



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES UNIDAD  
LEÓN**

**TEMA:**

**LA HERRAMIENTA DE UNO, PUEDE SER EL ARMA DE OTRO:  
BIOMOLÉCULAS INVOLUCRADAS EN EL PROCESO INICIAL INFECTIVO  
DEL MUÉRDAGO EN ÁRBOLES DE MEZQUITE**

**MODALIDAD DE TITULACIÓN:**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
LICENCIADA EN CIENCIAS AGROGENÓMICAS**

**P R E S E N T A:**

**JESSICA MONTSERRAT AGUILAR VENEGAS**

**TUTOR INTERNO:**

**DR. JULIO CÉSAR VEGA ARREGUÍN**

**TUTOR EXTERNO:**

**DR. DOMANCAR ORONA TAMAYO**



León, Guanajuato

2019



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES UNIDAD  
LEÓN**

**TEMA:**

**LA HERRAMIENTA DE UNO, PUEDE SER EL ARMA DE OTRO:  
BIOMOLÉCULAS INVOLUCRADAS EN EL PROCESO INICIAL INFECTIVO  
DEL MUÉRDAGO EN ÁRBOLES DE MEZQUITE**

**MODALIDAD DE TITULACIÓN:**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
LICENCIADA EN CIENCIAS AGROGENÓMICAS**

**P R E S E N T A:**

**JESSICA MONTSERRAT AGUILAR VENEGAS**

**TUTOR INTERNO:**

**DR. JULIO CÉSAR VEGA ARREGUÍN**

**TUTOR EXTERNO:**

**DR. DOMANCAR ORONA TAMAYO**



León, Guanajuato

2019

## AGRADECIMIENTOS

A la Escuela Nacional de Estudios Superiores Unidad León, UNAM, que me permitió recibir una educación de calidad durante toda mi estancia en la máxima casa de estudios y me abrió completamente el panorama hacia la investigación como un arma para la resolución de problemas.

A la UNAM por las becas recibidas de apoyos económicos y para realizar una estancia de investigación en el extranjero: Beca PFEL, Beca de Capacitación en Métodos de Investigación SEP-UNAM-FUNAM y Beca de Titulación, las cuales sin duda le dieron rumbo a mi carrera profesional, así como los apoyos recibidos en conjunto con EDUCAFIN para la participación en el concurso internacional de biología sintética iGEM 2016 en Boston, EUA, y para realizar la estancia de investigación de mi último año en el Max Planck Institute for Plant Breeding Research en Colonia, Alemania.

A la Licenciatura en Ciencias Agrogenómicas y su laboratorio en el que desarrollé la mayor parte de mi tesis. A todos los investigadores que tuve la dicha de llamarles profesores, en especial a la Dra. Harumi Shimada y el Dr. Julio Vega, coordinadores de la licenciatura, excelentes profesores de los cuales aprendí desde las bases hasta lo más complicado (tanto de la carrera como de la vida), pero sobretodo gran apoyo emocional que definitivamente sin su ayuda no habría tenido la oportunidad de tener tantas experiencias enriquecedoras en el ámbito científico.

Al CIATEC A.C. por permitirme desarrollar parte de mi tesis y por el apoyo económico otorgado. Al CINVESTAV Irapuato por las facilidades otorgadas, en especial al Dr. Martin Heil así como al Dr. Gustavo Hernández (Universidad de Guanajuato) por los reactivos y equipos proporcionados, indispensables para la realización de esta tesis.

Al Dr. Domancar Orona por enseñarme nuevas formas de abordar un problema biológico y por las facilidades para desenvolverme mejor en el ámbito científico.

A la Dra. Elizabeth Quintana por sus conocimientos transmitidos y apoyo en la realización de mi tesis.

Al los doctores del Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY), Víctor Loyola, Víctor Aguilar y Ligia Brito por la colaboración para la obtención de la cuantificación de las fitohormonas y por su apoyo para la realización de este trabajo.

A mi madre por representar la base más sólida de mi vida y apoyarme en todo momento.

A Juan Antonio, mi confidente, apoyo incondicional, compañero de vida e inspiración para nunca conformarme y siempre dar lo mejor de mi.

A mis amigos por haberme ayudado en su momento en clases o en el laboratorio, por la convivencia, y principalmente por el apoyo emocional con el que siempre conté.

A mi familia por el estímulo motivacional.

## 1 RESUMEN

Las plantas parásitas obtienen diferentes nutrientes de su huésped mediante el desarrollo de una estructura especializada llamada haustorio, el cual se conecta al sistema vascular de la planta hospedera. *Psittacanthus calyculatus* es una planta hemiparásita que representa una amenaza, ya que infecta árboles de interés agronómico y ecológico. Se cree que en el estado de Guanajuato el 65% del arbolado está infectado, derivando en una alarma estatal debido a la infección de diferentes árboles endémicos de la región. El proceso del establecimiento e infección de ésta parásita no está estudiado, por lo que en el presente trabajo nos enfocamos a estudiar el proceso inicial infectivo en árboles de mezquite. Identificamos los estadios fenológicos, combinamos análisis de enzimas involucradas en la degradación de la corteza del hospedero, cuantificamos diferentes fitohormonas y determinamos los perfiles proteómicos relacionados con los estadios de infección del muérdago. Identificamos cinco estadios diferentes de infección, el primer estadio inicia con la maduración de la semilla, la cual contiene viscina necesaria para adherirse a la corteza del hospedero, con las condiciones ambientales favorables se empieza a formar la radícula de infección. Posteriormente, ocurre la aparición de los cotiledones y la penetración de la radícula en la rama en el estadio número tres, además en este estadio encontramos las principales actividades enzimáticas compuestas de celulasas,  $\beta$ -1,4-glucosidasas, xilanasas y endo-1,4- $\beta$ -glucanasas involucradas en la degradación de la corteza del hospedero. También, en este estadio los perfiles proteómicos contienen proteínas que se acumulan y disminuyen su nivel de expresión, y la mayoría están involucradas con el procesamiento de la información genética, procesos celulares y actividad de proteasa, proteínas importantes en la infección y desarrollo del haustorio. Por último, encontramos variaciones en la concentración de fitohormonas del tipo citocininas y auxinas, fitohormonas relacionadas con las señales del desarrollo, establecimiento de la plántula, aparición de cotiledones, emergencia de la radícula y formación del haustorio infectivo. Se presenta por primera vez un estudio a nivel bioquímico molecular necesario para entender la biología de infección de *P. calyculatus* y que podría derivar en un método de control futuro.

