expanded
- BIOSIS Citation Index
- Natural Products Update/Royal Society of Chemistry
- PubMed/Medline
- Elsevier BIOBASE
- CAB International
- CINAHL
- Reaxys
- EMBiology

[View historical data and other metrics >](#)



Copyright © 2023 Elsevier B.V. or its licensors or contributors.  
ScienceDirect® is a registered trademark of Elsevier B.V.





Diversidad genética, estructura y perfil fitoquímico de *Annona muricata* L.  
en el Sureste de México



## CARTA DE ENVÍO DEL ARTÍCULO

31/3/23, 14:01

Gmail - Fwd: FITOTE-D-23-00468 - Confirming your submission to Fitoterapia



Heidi Montejo <hbmmarchivos@gmail.com>

### Fwd: FITOTE-D-23-00468 - Confirming your submission to Fitoterapia

Julia lesher <julialesher1@gmail.com>  
Para: Heidi Montejo <hbmmarchivos@gmail.com>

30 de marzo de 2023, 17:20

----- Forwarded message -----

De: Fitoterapia <em@editorialmanager.com>  
Date: jue, 30 de mar de 2023, 5:19 p. m.  
Subject: FITOTE-D-23-00468 - Confirming your submission to Fitoterapia  
To: Julia Maria Lesher-Gordillo <julialesher1@gmail.com>

\*This is an automated message.\*

Diversidad genética, estructura y perfil fitoquímico de *Annona muricata* L. en el sureste de México

Dear PhD Lesher-Gordillo,

We have received the above referenced manuscript you submitted to Fitoterapia. It has been assigned the following manuscript number: FITOTE-D-23-00468.

To track the status of your manuscript, please log in as an author at <https://www.editorialmanager.com/fitote/>, and navigate to the "Submissions Being Processed" folder.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,  
Fitoterapia

More information and support

You will find information relevant for you as an author on Elsevier's Author Hub: <https://www.elsevier.com/authors>

FAQ: How can I reset a forgotten password?

[https://service.elsevier.com/app/answers/detail/a\\_id/28452/supporthub/publishing/](https://service.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/28452/supporthub/publishing/)

For further assistance, please visit our customer service site: <https://service.elsevier.com/app/home/supporthub/publishing/>

Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions, and learn more about Editorial Manager via interactive tutorials. You can also talk 24/7 to our customer support team by phone and 24/7 by live chat and email

This journal uses the Elsevier Article Transfer Service. This means that if an editor feels your manuscript is more suitable for an alternative journal, then you might be asked to consider transferring the manuscript to such a journal. The recommendation might be provided by a Journal Editor, a dedicated Scientific Managing Editor, a tool assisted recommendation, or a combination. For more details see the journal guide for authors.

#AU\_FITOTE#

To ensure this email reaches the intended recipient, please do not delete the above code

*In compliance with data protection regulations, you may request that we remove your personal registration details at any time. (Remove my information/details). Please contact the publication office if you have any questions.*





## Genetic analysis and phytochemical profiling of soursop (*Annona muricata* L.) in southeastern Mexico.

Heidi B Montejo-Méndez<sup>1</sup>, Julia M Lesher-Gordillo<sup>1,\*</sup>, J Iñaki Hormaza<sup>2</sup> Carlos Ernesto Lobato-García<sup>3</sup>, Abraham Gómez-Rivera<sup>3</sup>, Salima Machkour-M'Rabet<sup>4</sup>, Manuel Ignacio Gallardo-Alvarez<sup>1</sup>, N. Larranaga<sup>5</sup>, Aminta Hernandez-Marín<sup>1</sup>, Alejandra Valdés-Marín<sup>1</sup>, Ricardo López-Rodríguez<sup>3</sup>, Hilda M Díaz-López<sup>1</sup>.

- 1 División Académica de Ciencias Biológicas, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Villahermosa, Tabasco, Mexico. [heidibmm@gmail.com](mailto:heidibmm@gmail.com) (H.B.M.-M.); [M\\_Gallardo\\_A@outlook.com](mailto:M_Gallardo_A@outlook.com) (M.I.G.-A.); [amintahdezmarin@gmail.com](mailto:amintahdezmarin@gmail.com) (A.H.-M.); [alejandravld.m@gmail.com](mailto:alejandravld.m@gmail.com) (A.V.-M.); [hildadiaz2@hotmail.com](mailto:hildadiaz2@hotmail.com) (H.M.D.-L.).
  - 2 Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterranea La Mayora (IHSM-UMACSIC), Algarrobo-Costa, Malaga. [ihormaza@eelm.csic.es](mailto:ihormaza@eelm.csic.es) (J.I.-H.).
  - 3 División Académica de Ciencias Básicas, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Cunduacan, Tabasco, Mexico. [carlos.lobato@ujat.mx](mailto:carlos.lobato@ujat.mx) (C.E.L.-G.); [abgori@gmail.com](mailto:abgori@gmail.com) (A.G.-R.); [ricardo.lopezr@ujat.mx](mailto:ricardo.lopezr@ujat.mx) (R.L.-R.).
  - 4 El Colegio de la Frontera Sur. Departamento de Conservacion de la Biodiversidad. Unidad Chetumal, Centenario Km 5.5, C.P. 77014, Chetumal, Quintana Roo, Mexico. [smachkou@ecosur.mx](mailto:smachkou@ecosur.mx) (S.M.-M.).
  - 5 Laboratorio Nacional de Identificación y Caracterización Vegetal (LaniVeg), Departamento de Botánica y Zoología, Universidad de Guadalajara, Zapopan 45200, Mexico. [nerea.larranaga@academicos.udg.mx](mailto:nerea.larranaga@academicos.udg.mx) (N.-L.).
- \* Correspondence: [julialesher1@gmail.com](mailto:julialesher1@gmail.com) (J.M.L.-G.); Tel.: 52-(993)-358-1500 (ext. 6466).

**Abstract:** *Annona muricata* is a neotropical perennial fruit tree cultivated in tropical regions of Central and South America, West Africa, Central Africa, East Africa, and Southeast Asia. In recent years, it has received increasing attention due to its pharmaceutical interest, especially for the presence of metabolites with reported anti-tumoral properties. In this research, 191 accessions of this species collected in home gardens from four states of southern Mexico were studied. They were analyzed using 10 microsatellite loci to determine their diversity and genetic structure. In addition, the metabolic content of flavonoids and total polyphenols was analyzed, and 34 compounds were identified by HPLC. The diversity was low to moderate in the populations analyzed with values of expected heterozygosity ( $H_e$ ) ranging from 0.28 to 0.52. Three genetic groups were identified that are not linked to geographical origin. As for the chemical content, variations were found among the different accessions studied.

**Keywords:** *Annona muricata*; Genetic diversity; Genetic structure; Flavonoids; Polyphenols.



## 1. Introduction

*Annona muricata* L., the soursop or guanabana, is a perennial, erect, and highly branched tree with oblong to ovate leaves of bright green color originating from the Neotropics that belongs to the Annonaceae family (Strijk et al., 2021). Its flowers are simple, with green sepals and thick yellow petals (Patel & Patel, 2016). Its fruits are ovoid, and dark green with soft spines on the outside (Lim, 2012). The soursop produces fruits throughout the year, with a higher production during spring and early fall. As other species of the genus *Annona*, the soursop fruit is a syncarp.

Propagation of *A. muricata* is commonly done by grafting or seedling rootstocks (Morton & Dowling, 1987). Pollination and fertilization of the plant, on the other hand, depend mainly on insect pollinators such as beetles of the family Nitidulidae (Nakasone & Paull, 1998), although this process is affected by various factors related to floral structures, such as dichogamous protogyny. Hand pollination is frequent in commercial soursop orchards to improve productivity.

Currently, soursop is widely cultivated in tropical regions of Central and South America, West Africa, Central Africa, East Africa, and Southeast Asia (Pinto et al., 2005) and it is one of the most important species in economic terms within the Annonaceae family, being Brazil, Mexico, and Venezuela the main producing countries (Strijk et al., 2021). In Mexico, it is mainly found in the states of Nayarit, Puebla, Veracruz, Colima, and Michoacán, and to a lesser extent in Guerrero, Tabasco, and Campeche (Luis M Hernández-Fuentes et al., 2008). In these areas, *A. muricata* is one of the species with the greatest development in agronomic terms, with a cultivation area of 2702 hectares according to SIAP reports (2018), and national clonal varieties have been registered (Guanay-1, Guanay-2, and Guanay-3).

The soursop has been used since pre-Columbian times by cultures such as the Maya. Evidence of soursop consumption date back to at least 3400 BC (Colunga-GarcíaMarín & Zizumbo-Villarreal, 2004). In addition, records have been found in Peru indicating the presence of *A. muricata* around 1000 AD, mainly associated with sites of the Chimú culture. From its use by ancient cultures to the present day, the soursop has been highly appreciated for its nutritional value and delicious taste. The fruits are consumed fresh or processed into a variety of products, such as juices, ice creams, yogurts, jams, liqueurs, and others. In traditional medicine, beverages made from all parts of the plant have been used to treat a wide range of diseases, including parasitic infections, dysentery, fever, urethritis, hematuria, asthma, liver diseases, and diarrhea. In addition, it is attributed with anticatarrhal, antispasmodic, antidepressant, and antiemetic properties (Quílez et al., 2018). These properties have been related to the presence of various



## Diversidad genética, estructura y perfil fitoquímico de *Annona muricata* L. en el Sureste de México



secondary metabolites and bioactive compounds (Coria-Téllez et al., 2018b) such as polyphenols, alkaloids, fatty acids, acetogenins, and flavonoids (Luis Martín Hernández-Fuentes et al., 2021). In the plant, these compounds play functions related to growth and survival under different environmental conditions (Kurepin et al., 2017). The synthesis, accumulation, and production of these metabolites are very complex and influenced by both genetic and environmental factors, such as the amount of light, temperature, water availability, salinity, soil, stress factors such as drought periods, flooding, or impoverished soils, among others (Li et al., 2020; Verma & Shukla, 2015).

The different pathways of secondary metabolite production are highly susceptible to environmental variations, leading to the expression of different genes (Sharma, 2018). Variations in production, storage, and medicinal properties can also be found depending on the plant part and developmental stage (Broun et al., 2006), as well as the geographic origin (Li et al., 2020).

Some of the Mexican soursop cultivars that have been evaluated to observe differences in chemical composition are Crioula, Lisa, and Morada. Precious results have shown that "Lisa" had a higher concentration of phenolic compounds, while "Crioula" had a higher potential for antioxidant activity (SIQUEIRA et al., 2015), demonstrating that there can be differences between soursop cultivars. Therefore, selection of genotypes with high secondary metabolite content is important for producing medicinal and food contents, considering that the concentration and bioactivity of compounds may vary depending on the region, growing conditions, and other factors. Additional research is required to determine the most promising cultivars in each context (Li et al., 2020).

In Mexico, the cultivation of *A. muricata* is favored by suitable geographic, climatic, and environmental conditions. However, production is limited by different reasons, such as phytosanitary aspects, deficiencies in production technology, lack of identification of highly productive or desirable cultivars, as well as lack of characterization of the genetic stock that is still present in natural conditions, backyard orchards or underutilized at the edge of local roads or grazing areas (Luis Martín Hernández-Fuentes et al., 2021).

Genetic and genomic studies are fundamental to identify valuable traits in plants, such as those related with higher production and storage of phytoconstituents that can be used in conservation and genetic improvement programs (Cabrera, 2016). Moreover, knowledge of genetic diversity and structure is crucial for the conservation of genetic resources of species such as *A. muricata*, which may be threatened by genetic erosion caused by land-use change practices, deforestation, and current climate change (R. Aguilar et al., 2019; Larrañaga, 2016). Furthermore, the genetic structure of plant populations can indicate



## Diversidad genética, estructura y perfil fitoquímico de *Annona muricata* L. en el Sureste de México



their evolutionary history and their ability to maintain adequate genetic variability for long-term survival (Yisilam et al., 2022).

Therefore, results obtained through these studies can be used for designing appropriate germplasm conservation and management strategies, including the identification of priority areas for protection and the selection of individuals to produce high-quality seeds and vegetative propagation material. Additionally, this information can be useful for improving the quality and efficacy of medicinal products derived from these plants by allowing the selection of cultivars with the most beneficial chemical properties for health.

Therefore, this study aims to determine the genetic diversity and structure of *A. muricata* populations in home gardens in the southern states of Mexico using microsatellite molecular markers (SSRs), as well as to identify and quantify the bioactive compounds present in the plants collected. In this way, the relationship between genetic diversity and structure of the populations in the region and the production of bioactive compounds in the plants can be estimated.

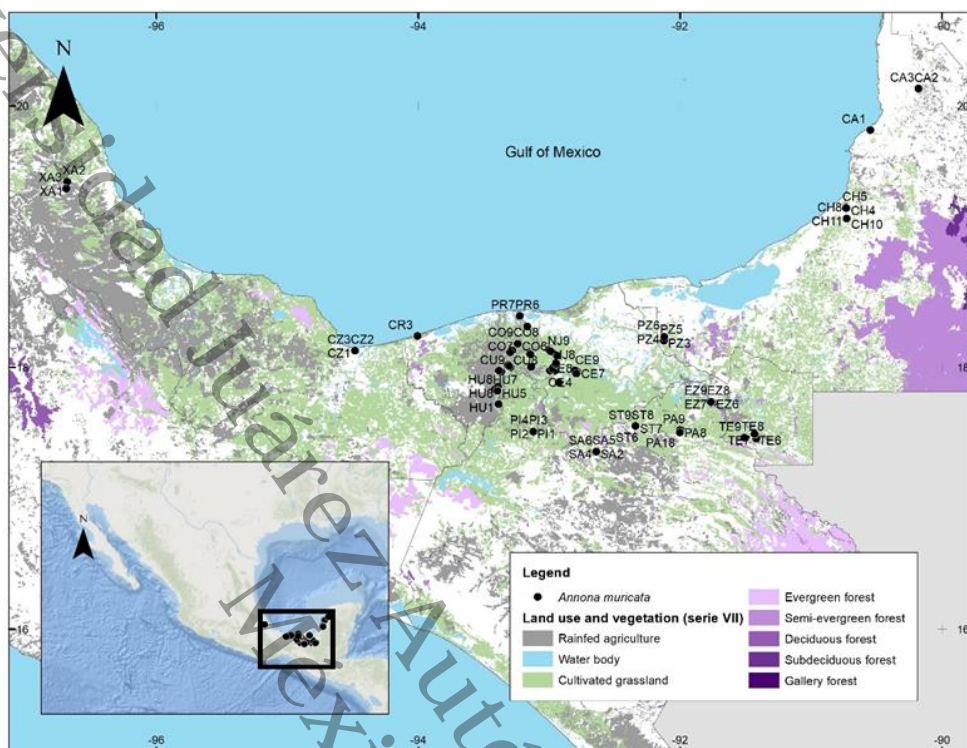
## 2. Materials and Methods

### 2.1. Study area and plant material.

191 foliar tissue samples were processed from *A. muricata* L. trees collected in home gardens of different municipalities within the states of Veracruz, Tabasco, Chiapas, and Campeche (Figure 1). Each tree was labeled with a unique code based on the collection site and sample number, and the geographic coordinates were documented using a Global Positioning System (GPS) for latitude and longitude (Table S1).



## Diversidad genética, estructura y perfil fitoquímico de *Annona muricata* L. en el Sureste de México



**Figure 1.** Geographical distribution of sampling sites of *A. muricata* L. XA: Xalapa, CZ: Coatzacoalcos, CR: Cárdenas, HU: Huimanguillo, CU: Cunduacán, CO: Comalcalco, PR: Paraíso, PI: Pichucalco, NJ: Nacajuca, CE: Centro, SA: Sabanilla, ST: Salto de Agua, PZ: Palizada, PA: Palenque, EZ: Emiliano Zapata, TE: Tenosique, CH: Champotón, CA: Campeche.

