

**UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA**



**Casa abierta al tiempo**

Inducción *in vitro* de haustorios en raíces de *Castilleja tenuiflora* Benth. y  
evaluación de los compuestos bioactivos

**TESIS**

**Para obtener el grado de**

**Doctora en Biotecnología**

**PRESENTA**

**M. en C. Guadalupe Salcedo Morales**

**Dr. Francisco Cruz Sosa (Director de tesis)**

**Dra. Gabriela Trejo Tapia (Co-Director)**

**Dr. Antonio Jiménez Aparicio (Asesor)**

**Julio del 2014**

**El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACyT, con la referencia 001466**

## **DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS**

El presente trabajo fue financiado por la Secretaría de Investigación y Posgrado del Instituto Politécnico Nacional (20131786) y el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, 100202). La alumna Guadalupe Salcedo Morales agradece al CONACyT (número de becario 47946) y al Consejo Técnico para el Otorgamiento de Becas de Estudio, Apoyos Económicos y Licencias con Goce de Sueldo (COTEBAL) del Instituto Politécnico Nacional por la beca para realizar estudios de Doctorado. La alumna Guadalupe Salcedo Morales agradece a la Universidad Autónoma Metropolitana por el apoyo brindado para realizar los estudios de Doctorado.

## **AGRADECIMIENTOS**

*Agradezco a la Dra. Gaby Trejo y co-Directora por brindarme su apoyo y asesoría para la realización de mis estudios de Doctorado.*

*Agradezco al Dr. Antonio Jiménez Aparicio por el apoyo que siempre me ha brindado desde que llegue al CeProBi.*

*Le doy las gracias al Dr. Francisco Cruz Sosa por su apoyo y por darme la oportunidad de formar parte de sus estudiantes.*

*Agradezco a la Dra. Kalina Bermúdez, a la Dra. Pilar Nicassio y al Dr. Antonio Bernabé por aceptar ser parte del Comité de Tesis y por sus valiosas sugerencias!*

*Les doy las gracias a mis compañeras(os) y amigas(os): Blanca, Sandra, Toñita,, Lety Bravo, Sandra Leticia, Norma Robledo, Edith, Gloria Mariaca, Alma Rosa, Jose Luis! Por brindarme su apoyo y amistad!*

*Gracias a la maestra Isabel y al Ingeniero Briones por su amistad!*

*A mis amigos de la Universidad: Margarita Zuñiga y Manuel Quiterio.*

*Agradezco a Toñita Gonzales Marquina por todo el apoyo que siempre me ha brindado!*

## **DEDICATORIAS**

*¡Agradezco a Dios por haberme dado la oportunidad de poder haber cumplido con una meta más en mi vida!*

*¡Les agradezco a mis padres por haberme dado la vida! A mi padre (qed), que antes de partir me brindo su apoyo y bendición cuando le platique de mis planes de hacer el Doctorado. ¡A mi madre que siempre ha estado conmigo apoyándome y dándome sus bendiciones!*

*¡A mi esposo Fernando, mi compañero y amigo por su comprensión, apoyo y compañía cuando más lo he necesitado! Gracias Fer por ayudarme a lograr mis metas!*

*¡Agradezco a Dios por darme dos hijos a quienes amo tanto... Misael y Andy! ¡Porque ellos han sido uno de los motivos más grandes para seguir adelante! Porque me han ayudado a enfrentar y superar los obstáculos! Gracias Misael y Andy!*

*¡A mi hija Itzel! Por apoyarme y estar siempre conmigo en las buenas y en las malas! Gracias Itzel, a Renatita y a Toño!*

*¡A mis hermanas y hermanos que tanto quiero... Chuy, Meche, Guille, Virgilio (qed), Angel, Fidel, Goyo y Adolfo! Gracias hermanos por todo su cariño y apoyo! Por estar siempre pendiente de mi salud y de mis metas!*

*Agradezco a todos mis sobrinos: César, Adriana, Israel, Uriel, Erick, Yosahandi, Eli, Omar, Toñito,,Edgar, Elvia, Ariel, Oliver, Kendy, Angel y Diana.*

*A mis cuñadas: Tony, Chuy y Rosa!*

*A mis cuñados: José, Julio y Adrián!*

*A mi amiga y comadre Bertha!*



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

# ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00134

Matrícula: 210180278

INDUCCION *in vitro* DE HAUSTORIOS EN RAICES DE *Castilleja tenuiflora* BENTH. Y EVALUACION DE LOS COMPUESTOS BIOACTIVOS

En México, D.F., se presentaron a las 12:00 horas del día 9 del mes de julio del año 2014 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

- DR. ANTONIO RUPERTO JIMENEZ APARICIO
- DRA. MARIA DEL PILAR NICASIO TORRES
- DR. ANTONIO BERNABE ANTONIO
- DRA. GABRIELA MARIANA RODRIGUEZ SERRANO
- DRA. KALINA BERMUDEZ TORRES

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretaria la última, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTORA EN BIOTECNOLOGIA

DE: GUADALUPE SALCEDO MORALES

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

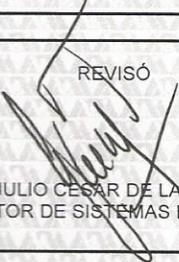
## APROBAR

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.




GUADALUPE SALCEDO MORALES  
ALUMNA

REVISÓ



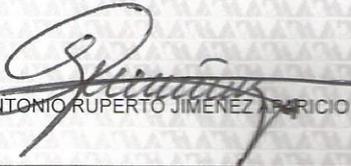
LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI  
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS



DRA. EDITH PONCE ALQUICIRA

PRESIDENTE



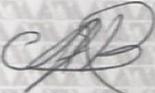
DR. ANTONIO RUPERTO JIMENEZ APARICIO

VOCAL

Ha. del Pilar Nicasio T.

DRA. MARIA DEL PILAR NICASIO TORRES

VOCAL



DR. ANTONIO BERNABE ANTONIO

VOCAL



DRA. GABRIELA MARIANA RODRIGUEZ SERRANO

SECRETARIA



DRA. KALINA BERMUDEZ TORRES

## INDICE GENERAL

	Página
Índice de cuadros	iii
Índice de figuras	iv
Notación	vi
<b>RESUMEN</b>	vii
<b>ABSTRACT</b>	ix
<b>I INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>II ANTECEDENTES</b>	2
II. 1. Parasitismo en plantas	2
II.2. Haustorio: características y proceso de formación	3
II.2.1 Eventos bioquímicos y moleculares en la formación de haustorios	6
II.3 Género <i>Castilleja</i> (Familia Orobanchaceae)	9
II.3.1 Ruta de biosíntesis de flavonoides y feniletanoides	
<b>III. JUSTIFICACIÓN</b>	14
<b>IV. HIPÓTESIS</b>	14
<b>V. OBJETIVOS</b>	14
V.I. Objetivo general	14
V.2. Objetivos particulares	15
<b>VI. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	16
VI.1. Material biológico	17
VI.1.1. Establecimiento del sistema experimental para la inducción de haustorios	17
VI.2.1 Interacción de <i>Castilleja tenuiflora-Zea mays</i> en sustrato	17
VI.2.2.1. Obtención de exudados de maíz	18
VI.2.2 Cultivo en un sistema hidropónico y aplicación de los factores de inducción de haustorios	18
VI.2.2.2. Preparación de FIHs	18
VI.2.3 Cultivo en inmersión permanente y aplicación de FIHs	19

VI.2.4	Inducción de haustorios con FIHs en medio de cultivo en tubos de ensaye con medio semisólido en condiciones <i>in vitro</i>	19
VI.2.4.1.	Calculo del número de haustorios	
VI.2.2.	Análisis estadístico	20
VI.3.	Caracterización estructural de los haustorios	20
VI.4.	Localización histoquímica de flavonoides utilizando DBPA	21
VI.5.	Localización histoquímica de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> utilizando DAB	21
VI.6.	Análisis químico	21
VI.6.1	Preparación de extractos	21
VI.6.2.	Cuantificación de compuestos fenólicos totales	22
VI.6.3.	Cuantificación de flavonoides totales	22
VI.6.4	Análisis químico por LC-MS (ESI)	23
VII.	<b>RESULTADOS</b>	24
VII.1.	Establecimiento del sistema experimental para la inducción de haustorios	24
VII.1.1.	Relación planta-planta entre <i>Castilleja tenuiflora-Zea mays</i> en sustrato	24
VII.1.2.	Sistema hidropónico	26
VII.1.3.	Cultivo en inmersión permanente y aplicación de FIHs	29
VII.1.4.	Cultivo en tubos de ensaye con medio de cultivo semisólido y aplicación de FIHs	31
VII.2.	Caracterización de haustorio mediante técnicas histológicas	34
VII.3.	Localización histoquímica de zonas nucleadas, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> y flavonoides en haustorios en raíces de <i>C. tenuiflora</i>	37
VII.4.	Análisis fitoquímico de plantas <i>in vitro</i> de <i>C. tenuiflora</i> después de la inducción de haustorios con FIHs	40
VII.4.1	Análisis LC-MS (ESI)	42
VII.5	<b>DISCUSIÓN</b>	49
VII.6	<b>CONCLUSIONES</b>	51
VIII.	<b>BIBLIOGRAFIA</b>	53

## ÍNDICE DE CUADROS

		Página
1	Efecto de la aplicación exógena de compuestos fenólicos en algunas especies vegetales	5
2	Estudios fitoquímicos en la especie vegetal <i>Castilleja tenuiflora</i>	11
3	Características de las plantas de <i>Castilleja tenuiflora</i> tratadas con diferentes Factores de Inducción de Haustorios (FIHs) en condiciones hidropónicas	27
4	Inducción de haustorios en raíces de <i>Castilleja tenuiflora</i>	33
5	Inducción de haustorios en raíces de plantas de <i>Castilleja tenuiflora</i> con diferentes concentraciones de vanillina	34
6	Concentración de compuestos fenólicos totales y flavonoides en plantas de <i>Castilleja tenuiflora</i> tratadas con diferentes concentraciones de vanillina	41
7	Tiempo de retención, longitud UV, ESI/MS (-) m/z, identificación y cuantificación de flavonoides y feniletanoides en extractos metanólicos de la parte aérea y raíz de plantas de <i>Castilleja tenuiflora</i> .	46
8	Concentración de apigenina en extractos metanólicos de parte aérea y raíz de plantas de <i>Castilleja tenuiflora</i> tratadas con Factores de Inducción de Haustorios	48

## ÍNDICE DE FIGURAS

		Página
1	Esquema que representa los eventos bioquímicos y moleculares que ocurren durante el desarrollo de haustorios inducidos por exudados de raíz ó FIHs	7
2	<i>Castilleja tenuiflora</i> Benth en su hábitat natural	10
3	Ruta de biosíntesis de compuestos fenólicos: flavonoides y feniletanoides	13
4	Estrategia general empleada para la inducción de haustorios en plantas de <i>C. tenuiflora</i>	16
5	Haustorios en una relación planta-planta <i>Castilleja tenuiflora</i> - <i>Zea-mays</i>	25
6	Inducción de haustorios en raíces de <i>Castilleja. tenuiflora</i> en condiciones hidropónicas empleando catequina y H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	28
7	Inducción de haustorios en raíces de <i>Castilleja tenuiflora</i> crecidas en medio de cultivo líquido aplicando FIHs después de 21 días	30
8	Inducción de haustorios en raíces de <i>Castilleja tenuiflora</i> aplicando compuestos químicos en un sistema semi-sólido	32
9	Caracterización histológica de haustorios inducidos con 25 µM de vanillina.	36
10	Localización histoquímica de zonas nucleadas, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> y flavonoides en haustorios inducidos en raíces de <i>Castilleja tenuiflora</i> con 25 µM de vanillina	38
11	Caracterización por microscopia electrónica de barrido de haustorios inducidos en raíces de <i>C. tenuiflora</i> aplicando vanillina y vanillina + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (25 µM).	40
12	Espectros de masas LC-MS-ESI (ionización por electrospray) de estándares y picos identificados en extractos metanólicos de <i>Castilleja tenuiflora</i>	43

- 13 Cromatogramas (330 nm) de extractos metanólicos de parte aérea 45  
de plántulas de *Castilleja tenuiflora* de 21 días tratadas con FIHs
- 14 Cromatogramas (330 nm) de extractos raíces de plántulas de 47  
*Castilleja tenuiflora* de 21 días tratadas con FIHs

## NOTACIÓN

BS	Biomasa seca
B <sub>5</sub>	Gamborg's medio de cultivo basal
CCE	Células de la corteza externa
CCI	Células de la corteza interna
DMBQ	Dimetil-benzoquinona
DAB	3,3-Diamonobenzidina
DBPA	Ácido difenilbórico-2-amonoetyl éster
EAG	Equivalentes de ácido gálico
EC	Equivalentes de catequina
FIHs	Factores de inducción de haustorios
GA	Gránulos de almidón
LC-MS	Cromatografía líquida-espectro de masas
SH	Schenk y Hilbebrandt
tr	Tiempo de retención
ZM	Zona meristemática

## RESUMEN

*Castilleja tenuiflora* Benth. (Orobanchaceae) es una especie vegetal hemiparásita de uso medicinal; presenta actividades biológicas comprobadas (citotóxica, anti-inflamatoria y anti-ulcerogénica), mismas que son atribuibles a iridoides y compuestos de tipo fenólico como flavonoides y feniletanoides. En presencia de compuestos fenólicos, flavonoides, quinonas, etc (presentes en exudados de raíz de plantas hospederas) *C. tenuiflora* desarrolla una estructura denominada haustorio por medio de la cual parasita a otras especies vegetales a nivel de las raíces. El proceso de formación de haustorios es complejo, involucra eventos moleculares, bioquímicos y anatómicos que no han sido completamente esclarecidos. Inicia con el reconocimiento (por parte de la planta parásita) de señales químicas del hospedero junto con reacciones de óxido-reducción. En estas reacciones, el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) es una molécula fundamental. Dada su complejidad, las investigaciones sobre los haustorios en condiciones naturales son escasas por lo que se ha recurrido al cultivo *in vitro* y a la aplicación de una serie de compuestos químicos a los que se les denomina factores de inducción de haustorios (FIHs). Las especies vegetales en las que se ha logrado la inducción de haustorios son escasas y no existen antecedentes sobre estudios en los que la planta parásita tiene un valor biotecnológico. Asimismo, persisten preguntas sobre la relación entre los FIHs y el metabolismo secundario de la parásita o, la caracterización anatómica del haustorio formado en condiciones *in vitro*. Por otra parte, a pesar de su papel fundamental en la señalización de la inducción del haustorio, el  $H_2O_2$  no ha sido probado como FIHs. Por lo anterior, el objetivo del trabajo fue “Inducir *in vitro* haustorios en raíces de *Castilleja tenuiflora* Benth. y evaluar el efecto de factores de inducción de haustorios (FIHs) sobre la producción de compuestos bioactivos”. Se estableció el sistema biológico para inducir los haustorios y se evaluaron los siguientes FIHs: catequina, vanillina y  $H_2O_2$  (10, 25 y 50  $\mu$ M). Los sistemas biológicos evaluados fueron: en sustrato (en una relación *C. tenuiflora-Zea mays*), en hidroponía (aplicando FIHs), en medio líquido (aplicando FIHs) y el sistema semisólido siendo este último el más favorable para la inducción de haustorios. De los tres compuestos vanillina, catequina y  $H_2O_2$ , la vanillina fue el mejor FIHs en raíces de *C. tenuiflora* induciendo 3 haustorios/raíz, desarrollados en de forma lateral a los 14 días de que se aplicó el compuesto. Utilizando la histología como una herramienta, se observaron las características propias de un haustorio

como el alargamiento de las células de la epidermis y un proceso de división de las células de la corteza interna donde se pudo observar la presencia de abundantes núcleos (zona nucleada) principalmente en la zona meristemática. El análisis histoquímico indicó que la formación de haustorios está asociado con la acumulación de  $H_2O_2$  y flavonoides. De acuerdo con el análisis fitoquímico de las plantas de *C. tenuiflora* tratadas con los FIHs, la concentración de fenoles totales de la parte aérea fue similar en el control y las muestras con vanillina y la concentración de fenoles totales en raíz fue mayor en el control que en los tratamientos (de tres concentraciones) con vanillina. Mientras que, la concentración de flavonoides en raíz fue mayor con vanillina a 25  $\mu$ M. El análisis de LC-MS (ESI), reportó la presencia de ácido logánico, verbascósido, apigenina y un compuesto no identificado. La mayor concentración de apigenina se encontró en la parte aérea (comparada también con lo obtenido en raíz) de las plantas de *C. tenuiflora* pero mayor en el tratamiento con 25  $\mu$ M de vanillina (37.3 mg apigenina/g de extracto). Por lo tanto, en este trabajo se indujo la formación de haustorios en *C. tenuiflora* en condiciones *in vitro* sin la presencia de un hospedero y utilizando vanillina (25  $\mu$ M), observando con esta misma un efecto sobre la producción de compuestos bioactivos.

## ABSTRACT

*Castilleja tenuiflora* Benth. (Orobanchaceae) is a species of plant hemiparasita of medicinal use; presents biological activities (cytotoxic, anti-inflammatory and anti-ulcerogenic), which are attributable to iridoides and type phenolic compounds such as flavonoids and feniletanoides. In the presence of phenolic compounds, flavonoids, quinones, etc (present in root exudates of host plants) *C. tenuiflora* develops a structure called for haustorium through which interference to other plant species at the level of the roots. The process of formation of haustoria is complex, involves molecular events, biochemical and anatomical that have not been fully clarified. Begins with the recognition (by the parasitic plant) of chemical signals in the host along with reactions of oxidation-reduction. In these reactions, the hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) is a molecule essential. Given its complexity, the research in natural conditions haustoria are limited so it has resorted *in vitro* culture and the implementation of a series of chemical compounds which are called factors of induction of haustoria (FIHS). Plant species in which it has achieved the induction of haustoria are scarce and there is no information on studies in which the parasitic plant biotechnology has a value. Also, there are still questions remain about the relationship between the FIHS and the secondary metabolism of the parasite or anatomical formed haustoria characterization *in vitro* conditions. Moreover, despite its crucial role in signaling induction haustorio,  $H_2O_2$  has not been tested as FIHS. On the other hand, in spite of its fundamental role in the signaling of the induction of for haustorium, the  $H_2O_2$  has not been tested as FIHS. Therefore, the objective of the work was to induce *in vitro* haustorium of *Castilleja tenuiflora* Benth roots and evaluate the effect of induction factors haustorios (FIHS) on the production of bioactive compounds. The biological systems evaluated were: substrate (in a relationship *C. tenuiflora-Zea mays*), hydroponics (applying FIHS) in liquid medium (applying FIHS) system and semisolid system and the latter being the most favorable for the induction of haustoria. The biological system is established for inducing FIHS haustoria and evaluated as follows: catechin, vanillin and  $H_2O_2$  (10, 25 and 50  $\mu M$ ). Of the three compounds vanillin, catechin and  $H_2O_2$ , The vanillin was the best FIHS in roots of *C. tenuiflora* inducing 3 haustoria/root, laterally developed at 14 days after the compound was applied. Using histology as a tool, it is noted the characteristics of a haustorium as the

elongation of the cells in the epidermis and a process for the division of the cells of the inner bark where they could observe the presence of abundant cores (nucleated area) were observed primarily in the meristematic region. The histochemical analysis indicated that the formation of haustoria is associated with the accumulation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and flavonoids. According to the phytochemical analysis of *C. tenuiflora* plants treated with FIHS, the concentration of total phenols of the aerial part was similar in control and the samples with vanillin and the concentration of total phenols in root was higher in the control than in treatments (of the concentrations) with vanillin. While the concentration of flavonoids in root was higher with vanillin to 25 µM. The analysis of LC-MS (ESI), reported the presence of loganico acid, verbascosido, apigenin and unidentified compound. The highest concentration of apigenin was found in the aerial part (also compared with the result obtained in root) of the plants of *C. tenuiflora* but higher in the treatment with 25 µM of vanillin (37.3 mg apigenina/g of extract). Therefore, in this work was induced the formation of haustoria in *C. tenuiflora* under *in vitro* conditions without the presence of a host and using vanillin (25 µM), noting with this same an effect on the production of bioactive compounds.

## I. INTRODUCCIÓN

*Castilleja tenuiflora* Benth es una especie vegetal hemiparásita que ha sido usada en la medicina tradicional por sus actividades citotóxica, anti-inflamatoria y anti-ulcerogénica. Dichas propiedades medicinales están basadas por la presencia de diversos grupos de compuestos como: iridoides glicosilados, feniletanoides glicosilados y flavonoides. Estos compuestos se presentan en plantas silvestres, plantas de invernadero y en plantas en condiciones *in vitro*.