# ÍNDICE DE CONTENIDO

## ÍNDICE DE FIGURAS

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>1 RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
<b>2 INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>8</b>
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>11</b>
3.1 Objetivo general .....	11
3.2 Objetivos específicos .....	11
3.3 Justificación .....	11
<b>4 ANTECEDENTES</b> .....	<b>12</b>
4.1 Plantas parásitas.....	12
4.2 Muérdagos .....	12
4.3 Género <i>Psittacanthus calyculatus</i> .....	13
4.3.1 Ciclo de vida.....	13
4.4 Haustorio: Sistema infeccionoso y de captación de nutrientes .....	16
4.5 Composición química de la madera de mezquite .....	19
4.5.1 Enzimas degradativas de material lignocelulósico secretadas por plantas parásitas.....	21
4.5.1.1 Celulasas .....	21
4.5.1.2 Xilanasas .....	22
4.5.1.3 Lacasas y peroxidasas .....	24
4.6 Proteómica molecular como herramienta de estudio en el establecimiento de la infección.....	26
4.7 Fitohormonas relacionadas con el proceso de infección .....	27
4.7.1 Citocininas .....	28
4.7.2 Auxinas .....	30
4.7.3 Funciones de fitohormonas en plantas parásitas .....	31
4.8 Daños e impacto ambiental .....	33
<b>5 MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>36</b>
5.1 Sitio de estudio .....	36
5.2 Análisis de los diferentes estadios fenológicos infeccionosos .....	37
5.3 Extracción enzimática.....	38
5.4 Actividades enzimáticas .....	38
5.4.1 Método cualitativo .....	38

5.4.2 Método cuantitativo.....	38
5.4.2.1 Actividad de celulasas.....	39
5.4.2.2 Actividad de endo-1,4- $\beta$ -glucanasas.....	40
5.4.2.3 Actividad de $\beta$ -1,4-glucosidasas .....	41
5.4.2.4 Actividad de xilanasas.....	42
5.5 Extracción de proteínas totales.....	43
5.6 Cuantificación de proteínas.....	43
5.7 Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE).....	43
5.8 Electroforesis en dos dimensiones (2-DE).....	44
5.9 Análisis bioinformático de los perfiles en 2-DE.....	45
5.10 Perfil de fitohormonas .....	45
5.11 Análisis estadístico .....	46
<b>6 RESULTADOS .....</b>	<b>47</b>
6.1 Fenología de infección.....	47
6.2 Actividades enzimáticas en haustorios de <i>P. calyculatus</i> .....	51
6.2.1 Actividad cualitativa de celulasas.....	52
6.2.2 Actividad enzimática de celulasas.....	53
6.2.3 Actividad enzimática de endo-1,4- $\beta$ -glucanasas .....	54
6.2.4 Actividad enzimática de $\beta$ -1,4-glucosidasas.....	55
6.2.3 Actividad enzimática de xilanasas .....	56
6.3 Perfiles de proteínas unidimensionales en SDS-PAGE .....	57
6.4 Electroforesis en 2-DE .....	59
6.5 Categorización funcional de proteínas de los estadios diferenciales del haustorio de <i>P. calyculatus</i> .....	63
6.6 Perfiles de fitohormonas en los estadios de infección .....	71
6.6.1 Citocininas.....	71
6.6.2 Auxinas.....	75
<b>7 DISCUSIÓN .....</b>	<b>78</b>
7.1 Fenología de infección.....	78
7.2 Actividades de enzimas involucradas en el proceso infectivo .....	79
7.3 Perfiles proteómicos de los estadios de infección .....	80
7.4 Perfiles de fitohormonas en estadios de infección .....	82
7.5 Modelo de infección inicial de <i>P. calyculatus</i> en árboles de mezquite.....	83

<b>8 CONCLUSIONES</b> .....	<b>86</b>
<b>9 PERSPECTIVAS</b> .....	<b>87</b>
<b>10 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>88</b>
<b>11 ANEXOS</b> .....	<b>104</b>



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Grados de infestación en árboles de mezquite por el muérdago <i>P. calyculatus</i> en la ciudad de León, Guanajuato .....	10
Figura 2. Ciclo de vida de <i>P. calyculatus</i> a lo largo de un periodo de 5 años .....	14
Figura 3. Fracaso en germinación de semilla de <i>P. calyculatus</i> .....	15
Figura 4. Principales visitantes y polinizadores florales de <i>P. calyculatus</i> .....	16
Figura 5. Haustorio de diferentes plantas parásitas .....	17
Figura 6. Representación gráfica de la penetración de una parásita ( <i>Cuscuta</i> spp.) al hospedero en el sistema vascular .....	18
Figura 7. Componentes principales de la pared celular de las plantas.....	20
Figura 8. Sitios de acción y productos de endoglucanasas, exoglucanasas y $\beta$ -glucosidasas en la estructura molecular de la celulosa.....	22
Figura 9. Sitios de acción y productos de enzimas involucradas en la degradación de la hemicelulosa.....	23
Figura 10. Esquema general de la biodegradación de la lignina.....	25
Figura 11. Formas más comunes y activas de las citocininas.....	29
Figura 12. Formas comunes de auxinas naturales y sintéticas.....	31
Figura 13. Infestación de muérdago en la zona del Malecón del Río en León, Guanajuato.....	34
Figura 14. Diversas noticias en diferentes periódicos y páginas informativas de los últimos años relacionados a la infestación por muérdago en los árboles de la ciudad de León, Gto.....	35
Figura 15. Estrategia general del estudio .....	36
Figura 16. Sitio de estudio y recolección de material vegetal .....	37
Figura 17. Estadíos fenológicos identificados en este estudio.....	38
Figura 18. Equipo utilizado para la cuantificación de actividades enzimáticas.....	39
Figura 19. Sistema de electroforesis SDS-PAGE y de revelado .....	44
Figura 20. Sistema GE Healthcare Ettan™ IPGphor™ 3 Isoelectric Focusing System. ....	45
Figura 21. Ciclo de vida de <i>P. calyculatus</i> en un periodo de 5 años .....	51
Figura 22. Detección cualitativa de celulasas en estadíos de infección. ....	52
Figura 23. Actividad de celulasa en estadíos diferenciales de <i>P. calyculatus</i> .....	53
Figura 24. Actividad de endo-1,4- $\beta$ -glucanasa en estadíos diferenciales de <i>P. calyculatus</i> .....	54
Figura 25. Actividad de $\beta$ -1,4-glucosidasa en estadíos diferenciales de <i>P. calyculatus</i> .....	55
Figura 26. Actividad de xilanasa en estadíos diferenciales de <i>P. calyculatus</i> .....	56
Figura 27. Perfil de SDS-PAGE de estadíos diferenciales de <i>P. calyculatus</i> .....	58

<b>Figura 28. Perfiles proteómicos en 2-DE pH 3-10 para los estadios diferenciales de <i>P. calyculatus</i></b> .....	60
<b>Figura 29. Perfiles proteómicos en 2-DE pH 4-7 para los estadios diferenciales de <i>P. calyculatus</i></b> .....	62
<b>Figura 30. Categoría funcional de las 41 proteínas identificadas en los estadios diferenciales de <i>P. calyculatus</i></b> .....	63
<b>Figura 31. Proteínas seleccionadas para su identificación en base a su punto isoeléctrico (pI) y peso molecular (Mw) en perfiles proteómicos en 2-DE de 3-10</b> .....	64
<b>Figura 32. Modelo hipotetizado de la utilización de biomoléculas involucradas en el proceso de infección en estadios diferenciales de <i>P. calyculatus</i></b> .....	84
<b>Figura A1. Curva estándar de albúmina de suero bovino (BSA) en concentraciones 0-1 mg/ml a una absorbancia de 595 nm</b> .....	105
<b>Figura A2. Curva estándar de glucosa en concentraciones 0-2 mg/ml a una absorbancia de 550 nm</b> .....	105
<b>Figura A3. Curva estándar de xilosa en concentraciones 0-2 mg/ml a una absorbancia de 550 nm</b> .....	106