Leaves that showed no signs of physical damage, pests, or diseases were collected and stored in silica gel bags for subsequent processing for genetic diversity analyses. For chemical analysis, an equivalent of 1 kg of fresh foliar tissue was collected from each evaluated population. The plant tissue was dried in an oven (RSU Labsupply, CD, MEX) at a temperature not exceeding 45°C and ground using a Pulvex MPP300 mill.

### 1.2. DNA extraction and microsatellite marker (SSR) analysis.

DNA extractions were performed following the methodology cited by (Viruel & Hormaza, 2004). Which consists of an extraction buffer based on CTAB and  $\beta$ -mercaptoethanol. The quality and concentration of the extracted DNA were determined using a





Diversidad genética, estructura y perfil fitoquímico de *Annona muricata* L.  
en el Sureste de México



NanoDrop™ One spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) at a wavelength of A260/280 nm and A260/230 nm. Ten microsatellites designed and evaluated for the genus *Annona* (Escribano et al., 2004, 2008) were used, eight of which had already been used in *A. muricata* (Table 1), and two primers previously reported for *A. cherimolla* (Escribano et al., 2008).

The PCR reactions were carried out in a T100 Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) using the following temperature program: an initial step of 1 min at 94°C, 35 cycles of 30 sec at 94 °C, 30 sec at 55 °C, 1 min at 72 °C, and a final extension step of 5 min at 72 °C. The forward primers were labeled with fluorescence at the 5' end, and the PCR products were detected and sized using a GeXp capillary DNA analysis system (Beckman Coulter Genome Lab). Samples were denatured at 90 °C for 120 s, injected at 2.0 kV for 30 s, and separated at 6.0 kV for 35 min. Samples with previously identified alleles were used as positive controls to ensure size accuracy and minimize variation from one run to another. Each PCR reaction and capillary electrophoresis was repeated at least twice to ensure the reproducibility of the results.

Table 1. Characteristics of the SSR loci analyzed, previously reported (Escribano et al., 2004, 2008).

SSR	Forward and reverse primers (5'-3')	Repeat	Ta (°C)	Size (pb)	Expected size
LMCH5	F: CCCACTCTTCTACCCTCAAC R: CAAGTCCCTGTAAGAATCAGA	(CT)10	55	152-166	155-160
LMCH6	F: GGCATCCTATATTCAGGTTT R: TTAAACATTTTGGACAGACC	(CT)14	55	204-224	220-254
LMCH12	F: TATCTGCTTGAAACCAAAC R: GCATTAGATGAGAAGGACTC	(CT)17	55	152-167	152-168
LMCH21*	F: TTTTATAGGAGGGGAGAGTAGA R: AAAACGACAACATTCCACAC		55	159-172	
LMCH29	F: GTACCATCTTTTAGGAAATC R: TGCAATCTATGTTAGTCAC	(GA)9	55	189-193	185-195
LMCH39	F: AATTTGTATGGTGTTGACAG R: AGTTGTAGGTGGTTAAGTTC	(CT)11	55	119-123	187-195
LMCH42	F: TTTATCATTACGAGAGTTATCA R: AAAGTTGTCCTTTTACTCCT	(GA)11	55	175-187	198-202
LMCH79	F: GAAGCAAGTAGACACGTAGTA R: AGGTTGGTATTTCTTTATAGT	(CT)12	55	206-210	207
LMCH87	F: AGTTAAGACACGAGATGATAAA	(GA)15	55	103-107	133-152



Diversidad genética, estructura y perfil fitoquímico de *Annona muricata* L.  
en el Sureste de México



R: CAAGTAAAGACTGAAAGGTTG  
LMCH118\* F: AAAACTATAACCAGGAAGTAAA 55 221-239  
R: AGACTGATGGTCTTTTTCTC

---

\*Report previously reported for *A. cherimolla*

---

### 1.3. Molecular data analyses.

#### 1.3.1. Genetic diversity.

The genetic diversity of the different populations of *A. muricata* was determined by calculating parameters such as  $N_A$ = average number of alleles ( $N_A$ ), average number of effective alleles ( $N_e$ ), observed heterozygosity ( $H_o$ ), expected heterozygosity ( $H_e$ ), fixation coefficient ( $F$ ), using the GenAlex 6.502 software (Peakall & Smouse, 2012). Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) was obtained by calculation of heterozygote deficiency using the GENEPOP 4.0.10 software (Rousset, 2008). The CERVUS 3.0.7 software was used to calculate the polymorphic content (PIC). The presence of null alleles per locus was verified using the FreeNa program (Chapuis & Estoup, 2007).

#### 1.3.2. Genetic Structure.

The genetic structure was estimated using various differentiation parameters, identification of substructures, and distance between the different analyzed populations. Genetic differentiation was carried out by calculating  $F_{ST}$  values, as well as a molecular variance analysis (AMOVA) using GenAlex 6.502 software. To identify the population structure, Structure v2.3.1 software was used, applying the Admixture model, which assumes that every sample has ancestry from one or more of  $K$  genetically distinct sources according to the run parameters mentioned by (Wang, 2017). The number of populations ( $K$ ) was established from 1 to 20 with a burn-in period of 100,000 iterations followed by 1,000,000 Markow Monte Carlo (MCMC) chain iterations and an individual alpha for each population of 0.06 (Pritchard et al., 2000; Wang, 2017). The identification of the most probable number of populations  $K$  according to our data was determined using the Evanno method (Evanno et al., 2005) implemented on the STRUCTURE HARVESTER website (Earl & VonHoldt, 2012). Genetic distance was evaluated by estimating the Nei coefficient using GenAlex software, and the dendrogram was constructed using the unweighted pair-group method with arithmetic mean (UPGMA) by the R program, and subsequently edited with the help of the Interactive Tree Of Life (iTOL) program (Letunic & Bork, 2021).



## Diversidad genética, estructura y perfil fitoquímico de *Annona muricata* L. en el Sureste de México



### 1.4. Chemical Data Analysis.

#### 1.4.1 Preparation of Extracts.

The extracts were prepared by exhaustive maceration, in which 100 g of crushed dried *A. muricata* leaves from each of the sampled locations were placed in Erlenmeyer flasks and completely covered with methanol. In total 10 populations belonging to the southern region of Mexico were analyzed. They were macerated for 24 hours and then filtered. Methanol was added again to the solid residues inside the flask after filtration. This process was repeated 2 more times. The extracts from the 3 days of maceration were combined in an amber-colored bottle and evaporated to dryness in a rotary evaporator (BRAND) at a temperature of 59 °C.

#### 1.4.2. Total Flavonoid and Polyphenol Content.

Assays for flavonoid determination were carried out using a colorimetric method previously described by (Liu et al., 2002), for each of the evaluated extracts. Solutions were measured using absorbance at 510 nm using a spectrophotometer; absorbance was immediately measured against the blank prepared at 510 nm using a GENESYS™ 10 UV-Vis spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). The standard used for the assays was rutin and each assay was performed in triplicate.

Total polyphenol determination was carried out using the Folin-Ciocalteu method (García Martínez et al., 2015). Absorbance measurements were taken at 760 nm with gallic acid as the reference reagent. Flavonoid content determination was measured in mg equivalents of rutin (RE)/g of methanolic extract, while polyphenol content was reported as mg equivalents of gallic acid (GAE)/g of methanolic extract, for 10 populations belonging to the southern region of Mexico.

To determine statistically significant differences in the amount of secondary metabolites per analyzed population, an ANOVA statistical test was employed. Multiple range contrasts were performed using the Tukey test. Different statistical tests were performed using Statgraphics Centurion® V18 software. The confidence limit of the statistical tests employed was  $\alpha = 0.05$ .

#### 1.4.3. Analysis of HPLC and UV-Vis spectra of *A. muricata* leaf extracts.

Chromatographic analysis was carried out on a Waters 2695 separation module system with a Waters 2695 photodiode array



## Diversidad genética, estructura y perfil fitoquímico de *Annona muricata* L. en el Sureste de México



detector and Empower Pro software (Waters Corporation, Milford, MA, USA). Chemical separation was performed using a Supelcosil LC-F column (4.6 mm × 250 mm, particle size 5 μm) (Sigma-Aldrich, Bellefonte, Pennsylvania, USA). The parameters used were based on those previously described by Gallegos-García et al., 2022, which are described below. For the mobile phase, an aqueous solution of trifluoroacetic acid at 0.5% (solvent A) and acetonitrile (solvent B) were used in a gradient: 0-1 min, 0% B; 2-3 min, 5% B; 4-20 min, 30% B; 21-23 min, 50% B; 24-25 min, 80% B; 26-27 min, 100% B; 28-30 min, 0% B. The flow was pumped at a speed of 0.9 ml/min with a sample volume of 10 μl, and absorbance was measured at 270 nm. Finally, a preliminary identification of peaks was performed by comparing with characteristic tR and UV-Vis bands of known standards and literature data.

### 3. Results

#### 3.1. Genetic analysis.

#### 3.2. Genetic diversity.

The population with the highest number of different alleles was Centro (NA =3.90) and the population with the lowest number was Pichucalco (NA =1.70). The global value obtained for the Polymorphic Information Content (PIC) was 0.53, which corresponds to a moderately polymorphic value. The population with the highest PIC value was Centro with 0.47, and the minimum value was found in the Pichucalco population with a value of 0.22. No null alleles were found using the FreeNa software. The expected heterozygosity ( $H_e$ ) of the 18 populations analyzed ranged from 0.28 to 0.52, with an average of 0.41. The rest of the values for determining genetic diversity are presented in Table 2.



Diversidad genética, estructura y perfil fitoquímico de *Annona muricata* L. en el Sureste de México



Table 2. Genetic diversity parameters for the 18 populations of *Annona muricata* L.

Population	<i>n</i>	$N_A$	$N_e$	$H_o$	$H_e$	<i>F</i>	<i>PIC</i>	<i>HWE</i>
XA	3	2.100	1.834	0.467	0.350	- 0.315	0.2977	NS
CZ	3	2.100	1.897	0.367	0.335	- 0.037	0.2843	NS
CR	10	3.200	2.391	0.408	0.522	0.257	0.4679	***
HU	8	2.600	1.897	0.271	0.407	0.456	0.3532	***
CU	20	3.000	1.917	0.298	0.417	0.424	0.355	***
CO	11	2.600	2.099	0.297	0.409	0.308	0.3574	***
PR	7	2.300	2.041	0.429	0.384	- 0.106	0.3296	***
PI	4	1.700	1.583	0.350	0.281	- 0.257	0.223	NS
NJ	19	2.500	1.845	0.269	0.349	0.332	0.3009	***
CE	30	3.900	2.520	0.386	0.528	0.271	0.479	***
SA	5	1.900	1.756	0.260	0.349	0.328	0.283	*
ST	13	3.000	2.285	0.337	0.459	0.320	0.4121	***
PZ	6	2.000	1.725	0.408	0.345	- 0.067	0.2857	NS
PA	17	3.200	2.447	0.395	0.519	0.257	0.4635	***
EZ	11	2.700	2.113	0.427	0.476	0.102	0.4054	***
TE	13	2.800	1.969	0.433	0.441	0.127	0.3709	***
CH	8	2.200	1.614	0.350	0.323	- 0.015	0.2692	***
CA	3	1.800	1.620	0.267	0.328	0.238	0.2582	NS
Global	191	2.533	1.975	0.357	0.401	0.166	0.5326	***

*n*=number of individuals,  $N_A$ = average number of alleles,  $N_e$ =average number of effective alleles,  $H_o$ = observed heterozygosity,  $H_e$ = expected heterozygosity, *F*= inbreeding coefficient, *PIC*= Polymorphic information content, *HWE*= Hardy-Weinberg equilibrium, Key: ns=not significant, \*  $P<0.05$ , \*\*  $P<0.01$ , \*\*\*  $P<0.001$ . XA: Xalapa, CZ: Coatzacoalcos, CR: Cárdenas, HU: Huimanguillo, CU: Cunduacán, CO: Comalcalco, PR: Paraíso, PI: Pichucalco, NJ: Nacajuca, CE: Centro, SA: Sabanilla, ST: Salto de Agua, PZ: Palizada, PA: Palenque, EZ: Emiliano Zapata, TE: Tenosique, CH: Champotón, CA: Campeche.



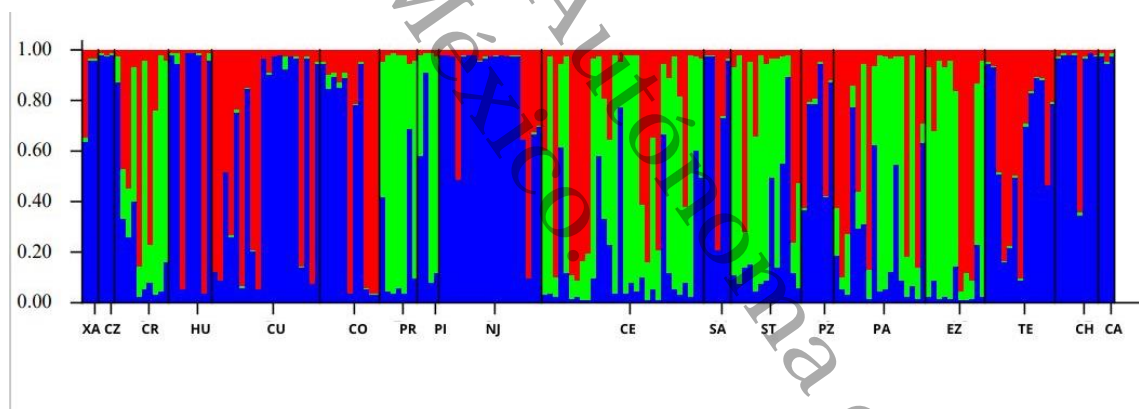


## Diversidad genética, estructura y perfil fitoquímico de *Annona muricata* L. en el Sureste de México



### 3.1.2 Genetic structure

The most probable number of populations determined using the Evanno method in the STRUCTURE software was  $K=3$  (Figure 2). Genetic groups one and two showed a geo-geographical distribution in Tabasco and the northern region of Chiapas, while the presence of genetic group three was present in most of the sampled populations, with highest pre-dominance in Veracruz and Campeche. Additionally, the  $F_{ST}$  values of most populations had values between 0.05 and 0.25; the Campeche population showed high genetic differentiation with respect to the Centro and Salto de Agua populations, with  $F_{ST}$  values of 0.29 and 0.26, respectively (Appendix A). Likewise, the overall  $F_{ST}$  index indicated moderate genetic differentiation (0.126). Regarding the analysis of molecular variance (AMOVA), the results showed that the highest percentage of variance (64%) is within individuals, followed by 30% among individuals and 6% among populations.



**Figure 2.** Genetic groups were estimated from a Bayesian evaluation of genetic partition using STRUCTURE in 18 populations, ordered from east- to west, of *A. muricata* ( $K=3$ ). Group one = red, group two = green, and group three = blue. XA: Xalapa, CZ: Coatzacoalcos, CR: Cárdenas, HU: Huimanguillo, CU: Cunduacán, CO: Comalcalco, PR: Paraíso, PI: Pichucalco, NJ: Nacajuca, CE: Centro, SA: Sabanilla, ST: Salto de Agua, PZ: Palizada, PA: Palenque, EZ: Emiliano Zapata, TE: Tenosique, CH: Champotón, CA: Campeche.



Diversidad genética, estructura y perfil fitoquímico de *Annona muricata* L.  
en el Sureste de México



In the analysis of genetic distance among the 18 populations by Neighbor Joining, three genetic clusters can be identified. The first cluster includes Paraíso, Xalapa, Comalcalco, Pichucalco, Campeche, Emiliano Zapata, Palizada, and Coatzacoalcos. The second cluster is formed by Sabanilla, Centro, Tenosique, Palenque, Champotón, and Cárdenas. The third cluster is made up of the populations of Salto de Agua, Cunduacán, Nacajuca, and Huimanguillo. Those clusters are represented in Figure 3.