Las especies de la familia Orobanchaceae (a la cual pertenece *C. tenuiflora*) han recibido especial atención por su condición hemiparásita ya que los estudios en este sentido están enfocados hacia el daño severo que causan en cultivos como maíz, sorgo, lentejas, alfalfa, cacahuete, ornamentales como orquídeas, etc., originando pérdidas muy grandes. Esta condición hemiparásita está dada por la presencia de una estructura llamada haustorio, la cual funciona como un puente mediante el cual se conecta la planta parásita a la planta hospedero y permite la absorción de agua, minerales y nutrientes, y le sirve de soporte. En condiciones naturales, los exudados de la raíz de estas plantas contienen una gran cantidad de compuestos como fenoles, flavonoides, mucílago, azúcares, vitaminas y aminoácidos, así como enzimas que favorecen la formación de haustorios (Walker y col. 2003). En reportes sobre la inducción de haustorios en condiciones *in vitro* se han empleado compuestos químicos (bajo ciertas condiciones de concentración) entre los que se encuentran, algunos compuestos fenólicos (vanillina, ácido ferúlico, ácido caféico), flavonoides (quercetina, peonidina, kamferol) y dimetil benzoquinona DMBQ usando como modelo de estudio *Triphysaria versicolor* (Familia Orobanchaceae). Actualmente no existen reportes que indiquen la utilización de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como un inductor de haustorios. A nivel histológico, los cambios estructurales que se presentan durante el desarrollo de haustorios son el desarrollo de zonas de abultamientos o globosas debido al alargamiento de las células de la epidermis que son a su vez, resultado de la división interna en la zona meristemática central. Así como la formación de pelos haustoriales que permiten anclarse a la planta hospedero. Sin embargo, no se ha reportado la acumulación de metabolitos secundarios a nivel del haustorio, así como su relación con la síntesis de compuestos activos.

Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue, inducir la formación de haustorios empleando factores de inducción de haustorios (FIHs) en raíces *in vitro* de *Castilleja tenuiflora* Benth y evaluar su efecto sobre la producción de compuestos activos. El primer paso para la inducción de haustorios en raíces de *C. tenuiflora* fue el establecimiento del sistema experimental. Los compuestos químicos empleados como FIHs fueron: vainillina, catequina y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La caracterización de haustorios se realizó mediante técnicas histológicas e histoquímicas. Por último, se determinó el contenido de feniletanoides y flavonoides en plantas *in vitro* de *C. tenuiflora* después de haber inducido los haustorios con los FIHs.

## **II. ANTECEDENTES**

### **II.1. Parasitismo en plantas**

El parasitismo es considerado una interacción biológica entre dos organismos, en la que uno de los dos organismos el parásito, consigue la mayor parte del beneficio. La planta a la que va a parasitar es invadida a través de tallos ó raíces.

Las plantas parásitas han sido objeto de estudio porque son plagas de cultivos de importancia económica como maíz, trigo, café, tabaco o cacahuate, entre otros (Deeks y col. 1999). Algunos géneros como *Orobanche*, han sido clasificados como plagas que afectan la producción de cultivos de importancia económica (Kureh y col. 2003). El género *Orobanche* es parásita principalmente en la agricultura (Parker. 2013). Dentro de las plantas clasificadas como plagas se encuentra *Orobanche minor* que parasita especies vegetales de las familias Ranunculaceae y Poaceae.

Las relaciones parasitas están clasificadas de la siguiente manera: holoparásitas (o parásitos obligados), plantas totalmente dependientes de la nutrición de la planta a la que parasitan; no sintetizan clorofila ni son capaces de asimilar carbono y nitrógeno. Y hemiparásitas (parásitos facultativos) las cuales no dependen totalmente de otra planta pero obtienen de ella, agua, minerales y un soporte físico mediante el desarrollo de una estructura llamada haustorio (Riopel y Musselman. 1979).

Existen dos tipos de haustorios: el haustorio terminal (haustorio primario) el cual se desarrolla directamente de la parte apical de la raíz a partir de donde emerge una radícula que se hincha dando origen a la formación del haustorio. El segundo tipo de haustorio es el lateral (haustorio secundario) que se desarrolla en raíces jóvenes o adventicias. En muchas plantas parásitas, el haustorio terminal es funcional a lo largo del ciclo de vida de la parásita, mientras que el haustorio lateral tiene un tiempo de vida “corto”, por ejemplo, en muchas especies es funcional solo durante una etapa del ciclo de vida (Yoder. 1999).

## **II.2. Haustorio: características y proceso de formación**

El haustorio es un órgano parasítico especializado que une estructural y fisiológicamente a la planta parásita con la planta que es parasitada, cuya función es dar soporte, ser un medio de absorción y transporte de agua, de nutrientes y de metabolitos secundarios.

El desarrollo de haustorios engloba los siguientes aspectos: el cese temporal del crecimiento de la punta de la raíz con la formación de un abultamiento de las células de la corteza. Posteriormente, continúa el anclaje al tejido de la planta parasitada mediante la formación de pelos haustoriales. El atrapamiento e invasión bajo el establecimiento de una conexión vascular ó puente xilemático que es la principal ruta de transporte de agua y nutrientes para la planta parásita (Estrabrook y Yoder. 1998). Durante el atrapamiento, la especie parásita atraviesa la corteza de las raíces de la planta parasitada rompiendo las barreras de las capas de la endodermis y como último paso se lleva a cabo la maduración completa del haustorio. Además, durante el desarrollo del haustorio, en la especie parasitada, se manifiestan un abultamiento de las células de la corteza con la respectiva formación de zonas meristemáticas nucleadas (Yoder. 1999; Keyes y col. 2007). Los eventos ya descritos eventos son esenciales para asegurar la supervivencia de la planta parásita (Dobbins y Kuijt. 1972; Baird y Riopel. 1984).

En condiciones naturales los haustorios se pueden formar por la presencia de exudados presentes en la rizosfera y en condiciones *in vitro* los haustorios se forman mediante la aplicación de compuestos químicos ó FIHs y su efecto depende del tipo de exudado ó

FIHs, la cantidad, la especie de la planta y el estado de desarrollo de la planta (Albrecht y col. 1999). Los FIHs pueden ser azúcares, vitaminas, aminoácidos, flavonoides (xenognosin A, xenognosin B), quinonas (2,6-dimetoxi benzoquinonas, DMBQ), citocininas (zeatina) y ácidos *p*-hidroxicinámicos (ácido ferúlico) los cuales se encuentran en diversas familias de las plantas y son liberados en la rizósfera (Walker y col. 2003; Hassan y col. 2004). El ácido ferúlico y el ácido vanilínico también han sido reportados como agentes alelopáticos, que al ser aplicados de forma exógena tiene diferentes efectos. En el caso del ácido ferúlico, causa disminución en el crecimiento de las raíces de Soya (*Glycine max*) debido al incremento en la biosíntesis de lignina (cuadro 1). Lucca y col. (2009) reportan que la aplicación exógena de ácido cumárico (metabolito de la ruta de fenilpropanoides) en plantas de *Glycine max*, tiene un efecto en las actividades de la enzima fenilalanina-amonio-liasa (PAL), disminución en los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, incremento las actividades de la enzima peroxidasa (POD) unida a la pared celular y el contenido de lignina. Además la aplicación exógena de otros compuestos fenólicos tiene un efecto sobre la actividad de la PAL. En *Cucumis sativus*, la aplicación exógena de ácido cinámico y ácido benzoico disminuye el contenido de compuestos fenólicos glicosilados solubles (Politycka. 1998).

Dentro de los compuestos fenólicos usados como FIHs se encuentran el ácido cumárico, ácido sirínico, ácido ferúlico, ácido caféico y vanillina, así como también antocianinas como peonidina, cianidina, pelargonidina; flavonoides como quercetina y kamferol, y quinonas (DMBQ). Por otro lado, una de las especies vegetales más estudiada en la inducción de haustorios en condiciones *in vitro* es *Triphysaria versicolor* (Orobanchaceae) en donde se ha observado la formación de haustorios después de la aplicación de diversos FIHs. Estos autores demostraron que la inducción de haustorios es dependiente del tipo de FIHs así como de la concentración (1.0 y 100 μM). Por ejemplo, la formación de haustorios es mayor al aplicar 1.0 a 50 μM de vanillina, mientras que con 1.0-100 μM de peonidina la formación de haustorios fue menor; por el contrario, se ha demostrado que la variación en la concentración de ácido caféico (1.0-50 μM) no tiene efecto en la cantidad de haustorios formados (Albrecht y col. 1999).

Cuadro 1. Efecto de la aplicación exógena de compuestos fenólicos en algunas especies vegetales

Compuesto	Especie vegetal	Efecto	Referencia
Ácido caféico y ácido vanilínico	<i>Glycine max</i>	√Disminución en el crecimiento de raíces, √Incremento en la actividad de la enzima peroxidasa (POD) soluble y POD unida a pared celular √Disminución en los niveles de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> √Incremento en la actividad de la enzima Fenilalanina-amonioliasa (PAL)	Herring y col. 2002    Bubna y col. 2011
Ácido cumárico	<i>Glycine max</i>	√Efecto en el crecimiento de raíces √Efecto en las actividades de las enzimas POD y PAL; disminución en los niveles de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> √Efecto en la composición de los monómeros de lignina en raíz	Lucca y col. 2009
Ácido cinámico (ácido ferúlico y <i>p</i> -cumárico)	<i>Cucumis sativus</i> L	√Disminución en el contenido de compuestos fenólicos glicosilados solubles	Politycka. 1998
Ácidos benzoico ( <i>p</i> -hidrobenzoico y vanílico)		√Incremento en la actividad de PAL √Alto contenido de compuestos fenólicos glicosilados solubles	
0.1 mM			

### II.2.1. Eventos bioquímicos y moleculares en la formación de haustorios

Reportes de trabajos en condiciones *in vitro* (Figura 1) a partir de “exudados de raíz”(A) ó FIHs (B) indican que las enzimas peroxidasas de raíces convierten moléculas fenólicas en quinonas activas que disparan la señalización de rutas mediante reacciones de óxido-reducción (C). El ciclo redox también genera intermediarios reactivos de oxígeno que son los responsables de la toxicidad de la quinona. Las plantas toman este intermediario potencialmente nocivo como señal para la inducción de los haustorios (Keyes y col. 2000; 2001) que conducen al desarrollo del mismo. Durante el ciclo redox se reportan la expresión de genes oxidoreductasas en raíces parásitas (Yoder. 1999; Yoder. 2001; Keyes y col. 2001; Bandaranayake y col. 2010). Estos genes oxidoreductasa codifican el primer paso en la ruta de señalización del haustorio (modelo “redox” de señalización del haustorio). Este modelo propone que compuestos como las quinonas (DMBQ) funcionan como una señal en las células de la parásita donde es activado por las enzimas: TvQR1 y TvQR2. La TvQR1 cataliza la reducción de la quinona a semiquinona con lo que inicia el desarrollo del haustorio (Yoder. 1999; Yoder. 2001).

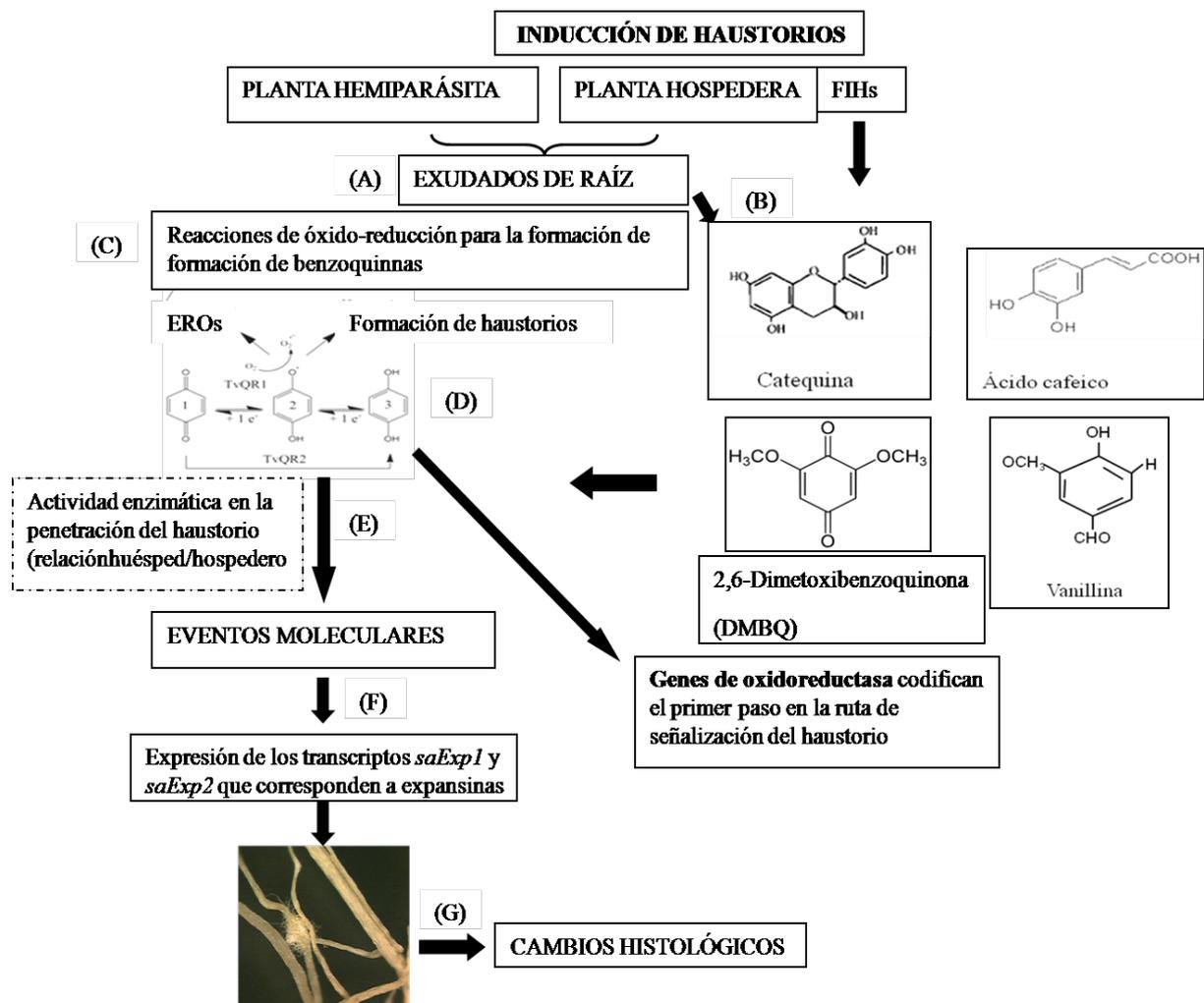


Figura 1. Esquema que representa los eventos bioquímicos y moleculares que ocurren durante el desarrollo de haustorios inducidos por exudados de raíz ó FIHs

Reportes en el género *Orobanchae* indicaron la presencia de actividad enzimática de la peroxidasa (POD) que permite la liberación de FIHs y cambios en la composición de lignina de la pared celular en el sitio de penetración del haustorio (Hassan y col. 2004). En estudios realizados respecto al reconocimiento químico del hospedero, se reporta que, ciertos mecanismos de defensa son activados cuando el haustorio se conecta al sistema vascular con la participación de enzimas que hidrolizan la pared celular de la planta hospedera (Estranbrook y Yoder. 1998; Joel. 2013).

Por otro lado, se ha reportado la participación de una segunda enzima, la poligalacturonasa (PG), la cual se propone que pudiera degradar las pectinas de la pared celular para facilitar la penetración de la parásita dentro de las células hospedero (Losner-Goshen y col. 1998). Estos eventos de penetración del parásito al hospedero, incluyen la síntesis y liberación de componentes citotóxicos (por ejemplo, ácidos fenólicos y fitoalexinas), la formación de barreras físicas como lignificación y suberización de las paredes celulares para prevenir el posible ingreso y crecimiento de la planta parásita.

Otro evento posterior al proceso de penetración del parásito a la especie vegetal parasitada, es la elongación de las células del haustorio dentro del tejido del hospedero hasta alcanzar el tejido vascular. En algunas especies como *Striga asiatica*, la penetración de la parásita al hospedero implica divisiones anticlinales y periclinales en la mayoría de las células así como un crecimiento desde la base hasta la punta del haustorio (Hood y col. 1998). También se ha encontrado que cuando *Vicia spp.* es parasitada o infectada por *Phelipanche aegyptiaca*, se despliega la acumulación de compuestos fenólicos, ligninas y la actividad de la enzima peroxidasa incrementa entre las células del hospedero y el parásito.

Durante la formación de haustorios ocurren otros cambios a nivel estructural que están dados por la participación de los genes de expansinas (proteínas). En *Striga asiatica* las benzoquinonas inducen la expresión de los transcritos *saExp1* y *saExp2* que corresponden a expansinas (Keyes y col. 2001). Las expansinas tienen una participación importante en el proceso de la expansión celular de forma radial cuando se está llevando a cabo la elongación de la raíz durante el desarrollo del haustorio (O'Malley y Lynn. 2000). Una vez que se forma el haustorio por la integración de la planta parásita y su hospedera puede haber traslocación de agua, nutrientes, y movimiento bi-direccional de proteínas y mRNA, como se ha descrito en la interacción de *Triphysaria* con lechuga (Tomilov y col. 2008). Otros metabolitos como alcaloides isoquinolines son transferidos de la especie hemiparásita *Tristerix verticillatus* a partir de su hospedero *Berberis montana* (Cabezas y col. 2009); *Rhinanthus minor* (Orobanchaceae) absorbe agua, nutrientes, asimila carbono y fitohormonas de la planta hospedera (Jiang y col. 2005).

Por otro lado, durante la formación de haustorios ya sea mediante “exudados de raíz” ó FIHs ocurren cambios histológicos que son modificaciones a nivel estructural. Dobbins y Kuijt. 1972, describieron por primero vez el desarrollo de haustorios en especies del género de *Castilleja lutescens* y *Castilleja cusickii*. Especies hemiparásitas como las del género *Castilleja* también han sido objeto de estudio por su uso en la medicina tradicional y potencial farmacológico (Bork y col. 1996) como a continuación se describirá.

### **II.3. Género *Castilleja* (Familia Orobanchaceae)**

*Castilleja tenuiflora* Benth. (Figura 2) es una especie vegetal mexicana que fue reclasificada de la familia Scrophulariaceae a la familia Orobanchaceae en función a su naturaleza hemiparásita y sus características moleculares (Tank y col. 2009). Se conoce comúnmente de diversas formas: Cola de borrego, Calzón de indio, Garañona, Garayona, Hierba del cáncer, *Castilleja*, Hierba del golpe, Flor de hielo. Se distribuye a lo largo del país pero su crecimiento es mayor en el área del centro y sur del país (Rosas. 2007). *C. tenuiflora* crece en bosques de pino encino en altitudes de 1680-3400 m.s.n.m. Es una planta herbácea de 30 cm a 1 m de alto que presenta inflorescencias ramosas con numerosas flores. El género *Castilleja* comprende más de 220 especies herbáceas o perenes, las cuales están ampliamente distribuidas en América; algunas de estas especies son raras o endémicas (Nesom. 1992; Egger. 2008; Tank y col. 2009).

*Castilleja tenuiflora* es una planta medicinal, de acuerdo a la herbolaria mexicana, todas las partes de la planta son utilizadas para tratar diversas afecciones como dolor de estómago, tosferina, sarampión y contra el piquete de víbora. Algunos autores le atribuyen propiedades diuréticas y en el tratamiento del cáncer (Jiménez y col. 1995). El uso tradicional está asociado a la acumulación de compuestos fitoquímicos de gran importancia farmacológica como los flavonoides, iridoides glicosilados y feniletanoides (Cuadro 2) (Gómez-Aguirre y col. 2012).



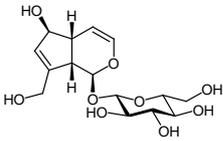
Figura 2. *Castilleja tenuiflora* Benth. en su hábitat natural

Los feniletanoides de manera particular, son de gran interés debido a sus propiedades anti-inflamatorias, antioxidantes y citotóxicas (Sánchez y col. 2013). Sin embargo, se reporta un alto grado de variabilidad tanto en el tipo como en la concentración de los compuestos activos entre las plantas individuales y las partes de la planta (Rosas. 2007; López-Laredo y col. 2012).