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Contenido de monómeros y lignina en el duramen de <i>P. laevigata</i> .....	20
Tabla 2. Funciones importantes de las principales fitohormonas a lo largo de la vida de la planta .....	27
Tabla 3. Parámetros utilizados para el isoelectroenfoco .....	44
Tabla 4. Eventos del desarrollo de <i>P. calyculatus</i> asociados a su estadio fenológico de infección en <i>P. laevigata</i> .....	47
Tabla 5. Contenido total de proteínas en estadios diferenciales de <i>P. calyculatus</i> .....	57
Tabla 6. Identificación teórica individual de las proteínas separadas por 2-DE de los diferentes estadios diferenciales de <i>P. calyculatus</i> .....	65
Tabla 7. Perfiles de citocininas en los estadios diferenciales de infección de <i>P. calyculatus</i> .....	71
Tabla 8. Perfiles de auxinas en los estadios diferenciales de infección de <i>P. calyculatus</i> .....	75
Tabla A1. Condiciones de salida del IEF de pH 3-10 .....	107
Tabla A2. Condiciones de salida del IEF de pH 4-7 .....	107

## 2 INTRODUCCIÓN

Las plantas parásitas obtienen nutrientes para su desarrollo de otras plantas hospederas (Comisión Nacional Forestal, 2010). Evolutivamente, han sido capaces de desarrollar mecanismos de identificación, crecimiento invasivo y establecer conexiones en diferentes hospederos (Clarke *et al.*, 2019). La forma de adquirir nutrientes del hospedero es mediante una estructura especializada llamada haustorio, la cual dependiendo del tipo de planta parásita puede unirse a la raíz o a la rama del hospedero, y posteriormente formará el haustorio infectivo que penetrará hasta los tejidos conectivos de la planta hospedera (Press & Phoenix, 2005). Los muérdagos son plantas hemiparásitas arbustivas y obligadas, que ocasionan daños a los árboles y coníferas de interés económico y ecológico (Geils & Vázquez-Collazo, 2002). Específicamente, existen 77 géneros y 950 especies que comprenden a la familia Loranthaceae, una de las familias más grandes del orden de las Santales. Estas plantas se encuentran desde las zonas tropicales y subtropicales exclusivamente en el Centro y Sur de América, África, Nueva Zelanda y Australia (Kuijt & Hansen, 2015). Los muérdagos del género *Psittacanthus* son endémicos del Nuevo Mundo y podemos encontrarlos desde México hasta el norte de Argentina. En México se encuentran presente en 25 estados y prevalecen en el centro y sur del país (Azpeitia & Lara, 2006).

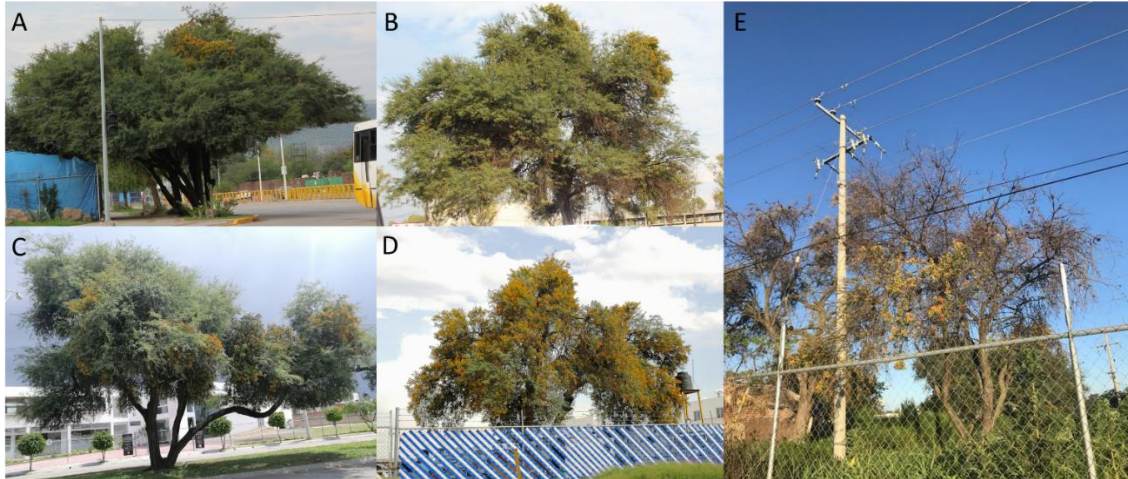
*Psittacanthus calyculatus* (DC.) G. Don (Loranthaceae) es un muérdago de gran prevalencia e infestación en la zona central de México. En el estado de Guanajuato este muérdago ha ocasionado una alarma por considerarse una plaga incontrolable, ya que aproximadamente el 65% del arbolado urbano de León se considera que está infestado por este muérdago (Valdés-Pirck, 2017; Figura 2). La importancia de los árboles de mezquite radica en la purificación del aire, sombra y regulación de la temperatura urbana, enriquecimiento del suelo ya que pueden fijar nitrógeno, además de que es una especie que soporta sequías extremas, su madera es muy utilizada para construcción de muebles y produce una resina parecida a la goma arábiga, usada en las industrias alimentaria, farmacéutica, textil, cosmética y vinícola (Orozco-Villafuerte *et al.*, 2003; Goycoolea *et al.*, 2006; Fullbright & Ortega-Santos, 2017). *P. calyculatus* una vez establecido en el hospedero, interfiere gravemente en los procesos fisiológicos, principalmente en el desarrollo, crecimiento y reproducción (Vázquez-Collazo & Geils, 2002). La infestación del muérdago también da como resultado en la defoliación y eventual muerte de las ramas distales del hospedero (Tennakoon *et al.*, 1996). Si el hospedero tiene un grado alto de infección, entonces podría estar destinado a la muerte (Press & Phoenix, 2005; Comisión Nacional Forestal, 2010).

Para su reproducción, esta especie presenta características atractivas para atraer polinizadores. Varios de estos rasgos son los colores llamativos de sus flores, que van desde amarillo a rojo durante el tiempo de floración, emisión de compuestos volátiles orgánicos (COVs) y producción de néctar floral como estrategia de reproducción (Quintana-Rodríguez, 2018). Así mismo, utiliza otros mecanismos de mutualismo con aves frugívoras para la dispersión de sus semillas, quienes comen su fruto y defecan la semilla en la rama del hospedero (Reid, 1991; López De Buen & Ornelas, 2001; Vázquez-Collazo & Geils, 2002). La germinación y dispersión de las semillas por las aves, radica en el tiempo de maduración, tamaño y color de fruto, adaptación para su pasaje por el tracto digestivo, adhesión y rápida germinación después de ser defecada, así como la susceptibilidad del hospedero (Kuijt, 1969).