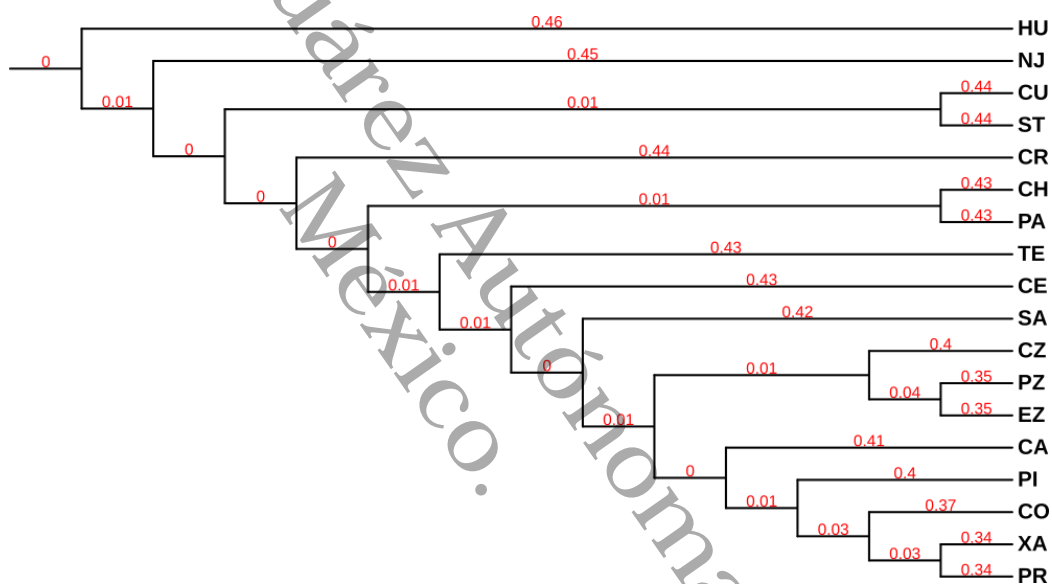
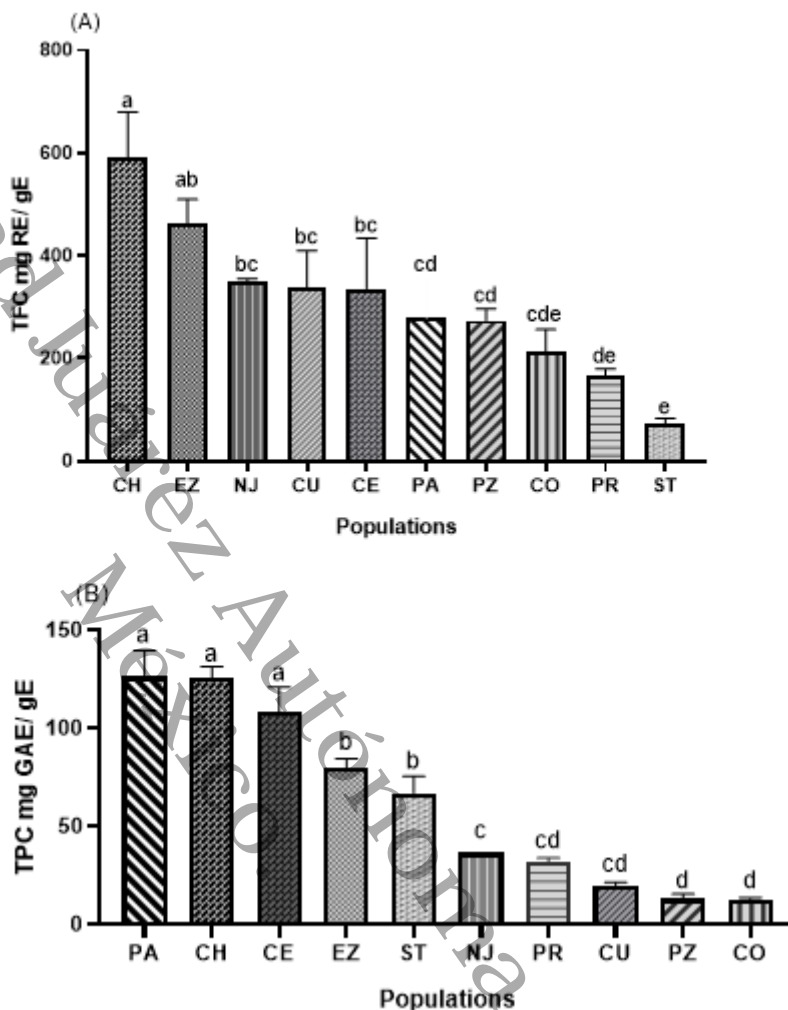


Figure 3. Analysis by the method of unweighted pair groups with arithmetic mean (UPGMA) of 18 populations of *A. muricata* in Southeastern Mexico. XA: Xalapa, CZ: Coatzacoalcos, CR: Cárdenas, HU: Huimanguillo, CU: Cunduacán, CO: Comalcalco, PR: Paraíso, PI: Pichucalco, NJ: Nacajuca, CE: Centro, SA: Sabanilla, ST: Salto de Agua, PZ: Palizada, PA: Palenque, EZ: Emiliano Zapata, TE: Tenosique, CH: Champotón, CA: Campeche.



Diversidad genética, estructura y perfil fitoquímico de *Annona muricata* L. en el Sureste de México



**Figure 4.** Flavonoid and polyphenol content in populations of *A. muricata*. A) Flavonoid content expressed in mg rutin equivalent/g of extract. B) Polyphenol content expressed in mg gallic acid equivalent/g of extract. Values are presented as means  $\pm$  standard deviation of the means (SD)  $n=3$ . ANOVA, with post-test with  $* p \leq 0.05$  Tukey test, where different letters indicate significant differences among them. PA: Palenque, CH: Champotón, CE: Centro, EZ: Emiliano Zapata, ST: Salto de Agua, NA: Nacajuca, PR: Paraíso, CU: Cunduacán, PZ: Palizada, CO: Comalcalco.



## Diversidad genética, estructura y perfil fitoquímico de *Annona muricata* L. en el Sureste de México



### 3.2 Metabolic profile of methanolic extracts of *A. muricata*.

#### 3.2.1 Total Flavonoid and Polyphenol Content.

The results of flavonoid and total polyphenol contents are shown in Figure 3. A significant content of flavonoids and polyphenols was observed in all populations, with values from 73.48 to 592.70 mg RE/gE. for flavonoids and 13.10 to 126.59 mg GAE/gE. for total polyphenols. The results showed that the contents of total flavonoids and polyphenols are different in the studied populations.

Regarding flavonoid contents, different groupings were observed: CH and EZ formed the first group and had the highest concentrations, with values from 592.70 and 464.14 mg RE/gE without showing significant differences between them. On the other hand, NA, CU, CE, PA, and PZ were the second group with the lowest TFC, with values ranging from 273.57 to 349.80 mg RE/gE without significant differences between them. Finally, CO, PR, and ST were the populations that showed the lowest TFC values, ranging from 75.48 to 213.50 mg RE/gE.

For the case of TPC, different groups were found based on the amount of this metabolite. The first group was constituted of PA, CH, and CE, who had the highest levels of TPC with values from 108.32-126.58 mg GAE/gE. The following group with values from 67.20 to 79.74 mg GAE/gE was formed by ST and EZ. The NJ, PR, and CU groups showed values from 20.14 to 36.67 mg GAE/gE. Finally, the populations with the lowest levels of TPC were PZ and CO with values from 13.10-13.12 mg GAE/gE.

#### 3.2.2. HPLC analysis of the methanolic extracts of *A. muricata* leaves.

Thirty-five compounds of medium and low polarity were identified with retention times from  $t_R = 8.26-27.867$  min and were characterized as shown in Table 3. It contains a summary of information such as retention time, main absorption bands of the UV-Vis spectrum, and the presence of each peak in the 10 analyzed populations. Based on the retention times and absorption spectra bands of each peak shown in Table 3, a preliminary analysis of each of these metabolites present in the populations was carried out by comparing these parameters with known standards and literature information.

Particularly, compounds corresponding to polyphenols, flavonoids, terpenes, and alkaloids could be observed, with polyphenolic compounds being the most predominant.

Notably, the compounds that were present in the majority of the populations corresponded to peaks 6, 7, 11, and 33. Peak 6 ( $t_R = 8.88$



Diversidad genética, estructura y perfil fitoquímico de *Annona muricata* L.  
en el Sureste de México



Table 3. Preliminary phytochemical profile by HPLC analysis of methanolic leaf extracts of *A. muricata* in 10 populations from the southern region of Mexico.

Peak	Retention Time (min)	Absorption Bands (nm)	Population	Compound Affinity	Ref.
1	8.26	220, 312.5	CE	Derived from gallic acid	Standard
2	8.4	220, 252.1, 293.5, 331.5	CE	Análogo de un alcaloide tipo indol	(Wu et al., 2019)
3	8.56	211, 313.7	PA, ST, PZ	Derived from gallic acid	Standard
4	8.58	209.9, 284, 313.7	CH	Derived from catechin	Standard
5	8.85	269.8, 401.8	CO	Derived from salicylic acid.	Standard
6	8.88	210, 236.8, 314.8	PA, CE, CH, EZ, PZ, ST, CU	Derived from coumaric acid	Standard
7	9	211, 256.9, 355.3	PA, CE, CH, EZ, PZ, ST, CU, PR	Rutin	Standard
8	9.11	241.5, 265.1, 347	NJ	Luteolin glucoside	Standard (Mabry et al., 2012)
9	9.2	229.8, 254.5, 335.1	CO	Apigenin glycoside	Standard (Mabry et al., 2012)
10	9.21	209.9, 265.1, 349.4	CE	Flavone derived from luteolin glycoside	Standard (Mabry et al., 2012)





Diversidad genética, estructura y perfil fitoquímico de *Annona muricata* L.  
en el Sureste de México



11	9.28	210,265.1, 349.4	PA, CH, NJ, PZ, ST, CU, PR	Glycosylated derivative of kaempferol	Standard (Mabry et al., 2012)
12	9.31	228.6, 308.9	CH, NJ, EZ, PZ	Coumaric acid	Standard
13	9.45	227.4, 310.1	PA	Derived from coumaric acid	Standard
14	9.617	260.4, 283, 354.1	CO	Vanillic acid	Standard (Mabry et al., 2012)
15	10.51	218, 292.3	EZ, PZ, PR	Derived from coumaric acid	Standard
16	10.73	234.5, 256.9, 288.8	CO	Derived from ferulic acid	Standard (Mabry et al., 2012)
17	10.750	218, 240, 293.5, 319.6	CU	Derived from ferulic acid	Standard (Mabry et al., 2012)
18	10.75	220, 320.8	EZ, ST	Derived from ferulic acid	Standard (Mabry et al., 2012)
19	10.76	220, 285, 318	PZ	Derived from ferulic acid	Standard (Mabry et al., 2012)
20	10.77	221, 242.7, 323.2	NJ	Derived from chlorogenic acid	(Mabry et al., 2012)
21	10.933	215, 225, 314.8	NJ	<i>p</i> -Coumaric acid	Standard
22	10.993	225, 285, 314.8	CH	Phenylpropane derived from caffeoylquinic	(Mabry et al., 2012)
23	11.40	210,258,285.2	CO, PR	Derived from vanillic acid	Standard
24	11.45	220, 258, 285.2	CH, NJ	Derived from vanillic acid	Standard
25	12.117	210, 255.7, 374.2	PA	Quercetin (Myricetin) derivative	Standard (Mabry et al., 2012)
26	12.15	211, 243.9, 274.6	CO	Derived from catechin	Standard
27	12.333	230, 260, 314.8	CO	Derived from coumaric acid	Standard



Diversidad genética, estructura y perfil fitoquímico de *Annona muricata* L.  
en el Sureste de México



28	12.883	210, 227.4, 311.3	PA	Derived from p-coumaric acid	Standard
29	12.883	215, 240.4, 280.5	PR	Derived from chlorogenic acid	(Mabry et al., 2012)
30	13.417	220, 235, 279.3	PA	Flavanone derived from eriodictyol	(Mabry et al., 2012)
31	15.483	210, 265.1, 368.2	PA	Flavanone derived from a methoxylated morin	(Mabry et al., 2012)
32	13.067	254.5, 286.4, 375.4	CO	Derived from coumaric acid	Standard
33	25.383	234.5, 284, 310	PA, CE, CH, NJ, EZ, PZ, ST, CU, CO, PR	Derived from coumaric acid.	Standard
34	28.217	227.4, 284.4, 400.6	CO	Derived from coumaric acid	Standard
35	27.867	220, 307.7, 370.6	PR	Terpene	(Zhang & Huang, 2018)

PA: Palenque, CH: Champotón, CE: Centro, EZ: Emiliano Zapata, ST: Salto de Agua, NJ: Nacajuca, PR: Paraíso, CU: Cunduacán, PZ: Palizada, CO: Comalcalco.

min,  $\lambda_{\max}$ = 210, 236.8, 314.8 nm) corresponds to a possible derivative of coumaric acid, peak 7 ( $t_R$  = 9 min,  $\lambda_{\max}$ = 211, 256.9, 355.3 nm) corresponds to the compound rutin, peak 11 ( $t_R$  = 9.28 min,  $\lambda_{\max}$ = 210, 265.1, 349.4 nm) is identified as a possible glycosylated derivative of kaempferol, and peak 32, which was present in all populations evaluated, has a retention time of  $t_R$  = 25.383 min and a maximum absorption wavelength of  $\lambda_{\max}$ = 234.5, 284, 310 nm, and corresponds to a derivative of coumaric acid.



## Diversidad genética, estructura y perfil fitoquímico de *Annona muricata* L. en el Sureste de México



### 4. Discussion

#### 4.1.1. Genetic diversity.

In the *Annonaceae* family, studies on genetic diversity have mainly focused on certain members such as *A. cherimola*, *A. squamosa* and *A. muricata*, using molecular and biochemical markers including isoenzymes, SSRs or SRAPs, and isoenzymes. In *A. cherimola*, average genetic diversity values ranging from 0.49 to 0.57 have been reported using SSR markers in different Latin American populations (Escribano et al., 2004, 2007; Larranaga et al., 2017). And in *A. squamosa*, using isoenzymes, and  $H_e$  of 0.47 has been reported, highlighting that this work was done with samples from family orchards (Salazar et al., 2010). On the other hand, studies on genetic diversity in *A. muricata* have been carried out in commercial orchards in the main producing areas in the state of Nayarit, Mexico, reporting low genetic diversity with  $H_e$  values of 0.050 and 0.164, indicating that the material for orchard establishment came from clonal plants (Lira-Ortiz, Cortes-Cruz, et al., 2022; Talamantes-Sandoval et al., 2019). Similarly, reports by (Aguilar et al., 2022) on *A. muricata* cultivars in a region of Colombia showed  $H_e$  of 0.34, indicating low genetic diversity. Considering these research studies as a reference, we can argue that the genetic diversity of *A. muricata* populations analyzed in this work is moderate (Frankham et al., 2004), with the population in Centro, Tabasco having the highest diversity value with a  $H_e$  of 0.52. This can be explained by the fact that this crop is mainly distributed by human action, which makes this population composed of plants from different regions within and outside the state (Agustín & Ledesma, 2014b).

The inbreeding coefficient ( $F$ ) showed a global value of 0.16, corresponding to a low level of inbreeding (Frankham et al., 2004), possibly due to the fact that the samples were collected from home gardens, which are estimated to maintain high levels of inter- and intra-specific plant genetic diversity, particularly in terms of traditional crop varieties and local races (Galluzzi et al., 2010) as most of these orchards are established with seeds (Rao & Hodgkin, 2002).