Estudios fitoquímicos (Cuadro 2) indican que en extractos metanólicos de la parte aérea y raíz, se acumulan iridoides con actividad inflamatoria (Carrillo y col. 2013; Sánchez y col. 2013) como la aucubina y el bartsiósido (Martínez-Bonfil y col. 2011) siendo este el primer reporte sobre la composición química de la raíz de *C. tenuiflora* (Rosas. 2007). Otros antecedentes indican la identificación de flavonoides como la apigenina (Gómez-Aguirre y col. 2011) y derivados de quercetina (López-Laredo y col. 2012). En otros reportes las plántulas crecidas en condiciones *in vitro* en biorreactores de inmersión temporal y permanente se reportó la cuantificación de iridoides totales, compuestos fenólicos totales y flavonoides (Valdez. 2011; Medina. 2011). Moreno-Escobar y col. (2011) reportaron actividad citotóxica de extractos de plantas completas contra líneas de cáncer de mama y cervicouterino. Sánchez y col. (2013) evaluaron la actividad citotóxica, anti-inflamatoria y anti-ulcerogénica de extractos de diversa polaridad de plantas de *C. tenuiflora* silvestres y plantas *in vitro*. Los principales componentes de estos extractos fueron verbascósido é isoverbascósido, y la concentración dependió del solvente usado y del origen del material. De acuerdo a lo

reportado por Gómez-Aguirre y col. (2012), Sánchez y col. (2013); Carrillo y col. (2013), los feniletanoides verbascósido é isoverbascósido son los principales compuestos antioxidantes de *C. tenuiflora*. Sin embargo, son pocos los antecedentes respecto a la biosíntesis de estos compuestos.

Cuadro 2. Estudios fitoquímicos en la especie vegetal *C. tenuiflora*

Compuesto químico	Fuente	Extracto	Actividad biológica	Referencia
Iridoides (aucubina y bartsiosido)	Raíz( <i>in vitro</i> ) tallos, hojas, plántulas completas	Metanólico	Anti-inflamatoria, citotóxica, neuroprotectora, inmunoestimulante	Jiménez y col. 1995; Rosas. 2007; Martínez-Bonfil y col. 2011; Valdez.2011; Medina.2011
				
Fenólicos y Flavonoides (apigenina)	Plantas completas, órganos de planta silvestre e <i>in vitro</i>	Metanólico	Antioxidante; citotóxica	Medina.2011 Valdéz.2011 Gómez.2011 López-Laredo y col. 2012
Feniletanoides: Verbascósido/ isoverbascósido	Raíces plantas silvestres, de invernadero, e <i>in vitro</i>	Metanólico	Antioxidante; anti-inflamatorio; Citotóxica;	Gómez-Aguirre y col. 2012; Sánchez y col. 2013; Carrillo y col. 2013. Moreno-Escobar y col. 2011

### II.3.1. Ruta de biosíntesis de flavonoides y feniletanoides

Las plantas sintetizan una gran variedad de metabolitos secundarios entre los que destacan los compuestos fenólicos, polifenoles, fenilpropanoides, verbascósido y otros feniletanoides glucósidos. En la figura 3 se muestra la ruta de biosíntesis de los flavonoides y feniletanoides. La ruta inicia a partir del ácido 3-deshidroshiquímico que es precursor de los compuestos fenólicos en plantas. A partir del ácido 3-deshidroshiquímico se derivan los tres aminoácidos aromáticos: fenilalanina, tirosina y triptófano. La fenilalanina es sustrato de la enzima clave para la biosíntesis de los compuestos fenólicos, la PAL, enzima que cataliza la formación de ácido cinámico por eliminación de una molécula de amonio de la fenilalanina; para sintetizar ácido *trans*-cinámico y amoniaco.

La actividad de PAL está estrechamente relacionada con el desarrollo de una planta (Lister y col. 1996). El ácido cinámico es convertido a ácido *p*-cumárico a través de la enzima cinamato 4-hidroxilasa (4CH). Entre los derivados del ácido cinámico se encuentra el ácido benzoico y ejemplos de estos son la vainillina y el ácido salicílico; este último actúa como regulador del crecimiento vegetal, implicado en la resistencia de la planta frente a patógenos. A partir del ácido cumárico se da origen a la biosíntesis de lignina que se forma a partir de tres derivados fenilpropanoides: los alcoholes coniferílico, cumarílico y sinapílico. Posteriormente, el ácido *p*-cumárico se metaboliza y es transformado en 4-cumaril-CoA por la 4-cumarato ligasa (4CL) para formar ácido ferúlico y ácido caféico cuya principal función es ser precursores de otros derivados más complejos: cumarinas, lignina, flavonoides e isoflavonoides. El principal paso para la formación de flavonoides, es la condensación de tres moléculas de malonil-CoA, reacción que es catalizada por la enzima chalcona sintasa (CHS) para la formación del primer flavonoide (Lister y col. 1996). Por último, de la chalcona se dan acilaciones y glicosilaciones para dar como productos a las antocianinas (Peng y col. 2008).

Respecto a la biosíntesis de los feniletanoides, aún son escasos los estudios. Lo reportado en la literatura sugiere que la fracción de hidroxitirosol es biosintetizado de la tirosina a través de DOPA y la dopamina; la amina de la dopamina se oxida a aldehído

seguida de una reducción a alcohol para posteriormente, ser  $\beta$ -glicosilada. En la biosíntesis de los feniletanoides, el hidoxitirosol se une a 3 moléculas de azúcares y a una molécula de ácido cafeico el cual es biosintetizado a partir de lafenilalanina (Saimaru y Orihara. 2010).

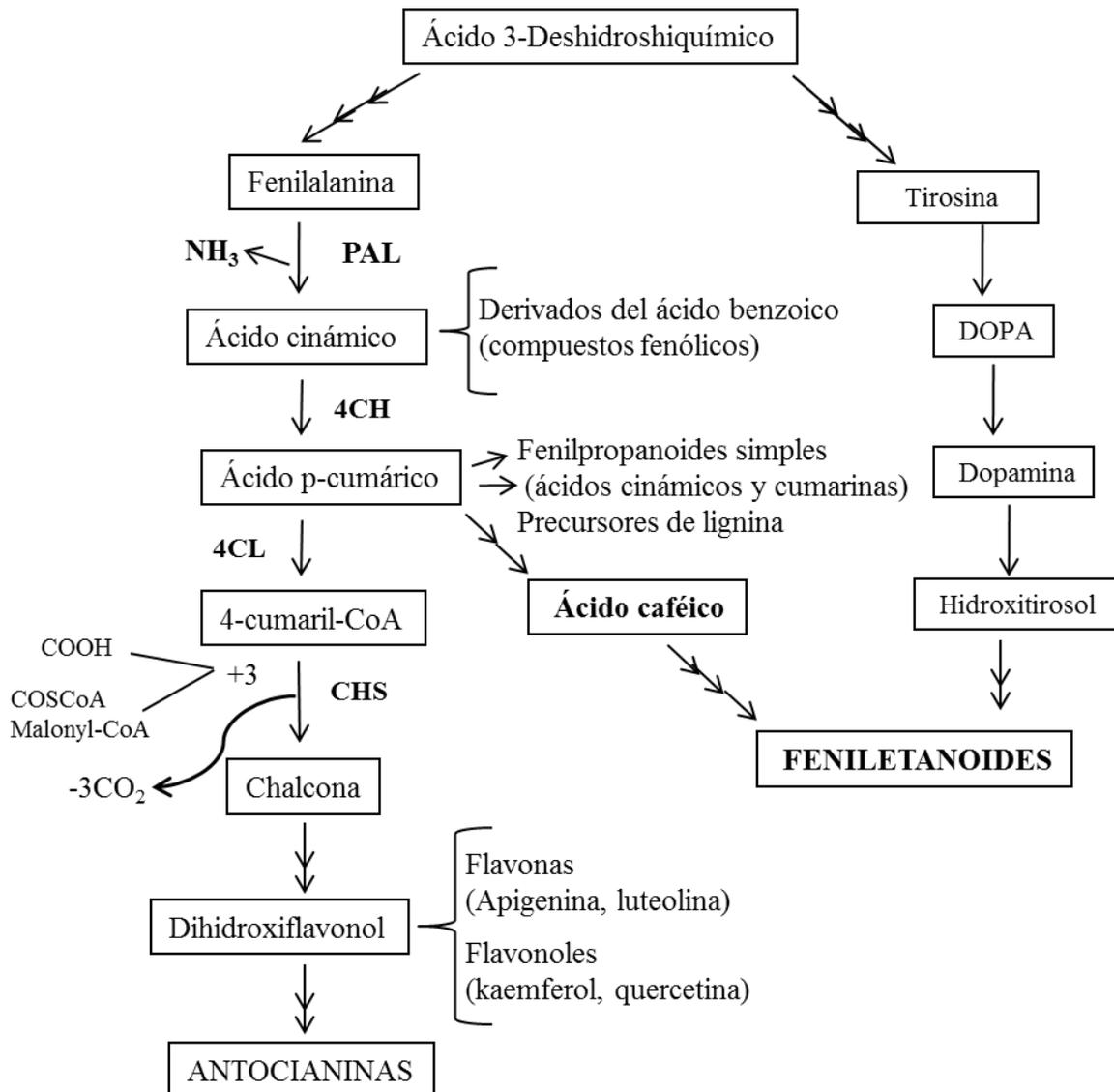


Figura 3. Ruta de biosíntesis de compuestos fenólicos: flavonoides y feniletanoides. PAL, Fenilalanina-amonio-liasa; CHS, Chalcona Sintasa; 4CH, Cinamato-4-hidoxilasa; 4CL, 4-Cumarato Co.A ligasa; DOPA, 3-4-dihidroxifenilalanina.

### III. JUSTIFICACIÓN

Por sus propiedades citotóxica, anti-inflamatoria y anti-ulcerogénica *Castilleja tenuiflora* es ampliamente utilizada en la medicina tradicional. Sin embargo, para el aprovechamiento sustentable de *C. tenuiflora* es importante buscar alternativas que favorezcan el crecimiento, desarrollo y capacidad de biosíntesis de compuestos activos de esta especie vegetal. En condiciones naturales, *C. tenuiflora* se encuentra en relación hemiparásita con otras especies. El hemiparasitismo está condicionado a la secreción de algunas sustancias denominadas “exudados de raíz” que inducen el desarrollo de una estructura denominada haustorio que tiene la función de absorber nutrientes de la planta huésped. Por lo anterior, en este trabajo se planteó la inducción de la formación de haustorios en raíces *in vitro* de *Castilleja tenuiflora* utilizando factores de inducción de haustorios y su relación con la producción de compuestos activos.

### IV. HIPÓTESIS

- (1) La aplicación de FIHs a plántulas de *C. tenuiflora* en condiciones *in vitro* y *ex vitro* inducirá el desarrollo de haustorios y cambios morfológicos en sus raíces.
  
- (2) La aplicación de FIHs a plántulas de *C. tenuiflora* en condiciones *in vitro* podría tener un efecto en la producción de compuestos bioactivos.

### V.OBJETIVOS

#### V.I. Objetivo general

Inducir la formación de haustorios empleando factores de inducción en raíces *in vitro* de *Castilleja tenuiflora* Benth y evaluar su efecto sobre la producción de compuestos bioactivos.

## V.2. Objetivos particulares

- 1) Establecer el sistema experimental para la inducción de haustorios en raíces de *C. tenuiflora*.
- 2) Evaluar el efecto de vainillina, catequina y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la inducción *in vitro* y *ex vitro* de haustorios.
- 3) Caracterizar los haustorios mediante técnicas histológicas e histoquímicas.
- 4) Analizar mediante técnicas espectroscópicas y cromatográficas los extractos de plantas de *C. tenuiflora* tratadas con FIHs en condiciones *in vitro*.

## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

La estrategia general plantea el establecimiento del sistema experimental a partir de plantas de *C. tenuiflora* para la inducción de haustorios (Figura 3). Se plantearon dos alternativas: en una relación parásita-hospedero y empleando FIHs en condiciones *in vitro* y en hidroponía (*ex vitro*). Posteriormente, una vez establecido el sistema biológico se planteó la caracterización de los haustorios mediante técnicas histológicas é histoquímicas empleando microscopía estereoscópica óptica y microscopia electrónica de barrido en modo ambiental. Por último, se realizó el análisis fitoquímico de las plantas *in vitro* después de la aplicación de los FIHs y la inducción de haustorios.

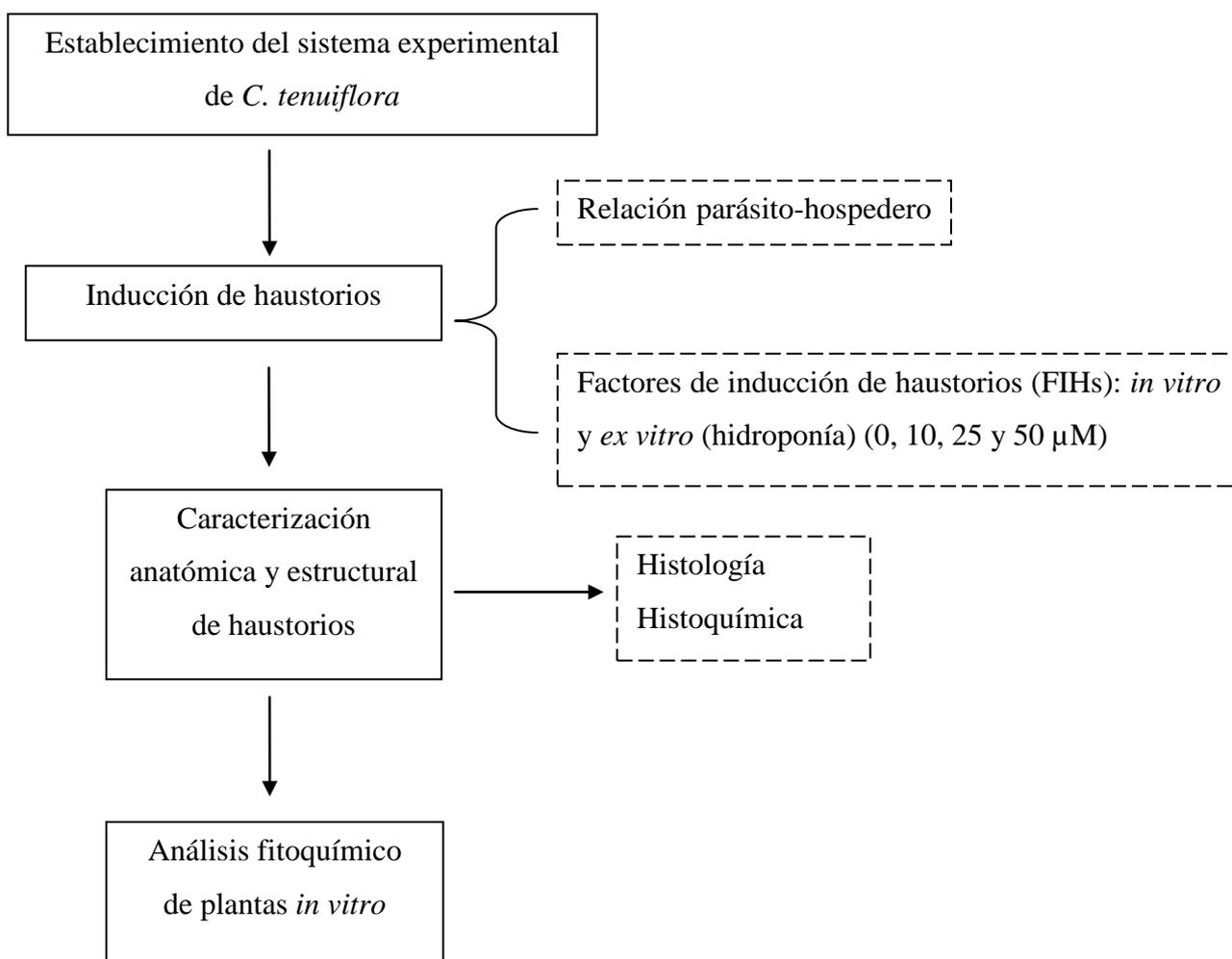


Figura 4. Estrategia general empleada para la inducción de haustorios en plantas de *C. tenuiflora*

## **VI.1. Material biológico**

### **VI.1.1. Establecimiento del sistema experimental para la inducción de haustorios**

Para la inducción de haustorios en *C. tenuiflora* se probaron 4 sistemas: (a) el crecimiento de plantas de *C. tenuiflora* en sustrato peat moss-agrolita-vermiculita (relación 1:1:1 y pH 5.8 ) en una relación hemiparásita con plantas de maíz (*Zea mays*); (b) en un sistema hidropónico con medio de cultivo Hoagland reportado por Ventura y col. ( 2003); (c) en medio de cultivo líquido SH (Schenk y Hilbebrandt. 1972) y B<sub>5</sub> (Gamborg y col. 1968); y (d) en medio semisólido en tubos de ensaye con medio de cultivo SH. Las plantas de *C. tenuiflora* utilizadas en los cuatro sistemas fueron provenientes de sistema de cultivo líquido crecidas en medio B<sub>5</sub> generado por Rosas (2007). Para establecer los sistemas a, b y d (sustrato, hidroponía y en tubos), las plantas se subcultivaron (por 21 días) en medio de cultivo semisólido SH. Para iniciar el cultivo en tubos de ensaye con medio de cultivo semisólido, plantas de 21 días de edad fueron transferidas y cultivadas en tubos de ensaye de 50 mL (Sigma/Aldrich, St. Louis, MO, EEUU) que contenían 10 mL de medio de cultivo líquido SH suplementado con sacarosa (30 g/L), ácido 3-indol acético (AIA, 10 µM) y 2.2 g/L de fitagel (Sigma/Aldrich, St. Louis, MO, EEUU). Los tubos fueron tapados con algodón. El medio de cultivo fue solidificado de forma inclinada (45°) y los brotes fueron sembrados de manera vertical. Las raíces de *C. tenuiflora* se desarrollaron sobre la superficie del medio de cultivo y bajo estas condiciones, a los 21 d se les aplicaron los compuestos químicos. Las plantas fueron cultivadas en condiciones controladas de fotoperiodo (16 h luz/8 h oscuridad) a 70 µmol/m<sup>2</sup>s de intensidad luminosa y 25°C de temperatura. En los sistemas hidroponía, medio líquido (SH y B<sub>5</sub>) y en tubos de ensaye se probaron los siguientes FIHs: catequina, vanillina, y peróxido de hidrógeno.

### **VI.2.1. Interacción *Castilleja tenuiflora*-*Zea mays* en sustrato**

Plantas de *C. tenuiflora* provenientes de un sistema de cultivo líquido, fueron colocadas en sustrato peat moss-agrolita-vermiculita y se dejaron crecer durante 40 días. Al cabo de este tiempo plántulas de maíz de 11 días de edad fueron trasplantadas junto a las plantas de *C. tenuiflora* (una distancia de 1 cm entre ambas plantas) durante un periodo de 30 días. Al cabo de este tiempo fueron evaluados los cambios morfológicos en las raíces de las plántulas de *C. tenuiflora*.

### **VI.2.2.1. Obtención de exudados de maíz**

Semillas de maíz (*Zea mays*) fueron desinfectadas de acuerdo a lo reportado por Salcedo y col. (2007) y germinadas en medio de cultivo semisólido SH en cajas magenta, colocando 4 semillas por caja (se utilizaron únicamente 2 cajas magenta para la obtención de los exudados). Plantas de maíz de 13 días de edad fueron extraídas de las cajas magenta y se colectó el medio de cultivo conteniendo los exudados de las raíces de maíz. El medio de cultivo fue centrifugado a 10 000 rpm/30 minutos. Se obtuvo una concentración de extracto de 1.26 g (de 8 plantas de maíz), y fueron diluidos en 10 mL de H<sub>2</sub>O destilada. 1 mL de esta solución fue agregado a 10 frascos gerber donde fueron colocadas las plantas de *C. tenuiflora* con 115 mL medio hidropónico Hoagland lo que correspondió a 1 mg/mL de exudado por frasco gerber.

### **VI.2.2. Cultivo en un sistema hidropónico y aplicación de factores de inducción de haustorios**

Plantas de *C. tenuiflora* provenientes de un medio de cultivo semisólido, fueron crecidas en un sistema hidropónico (medio de cultivo Hoagland) durante 36 días. Una vez que las plantas presentaron el crecimiento de sus raíces se aplicaron los exudados de maíz (1mg/mL) y los FIHs en el medio hidropónico: catequina (25 µM), vanillina (25 µM) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (25 µM) teniendo un control. Después de 21 días fueron evaluados los cambios morfológicos en las raíces de las plántulas de *C. tenuiflora*.

#### **VI.2.2.2. Preparación de FIHs**

Se prepararon soluciones de 25 µM con los compuestos de vanillina (Sigma/Aldrich, St. Louis, MO, EEUU), catequina (Sigma/Aldrich, St. Louis, MO, EEUU) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Marca comercial) y la mezcla de 25 µM vanillina y 25 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Los compuestos fueron esterilizados por filtración a través de membranas de 0.2 µm (Millipore, GNP, Irlanda) y aplicados en condiciones asépticas dentro de una campana de flujo laminar.

### **VI.2.3. Cultivo en inmersión permanente y aplicación de FIHs**

Plantas de *C. tenuiflora* fueron crecidas en un sistema de cultivo líquido (SCL) con medio de cultivo SH durante un período de 21 días; al cabo de este tiempo se les aplicaron los FIHs: catequina, vanillina y peróxido de hidrógeno en una concentración final de 25 µM. Los FIHs fueron aplicados en condiciones hidropónicas, en cultivo en inmersión permanente y en el sistema de tubos de ensaye. El volumen de aplicación fue de 1 ml por muestra. A cada frasco, se le agregó 1 mL de la solución respectiva sobre el medio de cultivo, de tal forma que estuviera en contacto con las raíces de las plantas durante 21 d. Después de 21 días fueron evaluados los cambios morfológicos en las raíces de las plántulas de *C. tenuiflora*.