Se conocen más de 50 géneros de hospederos entre angiospermas y coníferas, entre ellos se encuentran árboles de importancia económica y ecológica como son *Acacia* spp., *Alnus acuminata* (aile), *Bursera* spp. (copal, cuajote), *Eucalyptus* spp. (eucalipto), *Ficus*, *Fraxinus* spp. (fresno), *Juglans* spp. (nogal), *Liquidambar* spp., *Populus* spp. (álamo), *Prosopis* spp. (mezquite), *Quercus* spp. (encino), *Salix babylonica* (sauce), y otros de interés agronómico como *Citrus* spp. (limón, naranja, toronja), *Crataegus pubescens* (tejocote), *Malus domestica* (manzana), *Persea americana* (aguacate), *Prunus* spp. (durazno, cerezo, ciruelo y capulín), entre otros (Vázquez-Collazo & Geils, 2002; Azpeitia & Lara, 2006). En todos ellos causa los problemas ya mencionados.

El éxito de la compatibilidad con sus hospederos, reproducción y dispersión son los principales obstáculos que frenan un adecuado control de esta plaga, pudiendo direccionar estudios moleculares como métodos de control para la interrupción de los procesos vitales de la infección como la germinación, penetración, desarrollo del haustorio, floración y producción de frutos (Castillejo *et al.*, 2004). En la actualidad existen estudios limitados de plantas parásitas esencialmente de aquellas que afectan cultivos, y ha habido un enfoque molecular en señales inductoras de la germinación y la formación del haustorio en géneros de plantas parásitas como son *Cuscuta* spp., *Orobancha* spp. y *Striga* spp. (Nagar *et al.*, 1984; Singh & Singh, 1993; Losner-Goshen *et al.*, 1998; Yoder, 1999; Matusova *et al.*, 2005; Benvenuti, 2005; Johnsen, 2014), sin embargo, en *P. calyculatus* no está esclarecido ninguno de estos procesos.

Por tal motivo, en el presente trabajo se estudiaron las biomoléculas responsables del proceso infectivo inicial del muérdago *P. calyculatus* en árboles hospederos de *Prosopis laevigata* (mezquite) (Figura 1). Analizamos el ciclo de vida; en los primeros estadios fenológicos de infección determinamos las enzimas responsables en la degradación de la corteza, cuantificamos las fitohormonas e identificamos los patrones proteómicos del tejido del haustorio infectivo caracterizando putativamente algunas de las proteínas detectadas todo esto vinculado al proceso de la germinación e infección de árboles de mezquite.



**Figura 1. Grados de infestación en árboles de mezquite por el muérdago *P. calyculatus* en la ciudad de León, Guanajuato.** (A) Grado 2 (B-C) Grado 3 (D) Grado 4 (E) Grado 5. La determinación de los grados de infestación se realizó de acuerdo con Arriola-Padilla *et al.* (2013), donde el grado 1 es árbol sano, grado 2 una mata de muérdago, grado 3 más de una mata, pero domina el follaje del hospedero, grado 4 más de una mata de muérdago cuyo follaje domina, y grado 5 el árbol muerto. Fotos: fuente propia.

## 3 OBJETIVOS

### 3.1 OBJETIVO GENERAL

Caracterizar las biomoléculas del muérdago *P. calyculatus* en los primeros estadios fenológicos de infección y su posible relación con el proceso inicial infectivo en árboles de *Prosopis laevigata* (mezquite).

### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analizar los estadios fenológicos de infección.
- Determinar las actividades enzimáticas en el haustorio responsable del proceso de infección.
- Cuantificar las fitohormonas involucradas en el proceso de infección.
- Identificar los perfiles proteómicos y las funciones putativas de las proteínas de los diferentes estadios de infección.

### 3.3 JUSTIFICACIÓN

*Psittacanthus calyculatus* causa graves daños a los árboles de mezquite y sólo en el estado de Guanajuato se estima que el 50% de los árboles están infectados por este muérdago (Zamudio & Galván, 2011). En la ciudad de León, esta plaga ha infectado al 65% del arbolado (Valdés-Pirck, 2017) que incluyen árboles frutales y endémicos de gran interés económico y ecológico. De ahí radica el interés de entender cómo es el diálogo molecular entre una planta parásita y su huésped.

Hasta la fecha, no existen estudios moleculares que permitan entender que biomoléculas utiliza un muérdago para infectar árboles, por esta razón para abordar esta problemática, es necesario conocer las biomoléculas necesarias para la germinación de sus semillas, la formación del haustorio infectivo, así como otros componentes necesarios que este muérdago utiliza para asentarse en árboles susceptibles.

El entendimiento de estos mecanismos permitirá generar conocimiento nuevo que ayudará a la comprensión del asentamiento inicial en un huésped y abrirá una nueva ventana para la obtención de información, desarrollar estrategias y acciones para la disminución o erradicación del muérdago *P. calyculatus*.

## 4 ANTECEDENTES

### 4.1 Plantas parásitas

Durante la evolución de las plantas fotosintéticas, existieron aproximadamente 13 eventos evolutivos independientes donde se originaron especies de plantas que eran capaces de realizar su propia fotosíntesis (Barkman *et al.*, 2007). Un tipo de plantas muy particulares son las plantas parásitas, que dependen hasta cierto grado de un huésped para la obtención de agua y nutrientes (Westwood *et al.*, 2010). Se estima que existen aproximadamente 4,500 especies que están distribuidas en 28 familias, representando el 1% de las dicotiledóneas (Heide-Jørgensen, 2013; Clarke *et al.*, 2019). La clasificación de las plantas parásitas va acorde a su sistema fotosintético presente o ausente (Kuijt, 1969). Se les llama hemiparásitas si son parcialmente autótrofas y fotosintéticamente activas, y holoparásitas si han perdido completamente su capacidad fotosintética dependiendo completamente del suministro de nutrientes del hospedero (Yoshida *et al.*, 2016). Por otro lado, las plantas hemiparásitas son facultativas, ya que pueden completar su ciclo de vida sin el hospedero, y las holoparásitas son obligadas, debido a que no pueden desarrollarse sin la dependencia de un hospedero (Spallek *et al.*, 2017). De igual manera, se les clasifica como parásitas de raíz o de tallo, de acuerdo a su sitio de unión con el hospedero: son parásitas de raíz si infectan esa parte de la planta hospedera, y parásitas de tallo si infectan esta zona (Yoshida *et al.*, 2016). Algunos ejemplos de parásitas obligadas de tallo incluyen los muérdagos europeos (*Viscum* spp., hemiparásita de pinos, abetos, entre otros árboles) y *Cuscuta* spp. (holoparásita de cultivos como alfalfa, tomate y café). En parásitas obligadas de raíz se puede mencionar a *Orobancha* spp. (holoparásita de tomate, girasol, apio, leguminosas, entre otros) y *Striga* spp. (hemiparásita de sorgo, maíz, arroz, caña de azúcar, leguminosas) (Heide-Jørgensen, 2013). Anatómicamente las holoparásitas se distinguen fácilmente del hospedero ya que carecen de estructuras vegetales fundamentales como hojas o raíces, tal es el caso de *Rafflesia* spp., holoparásita de raíz de árboles de uvas que se compone únicamente de flores gigantes (Yoshida *et al.*, 2016). Para la adquisición de nutrientes en todas las plantas parásitas, estas desarrollan una estructura especializada llamada haustorio, que se conecta directamente al sistema vascular de la raíz o rama del hospedero, para ello se orquestan un sinnúmero de moléculas que ayudan a la degradación de la materia celulósica y posteriormente penetrándolo y conectándose al sistema vascular, específicamente con el xilema y floema (Press & Phoenix, 2005; Irving & Cameron, 2009).