The Hardy-Weinberg test ( $HWE$ ) showed that the populations of Xalapa, Coatzacoalcos, Pichucalco, Palizada, and Campeche were in  $HWE$  equilibrium. Additionally, the rest of the populations were not in  $HWE$  equilibrium due to a deficit of heterozygotes ( $P < 0.001$ ) (Table 2). This heterozygote deficit could be the result of some degree of inbreeding as phenotypic selection (Karlsson & Mork, 2005), and/or reproductive isolation, leading to more homozygous populations. Moreover, the phenotypic selection made by growers to increase certain desirable characteristics, such as fruit size, flavor, pulp



## Diversidad genética, estructura y perfil fitoquímico de *Annona muricata* L. en el Sureste de México



production, and pest resistance (Luis Martín Hernández Fuentes et al., 2013), could be biasing selection certain genotypes with low genetic variability. This is reflected by the inbreeding coefficient ( $F$ ), which showed values ranging from 0.257 to 0.456 (Table 2).

In conclusion, the sampled populations may be exhibiting geographic isolation due to habitat fragmentation, as these sites undergo soil/land-use changes caused by human activities such as agricultural intensification, livestock, and road construction (Moreno-Jiménez et al., 2019). This fragmentation can be observed in the land-use data of the sampled regions (Figure 1). Habitat fragmentation reduces population sizes and increases spatial isolation, and these changes are usually accompanied by a reduction in genetic variation and greater genetic divergence among populations (Havsteen, 1983; Tóth et al., 2019; Young et al., 1996).

### 4.1.2 Genetic structure.

Three genetic clusters were identified using different analyses such as Bayesian analysis in the Structure software,  $F_{ST}$  analysis, and genetic distance similarity analysis of Nei. This result may be explained by the gene flow between populations, which does not follow a specific geographic pattern. Although there was a predominance of one of the three genetic groups in certain populations, some degree of admixture between them was always perceived recorded. This could be due to the geographical proximity of the analyzed areas and the form of dispersion of *A. muricata*, which is mainly carried out by seeds transported by birds, small mammals, and humans (Bimmoy et al., 2014; Spencer & Fleming, 1989). It is important to highlight that wild fruit trees, such as *A. muricata*, are of great importance in the diet of surrounding local communities, and in some cases, their fruit is used for local trade, increasing the dispersion of their seeds (Agustín & Ledesma, 2014a). It has been reported that *A. muricata* is an important component of the diet of certain animal species in other parts of the world, such as the fish *Piaractus brachypomus* (Anderson et al., 2009), the monkey *Callithrix jacchus* (Amato et al., 2021), and the bat *Nyctimene robinsoni* (Spencer & Fleming, 1989). Therefore, it is possible that *A. muricata* seeds are dispersed by species that occupy a similar ecological niche in the sampled areas.

### 4.2.1. Total flavonoid and total polyphenol content.

The most important differences in the content of secondary metabolites present in the leaves of *A. muricata* from the analyzed populations may be due to the predominant regional factors of each study site. It has been reported that the synthesis, accumulation, and



## Diversidad genética, estructura y perfil fitoquímico de *Annona muricata* L. en el Sureste de México



fluctuations of compounds are regulated by four main factors, genetic, oncogenic, morphogenetic, and environmental (Verma & Shukla, 2015). We observed that the populations that presented the highest concentrations of both flavonoids and polyphenols (Figure 4) were distributed in zones whose vegetation type is predominantly perennial rainforest, in contrast to those populations that presented low concentrations of metabolites, which were mostly found in zones of cultivated grasslands (INEGI). This is important due to the contrast in terms of the environmental characteristics of both zones since the soil type of rainforests is considered much richer in nutrients and this allows the plant to be subjected to lower levels of environmental stress (Sánchez, 2001). All of this is relevant since it has been recorded that those negative abiotic conditions (imbalances in the amount of water, light, temperature, and nutrients in the soil) (Verma & Shukla, 2015) can affect the synthesis and accumulation of these compounds (Li et al., 2020). Such fluctuations are also evident in the results obtained in the identification of compounds in *HPLC* analyses. The presence of such compounds has been widely reported in *A. muricata* leaves (George et al., 2015; Nawwar et al., 2012). In addition to these variations in the composition and accumulation of secondary metabolites in *A. muricata* depending on the region, could be associate with genetic structure of the different populations of *A. muricata*. Populations with a higher presence of group three (Champton, Nacajuca, Cunduacan) are also those that present higher concentrations of flavonoids while the predominance of the green group occurs in populations with a higher production of polyphenols (Palenque, Centro, and Emiliano Zapata) (Figure 1). However, the values of genetic diversity do not seem to show a relationship with the levels of production of the analyzed secondary metabolites.

### 5. Conclusions

The study showed the existence of three genetic groups of *A. muricata* and that most of the populations analyzed presented moderate genetic diversity, which did not show any geographical relationship. Additionally, the results obtained show that certain populations, such as Champoton, Palenque, Emiliano Zapata, Nacajuca, and Centro, had higher productivity of flavonoids and polyphenols, which was related to moderate to high genetic diversity. It is important to highlight that these results may be influenced by environmental factors such as land use and interaction with surrounding human communities. These findings are relevant because identifying populations with higher metabolite production and genetic diversity can contribute to optimize new plantings of this crop, as well as the conservation of the genetic diversity of *A. muricata* in southern Mexico.





Diversidad genética, estructura y perfil fitoquímico de *Annona muricata* L.  
en el Sureste de México



**Author Contributions:** Conceptualization, (J.M.L.-G.) (C.E.L.-G.) and (J.I.-H.); methodology, (H.B.M.-M.), (A.H.-M.), (R.L.-R.) and (A.V.-M.); software, (H.B.M.-M.) (J.M.L.-G.) (N.-L) and (S.M.-M); validation, (J.M.L.-G.), (C.E.L.-G.) and (A.G.-R.); formal analysis, (J.M.L.-G.), (M.I.G.-A.) and (S.M.-M.); investigation, (H.B.M.-M.); resources, (J.M.L.-G.) and (J.I.-H.); data curation, X.X.; writing—original draft preparation, (J.M.L.-G.), (M.I.G.-A.) and (H.B.M.-M.), (H.M.D.-L.); writing—review and editing, (J.M.L.-G.), (M.I.G.-A.) and (H.B.M.-M.); visualization, (N.-L.); supervision, (J.M.L.-G.); project administration, (J.M.L.-G.); funding acquisition, (J.M.L.-G.).

**Data Availability Statement:** Data is contained within the article and Supplementary Material.

**Acknowledgments:** The authors wish to thank the National Council of Science and Technology (CONACYT) for the scholarship granted with CVU No.: 703106; (H.B.M.-M.) (1065844) had the support of the professor CONACYT, and the Ibero-American Postgraduate University Association (AUIP) for granting scholarships for the master's degree student (H.B.M.-M.).

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.



Diversidad genética, estructura y perfil fitoquímico de *Annona muricata* L.  
en el Sureste de México



Supplementary Materials:

Table S1. Location of the sampling sites of the *A. muricata* L. populations with the number of individuals used for the analyzes and their coordinates.

State	SSR analysis population	Population Chemical analysis	No.	Code	Latitude	Longitude
Veracruz	Xalapa (XA)		1	XA1	19,419,306	96,680,639
			2	XA2	19,420,778	96,668,075
			3	XA3	19,367,722	96,687,361
	Coatzacoalcos (CZ)		4	CZ1	18,129,333	94,481,833
			5	CZA2	18,128,806	94,483,861
			6	CZA3	18,128,556	94,483,583
			7	CR1	18,000,025	93,295,278
			8	CR2	18,000,778	93,295,389
			9	CR3	18,241,194	94,006,222
	Cardenas (CR)		10	CR4	17,976,765	93,384,833
			11	CR5	17,966,917	93,363,472
			12	CR6	17,969,361	93,336,575
			13	CR7	17,981,806	93,381,472
		14	CR8	17,976,972	93,384,639	
		15	CR12	18,018,667	93,317,806	
		16	CR13	18,019,167	93,308,917	
Tabasco			17	HU7	17,720,972	93,386,472
			18	HU8	17,832,325	93,415,155
		19	HU1	17,851,944	93,390,611	
	Huimanguillo (HU)		20	HU2	17,822,861	93,395,278
			21	HU3	17,821,215	93,393,972
			22	HU4	17,822,583	93,392,778
		23	HU5	17,820,583	93,397,361	
		24	HU6	17,821,806	93,396,528	
Cunduacan (CU)	Cunduacan	25	CU1	18,103,417	93,147,667	
		26	CU2	18,104,944	93,148,889	
		27	CU3	18,102,694	93,144,889	
		28	CU4	18,102,694	93,144,944	



Diversidad genética, estructura y perfil fitoquímico de *Annona muricata* L.  
en el Sureste de México



		29	CU5	18,102,889	93,144,778
		30	CU6	18,102,389	93,144,556
		31	CU7	18,010,056	93,305,417
		32	CU8	18,010,083	93,305,306
		33	CU9	18,010,194	93,305,028
		34	CU10	18,004,028	93,134,306
		35	CU11	18,004,028	93,134,306
		36	CU12	18,004,194	93,134,306
		37	CU13	18,004,556	93,136,365
		38	CU14	18,004,556	93,136,722
		39	CU15	18,004,333	93,136,778
		40	CU16	18,133,083	93,282,306
		41	CU17	181,325	93,282,556
		42	CU18	18,132,611	93,282,583
		43	CU19	18,115,611	93,296,675
		44	CU20	18,115,778	93,296,667
		45	CO1	1,818,225	93,240,639
		46	CO2	18,182,194	93,240,694
		47	CO3	18,182,278	93,240,694
		48	CO4	18,181,917	93,240,694
		49	CO5	18,181,833	93,240,075
Comalcalco (CO)	Comalcalco	50	CO6	18,181,972	93,240,556
		51	CO7	18,181,889	93,240,611
		52	CO8	18,182,167	93,240,972
		53	CO9	18,182,889	93,239,806
		54	CO10	18,182,889	93,239,861
		55	CO11	18,182,972	93,239,778
		56	PR1	18,314,444	93,167,667
		57	PR2	18,314,556	93,167,778
		58	PR3	18,314,667	93,167,667
Paraíso (PR)	Paraíso	59	PR4	183,145	93,167,806
		60	PR5	1,838,775	93,230,694
		61	PR6	18,393,167	93,226,972
		62	PR7	18,393,667	93,225,333
Nacajuca (NJ)	Nacajuca	63	NJ1	18,089,694	92,939,167
		64	NJ2	18,089,528	92,938,167



Diversidad genética, estructura y perfil fitoquímico de *Annona muricata* L.  
en el Sureste de México



		65	NJ5	18,139	93,003,028
		66	NJ6	18,139	93,002,917
		67	NJ7	18,136,861	93,001,583
		68	NJ8	18,136,889	93,001,611
		69	NJ9	18,119,028	92,983,778
		70	NJ10	18,119	92,983,556
		71	NJ11	18,125,139	9,299,025
		72	NJ12	18,125,056	92,989,361
		73	NJ13	18,124,917	92,989,472
		74	NJ14	18,124,861	92,989,333
		75	NJ15	1,812,475	92,989,333
		76	NJ16	18,124,806	92,989,667
		77	NJ17	18,124,944	92,990,056
		78	NJ20	18,021,806	92,947,722
		79	NJ21	18,033,056	92,948,083
		80	NJ22	18,033,083	92,947,556
		81	NJ23	18,033	92,947,333
		82	CE1	17,977,389	92,957,611
		83	CE2	17,954,528	92,791,222
		84	CE3	17,959,889	92,785,944
		85	CE4	17,969,333	92,790,278
		86	CE5	17,975,306	92,786,528
		87	CE6	17,976,472	92,786,972
		88	CE7	17,976,167	92,787,472
		89	CE8	17,976,389	92,786,694
		90	CE9	17,971,222	92,788,111
Centro (CE)	Centro	91	CE10	17,971,268	92,787,982
		92	CE11	17,973,417	92,789,028
		93	CE12	17,973,463	92,788,609
		94	CE13	17,972	92,786,778
		95	CE14	1,797,331	92,789,264
		96	CE15	17,979,861	92,800,556
		97	CE16	17,979,861	92,804,278
		98	CE17	179,795	92,803,667
		99	CE18	17,979,389	92,804,028
		100	CE19	17,883,639	92,924,333



Diversidad genética, estructura y perfil fitoquímico de *Annona muricata* L.  
en el Sureste de México



			101	CE20	1,788,375	92,924,306
			102	CE21	17,883,889	92,925,028
			103	CE22	17,883,889	92,924,944
			104	CE23	17,975,806	92,994,028
			105	CE24	17,975,778	92,994,667
			106	CE25	17,990,333	92,973,778
			107	CE26	17,990,472	92,973,806
			108	CE27	17,953,778	92,792,639
			109	CE29	17,953,472	92,792,528
			110	CE30	17,953,694	92,792,222
			111	CE31	17,953,889	92,791,944
			112	EZ1	17,736,917	91,754,333
			113	EZ2	17,731,667	91,744,917
			114	EZ3	17,731,667	91,744,917
			115	EZ4	17,731,667	91,744,917
			116	EZ5	17,737,139	91,755,222
	Emiliano Zapata (EZ)	Emiliano Zapata	117	EZ6	17,737,083	91,755,333
			118	EZ7	17,738,028	91,76
			119	EZ8	17,738,167	91,759,861
			120	EZ9	17,738,167	91,759,861
			121	EZ10	177,385	91,761,361
			122	EZ11	17,737,139	91,765,917
			123	TE1	17,456,583	91,417,528
			124	TE2	17,456,167	91,417,278
			125	TE3	17,491,222	91,431,222
			126	TE4	1,749,075	91,430,778
			127	TE5	17,491,722	91,432,583
			128	TE6	17,490,417	91,430,722
	Tenosique (TE)		129	TE7	17,493,167	91,431,056
			130	TE8	17,462,333	91,501,944
			131	TE9	17,461,722	91,499,944
			132	TE10	17,463,389	91,502,639
			133	TE11	17,465,972	91,509,528
			134	TE12	1,746,575	91,510,694
			135	TE13	17,465,417	91,508,361
Chiapas	Palenque (PA)	Palenque	136	PA1	17,512,111	92,006,611





Diversidad genética, estructura y perfil fitoquímico de *Annona muricata* L.  
en el Sureste de México



		137 PA2	17,512	92,006,528
		138 PA4	17,514,417	91,999,917
		139 PA5	17,514,417	91,999,917
		140 PA6	17,518,556	91,994,111
		141 PA7	17,519,528	9,200,075
		142 PA8	17,520,028	92,000,778
		143 PA9	17,519,972	92,001,333
		144 PA10	17,518,806	92,001,694
		145 PA11	17,516,667	91,997,167
		146 PA12	17,521,833	91,997,778
		147 PA13	17,524,083	91,995,639
		148 PA14	17,524,083	91,995,639
		149 PA15	17,522,028	92,002,417
		150 PA16	17,504,722	92,002,722
		151 PA17	17,504,722	92,002,361
		152 PA18	17,504,583	92,002,389
		153 PI1	17,507,306	93,123,722
Pichucalco (PI)		154 PI2	17,507,306	93,123,722
		155 PI3	17,511,306	93,122,444
		156 PI4	17,511,306	93,122,444
		157 SA1	17,362,306	92,640,111
		158 SA2	17,358,056	92,64
Sabanilla (SA)		159 SA3	17,358,111	92,638,528
		160 SA4	17,357,306	92,639,472
		161 SA5	17,357,167	92,639,472
		162 ST1	17,551,778	92,337,056
		163 ST2	17,551,778	92,337,083
		164 ST3	17,551,778	92,337,028
		165 ST4	17,551,833	92,337,111
		166 ST5	17,552,083	92,337,361
S. de Agua (ST)	S. de Agua	167 ST6	17,552,111	92,337,417
		168 ST7	17,550,944	92,339,417
		169 ST8	17,550,861	92,339,333
		170 ST9	17,550,833	92,340,028
		171 ST10	17,551,083	92,340,194
		172 ST11	17,551,139	92,340,361



Diversidad genética, estructura y perfil fitoquímico de *Annona muricata* L.  
en el Sureste de México



		173	ST12	17,551,167	923,405
		174	ST13	17,554,361	92,339,917
		175	CH1	19,222,972	90,731,056
		176	CH2	19,221,111	90,729,944
		177	CH3	19,224	9,073,025
	Champotón	178	CH4	19,219,139	90,727,917
	(CH)	179	CH5	19,219,972	90,731,583
		180	CH8	19,138,833	9,072,775
		181	CH10	19,139,028	90,726,722
		182	CH11	19,139,028	90,726,972
Campeche		183	CA1	19,815,056	90,546,722
	Campeche (CA)	184	CA2	20,130,083	90,178,667
		185	CA3	20,132,139	90,178,389
		186	PZ1	18.200583	92.123556
		187	PZ2	18.201417	92.123389
	Palizada (PZ)	188	PZ3	18.201806	92.123528
		189	PZ4	18.204861	92.123389
		190	PZ5	18.204917	92.123417
		191	PZ6	18.234667	92.120833



Diversidad genética, estructura y perfil fitoquímico de *Annona muricata* L.  
en el Sureste de México



Table S2. *F<sub>ST</sub>* genetic differentiation values among the 18 populations of *Annona muricata* analyzed.