### **VI.2.4. Inducción de haustorios con FIHs en medio de cultivo en tubos de ensaye con medio semisólido en condiciones *in vitro***

A cada tubo de ensaye, se le agregaron 1 mL del FIHs en condiciones de asepsia dentro de una campana de flujo laminar y sobre el medio de cultivo semisólido, de tal forma que estuviera en contacto con las raíces de las plantas durante 21 d. Las variables de respuesta fueron: inducción de haustorios (%) y número de haustorios por raíz. Las observaciones se realizaron en un microscopio estereoscópico (SMZ 1500, NIKON, Japón).

#### **VI.2.4.1. Calculo del número de haustorios**

$$\% \text{ de raíces con haustorios} = \frac{\text{Número de raíces con haustorios (100)}}{\text{Número total de raíces}}$$

#### **VI.2.4.2. Análisis estadístico**

Los resultados fueron analizados por medio de análisis de varianza ANOVA, para determinar si había diferencias en el número de haustorios por tratamiento al aplicar los FIHs tenía influencia significativa en las variables de respuesta. Para las comparaciones entre medias se hizo una prueba de Tukey con un nivel de significancia del 5 %. Todas las pruebas se realizaron con STATGRAPHICS plus 5.1 para Windows.

#### **VI.3. Caracterización estructural de los haustorios**

Las raíces de 21 días de edad fueron fijadas con formaldehído durante 24 h, posteriormente se realizaron tres lavados con amortiguador de fosfatos pH 7.2 (0.2 M) para eliminar los restos de formaldehído y evitar dañar el tejido. El siguiente paso consistió en deshidratar las raíces gradualmente utilizando etanol en diferentes concentraciones: 30%, 50%, 70%, 80%, 90% y etanol absoluto durante 1 h en cada una. Posteriormente, las raíces se colocaron en una solución de xilol-alcohol (50-50%, v/v) durante 1 h. Enseguida, se transfirieron a xilol al 100% (v/v) durante 24 h. Posteriormente, se pasaron a una solución xilol-paraplast (50%-50%, v/v) por 24 h. El siguiente paso fue colocarlas en paraplast al 100% durante 1 h. Finalmente, las raíces fueron colocadas de manera individual en contenedores simport con tapa en forma de rejilla (Sigma/Aldrich, St. Louis, MO, EEUU) se les aplicó el paraplast hasta quedar completamente cubiertas y colocarles una rejilla que permitió que las raíces quedaran inmobilizadas. Las muestras se secaron durante 24 h en un horno a 60°C y por último, se refrigeraron a 4°C para que solidificaran. Los cortes se realizaron a 10 µm de grosor mediante un microtomo (LEICA, RM2125RT, Alemania

Dado que los núcleos celulares tienen ácidos nucleicos ricos en radicales ácidos, se realizaron tinciones con hematoxilina para teñir componentes ácidos de los tejidos, dando una coloración violeta (Bancroft y Gamble. 2002). El tiempo del colorante con las muestras fue de 10 min, al cabo de este tiempo las muestras se enjuagaron con agua destilada y posteriormente en etanol. Enseguida, las muestras fueron sumergidas en una mezcla de xilol-etanol (50%-50%, v/v). Por último, se introdujeron en una solución de xilol absoluto.

#### **VI.4. Localización histoquímica de flavonoides utilizando DBPA**

Se utilizaron muestras fijadas en paraplast en cortes de 10  $\mu\text{m}$  las cuales fueron tenidas con aminoetil-2-difenil borinato (DBPA) al 0.25% (p/v) disuelto en metanol absoluto. El procedimiento fue el mismo que para la tinción de hematoxilina excepto que el tiempo de reacción fue de 15 min (Saslowky y Winkel. 2001). Las observaciones se realizaron en un microscopio compuesto (Eclipse 80I, NIKON, Japón).

#### **VI.5. Localización histoquímica de $\text{H}_2\text{O}_2$ utilizando DAB**

La detección de  $\text{H}_2\text{O}_2$  se realizó de acuerdo al método propuesto por Huang y col. (2011). Las raíces fueron colocadas en tubos Eppendorff de 1 mL y se les agregaron 500  $\mu\text{L}$  de una solución de 3,3-diaminobencidina (DAB) en una concentración de 1 mg/L disuelto en amortiguador TRIS pH 5. Se aplicaron pulsos de vacío de 6 min en condiciones de obscuridad y posteriormente las muestras se almacenaron por 24 h a 4°C bajo obscuridad. Al cabo de este tiempo, se realizaron 3 lavados con amortiguador TRIS pH 5 y las raíces se colocaron en un porta objetos y un cubre objetos que fue sellado con barniz para su posterior observación al microscopio.

#### **VI.6. Caracterización de haustorios con microscopia electrónica de barrido (MEB)**

La caracterización por MEB de los haustorios se realizó en material *in vivo*. Se utilizó un microscopio: Marca Carl Zeiss modelo EVO LS 10. Las condiciones de trabajo para sus muestras fueron: 10 kvolts de aceleración de los electrones, se usó el detector de electrones retrodispersos, las imágenes se obtuvieron en la modalidad de presión extendida, ésta fue de 90 Pa generada con gas de nitrógeno en la cámara del microscopio.

#### **VI.7. Análisis químico**

##### **VI.7.1. Preparación de extractos**

Los extractos metanólicos de las muestras de la parte aérea y raíz, se prepararon a partir de 200 mg de muestra fresca, se agregó 1 mL de metanol (MeOH) y se maceró en un mortero agregando nitrógeno líquido. Posteriormente, las muestras se colocaron en

viales *Ependorff* y se centrifugaron a 13000 rpm durante 6 minutos a 4°C (Medina. 2011) y se utilizó el sobrenadante.

### **VI.7.2. Cuantificación de compuestos fenólicos totales**

Para la determinación de fenoles totales se realizó el método colorimétrico reportado por Shohael y col. (2006). Se consideró una mezcla de reacción de un volumen final de 2.6 mL. Para lo cual se consideraron 10 µL de extracto, 90 µL de MeOH, 2.5 mL de agua destilada desionizada. Enseguida se agregó 0.1 mL de reactivo de Folin Ciocalteu agitando suavemente y dejando reposar la mezcla durante 6 min y enseguida se agregó 0.5 mL de carbonato de sodio al 20%, se agitó y se dejó reposar la mezcla 30 min. Finalmente se leyó en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 760 nm. La curva patrón se elaboró con ácido gálico en un intervalo de 0-25 µg/mL disueltos en metanol. Los resultados fueron expresados en mg equivalentes de ácido gálico por g de biomasa seca (mg EG/g BS).

### **VI.7.3. Cuantificación de flavonoides totales**

La determinación de flavonoides totales se realizó por el método colorimétrico reportado por Shohael y col. (2006). La mezcla de reacción fue de 250 µL considerando un volumen de extracto de 10 µL al cual se le agregó 240 µL MeOH y un volumen de agua desionizada de 1.25 mL. A esta mezcla se le agregaron 75 µL de nitrito de sodio al 5 % se agitó y se dejó reposar 6 min. Transcurrido este tiempo se le agregaron 150 µL de cloruro de aluminio al 10% agitando suavemente y se dejó en reposo por 5 min. Posterior a este tiempo se agregaron 500 µL de hidróxido de sodio 1 M mas 2.5 mL de agua desionizada agitando suavemente y se dejó reposar la mezcla por 30 min; transcurrido este tiempo, se leyó la absorbancia a 510 nm. Se elaboró una curva patrón con catequina en un intervalo de 0-100 µg/mL. Los resultados fueron expresados como mg equivalentes de catequina por g de biomasa seca (mg EC/gBS).

#### VI.7.4. Análisis químico por LC-MS

El análisis del contenido de flavonoides por cromatografía de líquidos de alta resolución acoplado a un espectrofotómetro de masas (HPLC-MS), en los extractos metanólicos se realizó en equipo Shimadzu LC-MS (Shimadzu, Tokio, Japon). El equipo está integrado por un sistema controlador CBM-20A, con dos bombas LC-20AD, un degasificador DGU-20A3, una columna Oven CTO 20A, un detector de arreglo de diodos (PDA) SPD-M20A UV-VIS. El espectrómetro de masas LCMS interconectado con una fuente de ionización de electrospray (ESI) y un software (solutions LSMS v 5.0). Las muestras extraídas y analizadas (200 µg BS/ ml) fueron colocadas a 40°C en una columna Alltima HP C18 HL (7 mm × 53 mm, 3 µm; Alltech Associates Inc. Deerfield, IL, USA). El sistema de gradientes [(fase móvil: A= agua acidificada (pH= 2.3) con ácido acético y B= acetonitrilo:metanol (1:1)] fue: 1–3 min, 90% A–10% B; 3–6 min 80% A–20% B; 6–10 min, 60% A–40% B; 10–15 min, 50% A–50% B; 15–20 min, 40% A–60% B; 20–23 min, 10% A 90% B and 23–24 min 90% A–10% B. Donde A= La velocidad de flujo fue de 1 mL/min y el volumen de inyección fue de 5 µL. La detección de PDA fue realizada en una longitud de onda de 200-400 nm y el espectro de masas fue registrado en un estado de ion negativo bajo la siguiente forma de operación: en un barrido de 300-600 m/z, gas de secado N<sub>2</sub> (10 L/min), flujo de gas secante nebulizador (1.5 L/min), voltaje de interfase (4.5 kV) y un detector de voltaje (1.2 kV). Los espectros fueron adquiridos en un intervalo de m/z de 400-500. Los picos principales en los cromatogramas de HPLC fueron identificados: a 330 nm para feniletanoides y a 360 para flavonoides. Los cromatogramas fueron analizados tomando en cuenta el tiempo de retención (t<sub>R</sub>) de los picos, el espectro de UV y el valor m/z.

La concentración de apigenina fue estimada por interpolación del área de los picos y comparando con la curva de calibración, la absorbancia fue medida a 360 nm. La curva de calibración fue lineal en un intervalo de 0-100 µg/mL ( $y = 4783x + 18319$ ;  $R^2 = 0.9704$ ) (Martínez-Bonfil y col. 2014). Esta metodología es reportada en cultivos de *C. aequipetala* Cav.

## VII. RESULTADOS

### VII.1. Establecimiento del sistema experimental para inducir haustorios

#### VII.1.1. Relación planta-planta entre *C. tenuiflora*-*Zea mays* en sustrato

Los resultados respecto a la relación planta-planta *C. tenuiflora* y *Zea mays* se muestran en la Figura 5. Se observaron cambios morfológicos en una de las raíces de *C. tenuiflora* que nos podrían estar indicando la formación de un haustorio (Figura 5 B-C). La estructura formada entre la relación parásita *C. tenuiflora*-*Zea mays*, fue de forma globular y un poco alargada la cual atravesaba toda la raíz de *C. tenuiflora* (Figura 5 B-C). De acuerdo a lo reportado por Losner-Goshen y col. (1998), en referencia a las especies del género *Orobanche*, para que se dé una relación parásita es importante la afinidad entre ambas especies, además de la composición y cantidad de exudados de raíz por parte de la planta hospedera.

El análisis histológico del corte longitudinal del haustorio mostró una pared celular muy gruesa (Figura 5D) debido quizás a la acumulación de lignina (polímero), reportado como uno de los cambios morfológicos característicos en la formación de estas estructuras. Por otro lado, se observó un crecimiento de células periclinales (CP) y células anticlinales (CA); ambos crecimientos (CP y CA) tienen una disposición del centro de la zona meristemática (ZM) hacia la punta del haustorio, lo cual coincide con lo descrito por Hood y col. (1998) en la especie parásita *Striga asiatica*. En la Figura 5E se observa el corte longitudinal del único haustorio inducido en este sistema, indica la presencia de almidón caracterizado por la presencia de la cruz de malta, la cual sirve como una fuente de energía que se emplea durante la formación de haustorios.

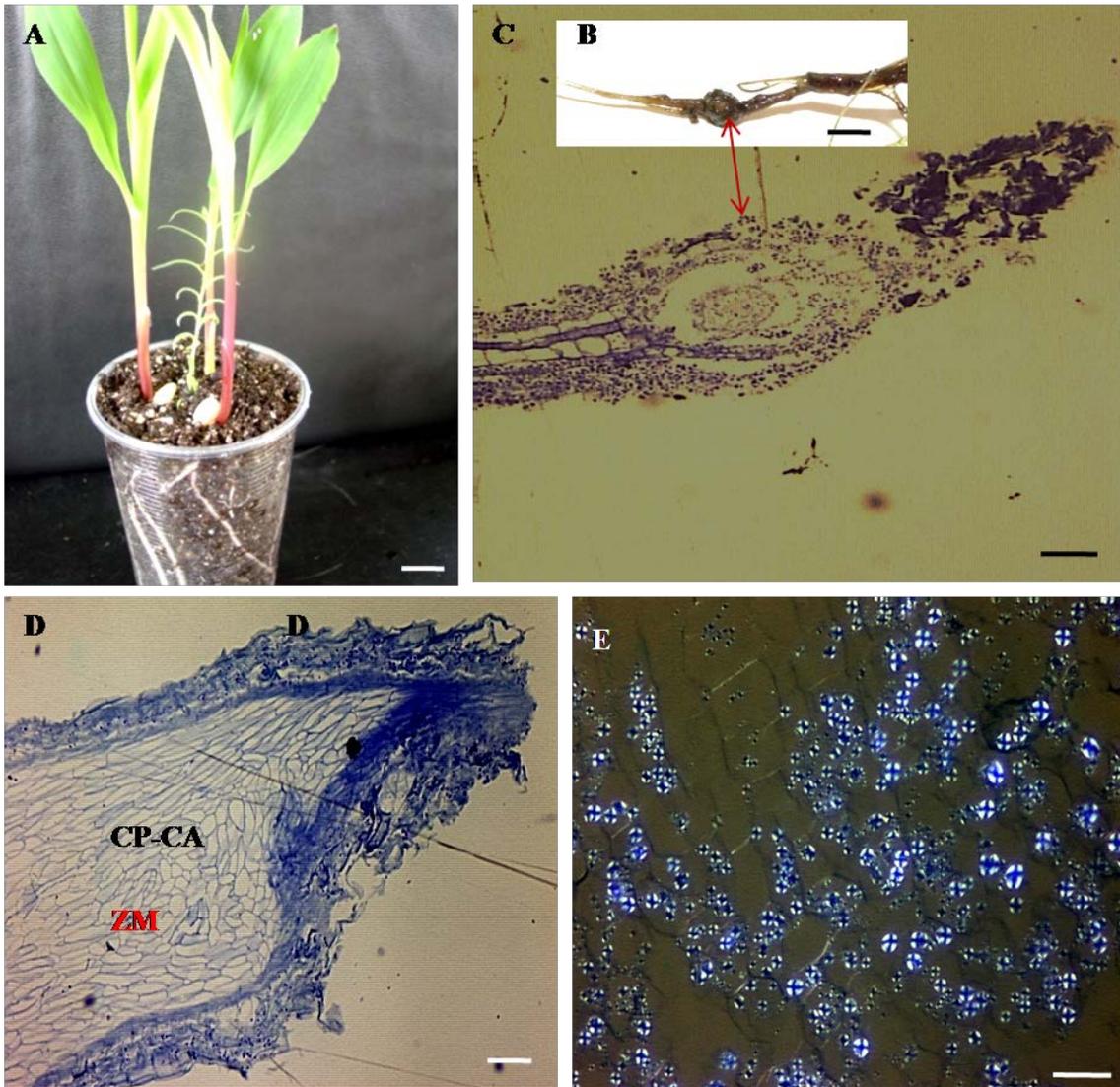


Figura 5. Haustorios en una relación planta-planta *Castilleja tenuiflora-Zea mays*. (A) *C. tenuiflora* con plantas de maíz, barra = 1 cm. (B) Raíz de *C. tenuiflora*, formación de un haustorio, barra = 1 mm. (C) Corte longitudinal de haustorio teñido con cristal violeta, barra= 0.1 mm. (D) Corte transversal del haustorio mostrando las células periclinales (CP) y células anticlinales (CA) así como la zona meristemática (ZM). (E) y haustorio con abundantes gránulos de almidón indicados por la cruz de malta, barra= 0.1 mm.

### VII.1.2. Sistema hidropónico

A partir de plantas de *C. tenuiflora* crecidas durante 36 días en hidroponía se evaluaron los parámetros: tamaño de la planta madre, número de raíces y tamaño de raíces (Figura 6A). En el cuadro 3 se observa que no hubo diferencias significativas en la altura de la planta madre entre los tratamientos: catequina, peróxido de hidrógeno y vanillina respecto al control. Respecto al número de raíces, las plantas tratadas con  $H_2O_2$  mostraron diferencias significativas; estas diferencias fueron de hasta 2 veces más con respecto a las plantas control y catequina, y de tres veces más comparadas a las plantas con vanillina. En cuanto a las raíces tratadas con peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), las diferencias observadas respecto al aumento en el número de raíces en comparación a los demás tratamientos, quizás puede deberse a la participación que tiene el peróxido de hidrógeno en los procesos de rizogénesis (Shiweng y col. 2007). En cuanto a la longitud de las raíces no se observaron diferencias significativas.

En el control se encontraron raíces tubulares, lisas sin cambios morfológicos (Figura 6B). Las plantas a las cuales se les aplicó catequina, presentaron raíces poco ramificadas, tubulares, lisas y más delgadas respecto a las raíces control (Figura 6C). Mientras que en las raíces a las que se les aplicó peróxido de hidrógeno, los cambios morfológicos fueron muy contrastantes (Figura 6D). Las raíces tratadas con peróxido de hidrógeno fueron más gruesas (3 mm) con una raíz principal y varias raíces laterales delgadas. A partir de la raíz principal emergieron varias pequeñas vellosidades (raíces secundarias) y se puede observar la forma globular de un haustorio de donde emergen también pequeñas vellosidades de aproximadamente 0.2-0.5 mm de longitud.

Por otro lado, en un corte longitudinal de raíz de *C. tenuiflora* (Figura 6E) se observa el crecimiento de las células que conforman el haustorio (H) el cual es un crecimiento muy típico en este tipo de estructuras. En este mismo corte longitudinal del haustorio se muestra la presencia de gránulos de almidón (GA) visto con luz polarizada (Figura 6F). Como ya se mencionó anteriormente, la acumulación de almidón, es una característica en el crecimiento de haustorios. Sin embargo, pese a que los resultados mostraron que el  $H_2O_2$  se comporta como un FIHs, no fue posible mantener viables las plantas en este sistema ya que las raíces acumularon algas y otras se contaminaron.

Cuadro 3. Características de las plantas de *C. tenuiflora* tratadas con diferentes FIHs (25  $\mu$ M) en condiciones hidropónicas

Tratamiento	Altura de la planta madre (cm)	Número de raíces	Longitud promedio de raíces (cm)
Control	33.5 $\pm$ 4.8 <sup>A</sup>	13.0 $\pm$ 2.6 <sup>A</sup>	4.3 $\pm$ 0.9 <sup>A</sup>
Catequina	38.3 $\pm$ 4.5 <sup>A</sup>	13.3 $\pm$ 2.5 <sup>A</sup>	3.9 $\pm$ 1.3 <sup>A</sup>
Vanillina	30.3 $\pm$ 9.5 <sup>A</sup>	8.3 $\pm$ 3.0 <sup>A</sup>	5.2 $\pm$ 2.2 <sup>A</sup>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	29.8 $\pm$ 1.2 <sup>A</sup>	25.0 $\pm$ 1.0 <sup>B</sup>	5.1 $\pm$ 2.3 <sup>A</sup>

Media  $\pm$  SE de 2 experimentos ( $n = 10$ ). Letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias a  $p < 0.05$  Tukey.