### 4.2 Muérdagos

Los muérdagos exclusivamente, son un grupo diverso de plantas del orden Santales, son parásitas arbustivas y aéreas, desarrollan frutos característicos por estar recubiertos de una proteína muy pegajosa llamada viscina, que ayuda a la unión con el hospedero (Kuijt, 1969). Se estima que existen aproximadamente 1,600 especies de muérdago en el mundo (Nickrent *et al.*, 2010). Todos comparten una forma de crecimiento que es el hemiparasitismo (Watson, 2001). Muchos muérdagos están adaptados para ser polinizados por aves e insectos (Geils & Vázquez-Collazo, 2002). Los frutos son ampliamente aprovechados por los pájaros para su alimentación, siendo la principal fuente de dispersión y reproducción de estas plantas (Geils & Vázquez-Collazo, 2002).

Las principales familias de muérdagos son Loranthaceae y Viscaceae. La familia Loranthaceae es una de las más amplias, comprende ~77 géneros y ~950 especies Kuijt & Hansen



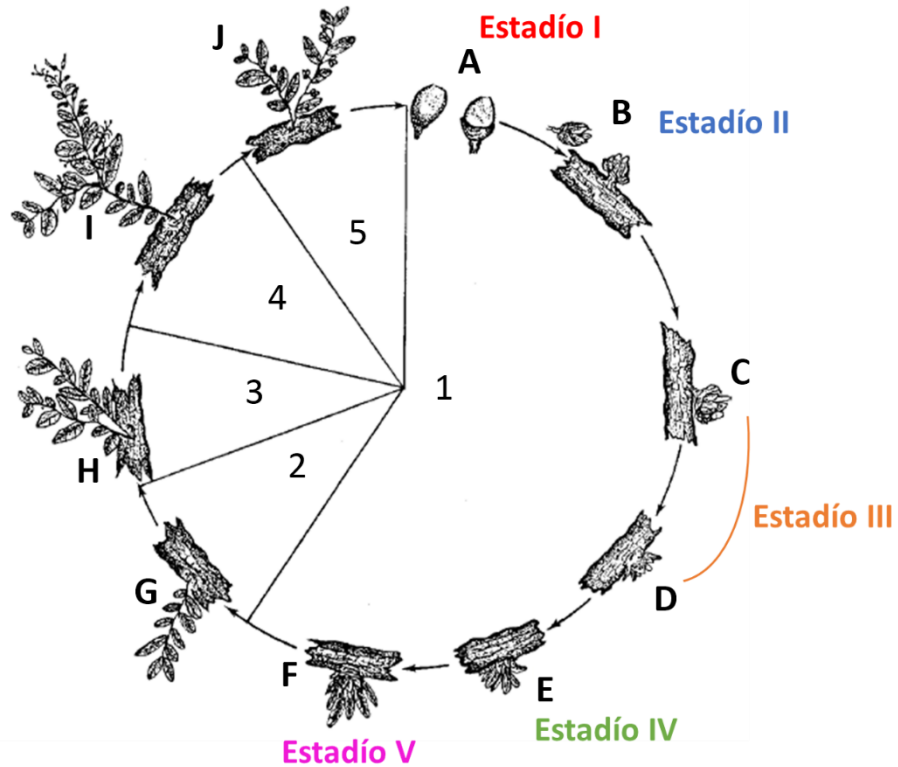
(2015). Una de las principales diferencias es que las flores de Loranthaceae son grandes, coloridas y tienen cáliz, mientras que de Viscaceae son pequeñas y conspicuas (Cházaro & Oliva, 1988).

### **4.3 Género *Psittacanthus calyculatus***

El género *Psittacanthus* pertenece a la familia Loranthaceae y consta de ~120 especies (Kuijt, 1969). Es un grupo de plantas arbustivas hemiparásitas que están distribuidas desde México hasta el norte de Argentina (Geils & Vázquez-Collazo, 2002). Habita en zonas templadas y tropicales del Nuevo Mundo (Castillo-Campos *et al.*, 2018). Su principal característica morfológica son sus grandes flores, y un haustorio voluminoso que sobresalta en las ramas infectadas de los hospederos, además de que produce frutos grandes sin endospermo (Cházaro & Oliva, 1988), ya que es una baya jugosa color negro oscuro elíptica de aproximadamente 1.5 cm de longitud (Vázquez-Collazo & Geils, 2002). La planta en sí se reproduce en grandes cantidades llegando a ser localmente muy abundante y notorio (Geils & Vázquez-Collazo, 2002). Esta especie se encuentra presente en 25 estados de México, pero es más común en el centro y sur del país, ya que son principalmente especies de zonas templadas y subhúmedas (Bello & Gutiérrez, 1985). Pueden parasitar a más de 50 géneros de coníferas y angiospermas (Vázquez-Collazo & Geils, 2002). Tienen una altura de 1 - 1.5 m, con hojas verde oscuro, flores de colores naranja o rojo brillante, capaces de secretar altos volúmenes de néctar floral y emisiones particulares de COVs, atractores de polinizadores, estos últimos rasgos son conocidos como síndromes de polinización (Quintana-Rodríguez *et al.*, 2018) que son utilizados como estrategias de polinización.

#### **4.3.1 Ciclo de vida**

El ciclo de vida de *P. calyculatus* está basado en los procesos fundamentales de polinización, dispersión, inoculación, germinación y desarrollo (Figura 2). Los frutos producidos por *P. calyculatus* son grandes (2 x 2.5 cm), y la semilla contenida en el interior está recubierta por viscina, la proteína pegajosa que les permite mantenerse adheridas a la rama del hospedero (Geils & Vázquez-Collazo, 2002). Una vez maduros, los frutos son consumidos por aves frugívoras y las semillas defecadas en las ramas del hospedero, sin embargo, si éstas no son consumidas, por efecto del viento y la gravedad infectan las ramas inferiores del hospedero (Figura 3). Cuando la semilla es depositada en la rama adecuada, 45 días después comienza la germinación (Azpeitia & Lara, 2006), la semilla abre sus cotiledones debido a la captación de luz como factor de germinación (Knutson, 1983; Mathiasen *et al.*, 2008), pero no necesariamente se establece la infección sino hasta que se inicia la penetración en el hospedero. Después de 5 meses se producen las primeras hojas verdaderas y durante el primer año se continúa con el crecimiento vegetativo y la producción de brotes adicionales, en donde la expansión total de sus ramas se genera a lo largo de 3 años, en una tasa de 30 cm por año (Geils & Vázquez-Collazo, 2002). La infección es perenne y la planta produce un haustorio grande con un gran número de ramas largas (Vázquez-Collazo & Geils, 2002). En su vida adulta, en el cuarto año produce flores y en noviembre del quinto año se da la polinización y la producción de frutos, que maduran en un año desde noviembre hasta febrero del quinto año. Con esto se comienza nuevamente el ciclo (Figura 3) (Pérez & Isabel, 2016). La semilla requiere altas cantidades de luz para la germinación, establecimiento y posterior maduración (Knutson, 1983). Por lo tanto, una generación requiere de cinco años para completar su ciclo (Geils & Vázquez-Collazo, 2002).