	CA	PZ	CH	PA	PI	SA	ST	CE	NJ	CR	PR	CU	HU	CO	EZ	TE	CX	XA
CA		0.0000	0.1315	0.0870	0.1553	0.2130	0.2620	0.2948	0.1528	0.1726	0.0337	0.1615	0.1880	0.1421	0.2226	0.0946	0.0914	0.2183
PZ	0.0000		0.0695	0.0000	0.0724	0.1290	0.1771	0.1279	0.0158	0.0997	0.0000	0.0698	0.0789	0.0872	0.2144	0.0584	0.0000	0.0355
CH	0.0712	0.0000		0.0042	0.0607	0.0905	0.0569	0.0802	0.1062	0.0000	0.0815	0.0000	0.1208	0.0000	0.0238	0.0541	0.1301	0.0737
PA	0.0360	0.0000	0.0000		0.0021	0.0864	0.0789	0.0738	0.0099	0.0120	0.0000	0.0104	0.0585	0.0125	0.1062	0.0119	0.0298	0.0396
PI	0.1289	0.0325	0.0560	0.0000		0.0653	0.1331	0.1408	0.0314	0.0704	0.0534	0.0841	0.0383	0.0625	0.1173	0.0246	0.0838	0.0503
SA	0.1760	0.0797	0.0556	0.0510	0.0446		0.2195	0.2393	0.1197	0.1280	0.1284	0.1437	0.1135	0.1133	0.1727	0.0796	0.1851	0.1405
ST	0.2336	0.1366	0.0332	0.0665	0.1293	0.1902		0.0894	0.1887	0.0586	0.1949	0.0396	0.2470	0.1014	0.0889	0.1532	0.1493	0.1425
CE	0.2779	0.0806	0.0224	0.0220	0.1134	0.1864	0.0790		0.1454	0.0984	0.2044	0.0648	0.2486	0.1063	0.1551	0.1650	0.1105	0.0949
NJ	0.1345	0.0000	0.0848	0.0000	0.0268	0.0980	0.1842	0.1111		0.1011	0.0057	0.0878	0.0406	0.0974	0.2108	0.0483	0.0522	0.0894
CR	0.1185	0.0415	0.0000	0.0212	0.0724	0.1045	0.0354	0.0509	0.0866		0.0856	0.0000	0.1188	0.0026	0.0787	0.0762	0.1338	0.0990
PR	0.0000	0.0000	0.0399	0.0000	0.0371	0.0970	0.1673	0.1527	0.0000	0.0581		0.0697	0.0477	0.0717	0.1990	0.0354	0.0477	0.1689
CU	0.1008	0.0001	0.0000	0.0091	0.0858	0.1098	0.0241	0.0223	0.0688	0.0000	0.0301		0.1082	0.0025	0.1012	0.0797	0.1080	0.0734
HU	0.1827	0.0582	0.0706	0.0038	0.0046	0.0548	0.2292	0.2269	0.0172	0.0702	0.0089	0.0652		0.0894	0.2487	0.0555	0.1387	0.0829
CO	0.0823	0.0285	0.0000	0.0118	0.0562	0.0801	0.0855	0.0622	0.0772	0.0000	0.0338	0.0000	0.0342		0.0753	0.0528	0.1364	0.0931
EZ	0.1711	0.1560	0.0143	0.0934	0.1078	0.1425	0.0461	0.1044	0.1951	0.0647	0.1644	0.0823	0.2075	0.0657		0.1173	0.1997	0.1954
TE	0.0771	0.0343	0.0493	0.0017	0.0072	0.0519	0.1672	0.1630	0.0359	0.0787	0.0214	0.0825	0.0238	0.0466	0.1177		0.0971	0.1087
CX	0.0748	0.0000	0.0859	0.0000	0.0609	0.1574	0.1344	0.0791	0.0337	0.1004	0.0167	0.0725	0.1252	0.0987	0.1607	0.0906		0.1088
XA	0.1667	0.0000	0.0301	0.0000	0.0114	0.0861	0.1152	0.0546	0.0523	0.0605	0.0842	0.0337	0.0247	0.0509	0.1477	0.0804	0.0382	

0-0.05 Indicate Little genetic differentiation.

0.05-0.25 Indicate moderate genetic differentiation.

> 0.25 Represent pronounced levels of genetic differentiation.



Diversidad genética, estructura y perfil fitoquímico de *Annona muricata* L.  
en el Sureste de México



## References

- Aguilar, S. B., Kogson, J. F., & Sánchez, C. F. B. (2022). *Annona muricata* L., 1753. Magnoliales. Annonaceae: evaluación preliminar de su diversidad genética en Colombia, mediante marcadores moleculares microsatélites. *Boletín Científico Centro de Museos Museo de Historia Natural*, 26(2), 37–51.
- Agustín, J. A., & Ledesma, S. D. S. (2014a). Conservación y uso de los recursos genéticos de Annonaceae en México. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 36, 118–124.
- Agustín, J. A., & Ledesma, S. D. S. (2014b). Conservation and use of genetic resources of Annonaceae in Mexico. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 36(SPE1), 118–124.
- Amato, K. R., Chaves, Ó. M., Mallott, E. K., Eppley, T. M., Abreu, F., Baden, A. L., Barnett, A. A., Bicca-Marques, J. C., Boyle, S. A., & Campbell, C. J. (2021). Fermented food consumption in wild nonhuman primates and its ecological drivers. *American Journal of Physical Anthropology*, 175(3), 513–530.
- Anaya-Dyck, J. M., Hernández-Oñate, M. Á., Tafolla-Arellano, J. C., Báez-Sañudo, R., Gutiérrez-Martínez, P., & Tiznado-Hernández, M. E. (2021). La cadena productiva de guanábana: una opción para el desarrollo económico en Compostela, Nayarit. *Estudios Sociales. Revista de Alimentación Contemporánea y Desarrollo Regional*, 31(57).
- Anderson, J. T., Saldaña Rojas, J., & Flecker, A. S. (2009). High-quality seed dispersal by fruit-eating fishes in Amazonian floodplain habitats. *Oecologia*, 161, 279–290.
- Balasundram, N., Sundram, K., & Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99(1), 191–203.
- Barroso, P. A., Medeiros, A. M., dos Santos, N. P. S., Silva, D. C. Q., Silva, S. da C., & Gomes, R. L. F. (2019). Phenotypic dispersion of Landrace lima bean varieties using multidimensional scaling. *Journal of Agricultural Science*, 11(13), 178.
- Beltrán Villanueva, C. E., Díaz Castillo, F., & Gómez Estrada, H. (2013). Tamizaje fitoquímico preliminar de especies de plantas promisorias de la costa atlántica colombiana. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 18(4), 619–631.
- Bhandari, H. R., Bhanu, A. N., Srivastava, K., Singh, M. N., & Shreya, H. A. (2017). Assessment of genetic diversity in crop plants-an overview. *Adv. Plants Agric. Res*, 7(3), 279–286.
- Bimmoy, E. D., Ngohayon, J. L., & Valdez, C. C. (2014). *Inspection Chart Mapping of National Power Corporation Watershed Agroforestation Areas*.



Diversidad genética, estructura y perfil fitoquímico de *Annona muricata* L.  
en el Sureste de México



- Bravo, L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, 56(11), 317–333.
- Broun, P., Liu, Y., Queen, E., Schwarz, Y., Abenes, M. L., & Leibman, M. (2006). Importance of transcription factors in the regulation of plant secondary metabolism and their relevance to the control of terpenoid accumulation. *Phytochemistry Reviews*, 5, 27–38.
- Cabrera, F. A. V. (2016). *Mejoramiento genético de plantas: Segunda Edición*. Universidad Nacional de Colombia.
- Chamcheu, J., Rady, I., Chamcheu, R.-C., Siddique, A., Bloch, M., Banang Mbeumi, S., Babatunde, A., Uddin, M., Noubissi, F., & Jurutka, P. (2018). Graviola (*Annona muricata*) exerts anti-proliferative, anti-clonogenic and pro-apoptotic effects in human non-melanoma skin cancer UW-BCC1 and A431 cells in vitro: Involvement of hedgehog signaling. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(6), 1791.
- Chapuis, M.-P., & Estoup, A. (2007). Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular Biology and Evolution*, 24(3), 621–631.
- Chatrou, L. W., Pirie, M. D., Erkens, R. H. J., Couvreur, T. L. P., Neubig, K. M., Abbott, J. R., Mols, J. B., Maas, J. W., Saunders, R. M. K., & Chase, M. W. (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(1), 5–40.
- Chen, L., Pan, T., Qian, H., Zhang, M., Yang, G., & Wang, X. (2021). Genetic Diversity and Population Structure Revealed by SSR Markers on Endemic Species *Osmanthus serrulatus* Rehder from Southwestern Sichuan Basin, China. *Forests*, 12(10), 1365.
- Colunga-GarcíaMarín, P., & Zizumbo-Villarreal, D. (2004). Domestication of plants in Maya lowlands. *Economic Botany*, 58(1), S101–S110.
- Coria-Téllez, A. V, Montalvo-González, E., Yahia, E. M., & Obledo-Vázquez, E. N. (2018a). *Annona muricata*: A comprehensive review on its traditional medicinal uses, phytochemicals, pharmacological activities, mechanisms of action and toxicity. *Arabian Journal of Chemistry*, 11(5), 662–691.
- Coria-Téllez, A. V, Montalvo-González, E., Yahia, E. M., & Obledo-Vázquez, E. N. (2018b). *Annona muricata*: A comprehensive review on its traditional medicinal uses, phytochemicals, pharmacological activities, mechanisms of action and toxicity. *Arabian Journal of Chemistry*, 11(5), 662–691.
- Correa Gordillo, J., Ortiz, D., Larrahondo, J. E., Sanchez Mejia, M., & Pachon, H. (2012). Soursop (*Annona muricata* L.) antioxidant activity: a literature review. *Boletín Latinoamericano y Del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas*, 11(2), 111–126.





Diversidad genética, estructura y perfil fitoquímico de *Annona muricata* L.  
en el Sureste de México



- Earl, D. A., & VonHoldt, B. M. (2012). STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*, 4(2), 359–361.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495–516.
- Eriksson, G. (2000). Red europea de conservación de recursos genéticos de frondosas nobles. *Invest. Agr.: Sist. Recur. For.: Fuera de Serie*, 2, 59–69.
- Escribano, P., Viruel, M. A., & Hormaza, J. I. (2004). Characterization and cross-species amplification of microsatellite markers in cherimoya (*Annona cherimola* Mill., Annonaceae). *Molecular Ecology Notes*, 4(4), 746–748.
- Escribano, P., Viruel, M. A., & Hormaza, J. I. (2008). Development of 52 new polymorphic SSR markers from cherimoya (*Annona cherimola* Mill.): transferability to related taxa and selection of a reduced set for DNA fingerprinting and diversity studies. *Molecular Ecology Resources*.
- Escribano, P., Viruel, M. A., & Hormaza, J. I. (2007). Establishment of a core collection to optimise the conservation of cherimoya (*Annona cherimola* Mill.) genetic resources using SSR information. *XII EUCARPIA Symposium on Fruit Breeding and Genetics 814*, 67–70.
- Evanno, G., Regnaut, S., & Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14(8), 2611–2620.
- Fahn, A. (1988). Secretory tissues in vascular plants. *New Phytologist*, 108(3), 229–257.
- Fang, X., Yang, C., Wei, Y., Ma, Q., Yang, L., & Chen, X. (2011). Genomics grand for diversified plant secondary metabolites. *Plant Diversity and Resources*, 33(1), 53–64.
- Foster, K., Oyenihi, O., Rademan, S., Erhabor, J., Matsabisa, M., Barker, J., Langat, M. K., Kendal-Smith, A., Asemota, H., & Delgoda, R. (2020). Selective cytotoxic and anti-metastatic activity in DU-145 prostate cancer cells induced by *Annona muricata* L. bark extract and phytochemical, annonacin. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 20(1), 1–15.
- Frankham, R., Ballou, J. D., & Briscoe, D. A. (2004). *A primer of conservation genetics*. Cambridge University Press.
- Gallegos-García, A. J., Lobato-García, C. E., González-Cortazar, M., Herrera-Ruiz, M., Zamilpa, A., Álvarez-Fitz, P., Pérez-García, M. D., López-Rodríguez, R., Ble-González, E. A., & Medrano-Sánchez, E. J. (2022). Preliminary Phytochemical Profile and Bioactivity of *Inga jinicuil* Schltdl & Cham. ex G. Don. *Plants*, 11(6), 794.
- Galluzzi, G., Eyzaguirre, P., & Negri, V. (2010). Home gardens: neglected hotspots of agrobiodiversity and cultural diversity. *Biodiversity and Conservation*, 19, 3635–3654.



**Diversidad genética, estructura y perfil fitoquímico de *Annona muricata* L.  
en el Sureste de México**



- García Martínez, E. M., Fernández Segovia, I., & Fuentes López, A. (2015). *Determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu*.
- Gavamukulya, Y., Abou-Elella, F., Wamunyokoli, F., & El-Shemy, H. A. (2015). GC-MS analysis of bioactive phytochemicals present in ethanolic extracts of leaves of *Annona muricata*: A further evidence for its medicinal diversity. *Pharmacognosy Journal*, 7(5).
- George, V. C., Kumar, D. R. N., Suresh, P. K., & Kumar, R. A. (2015). Antioxidant, DNA protective efficacy and HPLC analysis of *Annona muricata* (soursop) extracts. *Journal of Food Science and Technology*, 52, 2328–2335.
- González Barraza, L., Díaz Godínez, R., Castillo Guevara, C., Nieto Camacho, A., & Méndez Iturbide, D. (2017). Compuestos fenólicos: presencia, identificación y propiedades antioxidantes en plantas y frutos. *Mexican Journal of Biotechnology*, 2(1), 46–64.
- Havsteen, B. (1983). Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochemical Pharmacology*, 32(7), 1141–1148. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(83\)90262-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(83)90262-9)
- Hernández-Fuentes, Luis M, Bautista-Martínez, N., Carrillo-Sánchez, J. L., Sánchez Arroyo, H., Urías-López, M. A., & Salas Araiza, M. D. (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.
- Hernández-Fuentes, Luis Martín, Nolasco-González, Y., Orozco-Santos, M., & Montalvo-Gonzalez, E. (2021). Toxicidad de insecticidas contra (*Optatus palmaris* Pascoe) en guanábana. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 12(1), 49–60.
- Hernández Ángel, M., & Prieto González, E. A. (1999). Plantas que contienen polifenoles: Antioxidantes dentro del estilo de vida. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 18(1), 12.
- Hernández Fuentes, Luis M, Montalvo González, E., García Magaña, M. de L., Anaya Esparza, L. M., Nolasco González, Y., Villagrán, Z., González Torres, S., Velázquez Monreal, J. J., & Morelos Flores, D. A. (2021). Current Situation and Perspectives of Fruit Annonaceae in Mexico: Biological and Agronomic Importance and Bioactive Properties. *Plants*, 11(1), 7. <https://doi.org/10.3390/plants11010007>
- Hernández Fuentes, Luis Martín, Gómez Jaimes, R., & Andrés Agustín, J. (2013). *Importancia, plagas insectiles y enfermedades fungosas del cultivo del guanábano* (Primera). Instituto Nacional de Inestigaciones forestales, agrícolas y pecuarias.
- Ilango, S., Sahoo, D. K., Paital, B., Kathirvel, K., Gabriel, J. I., Subramaniam, K., Jayachandran, P., Dash, R. K., Hati, A. K., & Behera, T. R. (2022). A review on *annona muricata* and its anticancer activity. *Cancers*, 14(18), 4539.