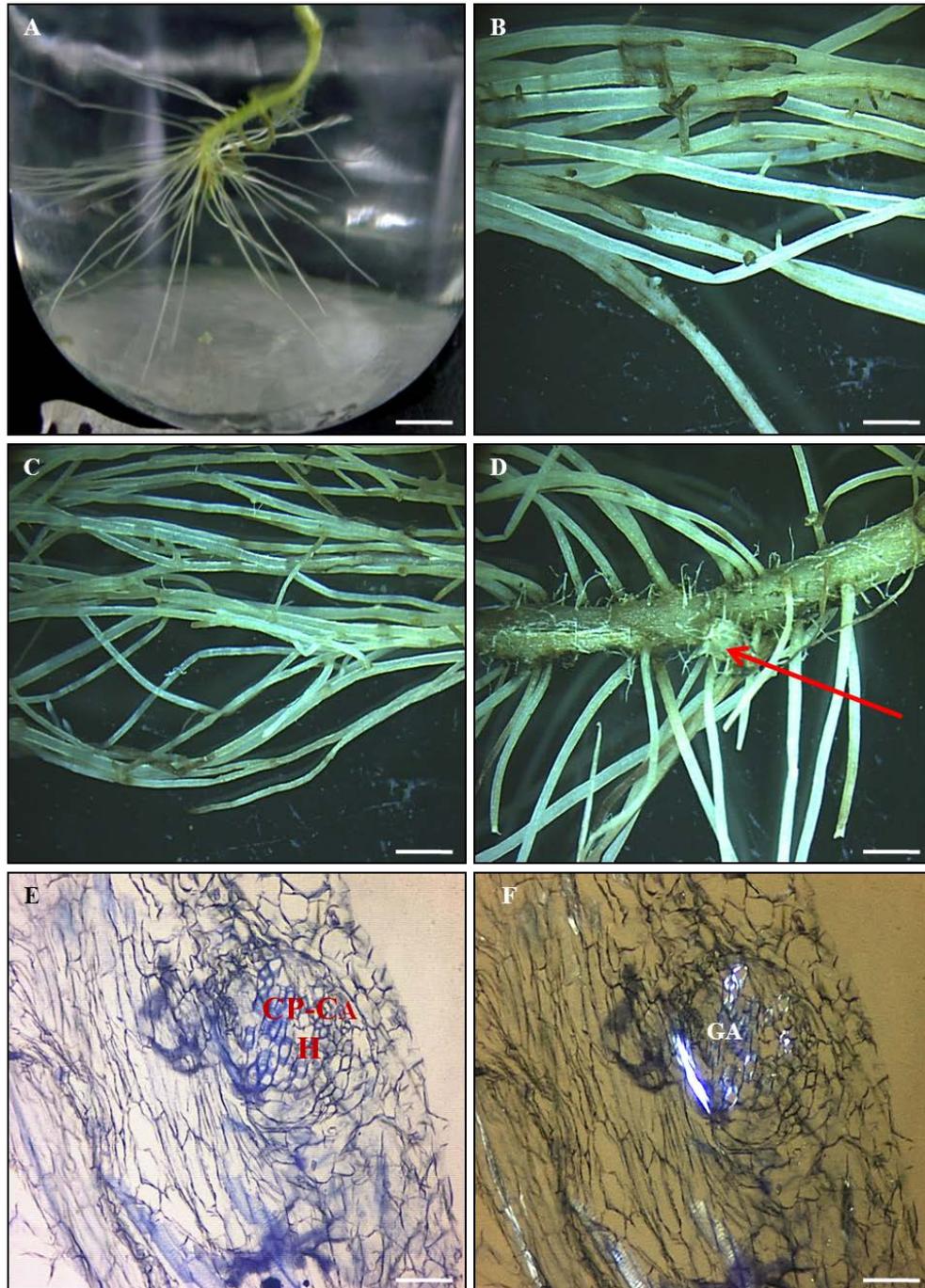


Figura 6. Inducción de haustorios en raíces de *C. tenuiflora* en condiciones hidropónicas empleando catequina y  $H_2O_2$ . (A) Plantas de *C. tenuiflora* crecidas en una solución nutritiva de Hogland, barra = 1 cm; (B) raíces control, barra=1 mm; (C) raíces con catequina, barra=1 mm; (D) Raíces con  $H_2O_2$  mostrando la presencia de un haustorio, barra = 1 mm; (E) corte longitudinal de la raíz indicando el haustorio; barra = 0.1 mm y (F) gránulos de almidón (GA) ubicados en el haustorio visto con luz polarizada; barra = 0.1 mm.

### VII.1.3. Cultivo en inmersión permanente y aplicación de FIHs

Los cambios morfológicos de las raíces de *C. tenuiflora* observados con la aplicación de estos compuestos se muestran en la Figura 7. En la Figura 7AB y 7C se muestran las raíces control crecidas en medio de cultivo B<sub>5</sub> y SH y se puede observar una gran diferencia entre ambos controles. Las raíces crecidas en medio B<sub>5</sub> (Figura 7B) fueron delgadas con algunas protuberancias a lo largo de toda la raíz; las raíces crecidas en medio de cultivo líquido SH (Figura 7C) fueron lisas y tubulares y un poco transparentes, a diferencia de lo observado con las raíces crecidas en medio de cultivo B<sub>5</sub>. Mientras que las tratadas a las cuales se les aplicó catequina mostraron en ambos medios de cultivo diferencias morfológicas importantes. Las raíces crecidas en medio de cultivo líquido B<sub>5</sub>, (Figura 7D) fueron más delgadas con una superficie irregular con pequeños bordes. También se observa el inicio del desarrollo de un haustorio (como lo indica la flecha) a partir de donde emergen pequeños pelos haustoriales. En la Figura 7E se observa que las raíces de *C. tenuiflora* crecidas en medio de cultivo SH, presentaron raíces gruesas con algunas formas globulares de donde emergen pelos haustoriales. En presencia de los FIHs, las raíces fueron más gruesas y capaces de inducir cambios morfológicos; también se observaron formas globulares similares a haustorios con la presencia de pelos los cuales fueron delgados y en algunos casos anclados a las raíces vecinas.

Se pudieron observar diferencias morfológicas así como la formación de haustorios en las raíces de *C. tenuiflora* crecidas en los medios de cultivo B<sub>5</sub> y SH y en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. En el medio de cultivo B<sub>5</sub>, las raíces de *C. tenuiflora* fueron un poco más gruesas y capaces de formar haustorios con sus respectivos pelos haustoriales. En contraste, las raíces crecidas en medio de cultivo líquido SH fueron más delgadas y un poco transparentes y además formaron haustorios tanto en la punta de la raíz como en la parte longitudinal de la raíz como lo indican las flechas en la Figura 7. En el caso de especies del género *Orobancha*, los haustorios desarrollados son cónicos ó cilíndricos de 0.1 mm pero en alguna especie puede ser de 1 a 1.5 mm (Joel. 2013). Los resultados generados empleando dos tipos de medio de cultivo B<sub>5</sub>-SH fueron interesantes porque se indujeron cambios morfológicos (múltiples) en las raíces de *C. tenuiflora*, así como también la inducción de haustorios con los FIHs: catequina y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

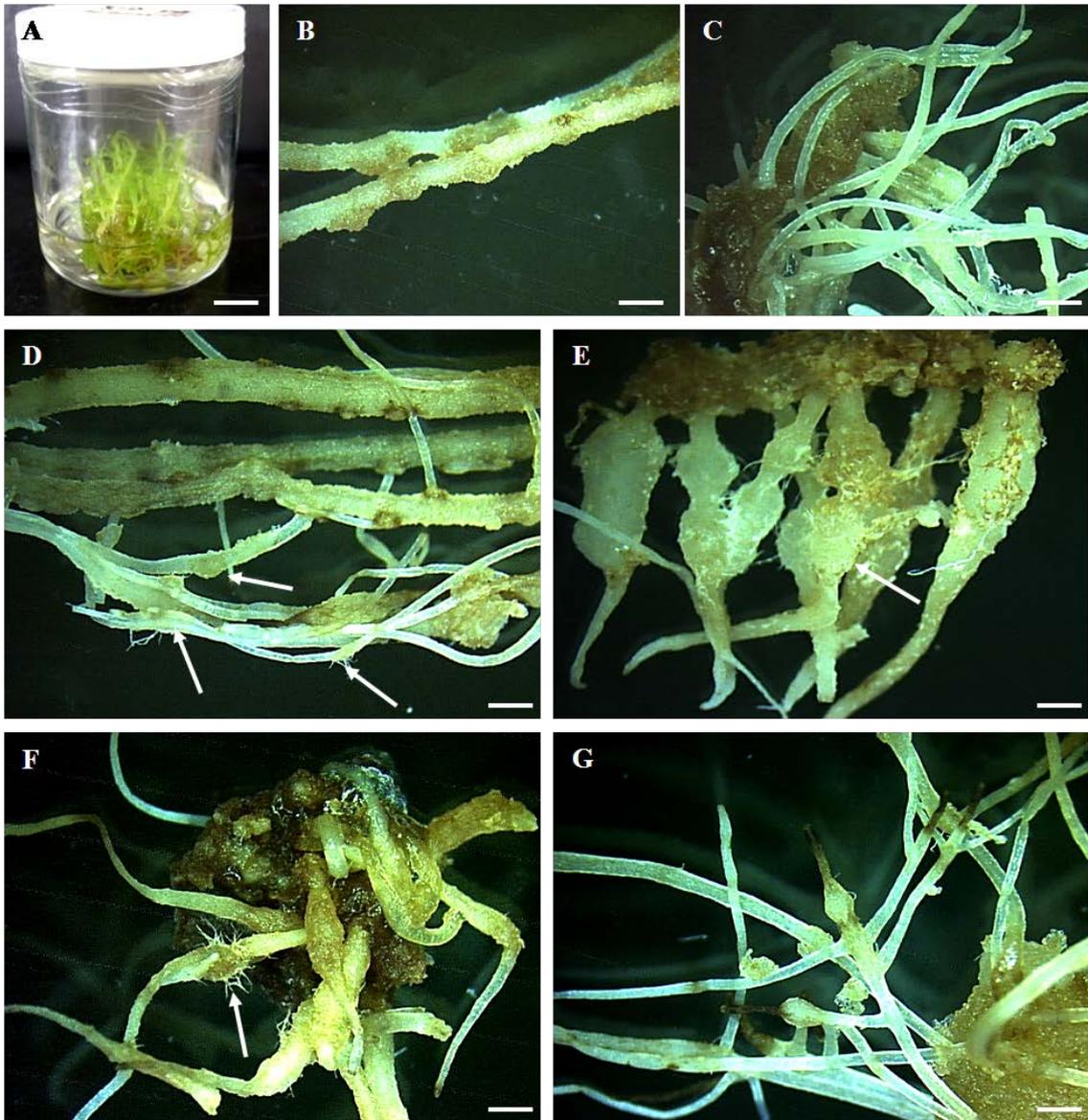


Figura 7. Inducción de haustorios en raíces de *C. tenuiflora* crecidas en medio de cultivo líquido aplicando FIHs después de 21 días. (A) Plantas de *C. tenuiflora* crecidas en condiciones *in vitro*; barra = 1 cm. (B-C) Raíces control crecidas en medios de cultivo líquido B<sub>5</sub> y SH; barra = 1 mm. (D-E) Raíces después de aplicar catequina en medios de cultivo B<sub>5</sub> y SH; barra = 1 mm. (F-G) raíces después de aplicar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en medio de cultivo B<sub>5</sub> y SH ; barra = 1 mm.

#### VII.1.4. Cultivo en tubos de ensayo con medio de cultivo semisólido y aplicación de FIHs

Las raíces de las plántulas de *C. tenuiflora* cultivadas en medio SH (Figura 8A) sin adicionar compuestos químicos (control) tuvieron un grosor de 1-2 mm (Figura 8B) y 3 cm de longitud, con la presencia de algunas vellosidades delgadas entrelazadas y la formación de raíces laterales.

Las raíces a las que se les aplicó vanillina fueron delgadas de color café claro y lisas. En algunos casos se pudo observar la formación de dos haustorios laterales de aproximadamente 1 mm de largo, del cual emergieron pelos haustoriales entrelazados en la misma raíz (Figura 8C). En las raíces donde se aplicó el compuesto catequina también fue posible inducir haustorios de 1 mm de longitud en la raíz lateral y, con una gran cantidad de pelos haustoriales (Figura 8D). De igual manera fue posible la inducción de haustorios al aplicar peróxido de hidrógeno, los cuales presentaron una forma globular (Figura 8E). Al aplicar la mezcla de catequina y vanillina también se indujo la formación de haustorios así como la formación de varias raíces pequeñas en las raíces adyacentes (Figura 8F). Sin embargo, la proporción de inducción de haustorios fue variable en función del compuesto químico empleado como se muestra en el cuadro 4. Se puede observar que el porcentaje de plantas formadoras de haustorios varió según el FIHs. Sin embargo, fue posible observar mas raíces formadoras de haustorios cuando se uso vanillina (5.7 %) con respecto a las tratadas con catequina (1.7 %) ó  $H_2O_2$  (2.1 %). Reportes para el caso de *Agalinis purpurea* indican la formación de 1.6 haustorios/planta, 12 h después de adicionar el agente inductor (exudados de raíz de *Lespedeza sericea*). Estos valores fueron similares a lo obtenido en este trabajo con *C. tenuiflora* empleando catequina y  $H_2O_2$  donde se obtuvo 1 haustorio/planta. Así mismo, también el número de haustorios por raíz fue mayor cuando se empleo vanillina (1-3 haustorios) en comparación con catequina (1 haustorio) o con  $H_2O_2$  (1 haustorio). Albrecht y col. (1999) reportan la inducción de haustorios en la especie vegetal *Triphysaria versicolor* aplicando compuestos fenólicos y quinonas en concentraciones de 1.0, 10 y 50  $\mu M$  y la mejor respuesta para la formación de haustorios fue con DMBQ (0.73 haustorios/planta) valores que fueron inferiores a lo obtenido con *C. tenuiflora* aplicando vanillina y catequina.

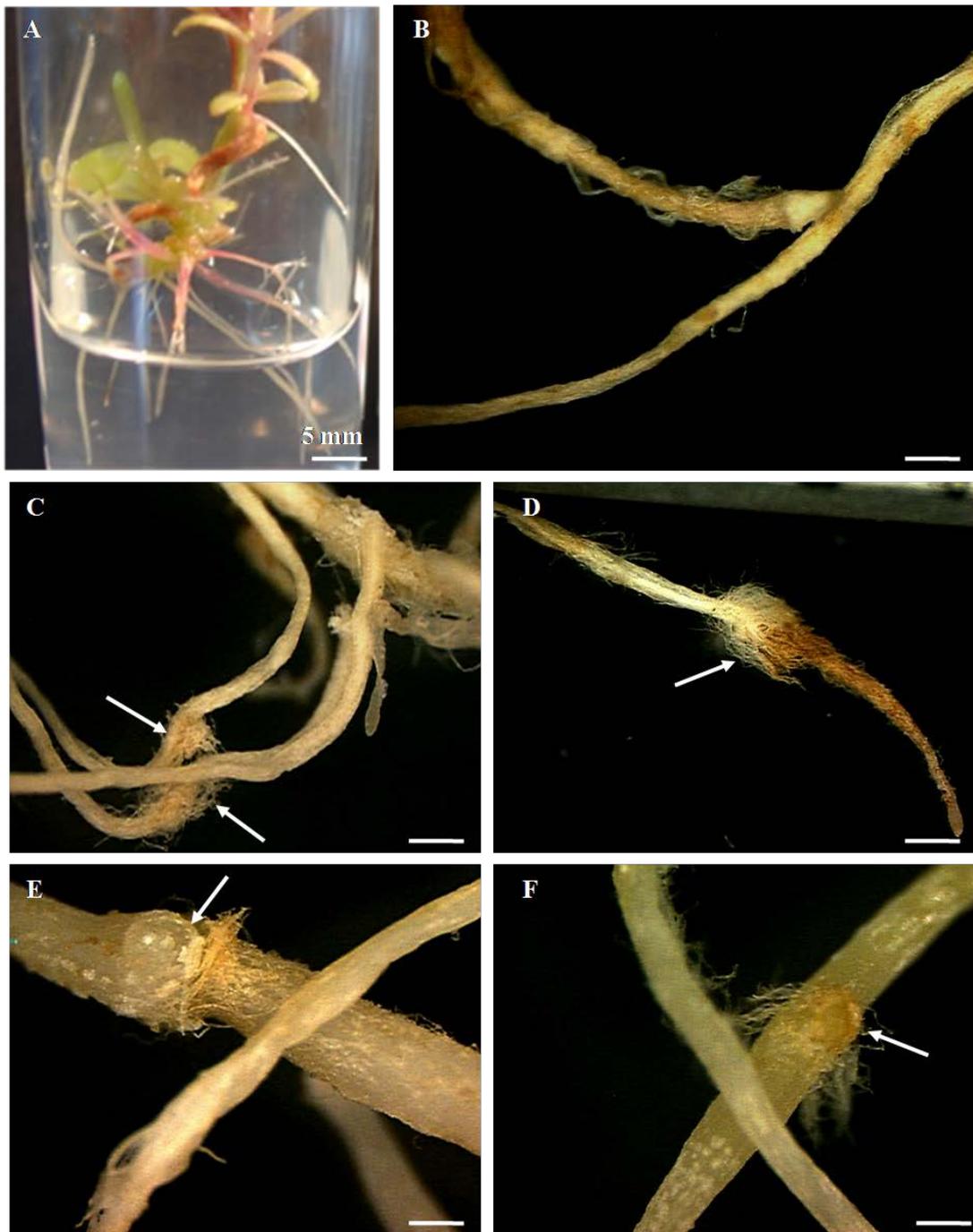


Figura 8. Inducción de haustorios en raíces de *C. tenuiflora* aplicando compuestos químicos en un sistema semi-sólido. (A) Inducción de raíces en plantas de *C. tenuiflora* en condiciones *in vitro*, barra = 5 mm. (B) Raíces control, barra = 1mm. (C) Raíces con vanillina, barra 1 = mm. (D) Raíces con catequina, barra = 1 mm. (E) Raíces con peróxido de hidrógeno, barra = 1mm y (F) Raíces con catequina + vanillina, barra = 1mm.

Con respecto a la aplicación exógena de compuestos fenólicos (vanillina) y flavonoides (catequina); y de acuerdo a lo reportado por Keyes y col. (2001) ambos compuestos podrían estar reaccionando con las pequeñas cantidades de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que se encuentran almacenadas de forma natural en el apoplasto, dando la señal para la formación de haustorios de acuerdo a lo reportado por Keyes y col. (2001). Se sabe que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es una especie reactiva de oxígeno y forma parte del sistema de defensa de las plantas. Al aplicarlo como se realizó en este trabajo, podría estarse dando una acumulación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el apoplasto, de tal forma que, una pequeña proporción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pudiera estar siendo utilizado por las peroxidasas de la pared y la otra parte de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> podría estar participando en las reacciones de oxidación de compuestos fenólicos en la pared celular dando la señal para la formación de haustorios (Keyes y col. 2001; 2007).

Cuadro 4. Inducción de haustorios en raíces de plantas de *C. tenuiflora* de 21 días de edad después del tratamiento con tres FIHs y evaluadas a los 21 días después de la aplicación del inductor.

Compuesto	Plantas con haustorios (%)	Longitud de la raíz (mm)	Raíz con haustorios (%)	Número de haustorios/raíz
Control	0	0.42 ± 0.1 <sup>B</sup>	0	0
Vanillina	75	1.73 ± 0.1 <sup>A</sup>	5.7 ± 1.0 <sup>A</sup>	1-3
Catequina	75	1.57 ± 0.1 <sup>A</sup>	1.7 ± 0.5 <sup>C</sup>	1
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	75	1.46 ± 0.1 <sup>A</sup>	2.1 ± 0.5 <sup>B</sup>	1

Media ± SE de 3 experimentos ( $n = 30$ ). Letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias a  $p < 0.05$  Tukey.

De acuerdo con los resultados previos, la vanillina indujo la formación de haustorios en mayor proporción, de tal manera, que se procedió a evaluar el efecto de su concentración (0, 10, 25 y 50 μM). Como se esperaba, en ausencia de este compuesto no se formaron haustorios; el % de raíces con haustorios fue similar con 10 y 25 μM de vanillina, 7.9 y 7.5 respectivamente (Cuadro 5). Pero el número de haustorios por raíz fue mayor con 25 μM de vanillina (1-2 haustorios). En función de la selección de la vanillina como el mejor FIHs; se procedió a la realización de los ensayos histológicos e histoquímicos para corroborar la presencia de algunos compuestos químicos presentes en las estructuras de los haustorios como se describe a continuación.

Cuadro 5. Inducción de haustorios en raíces de plantas de *C. tenuiflora* de 21 días de edad después del tratamiento con diferentes concentraciones de vanillina y evaluadas a los 21 días después de la aplicación del inductor.

Vanillina ( $\mu\text{M}$ )	Plantas con haustorios (%)	Longitud de la raíz (cm)	Raíces con haustorios (%)	Número de haustorios/raíz
0 (control)	0	$0.4 \pm 0.1^{\text{B}}$	0	0
10	75	$2.1 \pm 0.1^{\text{A}}$	$7.9 \pm 2^{\text{A}}$	1
25	75	$2.2 \pm 0.1^{\text{A}}$	$7.5 \pm 2^{\text{A}}$	1-2
50	25	$2.5 \pm 0.5^{\text{A}}$	$6.2 \pm 1^{\text{A}}$	1

Media  $\pm$  SE de 3 experimentos ( $n = 30$ ). Diferentes letras indican diferencias significativas entre las medias a  $p < 0.05$  de acuerdo a la prueba de Tukey.