**Figura 2. Ciclo de vida de *P. calyculatus* a lo largo de un periodo de 5 años.** Año 1: (A) Maduración de frutos en octubre; (B) Infección en noviembre; (C) Aparición de cotiledones en noviembre; (D) Aparición de brotes de hojas en abril; (E) Aparición de hojas verdaderas; (F) Desarrollo de hojas. Año 2: (G) Crecimiento vegetativo continuo. Año 3: (H) Desarrollo de brotes adicionales. Año 4: (I) Floración en noviembre. Año 5: (J) Desarrollo y maduración de frutos en noviembre. Se indican las etiquetas de los cinco estadios fenológicos iniciales. Adaptado de Geils *et al.* (2002).

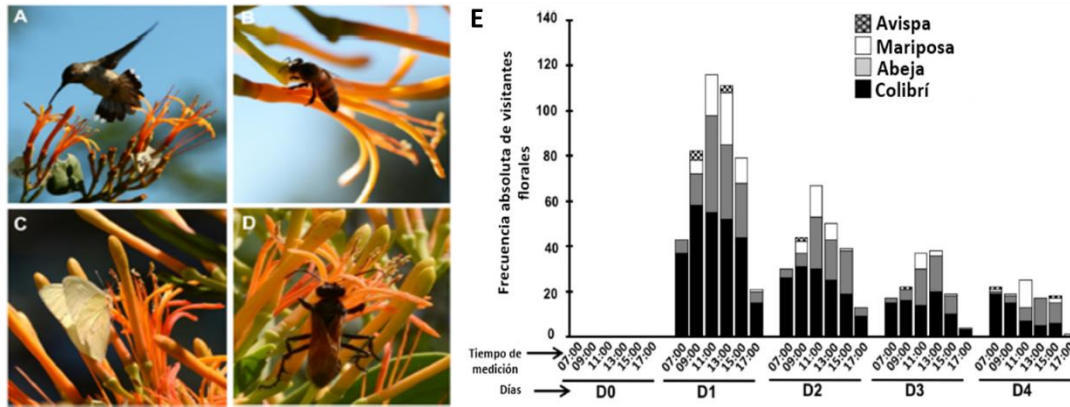


**Figura 3. Fracaso en germinación de semilla de *P. calyculatus*.** Proceso de dispersión por gravedad fallido. Fuente propia.

Las aves dispersadoras de los frutos de *P. calyculatus* son variadas y dependen de la zona geográfica. Salas (1988) reportó principalmente tres especies en Michoacán: *Oreothlypis superciliosa*, *Setophaga auduboni* y *Icterus bullockii*. En el bosque mesófilo de montaña en Veracruz, López-de Buen & Ornelas (1999, 2001) reportaron las especies *Bombycilla cedrorum*, *Ptilogonys cinereus* y *Myiozetetes similis* como principales dispersores del muérdago *P. schiedeanus*. En la zona de Guanajuato, Zamudio & Galván (2011) reportaron la presencia de *I. bullockii* y *B. cedrorum* en la biodiversidad de Guanajuato, sin embargo, no existen reportes específicos de los dispersores de *P. calyculatus* en la región, pero se puede inferir que la presencia de estas especies está relacionada con ese fin.

Los principales polinizadores, por su parte, son más frecuentes dependiendo del tiempo de floración y de la producción del néctar (Figura 4). Para ello, las flores de *P. calyculatus* utiliza tres estrategias de atracción de polinizadores. Primeramente, las flores tienen una vida fenológica de 5 días, en los primeros dos días las flores mantienen un color amarillo brillante en combinación con una secreción alta de néctar floral, el cual contiene nutrientes de alta calidad, además, en esos primeros estadios es capaz de liberar compuestos orgánicos volátiles atractores de polinizadores (Quintana-Rodríguez *et al.*, 2018). La producción y calidad del néctar afectan directamente la frecuencia de visitantes florales (Azpeitia & Lara, 2006), en donde una mayor producción y longevidad floral sugiere una mayor abundancia de polinizadores (Ramírez & Ornelas, 2010; Quintana-Rodríguez *et al.*, 2018). Quintana-Rodríguez *et al.* (2018) reportaron una mayor producción de néctar floral en los días 0 al 2, decreciendo significativamente en el día 3 y 4. Además, encontraron por primera vez que una invertasa de pared celular es la encargada de la hidrólisis de sacarosa para producir glucosa y fructosa relacionada con la secreción y calidad del néctar floral. Se

conoce que la calidad del néctar está basada con la concentración de sacarosa, glucosa y fructosa, para la atracción de los polinizadores (Heil, 2011).