Diversidad genética, estructura y perfil fitoquímico de *Annona muricata* L.  
en el Sureste de México



- Jan, R., Asaf, S., Numan, M., & Kim, K.-M. (2021). Plant secondary metabolite biosynthesis and transcriptional regulation in response to biotic and abiotic stress conditions. *Agronomy*, 11(5), 968.
- Karlsson, S., & Mork, J. (2005). Deviation from Hardy–Weinberg equilibrium, and temporal instability in allele frequencies at microsatellite loci in a local population of Atlantic cod. *ICES Journal of Marine Science*, 62(8), 1588–1596. <https://doi.org/10.1016/j.icesjms.2005.05.009>
- Kiemlian Kwee, J. (2016). Yin and Yang of polyphenols in cancer prevention: a short review. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, 16(7), 832–840.
- Kliebenstein, D. J. (2013). Making new molecules—evolution of structures for novel metabolites in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 16(1), 112–117.
- Kurepin, L. V, Ivanov, A. G., Zaman, M., Pharis, R. P., Hurry, V., & Hüner, N. P. A. (2017). *Interaction of Glycine Betaine and Plant Hormones: Protection of the Photosynthetic Apparatus During Abiotic Stress BT - Photosynthesis: Structures, Mechanisms, and Applications* (H. J. M. Hou, M. M. Najafpour, G. F. Moore, & S. I. Allakhverdiev (eds.); pp. 185–202). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-48873-8\\_9](https://doi.org/10.1007/978-3-319-48873-8_9)
- Larrañaga, N. (2016). *Origen, dispersión y diversidad del chirimoyo (Annona cherimola Mill.) en el continente americano*. Universidad Politécnica de Madrid.
- Larranaga, N., Albertazzi, F. J., Fontecha, G., Palmieri, M., Rainer, H., Van Zonneveld, M., & Hormaza, J. I. (2017). A Mesoamerican origin of cherimoya (*Annona cherimola* Mill.): Implications for the conservation of plant genetic resources. *Molecular Ecology*, 26(16), 4116–4130.
- Letunic, I., & Bork, P. (2021). Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic Acids Research*, 49(W1), W293–W296. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab301>
- Li, Y., Kong, D., Fu, Y., Sussman, M. R., & Wu, H. (2020). The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 148, 80–89. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.01.006>
- Lim, T. K. (2012). *Annona muricata*. In *Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants* (pp. 206–209). Springer. <https://doi.org/DOI 10.1007/978-90-481-8661-7>
- Limón, D., Díaz, A., Mendieta, L., Luna, F., Zenteno, E., & Guevara, J. (2010). Los flavonoides: mecanismo de acción, neuroprotección y efectos farmacológicos. *Mensaje Bioquímico*, 34(1), 143–155.



Diversidad genética, estructura y perfil fitoquímico de *Annona muricata* L.  
en el Sureste de México



- Lira-Ortiz, R., Cortes-Cruz, M. A., Lopez-Guzman, G. G., Palomino-Hermosillo, Y. A., Sandoval-Padilla, I., Ochoa-Jimenez, V. A., Sanchez-Herrera, L. M., Balois-Morales, R., & Berumen-Varela, G. (2022). Genetic diversity of soursop populations (*Annona muricata* L.) in Nayarit, Mexico using SSR and SRAP markers. *Acta Biológica Colombiana*, 27(1), 104–112.
- Lira-Ortiz, R., Cortés-Cruz, M. A., López-Guzmán, G. G., Palomino-Hermosillo, Y. A., Sandoval-Padilla, I., Ochoa-Jiménez, V. A., Sánchez-Herrera, L. M., Balois-Morales, R., & Berumen-Varela, G. (2022). Diversidad Genética de poblaciones de guanábana (*Annona muricata* L.) en Nayarit, México mediante marcadores SSR y SRAP. *Acta Biológica Colombiana*, 27(1), 104–112.
- Liu, M., Li, X. Q., Weber, C., Lee, C. Y., Brown, J., & Liu, R. H. (2002). Antioxidant and antiproliferative activities of raspberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(10), 2926–2930.
- Mabry, T., Markham, K. R., & Thomas, M. B. (2012). *The systematic identification of flavonoids*. Springer Science & Business Media.
- Makabe, H., Hattori, Y., Kimura, Y., Konno, H., Abe, M., Miyoshi, H., Tanaka, A., & Oritani, T. (2004). Total synthesis of cis-solamin and its inhibitory action with bovine heart mitochondrial complex I. *Tetrahedron*, 60(47), 10651–10657. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2004.09.011>
- Mesas, C., Martínez, R., Ortiz, R., Quinonero, F., Prados, J., Porres, J. M., & Melguizo, C. (2021). Antioxidant and antiproliferative potential of ethanolic extracts from *Moringa oleifera*, *Tropaeolum tuberosum* and *Annona cherimola* in colorectal cancer cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 143, 112248.
- Moreno-Jimenez, M. R., Trujillo-Esquivel, F., Gallegos-Corona, M. A., Reynoso-Camacho, R., González-Laredo, R. F., Gallegos-Infante, J. A., Rocha-Guzmán, N. E., & Ramos-Gomez, M. (2015). Antioxidant, anti-inflammatory and anticarcinogenic activities of edible red oak (*Quercus* spp.) infusions in rat colon carcinogenesis induced by 1, 2-dimethylhydrazine. *Food and Chemical Toxicology*, 80, 144–153.
- Morton, J. F., & Dowling, C. F. (1987). *Fruits of warm climates* (Vol. 20534). JF Morton Miami, FL.
- Najmuddin, S. U. F. S., Romli, M. F., Hamid, M., Alitheen, N. B., & Rahman, N. M. A. N. A. (2016). Anti-cancer effect of *Annona Muricata* Linn Leaves Crude Extract (AMCE) on breast cancer cell line. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 16(1), 311.
- Nakasone, H. Y., & Paull, R. E. (1998). *Tropical fruits*. Cab International.
- Nam, J.-S., Park, S.-Y., Jang, H.-L., & Rhee, Y. H. (2017). Phenolic compounds in different parts of young *Annona muricata* cultivated in Korea and their antioxidant activity. *Applied Biological Chemistry*, 60(5), 535–543.
- Nandhakumar, E., & Indumathi, P. (2013). In vitro antioxidant activities of methanol and aqueous



Diversidad genética, estructura y perfil fitoquímico de *Annona muricata* L.  
en el Sureste de México



- extract of *Annona squamosa* (L.) fruit pulp. *Journal of Acupuncture and Meridian Studies*, 6(3), 142–148.
- Nawwar, M., Ayoub, N., Hussein, S., Hashim, A., El-Sharawy, R., Wende, K., Harms, M., & Lindequist, U. (2012). Flavonol triglycoside and investigation of the antioxidant and cell stimulating activities of *Annona muricata* Linn. *Archives of Pharmacal Research*, 35, 761–767.
- Nijveldt, R. J., Van Nood, E. L. S., Van Hoorn, D. E. C., Boelens, P. G., Van Norren, K., & Van Leeuwen, P. A. M. (2001). Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 74(4), 418–425.
- Orallo, F., Álvarez, E., Camiña, M., Leiro, J. M., Gómez, E., & Fernández, P. (2002). The possible implication of trans-resveratrol in the cardioprotective effects of long-term moderate wine consumption. *Molecular Pharmacology*, 61(2), 294–302.
- Pant, P., Pandey, S., & Dall'Acqua, S. (2021). The influence of environmental conditions on secondary metabolites in medicinal plants: A literature review. *Chemistry & Biodiversity*, 18(11), e2100345.
- Patel, M. S., & Patel, J. K. (2016). A review on a miracle fruits of *Annona muricata*. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 5(1), 137.
- Peakall, R., & Smouse, P. E. (2012). GenAlEx Tutorials-Part 2: Genetic distance and analysis of molecular variance (AMOVA). *Bioinformatics*, 28, 2537–2539.
- Pinto, A. C. de Q., Cordeiro, M. C. R., De Andrade, S. R. M., Ferreira, F. R., Filgueiras, H. A. de C., Alves, R. E., & Kinpara, D. I. (2005). *Annona species*.
- Podoler, H., Galon, I., & Gazit, S. (1985). The effect of atemoya flowers on their pollinators: nitidulid beetles [*Annona squamosa* x *Annona cherimola*]. *Acta Oecologica Oecologia Applicata (France)*.
- Pritchard, J. K., Stephens, M., & Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155(2), 945–959.
- Quílez, A. M., Fernández-Arche, M. A., García-Giménez, M. D., & De la Puerta, R. (2018). Potential therapeutic applications of the genus *Annona*: Local and traditional uses and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*, 225, 244–270.
- Quiñones, M., Miguel, M., & Aleixandre, A. (2012). The polyphenols, naturally occurring compounds with beneficial effects on cardiovascular disease. *Nutrición Hospitalaria*, 27(1), 76–89.
- Rao, V. R., & Hodgkin, T. (2002). Genetic diversity and conservation and utilization of plant genetic resources. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 68(1), 1–19.
- Reyes-Montero, J. A., Aceves-Navarro, E., Caamal-Velázquez, J. H., & Alamilla-Magaña, J. C. (2018).





**Diversidad genética, estructura y perfil fitoquímico de *Annona muricata* L.  
en el Sureste de México**



Producción de guanábana (*Annona muricata* L.) en alta densidad de plantación, como alternativa para productores con superficies reducidas soursop (*Annona muricata* L.) production in high density planting as alternative for producers with reduced surfaces. *PROCESSED CHAYOTE*, 11(9), 37–42.

Rice-Evans, C. A., & Miller, N. J. (1996). Antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of food. *Biochemical Society Transactions*, 24(3), 790–795.

Rojas, L., Jaramillo, C., & Lemus, M. (2015). Métodos analíticos para la determinación de metabolitos secundarios de plantas. *Universidad Machala, Ecuador*.

Rousset, F. (2008). genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, 8(1), 103–106.

Salazar, C., Vargas-Mendoza, C. F., & Flores, J. S. (2010). Estructura y diversidad genética de *Annona squamosa* en huertos familiares mayas de la península de Yucatán. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 81(3), 759–770.

Sánchez, J. Á. (2001). Descomposición y ciclo de nutrientes en ecosistemas terrestres de México. *ACTA ZOOLOGICA MEXICANA (NS)*, 11–27.

Schlie-Guzmán, M. A., González-Esquinca, A. R., & Luna-Cazares, L. M. (2009). Las acetogeninas de Annonaceae: efecto antiproliferativo en líneas celulares neoplásicas. *Boletín Latinoamericano y Del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 8(4), 245–257.

Sharma, A. (2018). Gene expression analysis in medicinal plants under abiotic stress conditions. In *Plant metabolites and regulation under environmental stress* (pp. 407–414). Elsevier.

SIQUEIRA, A. D. M. O., MOREIRA, A. C. C. G., MELO, E. D. A., STAMFORD, T. C. M., & STAMFORD, T. L. M. (2015). DIETARY FIBRE CONTENT, PHENOLIC COMPOUNDS AND ANTIOXIDANT ACTIVITY IN SOURSOPS (*Annona muricata* L.). *Revista Brasileira de Fruticultura*, 37(4), 1020–1026. <https://doi.org/10.1590/0100-2945-211/14>

Spencer, H. J., & Fleming, T. H. (1989). Roosting and Foraging Behavior of the Queensland Tube-nosed Bat, *Nyctimene-Robinsoni* (Pteropodidae)-Preliminary Radio-Tracking Observations. *Wildlife Research*, 16(4), 413–420.

Strijk, J. S., Hinsinger, D. D., Roeder, M. M., Chatrou, L. W., Couvreur, T. L. P., Erkens, R. H. J., Sauquet, H., Pirie, M. D., Thomas, D. C., & Cao, K. (2021). Chromosome-level reference genome of the soursop (*Annona muricata*): A new resource for Magnoliid research and tropical pomology. *Molecular Ecology Resources*, 21(5), 1608–1619.

Talamantes-Sandoval, C. A., Cortés-Cruz, M., Balois-Morales, R., López-Guzmán, G. G., & Palomino-Hermosillo, Y. A. (2019). ANÁLISIS MOLECULAR DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA EN



Diversidad genética, estructura y perfil fitoquímico de *Annona muricata* L.  
en el Sureste de México



GUANÁBANA (*Annona muricata* L.) MEDIANTE MARCADORES SRAP. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 42(3), 209–214.

Tóth, E. G., Tremblay, F., Housset, J. M., Bergeron, Y., & Carcaillet, C. (2019). Geographic isolation and climatic variability contribute to genetic differentiation in fragmented populations of the long-lived subalpine conifer *Pinus cembra* L. in the western Alps. *BMC Evolutionary Biology*, 19, 1–17.

Valares Masa, C. (2011). *Variación del metabolismo secundario en plantas debida al genotipo y al ambiente*. Universidad de Extremadura. Servicio de Publicaciones.

Valencia-Avilés, E., Ignacio-Figueroa, I., Sosa-Martínez, E., Bartolomé-Camacho, M. C., Martínez-Flores, H. E., & García-Pérez, M.-E. (2017). Polifenoles: propiedades antioxidantes y toxicológicas. *Revista de La Facultad de Ciencias Químicas*, 16, 15–29.

Verma, N., & Shukla, S. (2015). Impact of various factors responsible for fluctuation in plant secondary metabolites. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 2(4), 105–113. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2015.09.002>

Viruel, M. A., & Hormaza, J. I. (2004). Development, characterization and variability analysis of microsatellites in lychee (*Litchi chinensis* Sonn., Sapindaceae). *Theoretical and Applied Genetics*, 108(5), 896–902.

Wang, J. (2017). The computer program structure for assigning individuals to populations: easy to use but easier to misuse. *Molecular Ecology Resources*, 17(5), 981–990.

Wu, J., Yu, Y., Wang, Y., Bao, M.-F., Shi, B.-B., Schinnerl, J., & Cai, X.-H. (2019). Four yellow monoterpenoid quinoline alkaloids from the stem of *Tabernaemontana bovinia*. *Organic Letters*, 21(12), 4554–4558.

Wuyts, N., De Waele, D., & Swennen, R. (2006). Extraction and partial characterization of polyphenol oxidase from banana (*Musa acuminata* Grande naine) roots. *Plant Physiology and Biochemistry*, 44(5–6), 308–314.

Young, A., Boyle, T., & Brown, T. (1996). The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. *Trends in Ecology & Evolution*, 11(10), 413–418.