## VII.2. Caracterización de haustorios mediante técnicas histológicas

En la Figura 9AB se muestra una fotomicrografía de una raíz (campo claro) de *C. tenuiflora* sin ningún tratamiento (control), en la cual se pueden observar raíces lisas y delgadas. De igual manera en la Figura 9C se muestra la fotomicrografía de la misma raíz control teñida con cristal violeta donde se puede observar la pared celular lisa sin la presencia de alguna otra estructura. Mientras que en la parte lateral de raíces tratadas con vanillina (Figura 9DE), se distingue una zona con abultamiento (flecha) de aproximadamente 2 mm de longitud. En la figura 9F se muestra un corte longitudinal de esta estructura teñida con cristal violeta. En la que se observan células de la corteza externa (CE) alargadas además de divisiones celulares en las células de la corteza interna (CCI). En la Figura 9G se muestra el corte transversal de una raíz de *C. tenuiflora* teñida con cristal violeta y vista con luz polarizada, se pueden observar gránulos de almidón que son característicos en las estructuras de haustorios. Estas características indican que las estructuras observadas en las raíces de *C. tenuiflora* corresponden a haustorios. Fue evidente un alargamiento de las células de la epidermis y CCI las cuales constituirán el haustorio (Bair y Riopel. 1984); los cambios más evidentes durante la formación de haustorios se llevan a cabo principalmente en la epidermis. Es posible que estas divisiones ocurran en respuesta a la tensión superficial

generada a partir del alargamiento de las células corticales (Riopel y Musselman. 1979). Las observaciones realizadas en este trabajo son similares a lo reportado en la especie *Rhinantoides spp.* (Scrophulareaceae), donde el desarrollo de haustorios consiste en la formación de zonas de abultamiento como resultado de la división celular de las células de corteza interna que da origen al haustorio (Keyes y col. 2000).

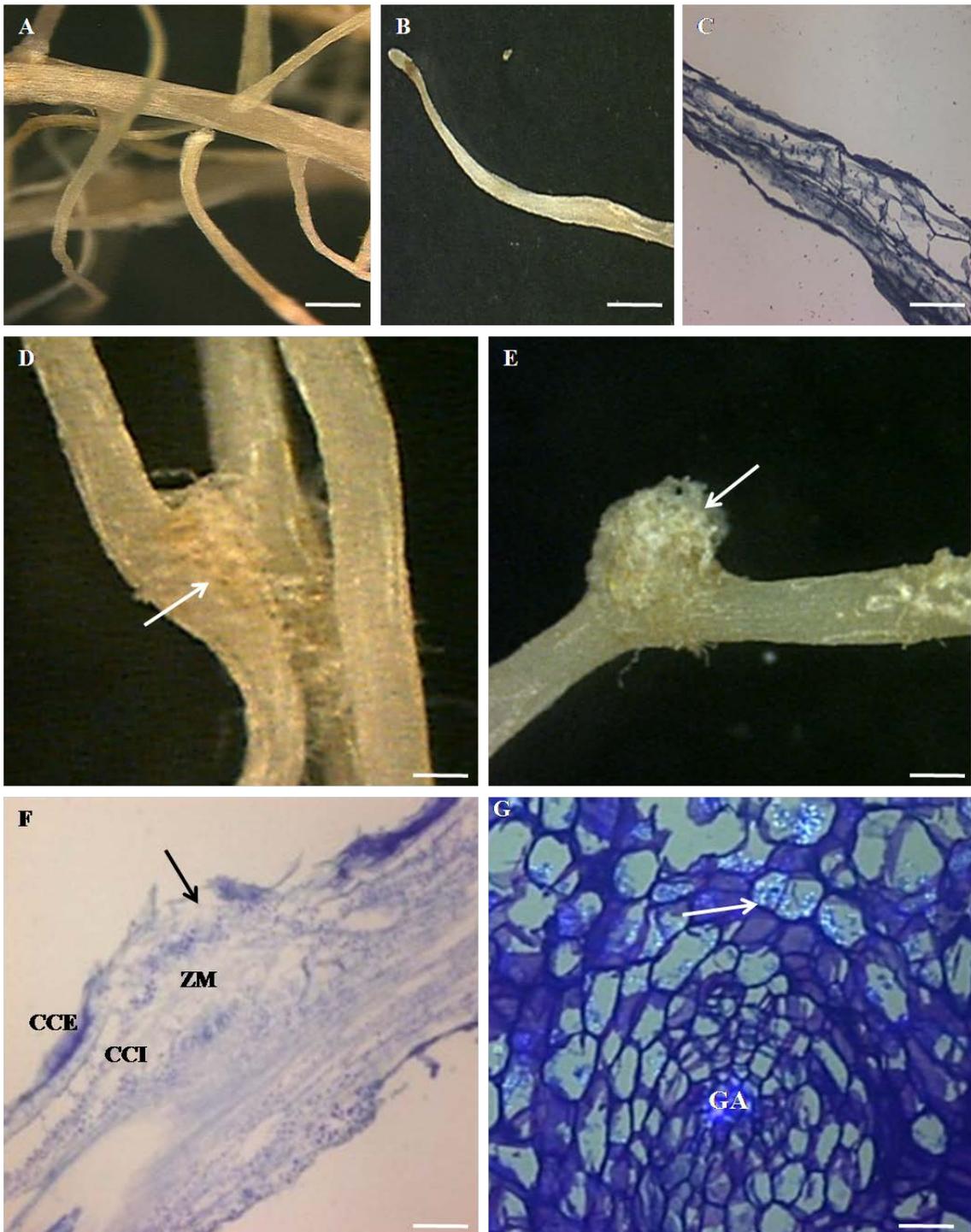


Figura 9. Caracterización histológica de haustorios inducidos con 25  $\mu$ M de vanillina, utilizando tinciones con cristal violeta (A-B) Control. barra = 1 mm. Raíces de *C. tenuiflora*, barra 1 = mm (C) Control, tinción con cristal violeta, barra = 0.1 mm. (D-E) Inducción de haustorios con vanillina barra = 1 mm. (F) Tinción de haustorio. ZM, Zona meristemática barra = 0.1 mm, CCE. Células de la corteza externa y CCI. Células de la corteza interna. (G) Haustorio. Tinción con cristal violeta visto con luz polarizada. GA. Gránulos de almidón. Barra = 0.1 mm.

### VII.3. Localización histoquímica de zonas nucleadas, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y flavonoides en haustorios de *C. tenuiflora*

Durante la formación de haustorios, existe la acumulación de núcleos en la zona meristemática, por tal motivo se realizó una tinción con hematoxilina (Bancroft y Gamble. 2002). En la Figura 10A se muestra una raíz que corresponde a un haustorio inducido con vanillina (campo claro) y en la Figura 10B se muestra el corte longitudinal de esta misma raíz teñida con hematoxilina. Estas tinciones permitieron observar una zona intensamente teñida de azul demostrando la presencia de varios núcleos. De acuerdo a lo reportado en la literatura, las zonas meristemáticas (ZM) con la acumulación de núcleos dan la pauta a la formación de haustorios, debido a que la división de estas células ejerce presión en las CCI y la epidermis dando la formación de los haustorios (Joel. 2013).

Se sabe que H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> está involucrado en la formación haustorios, por lo cual, se determinó la presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en las raíces *in vivo* de *C. tenuiflora*, tratadas con vanillina para caracterizar la formación de haustorios. Las raíces correspondientes al control (Figura 10C) presentaron zonas pigmentadas en color café a lo largo de la raíz lateral, indicando la presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. En las raíces tratadas con vanillina, en un tiempo de contacto de 14 d se observó que los haustorios presentaron zonas pigmentadas en color café, sin embargo, estas pigmentaciones fueron disminuyendo su tonalidad conforme transcurría el tiempo de cultivo (21 d) (Figura 10DE). El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> también fue localizado en las vellosidades ó en la parte superficial de los haustorios (Figura 10DE), y a diferencia del control, a los 21 d se observó una mayor acumulación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a lo largo de la raíz lateral (Figura 10C). Lo anterior confirmó la participación que tiene esta molécula en el desarrollo de haustorios (Keyes y col. 2001; 2007), así como también su acumulación en la raíz de la planta hospedera como se reporta para *S. asiatica* en respuesta a la formación de haustorios aplicando DMBQ (Keyes y col. 2007). Se sugiere que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en raíces de *Striga* actúa como un oxidante que interacciona con las peroxidasas y las pectinas de la pared del huésped para formar benzoquinonas que actúan como una señal para la inducción de haustorios.

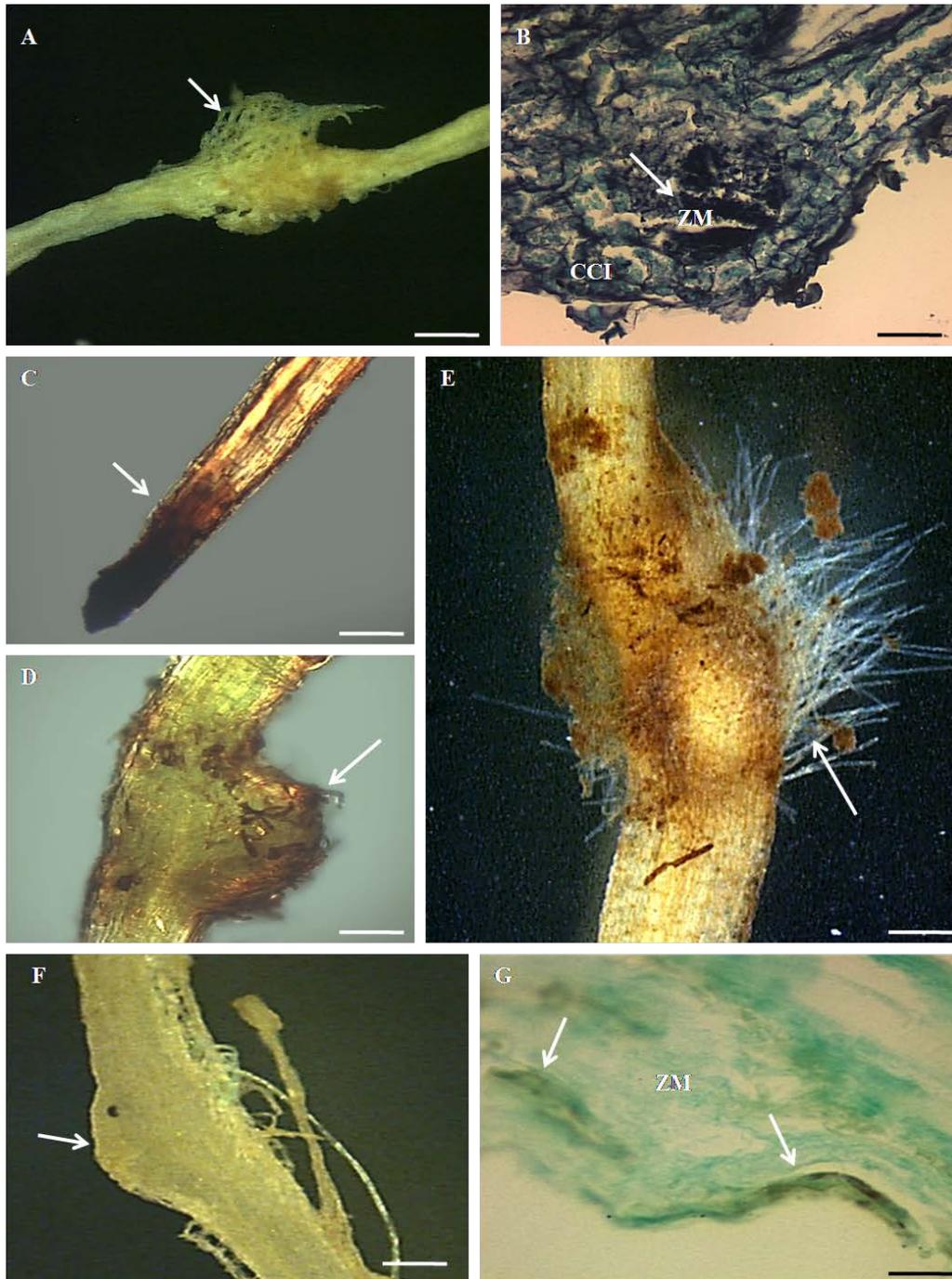


Figura 10. Localización histoquímica de zonas nucleadas,  $H_2O_2$  y flavonoides en haustorios inducidos en raíces de *C. tenuiflora* con  $25 \mu M$  de vanillina. (A) Haustorio secundario inducido con vanillina, barra = 0.1 mm. (B) Corte longitudinal del haustorio teñido con hematoxilina mostrando ZM con grandes núcleos, barra = 0.1 mm. (C) Localización de peróxido de hidrógeno en las raíces 3,3-diaminobenzidina en raíces no tratadas (de 14 días de edad) mostrando teñido en la punta, barra = 1 mm. (D-E) Haustorio mostrando la acumulación de  $H_2O_2$  en la superficie y en los pelos haustoriales, barra = 1 mm. (F) Haustorio secundario inducido con vanillina, barra = 1 mm; (G) Corte longitudinal mostrando la localización de flavonoides (zona teñida marcada con las flechas) usando ácido difenilbórico 2-aminoethyl éster, barra = 0.1 mm, ZM-zona meristemática.

Durante el desarrollo de haustorios uno de los eventos que se pueden llevar a cabo es la acumulación de algunos metabolitos secundarios entre los que destacan los flavonoides (Albrecht, y col. 1999). Para detectar la acumulación de estos compuestos se realizó una tinción con DBPA. En la Figura 10F se muestra una raíz que corresponde a un haustorio inducido con vanillina (campo claro) y en la Figura 10G se muestra el corte longitudinal de esta misma raíz teñida con ácido difenilbórico 2-aminoetil éster. En la Figura 10G se muestra el corte longitudinal de una raíz de *C. tenuiflora* y donde fue posible visualizar zonas pigmentadas de amarillo tanto en la epidermis como en la ZM. Estas observaciones podrían estar indicando la participación de los flavonoides en la formación de los haustorios, principalmente porque los flavonoides se encuentran localizados en la estructura del haustorio.

Por otro lado, se propuso un ensayo con el empleo vanillina (25  $\mu\text{M}$  y la mezcla de vanillina +  $\text{H}_2\text{O}_2$  en una concentración de 25  $\mu\text{M}$  cada uno. El tratamiento de la mezcla vanillina +  $\text{H}_2\text{O}_2$  fue propuesto en función de que el  $\text{H}_2\text{O}_2$  pudiera ser la fuente que proporcionara los radicales para la oxidación de compuestos fenólicos como vanillina e inducir la formación de quinonas (molécula señal para la formación de haustorios). Empleando microscopia electrónica de barrido se pudo observar la formación de haustorios. La Figura 11A representa la muestra control donde se puede apreciar una raíz lisa y delgada sin algún otro cambio en la epidermis. Con el tratamiento vanillina +  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Figura 11B) se observó la formación de un haustorio lateral secundario caracterizado por la forma de cúpula ubicado a lo largo de la raíz. Se puede apreciar un incremento en el diámetro de la raíz como resultado de la división de las células de la corteza interna y externa las cuales contribuyen a dar la forma del haustorio. En el inciso C se observa la iniciación de la formación de un haustorio con vanillina (indicado con la flecha) se observa la zona de abultamiento característica del desarrollo de haustorios en el cual también se puede apreciar un engrosamiento de la raíz principalmente en la zona donde se encuentra ubicado el haustorio.

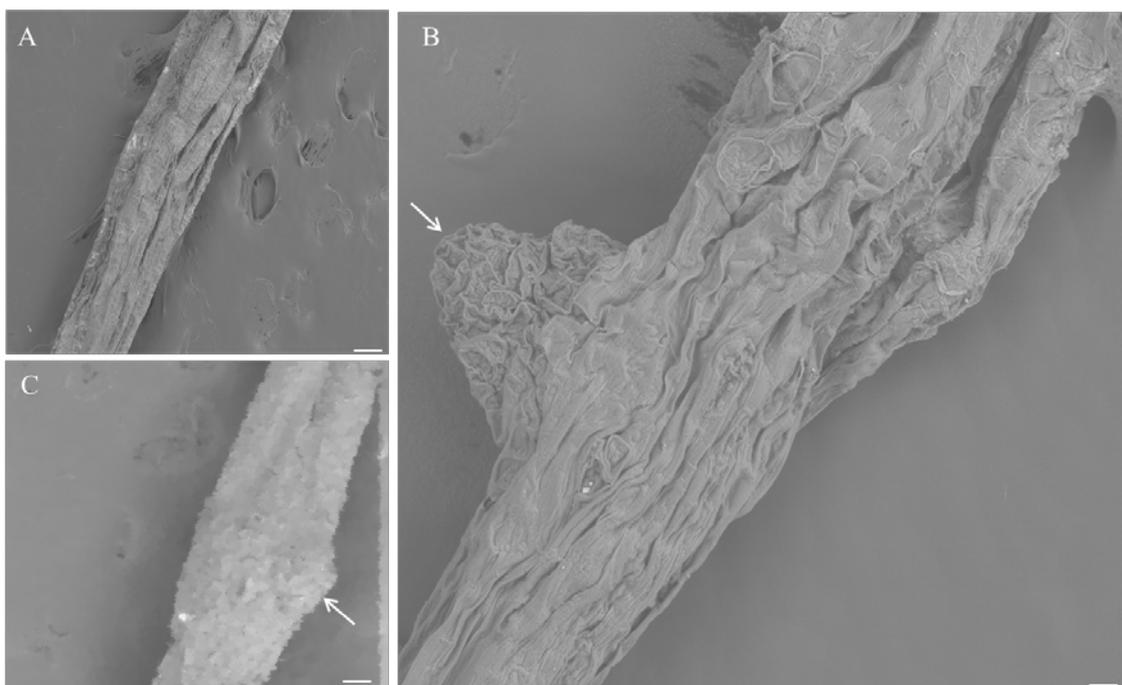


Figura 11. Caracterización por Microscopia electrónica de barrido, de haustorios inducidos en raíces de *C. tenuiflora* aplicando vanillina y vanillina + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (25 μM). (A) Raíz control, barra = 200 μm. (B) Raíz con vanillina + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, barra = 200 μm. (C) Raíz con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, barra = 200 μm.

#### VII.4. Análisis fitoquímico de plantas *in vitro* de *C. tenuiflora* después de la inducción de haustorios con FIHs

Para evaluar el efecto de FIHs sobre la producción de compuestos activos sintetizados por *C. tenuiflora*, se realizó el análisis fitoquímico de las plantas *in vitro* después de aplicar los FIHs (42 días de edad). En el cuadro 6 se muestran los resultados de la determinación de los compuestos fenólicos totales y flavonoides tanto en raíz como en la parte aérea a 0, 10, 25 y 50 μM de vanillina. La cantidad de fenoles totales en raíz fueron similares con los tratamientos: 50 (9.77 mg EC/g BS), 10 (10.51 mg ECG/g BS) y, 25 μM (10.25 mg EAG/g BS) de vanillina y el control (11.17 mg EAG/g BS). La concentración de fenoles totales determinados en la parte aérea, reporta valores similares en las muestras con 10 (19.69 mg EAG/g BS), 25 (18.24 mg EAG/g BS) y 50 μM (17.41 mg EAG/g BS) de vanillina en comparación a la muestra control que fue de 26.52 mg EAG/g BS.

En cuanto a la determinación de flavonoides en raíz (Cuadro 6), los resultados indicaron una mayor concentración cuando se aplicó 25  $\mu\text{M}$  de vanillina (4.13 mg EC/g BS) respecto al control (0.031 mg EC/g BS) y a la muestra con 50  $\mu\text{M}$  de vanillina (2.62 mg EC/g BS). La determinación de flavonoides en la parte aérea, reportaron una mayor producción en la muestra control (41.69 mg EC/g BS) en relación a lo obtenido con las muestras con 10  $\mu\text{M}$  (27.46 mg EC/g BS), 25  $\mu\text{M}$  (38.83 mg EC/g BS) y 50  $\mu\text{M}$  (32.56 mg EC/g BS), de vanillina. Lo anterior demuestra que la aplicación de FIHs en raíces de *C. tenuiflora* induce cambios importantes principalmente en el contenido de flavonoides en la raíz. Estos resultados concuerdan con las pruebas histoquímicas realizadas a los haustorios inducidos con 25  $\mu\text{M}$  de vanillina, las cuales indicaron la presencia de flavonoides en la estructura del haustorio. Con respecto a la aplicación exógena de compuestos fenólicos (vanillina) y flavonoides (catequina); ambos compuestos podrían estar dando la señal para la formación de haustorios. Además de que los flavonoides actúan como una molécula señal que se encuentra en exudados de raíz involucrados en los procesos de morfogénesis de haustorios (Albrecht y col. 1999).