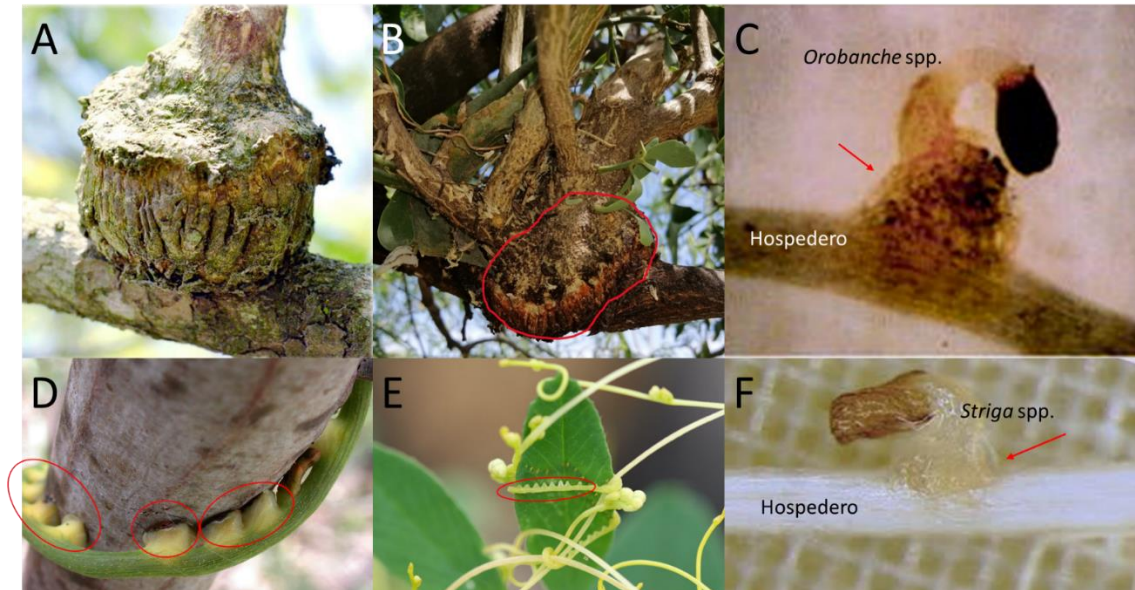


**Figura 4. Principales visitantes y polinizadores florales de *P. calyculatus*.** (A) Visita del colibrí *Cyananthus latirostris*, siendo detectado como el mayor visitante floral de acuerdo a la producción de néctar y hora del día (B) Abeja *Apis mellifera* en el día 2 (C) Mariposa *Ascia* spp. (D) Avispa *Pepsis* spp. (E) Frecuencia de visitantes florales de acuerdo al estadio fenológico de a flor. Adaptado de Quintana-Rodríguez *et al.* (2018).

El éxito de la compatibilidad con sus hospederos, las estrategias de reproducción y dispersión son los principales obstáculos que frenan un adecuado control de esta plaga.

#### 4.4 Haustorio: Sistema infectivo y de captación de nutrientes

La palabra “haustorio” proviene del latín “*haustor*”, que se refiere a la acción de beber, y “*orium*”: “dispositivo utilizado para...”, es decir, el dispositivo que es utilizado para la obtención de nutrientes. A diferencia con el haustorio de hongos, el haustorio de las plantas parásitas es una estructura intracelular que penetra entre las células del hospedero y es multicelular (Yoshida *et al.*, 2016). La forma del haustorio depende de la especie (Joel, 2013), y la mayoría presentan un haustorio bien definido (Figura 5), sin embargo, en otras se presenta como un grupo de células penetrantes cuya diferenciación termina una vez que llegan al xilema (Figura 6) (Riches & Parker, 1995). A continuación, se muestran las funciones principales del haustorio formado en las plantas parásitas (Yoshida *et al.*, 2016).



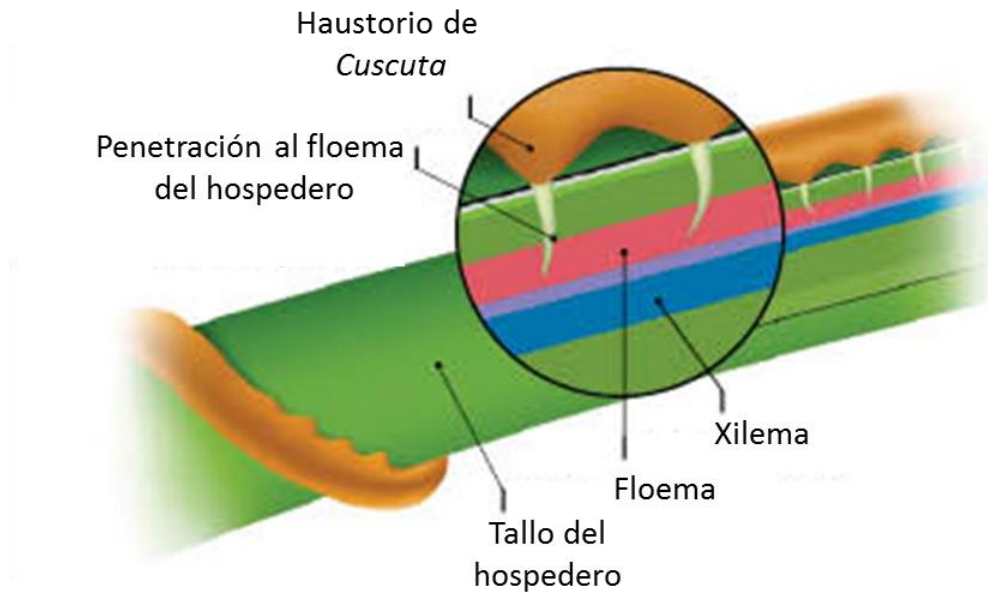
**Figura 5. Haustorio de diferentes plantas parásitas.** (A-B) *Psittacanthus calyculatus* (C) *Orobanche* spp., (D) *Cassytha* spp. (E) *Cuscuta* spp. (F) *Striga* spp. Fotos de Instituto de Ecología y fuente propia (A-B), Goldwasser *et al.*, 2002 (C), Mosquin, 2018 (D), Hettenhausen *et al.*, 2017 (E) y Yoshida *et al.*, 2016 (F).

- 1) **Unión al hospedero.** Esta función es facilitada por diferentes estructuras denominadas pelos haustoriales, cuya superficie está cubierta por materiales pegajosos como hemicelulosa y pectina, como se ha visto en *Triphysaria* spp. y *Cuscuta* spp. (Pérez-de-Luque, 2013). En los muérdagos, esta función también es llevada a cabo por una proteína viscosa llamada viscina que recubre la semilla y facilita su adhesión al hospedero (Gedalovich-Shedletzky *et al.*, 1989).
- 2) **Invasión del hospedero.** En el proceso de penetración del hospedero, las actividades enzimáticas han mostrado tener un papel preponderante, ya que se ha demostrado que la pared celular del hospedero es degradada a unidades básicas fundamentales que son efectores para orquestar diferentes procesos moleculares que perciben las plantas parásitas. La penetración se creía que únicamente ocurría por presión mecánica, sin embargo, podrían ser ambos procesos (Olivier *et al.*, 1991).
- 3) **Evasión del sistema inmune del hospedero.** En la actualidad, se conoce que el proceso de invasión en plantas parásitas, activa el sistema inmune de la planta hospedera. La manera de evitar esta respuesta, es mediante la imitación de la parásita con procesos fisiológicos normales en el desarrollo de la hospedera como son la expresión de genes para la degradación de pectina necesaria para el desarrollo del tubo polínico, o expansinas, necesarias para la penetración del estigma por el tubo polínico (Wing *et al.*, 1990; Cosgrove, 2000). Se ha hipotetizado la secreción de efectores por la parásita que suprime el sistema inmune (Li & Timko, 2009), y actualmente se tiene el conocimiento que en especies como *Cuscuta* spp. (Alakonya *et al.*, 2012; Shahid *et al.*, 2018; Johnson & Axtell, 2019) y *Orobanche* spp. (Tomilov *et al.*, 2008) existe una transferencia de moléculas de microRNAs hacia el

hospedero que tienen por objetivo la supresión de genes relacionados con mecanismos de defensa.