Yuan, S.-S. F., Chang, H.-L., Chen, H.-W., Kuo, F.-C., Liaw, C.-C., Su, J.-H., & Wu, Y.-C. (2006). Selective cytotoxicity of squamocin on T24 bladder cancer cells at the S-phase via a Bax-, Bad-, and caspase-3-related pathways. *Life Sciences*, 78(8), 869–874.

Zeng, L., Ye, Q., Oberlies, N. H., Shi, G., Gu, Z.-M., He, K., & McLaughlin, J. L. (1996). Recent advances in annonaceous acetogenins. *Natural Product Reports*, 13(4), 275–306. <https://doi.org/10.1039/NP9961300275>



Diversidad genética, estructura y perfil fitoquímico de *Annona muricata* L.  
en el Sureste de México



- Zhang, Q., & Huang, Q. (2018). Revised method for determining Ganoderma lingzhi terpenoids by UV-Vis spectrophotometry based on colorimetric vanillin perchloric acid reaction. *Mycosystema*, 37(12), 1792–1801.
- Zhu, H., Wang, Y., Liu, Y., Xia, Y., & Tang, T. (2010). Analysis of flavonoids in *Portulaca oleracea* L. by UV-vis spectrophotometry with comparative study on different extraction technologies. *Food Analytical Methods*, 3, 90–97.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.  
México.



Diversidad genética, estructura y perfil fitoquímico de *Annona muricata* L.  
en el Sureste de México



## CAPITULO 2. DISCUSIÓN GENERAL Y CONSIDERACIONES FINALES.



Diversidad genética, estructura y perfil fitoquímico de *Annona muricata* L.  
en el Sureste de México



**Diversidad y estructura genética en *A. muricata* en el Sureste de México.**

Esta investigación ofrece uno de los primeros análisis de la diversidad y estructura genética, así como de la composición química de *A. muricata* en el Sur de México. El área estudiada comprende un territorio más amplio que los reportados en estudios previos en esta especie. Los resultados obtenidos indican que la región del Sur de México presenta valores significativos de diversidad genética en plantas de *A. muricata* en huertos familiares. Esto se evidencia en el valor de  $H_e$  obtenido, que es de 0.40, lo cual indica una diversidad genética moderada en comparación con estudios previos realizados en el estado de Nayarit, donde se reportaron valores bajos de  $H_e$ , de 0.050 y 0.164 respectivamente (Lira-Ortiz, Cortés-Cruz, et al., 2022; Talamantes-Sandoval et al., 2019), por lo que nuestros resultados demuestran una mayor diversidad genética para esta especie en la región Sur de México. Esto debido a que las áreas en las que se realizó este estudio, el cultivo se dispersa principalmente mediante la intervención humana, lo que tiene una repercusión directa sobre la diversidad genética encontrada (Agustín & Ledesma, 2014a) por lo contrario los valores reportados para el estado de Nayarit corresponden a plantaciones comerciales lo que explican su baja diversidad genética.

El coeficiente de consanguinidad ( $F$ ) presentó un valor global de 0.16, lo cual indica un nivel bajo de consanguinidad (Frankham et al., 2004). Esto se atribuye a que las muestras fueron obtenidas de huertos familiares, los cuales se consideran que





Diversidad genética, estructura y perfil fitoquímico de *Annona muricata* L.  
en el Sureste de México



mantienen niveles altos de diversidad genética tanto dentro como entre especies vegetales, especialmente en términos de variedades de cultivos tradicionales y variedades locales (Galluzzi et al., 2010).

El análisis de Hardy-Weinberg (*HWE*) demostró que las poblaciones de Xalapa, Coatzacoalcos, Pichucalco, Palizada y Campeche se encontraban en equilibrio *HWE*. Sin embargo, el resto de las poblaciones no presentaban equilibrio *HWE* debido a un déficit de heterocigotos ( $P < 0.001$ ). Este déficit de heterocigotos puede ser resultado de diferentes factores, como consanguinidad en cierto grado, selección fenotípica (Karlsson & Mork, 2005) y/o aislamiento reproductivo, lo cual lleva a tener poblaciones más homocigotas. Además, la selección fenotípica llevada a cabo por los productores para favorecer características deseables, como tamaño del fruto, sabor, producción de pulpa y resistencia a plagas (Hernández Fuentes et al., 2013), podría estar sesgando la selección de ciertos genotipos con una variabilidad genética más baja.

Las poblaciones muestreadas pueden estar experimentando aislamiento geográfico debido a la fragmentación del hábitat. Estos sitios se ven afectados por cambios en el uso del suelo causados por actividades humanas como la intensificación de la agricultura, la ganadería y la construcción de carreteras (Moreno-Jiménez et al., 2019). La fragmentación del hábitat se puede observar claramente en los datos de uso de la tierra de las regiones muestreadas en el mapa



Diversidad genética, estructura y perfil fitoquímico de *Annona muricata* L.  
en el Sureste de México



(Figura 1). Este fenómeno conlleva a una reducción en el tamaño de las poblaciones y un aumento en el aislamiento espacial. Además, estos cambios suelen estar asociados con una disminución en la variación genética y un incremento en la divergencia genética entre las poblaciones (Havsteen, 1983; Tóth et al., 2019; Young et al., 1996).

La preservación de la diversidad genética es un aspecto fundamental que contribuye a la supervivencia de las especies en su entorno natural. En el caso de las plantas cultivables, esta diversidad genética es de gran importancia, ya que proporciona beneficios significativos e información valiosa para su conservación a largo plazo (Bhandari et al., 2017). Sin embargo, a lo largo del tiempo, la diversidad genética se ve disminuida debido a varios factores, como prácticas de selección desequilibradas, el uso frecuente de un número limitado de genotipos seleccionados en el desarrollo de variedades, así como la propagación de un número reducido de líneas genéticas (Bhandari et al., 2017). Esto resulta en una menor diversidad genética en los cultivos, como se ha observado en algunos informes sobre *A. muricata* en el país. Por lo tanto, la investigación de variedades o genotipos regionales puede desempeñar un papel importante en la preservación del acervo genético y en el aumento de la diversidad genética.

Durante esta investigación, se identificaron tres grupos genéticos mediante análisis bayesiano en el software Structure, análisis  $F_{ST}$  y análisis de similitud de distancia



Diversidad genética, estructura y perfil fitoquímico de *Annona muricata* L.  
en el Sureste de México



genética de *Nei*. Estos resultados indican que el flujo de genes entre las poblaciones no sigue un patrón geográfico. Aunque algunas poblaciones mostraron una prevalencia de un grupo genético en particular, siempre se observó algún grado de mezcla entre ellos. Este fenómeno puede atribuirse a la proximidad geográfica de las áreas analizadas y a la forma de dispersión de *A. muricata*, que ocurre principalmente a través del transporte de semillas por aves, pequeños mamíferos y humanos (Bimmoy et al., 2014; Spencer & Fleming, 1989). Es importante destacar que los árboles frutales silvestres, como *A. muricata*, desempeñan un papel fundamental en la dieta de las comunidades locales cercanas, e incluso su fruto se utiliza en el comercio local, lo que favorece la dispersión de sus semillas (Agustín & Ledesma, 2014a).

**Perfil metabólico de extractos metanólicos de *A. muricata*.**

**Contenido total de flavonoides y polifenoles totales.**

Los contenidos de flavonoides y polifenoles totales encontrados en las muestras de las poblaciones de *A. muricata* (Figura 3) en la región sur de México presentaron variaciones en cada una de las regiones estudiadas, lo cual concuerda con lo reportado en la literatura por otros estudios realizados en extractos metanólicos de hojas de la misma especie. Algunos de estos son los mencionados por León-Fernández et al. (2021) de 30 mg GAE/ gE, por George et al. (2015) 36,2 µg GAE/g por Vit et al. (2014) de 375.3 mg GAE/100g, para el caso de polifenoles totales. Para



Diversidad genética, estructura y perfil fitoquímico de *Annona muricata* L.  
en el Sureste de México



el caso de flavonoides totales Nam et al. (2017) reportó valores de 168,52 mg RE / gE. y León-Fernández et al. (2021) reportó valores de 490.83 mg RE / gE. Como se puede observar, diferencia entre el contenido fitoquímico en las muestras analizadas, lo cual podría deberse a las diferencias en el clima, la temperatura, la humedad, el suelo y el viento en las áreas donde se realizaron cada uno de estos estudios (Nam et al., 2017; Pant et al., 2021). Además, el elevado contenido de flavonoides en ciertas áreas puede estar relacionado con los distintos niveles de radiación ultravioleta presentes en cada una de las zonas estudiadas (Angmo et al., 2021; Nam et al., 2017). La radiación UV se vincula con la respuesta en la síntesis de flavonoides y polifenoles debido a los procesos de fotosíntesis en las plantas (Nam et al., 2017; Olsson, 1999).

**Análisis por HPLC de los extractos metanólicos de hojas de *A. muricata*.**

Entre los 35 compuestos identificados, se observó la presencia de posibles ácido cumárico pico 6 y 33, rutina pico 7 y glucósidos de camferol en el pico 11, en todas las muestras de las diferentes poblaciones estudiadas. Estos resultados son consistentes con lo reportado en hojas de *A. muricata*, como se ha menciona en investigaciones como las mencionadas George et al. (2012, 2015) y Jiménez et al. (2014).



Diversidad genética, estructura y perfil fitoquímico de *Annona muricata* L.  
en el Sureste de México



**Relación entre la diversidad genética y la cantidad de polifenoles y flavonoides en las diferentes regiones de muestreo en el Sureste de México.**

Para analizar la relación entre la estructura genética y la cantidad de polifenoles y flavonoides en distintas regiones del Sureste de México, se empleó el método de escalamiento multidimensional basado en una matriz de correlación utilizando el software Statistica 13.3. Mediante este análisis, se generó una representación gráfica en dos dimensiones que muestra las correlaciones entre los contenidos químicos de polifenoles y flavonoides, considerando las categorías de producción de metabolitos secundarios del 25%, 50% y 75%. Además, se incluyó la pertenencia a uno de los tres grupos genéticos identificados mediante el programa Structure, utilizando datos de las 10 poblaciones evaluadas en el estudio de la identificación fitoquímica de *A. muricata*. Con base en esta representación gráfica se pudo observar cierta tendencia en la cual las poblaciones que presentan los más altos contenidos, tanto de polifenoles como de flavonoides (75%) pertenecen al grupo genético (Verde) en el cual se encuentran las poblaciones de Champotón, Emiliano Zapata, Palenque y Centro. Por otra parte, se observó una tendencia en las poblaciones donde prevalece el genotipo azul, caracterizadas por un bajo contenido de polifenoles (25%) y un contenido más alto de flavonoides (50%). Estas poblaciones incluyen a Comalcalco, Palizada, Nacajuca y Cunduacán. Además, se pudo determinar la presencia de un tercer grupo que se caracterizó por mostrar una mayor producción de polifenoles (50%) y una menor producción de flavonoides





Diversidad genética, estructura y perfil fitoquímico de *Annona muricata* L.  
en el Sureste de México



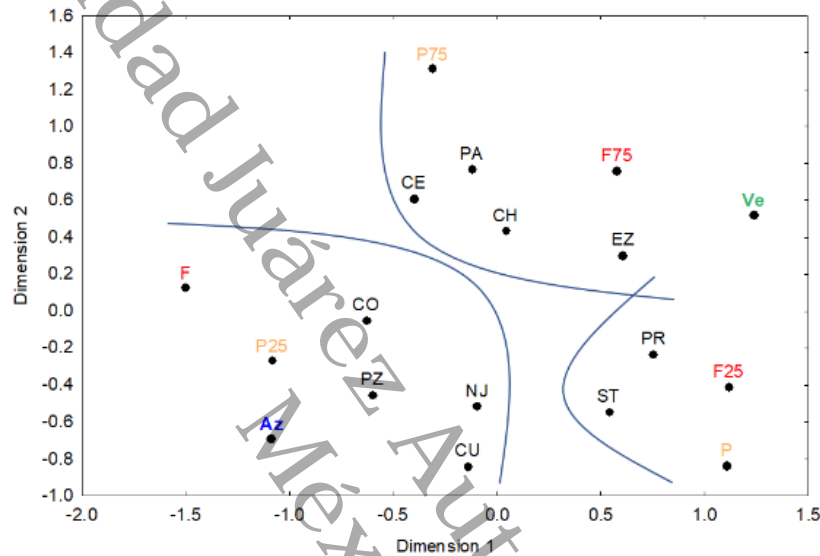
(25%). Estas poblaciones, Salto de Agua y Paraíso, formaron parte de dicho grupo y se identificaron como parte del genotipo verde. La conexión entre la información entre los perfiles genéticos y los perfiles químicos no puede establecerse de forma directa, debido a las técnicas aplicadas. Mientras que para el perfil genético es posible realizarlos por cada individuo (0.2 g. de tejido vegetal), el perfil fitoquímico se realizó por poblaciones, debido a la cantidad de material vegetal necesario para los extractos químicos, que requería 5 kilos de hojas frescas y por lo tanto fue necesario combinar el material vegetal de todos los individuos de la población en una sola muestra para extraer los compuestos químicos. Sin embargo, a pesar de esta limitación, se observó una tendencia importante entre la estructura genética y la cantidad de metabolitos secundarios encontrados en las poblaciones de *A. muricata* en el Sur de México, mostrando que puede existir una relación entre la estructura genética y la cantidad de metabolitos secundarios contenidos en las plantas de esta familia en la región. Las diferencias en el contenido de metabolitos secundarios presentes en las hojas de *A. muricata* de las poblaciones evaluadas pueden deberse a los factores regionales predominantes de cada sitio de estudio, así como a la estructura genética de las poblaciones. Se ha informado que la síntesis, acumulación y fluctuaciones de compuestos están reguladas por cuatro factores principales: genéticos, ontogénicos, morfogenéticos y ambientales (Verma & Shukla, 2015). Estos factores interactúan de manera compleja y pueden influir en



Diversidad genética, estructura y perfil fitoquímico de *Annona muricata* L. en el Sureste de México



las características químicas de las plantas en diferentes regiones de la parte Sur de México.



**Figura. 12.** Dispersión gráfica de 10 poblaciones de *A. muricata* a través de escalonamiento multivariado, basado en el contenido químico de polifenoles, flavonoides y estructura genética de plantas de guanábanas en la región Sur de México, llevado a cabo con el programa *Statistica 13.3*. CU: Cunduacán, CO: Comalcalco, PR: Paraíso, NJ: Nacajuca, CE: Centro, ST: Salto de Agua, PZ: Palizada, PA: Palenque, EZ: Emiliano Zapata, CH: Champotón, F25: Contenido de 25% de Flavonoides, F: Contenido de 50% de Flavonoides, F75%: Contenido de 75% de Flavonoides, P25: Contenido de 25% de Polifenoles, P: Contenido de 50% de Polifenoles, P75%: Contenido de 75% de Polifenoles, Ve: Grupo genético verde, Az: Grupo genético Azul.



Diversidad genética, estructura y perfil fitoquímico de *Annona muricata* L.  
en el Sureste de México



## CONCLUSIONES Y CONSIDERACIONES FINALES.

El estudio demostró la existencia de tres grupos genéticos de *A. muricata*, además de que la mayoría de las poblaciones evaluadas presentaron una diversidad genética moderada. Además, se identificó que ciertas poblaciones, como Champotón, Palenque, Emiliano Zapata, Nacajuca y Centro, presentaron una mayor productividad de flavonoides y polifenoles, lo cual se relacionó con una diversidad genética de moderada a alta. Sin embargo, cabe destacar que estos resultados pueden verse influenciados por factores ambientales como el uso del suelo y la interacción con las comunidades humanas circundantes. Estos hallazgos son relevantes ya que la identificación de las poblaciones con mayor producción de metabolitos y diversidad genética puede contribuir a establecer cultivos con fines farmacéuticos, así como a conservar variedades genéticas exclusivas de la región. De igual forma, es crucial el desarrollo de nuevas tecnologías de domesticación de plantas altamente productivas en metabolitos secundarios de interés medicinal que consideren el conocimiento existente sobre la influencia de los factores abióticos en la producción de metabolitos secundarios. En última instancia, es importante destacar que la diversidad genética contribuye a la variabilidad en el contenido de metabolitos secundarios en las plantas.