Cuadro 6. Concentración de compuestos fenólicos totales y flavonoides en plantas de *C. tenuiflora* tratadas con diferentes concentraciones de vanillina

Concentración de vanillina ( $\mu\text{M}$ )	Fenoles totales (mg EAG/g BS)		Flavonoides (mg EC/g BS)	
	Raíz	Parte aérea	Raíz	Parte aérea
0	11.17 $\pm$ 1.17	26.52 $\pm$ 1.86	.031 $\pm$ 1.07	41.69 $\pm$ 2.73
10	10.51 $\pm$ 0.07	19.69 $\pm$ 0.64	n. d.	27.46 $\pm$ 1.15
25	10.25 $\pm$ 0.43	18.24 $\pm$ 0.97	4.13 $\pm$ 0.62	35.83 $\pm$ 1.61
50	9.77 $\pm$ 0.31	17.41 $\pm$ 1.07	2.62 $\pm$ 0.56	32.56 $\pm$ 3.86

EAG: Equivalentes de ácido gálico

EC: Equivalentes de catequina

n.d: no determinado

#### VII.4.1. Determinación de compuestos activos en plantas *in vitro* de *C. tenuiflora* después de la inducción de haustorios con FIHs mediante el análisis LC-MS (ESI)

Respecto a los espectros de masas carga ( $m/z$ ) de los 4 picos. Los incisos de la Figura 12 A y B corresponden a los estándares de verbascósido con una  $m/z= 623$  (Figura 12A) y el estándar de apigenina con una  $m/z= 269$  (Figura 12B). En la Figura 12C se muestra la  $m/z$  del pico 4= 269 que correlaciona con la apigenina y que corresponde a la muestra de la parte aérea con  $H_2O_2$ . La figura 12D se muestra la  $m/z$  del pico 2 = 623 que correlaciona con el verbascósido y corresponde a la mezcla de la parte aérea con vanillina +  $H_2O_2$ . Posteriormente, la Figura 12 E corresponde a la parte aérea del control que dio una señal de  $m/z= 487$  y del cual se desconoce el tipo de compuesto que corresponde. En este trabajo los resultados del análisis LC-MS (ESI), nos indicaron la presencia de ácido logánico (aún no reportado para *Castilleja tenuiflora*), flavonoides (apigenina) y de feniletanoides y la presencia de un compuesto no identificado (pico 3). También se observaron diferencias en la concentración en el contenido de apigenina entre el control y las muestras a las que se les aplicaron los FIHs principalmente en la parte aérea.

En la Figura 13 se muestran los cromatogramas de los extractos metanólicos de la parte aérea de plántulas de *C. tenuiflora* tratadas con los FIHs (25  $\mu$ M): control (Figura 13A),  $H_2O_2$  (Figura 13B), vanillina (Figura 13C) y vanillina +  $H_2O_2$  (Figura 13D). El objetivo de este ensayo fue correlacionar la aplicación de los FIHs con la producción de compuestos activos en plantas de *C. tenuiflora*. De acuerdo a sus tiempos de retención ( $t_r$ ) se pudieron identificar 4 picos (Cuadro 7): el pico 1 corresponde a ácido logánico (Figura 13ABCD) con un  $t_r= 4.28$  min y con una  $m/z = 375$  aún no reportado para *C. tenuiflora*; este compuesto ha sido identificado en plantas de *Cuphea aequipetala* (Martínez-Bonfil y col. 2014); el pico 2 (Figura 13ABCD) corresponde a verbascósido con un  $t_r= 4.95$  min y  $m/z = 623$ ; y el pico 4 (Figura 13ABCD) con un  $t_r = 13.65$  min y  $m/z = 269$  que corresponde al flavonoide apigenina. Mientras que el pico 3 (Figura 13ABCD) con un  $t_r = 10.60$  y una  $m/z = 487$ , aún no se tiene el reporte del tipo de compuesto al que corresponde. En los cuatro tratamientos se puede observar la presencia del pico 1 que corresponde al ácido logánico.

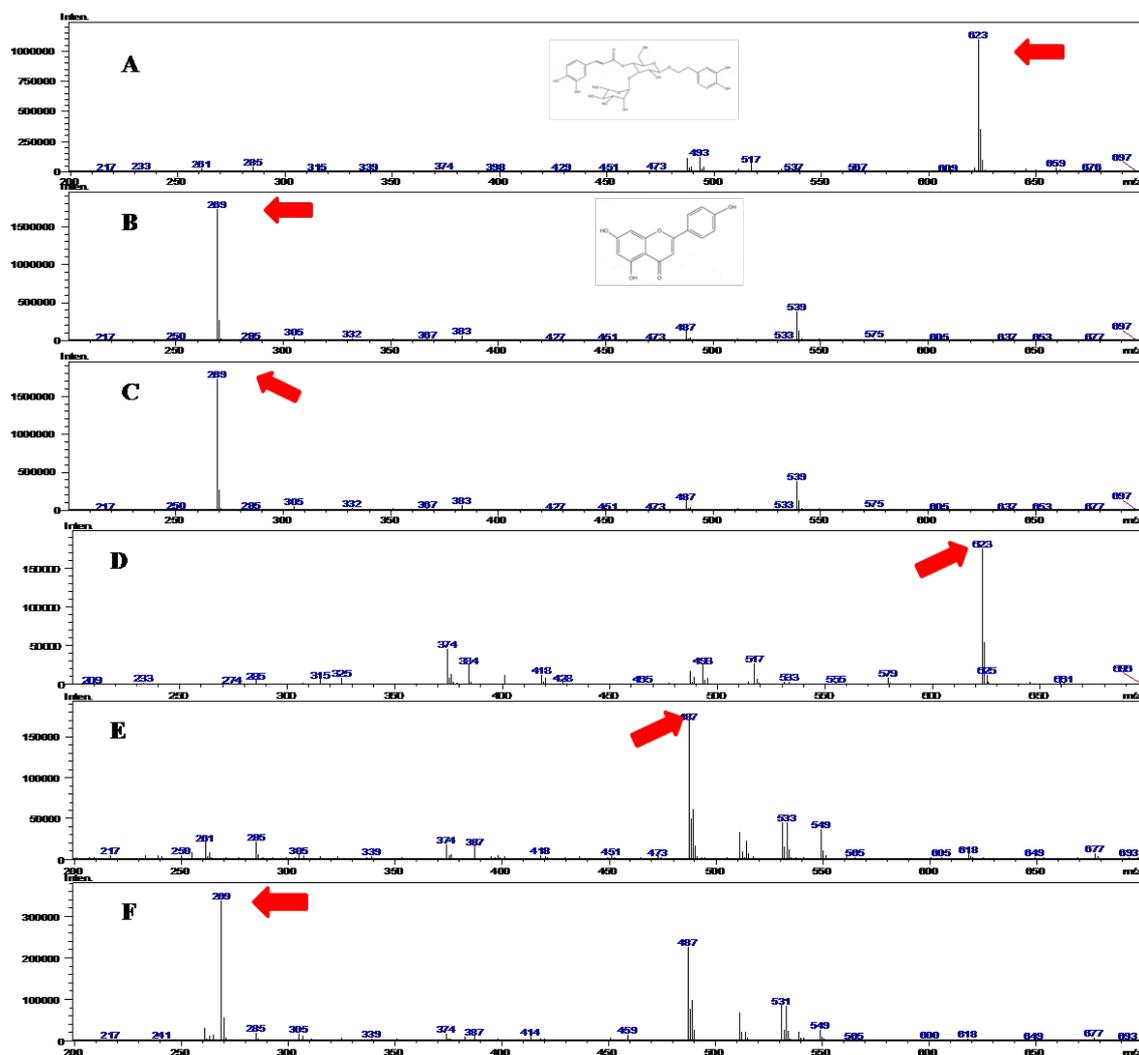


Figura 12. Espectros de masas LC-MS-ESI (ionización por electrospray) de estándares (A-B) y picos identificados en extractos metanólicos de *Castilleja tenuiflora* (C-F), A-verbascósido, m/z 623, B-apigenina, m/z 269, C- extracto de raíz con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, D- extracto de raíz con vanillina + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, E- extracto de parte aérea del control y F- extracto de parte aérea con vanillina + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

El pico 2 que corresponde a verbascósido estuvo presente en los 3 tratamientos y el control. De acuerdo a lo observado en la figura 12, la altura del pico 2 fue similar en los 3 tratamientos y el control, tratamientos lo que estaría que indicando que la concentración de verbascósido estuvo en los mismos niveles en todas las muestras. El pico 3 (compuesto no identificado) fue detectado en las cuatro muestras, pero la altura de este pico fue similar con el control y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La altura del pico 3 fue mayor en las muestras con vanillina y la mezcla de vanillina + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Es posible que la concentración de este compuesto no identificado sea mayor a las muestras control y con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. El pico

4 (apigenina) se detectó en los 3 tratamientos y el control, pero la altura de este pico fue similar con las muestras a las que se les aplicaron los FIHs. Los resultados anteriores concuerdan con las concentraciones de apigenina reportadas en este trabajo (Cuadro 8). La concentración de apigenina con el control en la parte aérea fue de 15 mg de apigenina/g de extracto respecto a las muestras con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, vanillina y vanillina + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que fueron de 27.3, 37.3 y 34.7 mg de apigenina, respectivamente. Los resultados indicaron que la aplicación de los FIHs favoreció la producción de apigenina principalmente.

En la Figura 13 se muestran los cromatogramas de los compuestos identificados en los extractos metanólicos de raíz de plantas de *C. tenuiflora*: control (Figura 13A), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 13B), vanillina (Figura 13C) y vanillina + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 13D). El pico 1 (ácido logánico) fue detectado en las tres muestras tratadas con los FIHs y el control (Cuadro 7). Sin embargo, se observó que la abundancia relativa fue con la muestra tratada con vanillina respecto al control y a la muestra con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y la mezcla de vanillina + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, indicando que la aplicación de vanillina favoreció la síntesis de ácido logánico. Mientras que el verbascósido (pico 2) únicamente estuvo presente en la muestra vanillina + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. En cuanto al pico 4 (apigenina), fue detectado en las muestras con vanillina y vanillina + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> además, de que las concentraciones de apigenina fueron similares: 37.3 y 34.7 mg apigenina/g de extracto, respectivamente como se muestra en el cuadro 8. La concentración de apigenina en la muestra control de raíz (10.4 mg/g de extracto), fue casi dos veces superior a la determinada en las muestras con vanillina + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (5.6 mg de apigenina/g de extracto), casi cinco veces más a la muestra con vanillina (2.2 mg de apigenina/g de extracto) y con 3 mg de apigenina/g de extracto más respecto a la muestra con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

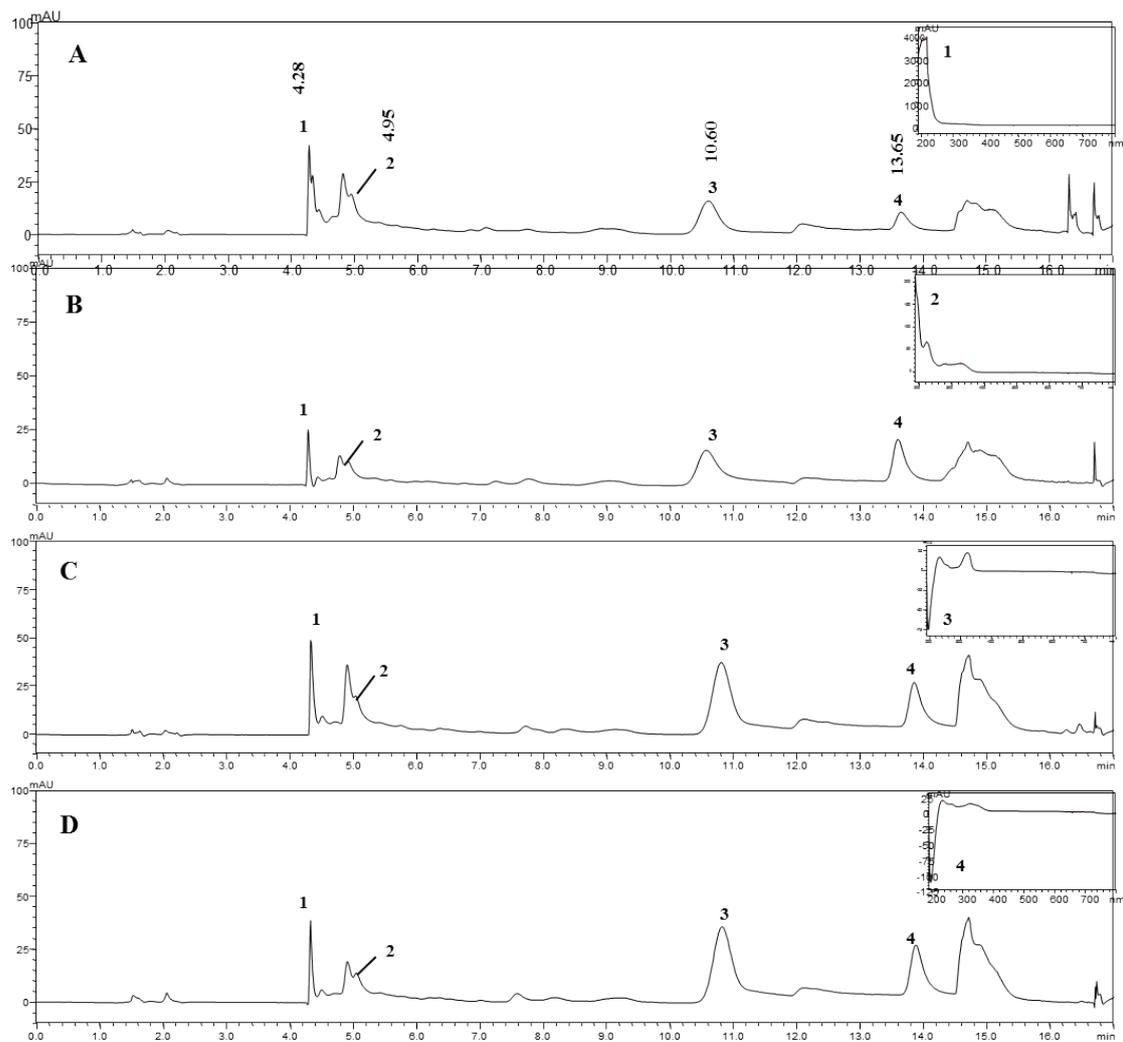


Figura 13. Cromatogramas (a 330 nm) de extractos metanólicos, **de parte aérea** de plántulas de *C. tenuiflora* de 21 días tratadas con FIHs. A-control; B-25  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ ; C- 25  $\mu\text{M}$  de vanillina; D- 25  $\mu\text{M}$  de vanillina + 25  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ . Picos: (1) Ácido logánico; (2) verbascósido; (3) tr= 10, 60 min; (4) apigenina. Inserto: espectro de absorción UV/VIS (1)  $\lambda=204$  nm; (2)  $\lambda= 225, 329$  nm; (3)  $\lambda= 207$  y 322; (4)  $\lambda= 235$  y 328 nm.

Cuadro 7. Tiempo de retención, longitud UV, ESI/MS (-) m/z e identificación en extractos metanólicos de la parte aérea de plantas de *C. tenuiflora*.

Pico	t <sub>R</sub> (min)	UV λ <sub>max</sub>	[M - H] <sup>-</sup> m/z	Identificación	Muestras	
					Parte aérea	Raíz
1	4.28	204	375	Ácido logánico	Control, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , vanillina y vanillina + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Control, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , Vanillina y vanillina + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
2	4.95	225, 329	623	Verbascósido	Control, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , Vanillina + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Vanillina + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
3	10.60	207, 322	487	No identificado	Control, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , vanillina y vanillina + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Control, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , vanillina y vanillina + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
4	13.65	235, 328	269	Apigenina	Control, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , vanillina y vanillina + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Vanillina, vanillina + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>

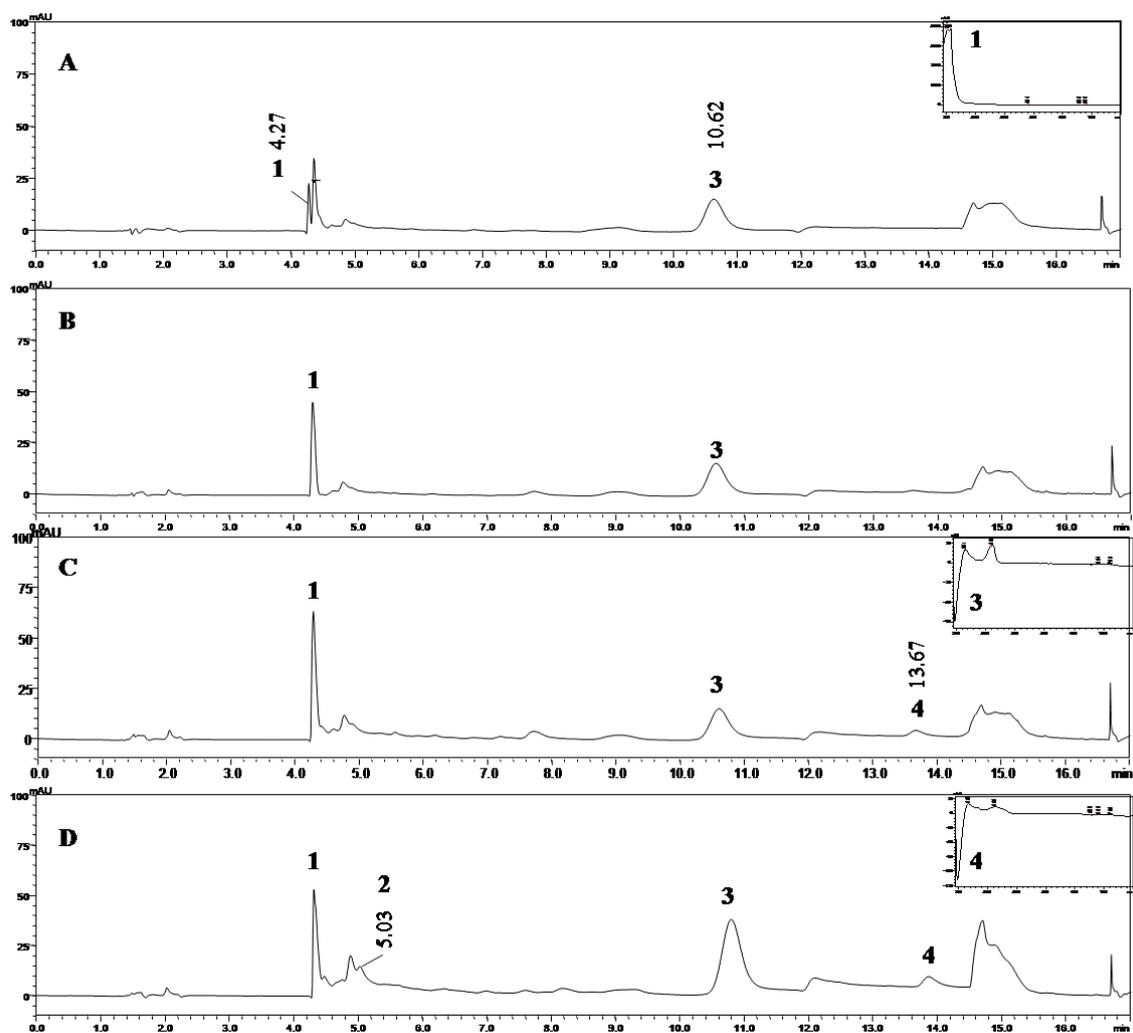


Figura 14. Cromatogramas (a 330 nm) de extractos metanólicos, **de raíz** de plántulas de *C. tenuiflora* de 21 días tratadas con FIHs. A-control; B-25  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ ; C- 25  $\mu\text{M}$  de vanillina; D- 25  $\mu\text{M}$  de vanillina + 25  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ . Picos: (1)  $t_R = 4.29$  min; (2) verbascósido; (3)  $t_R = 10.79$ ; (4) apigenina. Insertos: (1)  $\lambda = 204$ ; (2)  $\lambda =$  verbascósido; (3)  $\lambda = 232$  y  $322$ ; (4)  $\lambda = 236$  y  $324$  nm.

Cuadro 8. Comparación de la concentración de apigenina en extractos metanólicos de parte aérea y raíz de plantas de *C. tenuiflora* tratadas con FIHs.