Diversidad genética, estructura y perfil fitoquímico de *Annona muricata* L.  
en el Sureste de México



## BIBLIOGRAFÍA

Agustín, J. A., & Ledesma, S. D. S. (2014). Conservación y uso de los recursos genéticos de Annonaceae en México. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 36, 118–124.

Bhandari, H. R., Bhanu, A. N., Srivastava, K., Singh, M. N., & Shreya, H. A. (2017). Assessment of genetic diversity in crop plants-an overview. *Adv. Plants Agric. Res*, 7(3), 279–286.

Lira-Ortiz, R., Cortés-Cruz, M. A., López-Guzmán, G. G., Palomino-Hermosillo, Y. A., Sandoval-Padilla, I., Ochoa-Jiménez, V. A., Sánchez-Herrera, L. M., Balois-Morales, R., & Berumen-Varela, G. (2022). Diversidad Génetica de poblaciones de guanábana (*Annona muricata* L.) en Nayarit, México mediante marcadores SSR y SRAP. *Acta Biológica Colombiana*, 27(1), 104–112.

Pant, P., Pandey, S., & Dall'Acqua, S. (2021). The influence of environmental conditions on secondary metabolites in medicinal plants: A literature review. *Chemistry & Biodiversity*, 18(11), e2100345.

Talamantes-Sandoval, C. A., Cortés-Cruz, M., Balois-Morales, R., López-Guzmán, G. G., & Palomino-Hermosillo, Y. A. (2019). ANÁLISIS MOLECULAR DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA EN GUANÁBANA (*Annona muricata* L.) MEDIANTE MARCADORES SRAP. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 42(3), 209–214.



Diversidad genética, estructura y perfil fitoquímico de *Annona muricata* L.  
en el Sureste de México



ANEXOS.

Tabla 2. Ubicación de los sitios de muestreo de las poblaciones de *A. muricata* L. con el número de individuos utilizados para los análisis y sus coordenadas.

Estado	Poblaciones analisis SSR	Poblacion analisis Quimico	No.	Codigo	Latitud	Longitud
Veracruz	Xalapa (XA)		1	XA1	19,419,306	96,680,639
			2	XA2	19,420,778	9,668,075
			3	XA3	19,367,722	96,687,361
	Coatzacoalcos (CZ)		4	CZ1	18,129,333	94,481,833
			5	CZA2	18,128,806	94,483,861
			6	CZA3	18,128,556	94,483,583
Tabasco	Cardenas (CR)		7	CR1	1,800,025	93,295,278
			8	CR2	18,000,778	93,295,389
			9	CR3	18,241,194	94,006,222
			10	CR4	179,765	93,384,833
			11	CR5	17,966,917	93,363,472
			12	CR6	17,969,361	9,336,575
			13	CR7	17,981,806	93,381,472
			14	CR8	17,976,972	93,384,639
			15	CR12	18,018,667	93,317,806
			16	CR13	18,019,167	93,308,917
	Huimanguillo (HU)		17	HU7	17,720,972	93,386,472
			18	HU8	178,325	934,155
			19	HU1	17,851,944	93,390,611
			20	HU2	17,822,861	93,395,278
			21	HU3	178,215	93,393,972
			22	HU4	17,822,583	93,392,778
			23	HU5	17,820,583	93,397,361
			24	HU6	17,821,806	93,396,528





Diversidad genética, estructura y perfil fitoquímico de *Annona muricata* L.  
en el Sureste de México



Cunduacan (CU)	Cunduacan	25	CU1	18,103,417	93,147,667
		26	CU2	18,104,944	93,148,889
		27	CU3	18,102,694	93,144,889
		28	CU4	18,102,694	93,144,944
		29	CU5	18,102,889	93,144,778
		30	CU6	18,102,389	93,144,556
		31	CU7	18,010,056	93,305,417
		32	CU8	18,010,083	93,305,306
		33	CU9	18,010,194	93,305,028
		34	CU10	18,004,028	93,134,306
		35	CU11	18,004,028	93,134,306
		36	CU12	18,004,194	93,134,306
		37	CU13	18,004,556	931,365
		38	CU14	18,004,556	93,136,722
		39	CU15	18,004,333	93,136,778
		40	CU16	18,133,083	93,282,306
		41	CU17	181,325	93,282,556
		42	CU18	18,132,611	93,282,583
		43	CU19	18,115,611	9,329,675
		44	CU20	18,115,778	93,296,667
Comalcalco (CO)	Comalcalco	45	CO1	1,818,225	93,240,639
		46	CO2	18,182,194	93,240,694
		47	CO3	18,182,278	93,240,694
		48	CO4	18,181,917	93,240,694
		49	CO5	18,181,833	9,324,075
		50	CO6	18,181,972	93,240,556
		51	CO7	18,181,889	93,240,611
		52	CO8	18,182,167	93,240,972
		53	CO9	18,182,889	93,239,806
		54	CO10	18,182,889	93,239,861
		55	CO11	18,182,972	93,239,778
Paraíso (PR)	Paraíso	56	PR1	18,314,444	93,167,667
		57	PR2	18,314,556	93,167,778
		58	PR3	18,314,667	93,167,667



Diversidad genética, estructura y perfil fitoquímico de *Annona muricata* L.  
en el Sureste de México



		59	PR4	183,145	93,167,806	
		60	PR5	1,838,775	93,230,694	
		61	PR6	18,393,167	93,226,972	
		62	PR7	18,393,667	93,225,333	
	Nacajuca (NJ)	Nacajuca	63	NJ1	18,089,694	92,939,167
			64	NJ2	18,089,528	92,938,167
			65	NJ5	18,139	93,003,028
			66	NJ6	18,139	93,002,917
			67	NJ7	18,136,861	93,001,583
			68	NJ8	18,136,889	93,001,611
			69	NJ9	18,119,028	92,983,778
			70	NJ10	18,119	92,983,556
			71	NJ11	18,125,139	9,299,025
			72	NJ12	18,125,056	92,989,361
			73	NJ13	18,124,917	92,989,472
			74	NJ14	18,124,861	92,989,333
			75	NJ15	1,812,475	92,989,333
			76	NJ16	18,124,806	92,989,667
			77	NJ17	18,124,944	92,990,056
	78	NJ20	18,021,806	92,947,722		
	79	NJ21	18,033,056	92,948,083		
	80	NJ22	18,033,083	92,947,556		
	81	NJ23	18,033	92,947,333		
	Centro (CE)	Centro	82	CE1	17,977,389	92,957,611
			83	CE2	17,954,528	92,791,222
			84	CE3	17,959,889	92,785,944
			85	CE4	17,969,333	92,790,278
			86	CE5	17,975,306	92,786,528
			87	CE6	17,976,472	92,786,972
			88	CE7	17,976,167	92,787,472
			89	CE8	17,976,389	92,786,694
			90	CE9	17,971,222	92,788,111
			91	CE10	17,971,268	92,787,982
			92	CE11	17,973,417	92,789,028



Diversidad genética, estructura y perfil fitoquímico de *Annona muricata L.*  
en el Sureste de México



		93	CE12	17,973,463	92,788,609	
		94	CE13	17,972	92,786,778	
		95	CE14	1,797,331	92,789,264	
		96	CE15	17,979,861	92,800,556	
		97	CE16	17,979,861	92,804,278	
		98	CE17	179,795	92,803,667	
		99	CE18	17,979,389	92,804,028	
		100	CE19	17,883,639	92,924,333	
		101	CE20	1,788,375	92,924,306	
		102	CE21	17,883,889	92,925,028	
		103	CE22	17,883,889	92,924,944	
		104	CE23	17,975,806	92,994,028	
		105	CE24	17,975,778	92,994,667	
		106	CE25	17,990,333	92,973,778	
		107	CE26	17,990,472	92,973,806	
		108	CE27	17,953,778	92,792,639	
		109	CE29	17,953,472	92,792,528	
		110	CE30	17,953,694	92,792,222	
		111	CE31	17,953,889	92,791,944	
	Emiliano Zapata (EZ)	Emiliano Zapata	112	EZ1	17,736,917	91,754,333
			113	EZ2	17,731,667	91,744,917
			114	EZ3	17,731,667	91,744,917
			115	EZ4	17,731,667	91,744,917
			116	EZ5	17,737,139	91,755,222
			117	EZ6	17,737,083	91,755,333
			118	EZ7	17,738,028	91,76
			119	EZ8	17,738,167	91,759,861
			120	EZ9	17,738,167	91,759,861
			121	EZ10	177,385	91,761,361
	Tenosique (TE)		122	EZ11	17,737,139	91,765,917
			123	TE1	17,456,583	91,417,528
			124	TE2	17,456,167	91,417,278
			125	TE3	17,491,222	91,431,222
			126	TE4	1,749,075	91,430,778



Diversidad genética, estructura y perfil fitoquímico de *Annona muricata* L.  
en el Sureste de México



			127	TE5	17,491,722	91,432,583
			128	TE6	17,490,417	91,430,722
			129	TE7	17,493,167	91,431,056
			130	TE8	17,462,333	91,501,944
			131	TE9	17,461,722	91,499,944
			132	TE10	17,463,389	91,502,639
			133	TE11	17,465,972	91,509,528
			134	TE12	1,746,575	91,510,694
			135	TE13	17,465,417	91,508,361
Chiapas	Palenque (PA)	Palenque	136	PA1	17,512,111	92,006,611
			137	PA2	17,512	92,006,528
			138	PA4	17,514,417	91,999,917
			139	PA5	17,514,417	91,999,917
			140	PA6	17,518,556	91,994,111
			141	PA7	17,519,528	9,200,075
			142	PA8	17,520,028	92,000,778
			143	PA9	17,519,972	92,001,333
			144	PA10	17,518,806	92,001,694
			145	PA11	17,516,667	91,997,167
			146	PA12	17,521,833	91,997,778
			147	PA13	17,524,083	91,995,639
			148	PA14	17,524,083	91,995,639
			149	PA15	17,522,028	92,002,417
			150	PA16	17,504,722	92,002,722
			151	PA17	17,504,722	92,002,361
			152	PA18	17,504,583	92,002,389
				Pichucalco (PI)		153
		154	PI2		17,507,306	93,123,722
		155	PI3		17,511,306	93,122,444
		156	PI4		17,511,306	93,122,444
	Sabanilla (SA)		157	SA1	17,362,306	92,640,111
			158	SA2	17,358,056	92,64
			159	SA3	17,358,111	92,638,528
			160	SA4	17,357,306	92,639,472



Diversidad genética, estructura y perfil fitoquímico de *Annona muricata* L.  
en el Sureste de México



S. de Agua (ST)	S. de Agua	161	SA5	17,357,167	92,639,472		
		162	ST1	17,551,778	92,337,056		
		163	ST2	17,551,778	92,337,083		
		164	ST3	17,551,778	92,337,028		
		165	ST4	17,551,833	92,337,111		
		166	ST5	17,552,083	92,337,361		
		167	ST6	17,552,111	92,337,417		
		168	ST7	17,550,944	92,339,417		
		169	ST8	17,550,861	92,339,333		
		170	ST9	17,550,833	92,340,028		
		171	ST10	17,551,083	92,340,194		
		172	ST11	17,551,139	92,340,361		
		173	ST12	17,551,167	923,405		
		174	ST13	17,554,361	92,339,917		
Campeche	Champtón (CH)	Champtón	175	CH1	19,222,972	90,731,056	
			176	CH2	19,221,111	90,729,944	
			177	CH3	19,224	9,073,025	
			178	CH4	19,219,139	90,727,917	
			179	CH5	19,219,972	90,731,583	
			180	CH8	19,138,833	9,072,775	
			181	CH10	19,139,028	90,726,722	
			182	CH11	19,139,028	90,726,972	
	Campeche (CA)			183	CA1	19,815,056	90,546,722
				184	CA2	20,130,083	90,178,667
				185	CA3	20,132,139	90,178,389
Palizada (PZ)			186	PZ1	18.200583	92.123556	
			187	PZ2	18.201417	92.123389	
			188	PZ3	18.201806	92.123528	
			189	PZ4	18.204861	92.123389	
			190	PZ5	18.204917	92.123417	
			191	PZ6	18.234667	92.120833	

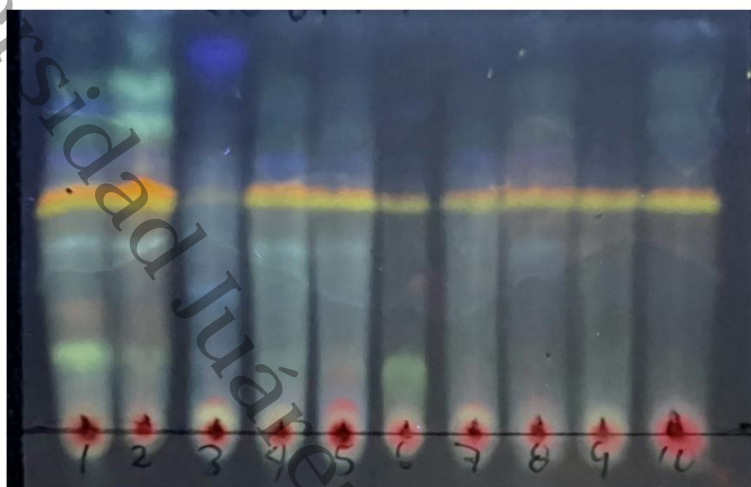




Diversidad genética, estructura y perfil fitoquímico de *Annona muricata* L. en el Sureste de México

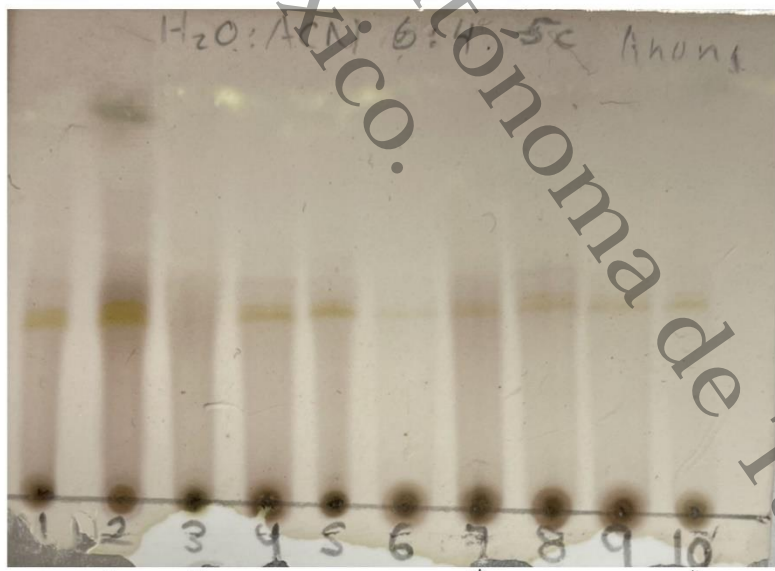


A)



Palenque-Chi Centro-Tab Champotón-Cam Nacajuca-Tab Emiliano Z-Tab Palizada-Cam Salto de A-Chi Cunduacán-Tab Comalcalco-Tab Paraiso-Tab

B)



Palenque-Chi Centro-Tab Champotón-Cam Nacajuca-Tab Emiliano Z-Tab Palizada-Cam Salto de A-Chi Cunduacán-Tab Comalcalco-Tab Paraiso-Tab

**Figura. 13.** Cromatoplaqa fase normal de los extractos hexánico (A) Luz visible, (B) Onda larga en lámpara UV.



Diversidad genética, estructura y perfil fitoquímico de *Annona muricata* L. en el Sureste de México