	Concentración de apigenina (mg de apigenina/g de extracto)			
	Control	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Vanillina	Vanillina + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Parte aérea	15	27.3	37.3	34.7
Raíz	10.4	7.4	2.2	5.6

## VIII. DISCUSIÓN

En este trabajo, se indujeron *in vitro* haustorios en raíces de *C. tenuiflora* empleando compuestos químicos ó factores de inducción de haustorios (FIHs). Primero se estableció un sistema biológico que facilitara la inducción de haustorios en plantas de *C. tenuiflora*. De los cuatro sistemas propuestos: sustrato, hidroponía, medios de cultivo líquidos y en medio semisólido en tubos de ensaye se seleccionó el sistema en tubos de ensaye. En este sistema se llevó a cabo la inducción de haustorios empleando tres FIHs: catequina, vanillina y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en concentraciones de 25 µM. Con esta concentración se se obtuvieron 75% de plantas con haustorios y el porcentaje de raíces con haustorios fue mayor cuando se uso vanillina (5.7 %) respecto al control (0 %), catequina (1.75 %) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2.1 %). Los haustorios inducidos con catequina, vanillina y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mostraron características similares. Con respecto a la aplicación exógena de compuestos fenólicos (vanillina) y flavonoides (catequina); ambos compuestos podrían estar reaccionando con pequeñas cantidades de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que se encuentran almacenadas de forma natural en el apoplasto, dando la señal para la formación de haustorios. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Albrech y col. (1999), sobre la inducción de haustorios en *T. versicolor* empleando compuestos fenólicos. Los compuestos fenólicos al igual que otros FIHs actúan como una señal química para la inducción de haustorios.

Por otro lado, el número de haustorios fue mayor empleando vanillina (1-3 haustorios), resultados que concuerdan con lo reportado por Tomilov y col. (2008); estos autores reportaron del 20-48 % de haustorios empleando como FIHs a la DMBQ. Así mismo, Bair y Riopel (1984) reportaron de 0-5 haustorios/planta inducidos con goma tragacanto. Los resultados obtenidos en el presente trabajo sugiere que la respuesta a los compuestos químicos puede verse influenciada por la especie vegetal y las condiciones de cultivo.

En función de los resultados obtenidos se seleccionó la vanillina como el mejor FIHs, de tal forma que, se planteó evaluar 3 concentraciones de vanillina (0, 10, 25 y 50 µM) y, la mayor inducción de haustorios se obtuvo con 25 µM de vanillina. Mientras que con 10 µM se obtuvo un 6 % de inducción de haustorios y con 50 µM únicamente se logró un 2 % de inducción de haustorios. Los resultados reportados en este trabajo difieren a

lo reportado por Albrech y col. (1999), los autores reportaron que la inducción de haustorios en la punta de la raíz en la especie vegetal *Tryphisaria versicolor*, depende del tipo de FIHs y de su concentración. Albrecht y col. (1999) reportaron que conforme se incrementó la concentración de vanillina 1.0, 10 y 50  $\mu\text{M}$  se incrementó la inducción de haustorios 0.01, 0.16 y 0.74 haustorios/raíz, respectivamente. Sin embargo, los valores reportados para la inducción de haustorios en la especie vegetal *Tryphisaria versicolor* con vanillina reportados por Albrecht y col. (1999) fueron muy bajos respecto a la inducción de haustorios en este trabajo.

Por otro lado, el análisis histológico e histoquímico realizado a los haustorios inducidos con 25  $\mu\text{M}$  de vanillina, permitió detectar en los haustorios  $\text{H}_2\text{O}_2$  y flavonoides. Empleando la tinción de hematoxilina, se corroboró la presencia de algunas zonas meristemáticas (acumulación de varias células con sus respectivos núcleos) que es una característica de la formación de haustorios.

El análisis fitoquímico realizado en raíz y parte aérea de las muestras a las que se les aplicaron 3 concentraciones de vanillina, indicaron valores en compuestos fenólicos similares en los tratamientos con vanillina 10, 25 y 50  $\mu\text{M}$  y el control. La concentración de compuestos fenólicos en la parte aérea fue disminuyendo conforme se incrementó la concentración de vanillina. Lo anterior podría indicar cambios en la ruta de biosíntesis de compuestos fenólicos lo cual concuerda con lo reportado por Herring y col. (2002). Estos autores comentan que la producción de compuestos fenólicos está correlacionada con un incremento en los intermediarios de la ruta de biosíntesis de los fenilpropanoides. Un ejemplo es la aplicación de exógena de ácido cinámico en cultivos celulares de alfalfa (*Medicago sativa* L.) e incremento en la acumulación de cinamato. En cuanto a la concentración de flavonoides en raíz, la mayor concentración se obtuvo cuando se aplicó vanillina a 25  $\mu\text{M}$  en comparación al control, ó 10 y 50  $\mu\text{M}$  de vanillina. La concentración de flavonoides en la parte aérea con 10  $\mu\text{M}$  vanillina, fue menor a lo observado con 25 y 50  $\mu\text{M}$ , mientras que con el control, se obtuvieron los valores más altos de flavonoides. Estos resultados indicaron que la aplicación de 25  $\mu\text{M}$  de vanillina indujo, cambios en la concentración de flavonoides en raíz con respecto a lo observado con los compuestos fenólicos.

Aún cuando la inducción de haustorios fue mayor cuando se aplicó vanillina a 25  $\mu\text{M}$ , era importante la identificación de compuestos [(por LC-MS (ESI) ] cuando se aplica  $\text{H}_2\text{O}_2$ , el cual en este trabajo funcionó como un inductor de haustorios. Por lo tanto, se identificaron los compuestos de las muestras con los tratamientos vanillina,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , vanillina +  $\text{H}_2\text{O}_2$  y el control. Los resultados indicaron la presencia de 4 picos. El pico 1 corresponde a ácido logánico con un  $t_r= 4.8$  y  $m/z = 375$ , el pico 2 a verbascósido con un  $t_r= 4.95$  y  $m/z = 623$ , el pico 3 que corresponde a un compuesto no identificado  $t_r=10.60$  y  $m/z = 487$ , y el pico 4 a la apigenina con un  $t_r= 13.65$  y  $m/z = 269$ . Se pudo observar que solamente en el tratamiento con vanillina de la parte aérea no presentó verbascósido. Con respecto a la concentración de apigenina, se observó una mayor concentración de apigenina en las muestras correspondientes a la parte aérea principalmente cuando se aplicó vanillina (37.3 mg de apigenina/g de extracto). Es posible que la aplicación exógena de vanillina tenga influencia en la biosíntesis de los compuestos activos: flavonoides (apigenina) y feniletanoides (verbascósido) en *C. tenuiflora* tal y como lo reporta Herring y col. (2002). Estos autores reportan cambios en la actividad de PAL (fenil-amonio-liasa) que es la enzima primaria que conduce a la ruta de fenilpropanoides cuando se aplicaron ácido ferúlico y vanillinico (0-1.0 mM) en plantas de soya (*Glicine max*).

## IX. CONCLUSIONES

En *Castilleja tenuiflora* se indujo la formación de haustorios en condiciones *in vitro* sin la presencia de un hospedero y empleando 3 compuestos químicos: catequina, vanillina y  $\text{H}_2\text{O}_2$ . La adición de 25  $\mu\text{M}$  de vanillina al medio de cultivo indujo la máxima formación de haustorios (1-2 haustorios/raíz) en *C. tenuiflora*.

El análisis histológico de los haustorios permitió evidenciar los cambios característicos en la formación de haustorios: zonas de abultamientos, alargamiento de las células de la epidermis, y de la corteza interna. Los ensayos histoquímicos permitieron detectar la presencia de flavonoides en las zonas donde se observó la formación de los haustorios, principalmente en la epidermis y en las células de la zona meristemática. Por otro lado, mediante el DAB (3,3-diaminobencidina) fue posible identificar la presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$  durante el desarrollo de haustorios en los tratamientos con vanillina.

Respecto al análisis fitoquímico, la concentración de fenoles totales de las partes aéreas fueron similar en el control y en las muestras con vanillina mientras que la concentración de fenoles totales en raíz fue mayor en el control que en los tratamientos con vanillina. Mientras que, la concentración de flavonoides en raíz fue mayor con vanillina a 25  $\mu\text{M}$  (4.13 mg EC/ g BS), respecto a 50  $\mu\text{M}$  de vanillina (2.62 mg EC/ g BS) y al control (0.31 mg EC/ g BS).

El análisis químico por medio de LC-MS (ESI), reportó la presencia de ácido logánico, verbascósido, apigenina y un compuesto no identificado. La mayor concentración de apigenina se encontró en la parte aérea (comparada también con lo obtenido en raíz) de las plantas de *C. tenuiflora* pero mayor en el tratamiento con vanillina (37.3 mg apigenina/g de extracto).

## X. BIBLIOGRAFIA

Albrecht, H.; Yoder, I. J. and Phillips A.D. 1999. Flavonoids promote haustoria formation in the root parasite *Triphysaria versicolor*. *Plant Physiology*.119:585–591.

Baird, V. and Riopel J. 1984. Studies of haustorium initiation and early development in *Agalinis purpurea* (L.) Raf. (Scrophulariaceae). *American Journal of Botany*. 71(6): 803-814.

Bancroft, J. and Gamble. 2002. *Theory and practice of histological techniques*, 2nd ed., Editors, Churchill Livingstone, New York (NY). page 111.

Bandaranayake, P.; Filappova, T.; Tomilov, A.; Tomilova, N.; Jamison-McClung.; Ngo, Q.; Inoue K. and Yoder, I. J. 2010. A Single-electron reducing quinone oxidoreductase is necessary to induce haustorium development in the root parasitic plant *Triphysaria*. *The Plant Cell*. 22:1404-1419.

Bork, P., Schmitz, M., Weimann, C., Kist, M. and Heinrich, M. 1996. Nahua Indian medicinal plants (Mexico): Inhibitory activity on NF-KB as an anti-inflammatory model and antibacterial effects. *Phytomedicine*. 3(3): 263-269.

Cabezas, N.; Urzu, A. and Niemeyer ,H. 2009. Translocation of isoquinoline alkaloids to the hemiparasite, *Tristerix verticillatus* from its host, *Berberis Montana*. *Biochemical Systematics and Ecology*. 37:225–227.

Carrillo-Ocampo, D.; Bazaldúa-Gómez, S.; Bonilla-Barbosa, J.R.; Aburto-Amar, R and Rodríguez-López, V. 2013. Anti-inflammatory activity of iridoids and verbascoside isolated from *Castilleja tenuiflora*. *Molecules*. 18:12109-12118.

Deeks, S.J. ; Shamoun, S.F. and Punja, Z.K. 1999. Tissue culture of parasitic flowering plants: Methods and applications in agriculture and forestry. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant*. 35:369-381.

Dobbins D. and Kuijt J. 1972. Studies on the haustorium of *Castilleja* (Scrophulariaceae). I. The upper haustorium. Canadian Journal of Botany. 51: 917-922.

Egger, J.M., 2008. Nomenclatural changes and selected lectotypifications in *Castilleja* (Oronbanchaceae). Phytologia 90, 63–82.

Estrabrook, E. M. and Yoder, J. 1998. Plant-plant communications: rhizosphere signaling between parasitic angiosperms and their hosts. Update on plant-plant communication. Plant Physiology. 116:1-7.

Gamborg, O.L., Miller, R.A. and Ojima, K. (1968). Nutrient requirement of suspension cultures of soybean root cells. Experimental Cell Research. 50:151-158.

Gómez-Aguirre, Y.A.; Zamilpa, A.; González, C. and Trejo-Tapia. 2012. Adventitious root cultures of *Castilleja tenuiflora* Benth. as source of phenylethanoid glycosides. Industrial Crops and Products. 36: 188-195.

Hassan, E. A.; El-Akkad S. S.; Moustafa S. M. and El-Awadi, M. E. 2004. Histochemical aspects of penetration and vascular connection of broomrape haustoria in the host root, and the possible implication of phenylpropanoids. International Journal of Agriculture and Biology. 6(3):430-43.

Herring V.; Ferrarese, M.L.; Suzuki, L.S.; Rodrigues, J.D. and Filho, O.F. 2002. Peroxidase and phenylalanine ammonia-lyase activities, phenolic acid contents and allelochemicals-inhibited root growth of soybean. Biological Research.35(1):1-13.

Hood M. E.; Condon J. M.; Timko M. P. and Riopel J. L. 1998. Primary haustorial development of *Striga asiatica* on host and nonhost species. Phytopathology 88(1):70-75.

Huang, A-X.; She, X-P.; Cao, B-H. and Ren. Y. 2011. Distribution of hydrogen peroxide during adventitious roots initiation and development in mung bean hypocotyls cuttings. Plant Growth Regul. 64:109–118.

Jiang, F.; Dieter, W. and Hartung, W. 2005. Contents and flows of assimilates (mannitol and sucrose) in the hemiparasitic *Rhinanthus minor* l. *Hordeum vulgare* association. *Folia Geobotanica*. 40:195-203.

Jiménez, M. E.; Padilla, M.E.; Reyes, Ch. R.; Espinoza, L.M.; Melendes, E. and Lira-rocha, A. 1995. Iridoid glycoside constituents of *Castilleja tenuiflora*. *Biochemical Systematics and Ecology*. 23:445-456.

Joel, D.M. 2013. Functional structure of the mature haustorium. Chapter 3. In: *Orobanchaceae. Parasitic mechanisms and control strategies*. Springer. 1-518.

Keyes, W. J.; O'Malley, R. C.; Kim, D. and Lynn D. G. 2000. Signaling organogenesis in parasitic angiosperms: xenognosin generation, perception, and response. *Journal Plant Growth Regulation* 19:217–23.

Keyes, W. J.; Taylor, J. V. ; Apkarian, R. P. and Lynn, D. G. 2001. Dancing together. Social controls in parasitic plant development. *Plant Physiology*. 127:1508–1512.

Keyes W. J.; Palmer A. G.; Erbil W. K.; Taylor J. V., Apkarian R. P., Weeks, E. R. and Lynn D. G. 2007. Semagenesis and the parasitic angiosperm *Striga asiatica*. *The Plant Journal* 51: 707–716.

Kureh, I.; Chikoye, D.; Emechebe, A.; Hussaini, M.; Kormawa, P.; Schulz, S.; Ellis-Jones, J.; Franke, L. and Odunze, A. 2003. Reduction of *Striga hermonthica* parasitism on maize using host plant resistance, fertilization and rotation with legume trap-crops. *African Crop Science Conference Proceedings*, Vol. 6. 167-171.

Lister, C.E.; Lancaster, J.E. and Walker, J.L.; 1996. Developmental changes in enzymes biosynthesis in the skins of red and of flavonoid green apple cultivars. *Journal of Science Food and Agriculture*. 71:313-330.

López-Laredo, A.R.; Gómez, A. Y; Medina, P. V.; Salcedo, M.G.; Sepúlveda-Jiménez G. and Trejo, T. G. 2012. Variation in antioxidant properties and phenolics concentration in different organs of wild growing and greenhouse cultivated *Castilleja tenuiflora* Benth. *Acta Physiologiae Plantarum*. 34(6):2435-2442.

Losner-Goshen, D., Portnoy, V.L.; Mayer, A. and Joel, D. M. 1998. Pectolytic activity by the haustorium of the parasitic plant *Orobancha* L. (Orobanchaceae) in host roots. *Annals of Botany*. 81: 319-326.

Lucca, Z.; Barbosa, L.; Lucio, F.; Bubna, A. and Ferrase, F. 2009. Soybean root growth inhibition and lignification induced by *p*-coumaric acid. *Environmental and Experimental Botany*. 66:25–30

Martínez-Bonfil, B., Cruz-Hernández, A., López-Laredo, A.R., Trejo-Tapia, G. and Trejo-Espino, J.L. 2014. Effects of culture medium and auxins on growth of adventitious root cultures of *Cuphea aequipetala* Cav. and their ability to produce antioxidant compounds. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. DOI: 10.1007/s11240-014-0492-6.

Martínez-Bonfil, B.P.; Salcedo-Morales, G.; López-Laredo, A.R.; Ventura-Zapata, E.; Evangelista-Lozano, S. and Trejo-Tapia, G. 2011. Shoot regeneration and determination of iridoid levels in the medicinal plant *Castilleja tenuiflora* Benth. *Plant Cell Tissue Organ Culture*. 107:195-203.

Medina, V. 2011. Efecto de la reducción de nitrógeno en el metabolismo de compuestos fenólicos en brotes de *Castilleja tenuiflora* Benth. cultivados en biorreactor de inmersión temporal. Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional. Yautepec, Morelos, México. 55p.

Moreno-Escobar, J.A., Bazaldúa, S.; Villarreal, M.L.; Bonilla-Barbosa, J.R., Mendoza, S. and Rodríguez-López, V. 2011. Cytotoxic and antioxidant activities of selected Lamiales species from Mexico. *Pharmaceutical Biology*. 49(12):1243-1248.

Nesom, G.L., 1992. Taxonomy of the *Castilleja tenuiflora* group (Scrophulariaceae) in Mexico, with an overview of sect. *Castilleja*. *Phytologia* 73:389–390.

O'Malley, R. C. and D. G. Lynn. 2000. Expansin message regulation in parasitic angiosperms: marking time in development." *The Plant Cell*. **12**(8): 1455-1465.

Politycka, B. 1998. Phenolics and the activities of phenylalanine ammonia-lyase, phenol- $\beta$ -glucosyltransferase and  $\beta$ -glucosidase in cucumber roots as affected by phenolic allelochemicals. *Acta Physiologiae Plantarum*. 20(4):405-410.

Parker, Ch. 2013. The parasitic weeds of the Orobanchaceae Chapter 18. In: *Parasitic Orobanchaceae. Parasitic mechanisms and control strategies*. Springer. 1-518.

Riopel, J. L. and Musselman, L. J. 1979. Experimental initiation of haustoria in *Agalinis purpurea* (Scrophulariaceae). *American Journal of Botany*. 66(5):570-575.

Rosas, R.R. 2007. Establecimiento del cultivo *in vitro* de *Castilleja tenuiflora* Benth.. Tesis de Maestría. Centro de Desarrollo de Productos Bióticos. Instituto Politécnico Nacional. México, D.F.

Saimaru, H. and Orihara, Y. 2010. Biosynthesis of acteoside in cultured cells of *Olea europea*. *Journal of Natural Medicine*. 64:139-145.

Salcedo, M. G.; Rosas, R.G. and Trejo, T.G. 2007. Evaluación de un protocolo para la micropropagación de *Castilleja tenuiflora* Benth (hierba del cáncer) a partir de meristemas, XII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería . Morelia, Michoacán del 25 al 29 de junio.

Sánchez, P.M.; Villarreal, M.L.; Herrera-Ruíz, M.; Zamilpa, A.; Jiménez-Ferrer, E. and Trejo-Tapia, G. 2013. In vivo anti-inflammatory and anti-ulcerogenic activities of extracts from wild growing and *in vitro* plants of *Castilleja tenuiflora* Benth. (Orobanchaceae). *Journal of Ethnopharmacology*. 150(3):1032-1037.

Saslowsky, D. and Winkel, B.S. 2001. Localization of flavonoid enzymes in *Arabidopsis* roots. *The Plant Journal*. 27(1): 37-48.

Shiweng, L.; Linggui, X.; Shijian, X.; Huyuan, F. and Lizhe, A. 2007. Hydrogen peroxide involvement in formation and development of adventitious roots in cucumber. *Plant Growth Regulation* 52:173–180.

Shohael, A.M.; Chakrabarty, D.; Ali, M.B.; Yu, K.W.; Hahn, E.J.; Lee, H.L. and Paek, K.; Y. 2006. Enhancement of Chutherosides production in embryogenic cultures of *Eletrerucoccus sessiflorus* in response sucrose-induced osmotic stress. *Procces Biochemistry*. 41:512-518.

Shenk R. A., Hildebrandt. 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous plant cell cultures. *Canadian Journal of Botany*. 50:199-204.

Tank, D.C., Egger, J.M. and Olmstead, R.G., 2009. Phylogenetic classification of subtribe Castillejinae (Orobanchaceae). *Systematic Botany*. 34, 182–197.

Tomilov, A., Tomilova, N., Wroblewski, T., Michelmore, R. and Yoder J.I. 2008. Trans-specific gene silencing between host and parasitic plants. *The Plant Journal*. (56)389–397.

Valdéz, R. 2011. Cultivo de brotes de *Castilleja tenuiflora* Benth. en un biorreactor de inmersión temporal: acumulación de compuestos fenólicos, flavonoides y su actividad antioxidante. Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional. Yautepec, Morelos, México. 68p.

Ventura, Z.E.; Salcedo, M.G.; Hernández, L.A.; Martínez, B.B.; Trejo, T.G.; De Jesús, S.A.; Velázquez Del Valle, M. and Jiménez, A.A. 2003. In vitro regeneration and acclimatization of plants of tumeric (*Curcuma longa* L.) in a hydroponic system. *Biotechnología Aplicada*. 20(1):25-31.

Walker, T. S.; Bais, H. P.; Grotewold, E. and. Vivanco, J. M. 2003. Root Exudation and Rhizosphere Biology. Update on Root Exudation and Rhizosphere Biology. *Plant Physiology*. 132: 44–51.

Yoder, J. 1999. Parasitic plant responses to host plant signals: a model for subterranean plant–plant interactions. *Current Opinion in Plant Biology*. 2:65–70.

Yoder J. 2001. Host-plant recognition by parasitic *Scrophulariaceae*. . *Current Opinion in Plant Biology*.