- 4) **Transferencia nutricional.** Establecida la conexión con los tejidos conductivos del hospedero (Figura 6), se proporciona la transferencia de agua y nutrientes. Este movimiento se genera desde el hospedero a través de la conexión con el xilema mediante el siguiente mecanismo: la planta parásita mantiene un potencial hídrico más bajo que la hospedera de manera que la dirección del flujo sea hacia ella, acumulando selectivamente cationes como  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$  y  $Na^{2+}$  (Smith & Stewart, 1990). En *Cuscuta* spp. se conoce que la acumulación de grandes cantidades de  $Na^{2+}$  y  $K^{2+}$  sirven como osmolitos para atraer agua y sales minerales desde el hospedero (Kelly & Horning, 1999; Raya-Pérez *et al.*, 2014). En una manera similar, *Rhinanthus* spp. mantienen sus estomas abiertos de forma que se genere una mayor tasa respiratoria y se facilite el flujo de nutrientes hacia la parásita (Jiang *et al.*, 2003).

El haustorio es un medio de intercambio genético entre ambas plantas (Mower *et al.*, 2004), como transferencia genética horizontal, intercambios de mRNAs, proteínas, metabolitos e incluso patógenos como virus y fitoplasmas, todo con el fin de suprimir el sistema inmune de la hospedera y lograr una infección exitosa (Yoshida *et al.*, 2016).



**Figura 6. Representación gráfica de la penetración de una parásita (*Cuscuta* spp.) al hospedero en el sistema vascular.** Adaptado de Kaiser *et al.* (2015).

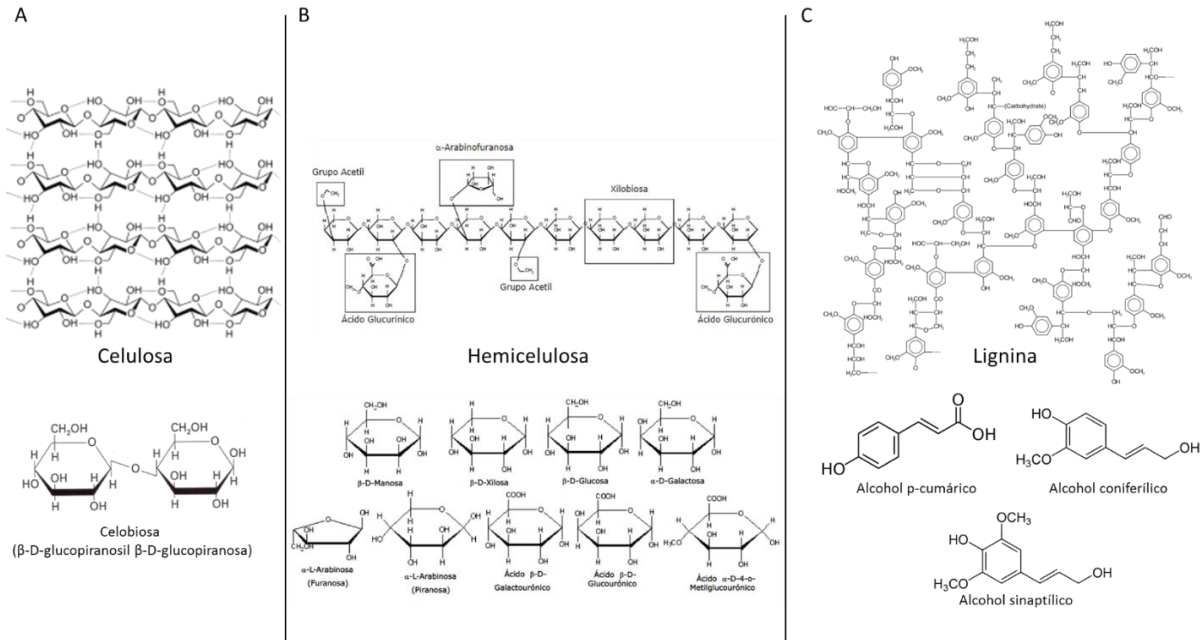
#### 4.5 Composición química de la madera de mezquite

La biomasa vegetal está compuesta principalmente de celulosa, hemicelulosa y lignina (Figura 7). La mezcla total es de aproximadamente 50% de carbono, 44% oxígeno, 6% hidrógeno (Pettersen, 1984). Los porcentajes de cada polímero varían dependiendo de la especie, estadio de crecimiento y otras condiciones (Pérez *et al.*, 2002).

La celulosa es el mayor componente de la biomasa vegetal (40-60%) (Yang *et al.*, 2007). Es un polímero lineal compuesto de moléculas de glucosa unidas por enlaces  $\beta$ -1,4 formando moléculas de celobiosa (Pérez *et al.*, 2002). Las cadenas de celulosa forman enlaces de hidrógeno intra- e intermoleculares, dando como resultado microfibrillas rígidas e insolubles (Béguin & Aubert, 1994). La hemicelulosa junto con la lignina cubren las microfibrillas, formando la fibra de celulosa. Adicionalmente, la celulosa puede estar en forma cristalina o en una forma de cadenas desorganizadas llamada celulosa amorfa (Pérez *et al.*, 2002).

La hemicelulosa es un grupo de polisacáridos de menor peso molecular que la celulosa y que compone el 20-40% de la biomasa lignocelulítica (Yang *et al.*, 2007). Es una estructura compleja de carbohidratos compuestos de diferentes polímeros de D-xilosa y L-arabinosa (pentosas), D-manosa, D-glucosa y D-galactosa (hexosas) y ácidos de azúcar D-glucorónicos, 4-O-metilglucurónicos y D-galacturónicos (Pérez *et al.*, 2002; Ortiz, 2011). Al contrario de la celulosa, la hemicelulosa no es químicamente homogénea. La madera dura está compuesta principalmente de xilanos, y la madera blanda de glucomananos. Los xilanos son heteropolisacáridos de unidades de D-xilosa ( $\beta$ -D-Xilopiranosas) unidas con enlaces  $\beta$ -1,4 (Saha, 2003). La principal diferencia entre la celulosa y la hemicelulosa es que la hemicelulosa tiene ramificaciones con cadenas laterales cortas de diferentes azúcares, son polímeros que son fáciles de hidrolizar y no forman agregados (Pérez *et al.*, 2002).

La lignina compone el 10-25% de la biomasa lignocelulítica (Yang *et al.*, 2007). Es un polímero aromático conformado de unidades fenil-propano (Singh *et al.*, 2018). Este polímero es crucial para la integridad estructural de la pared celular, para su permeabilidad y correcto transporte de agua y solutos a través del sistema vascular, y funciona como barrera en contra de patógenos y estrés oxidativo (Boerjan *et al.*, 2003). Químicamente es un polímero amorfo insoluble en agua, compuesto de unidades de fenilpropano unidas con diferentes tipos de enlaces. Su síntesis se da por la generación de radicales libres generados por la deshidrogenación mediada por peroxidasa de los alcoholes fenilpropiónicos alcohol coniferílico (guaiacil propanol), alcohol p-cumárico (p-hidroxifenilpropanol) y alcohol sinapílico (siringilpropanol), unidades básicas de la lignina que forman polímeros de lignina (Pérez *et al.*, 2002). El alcohol coniferílico es el mayor componente de la lignina de madera blanda, mientras que los alcoholes cumáricos y sinapílicos se encuentran en mayor proporción en la lignina de madera dura (Pérez *et al.*, 2002).



**Figura 7. Componentes principales de la pared celular de las plantas.** (A) Celulosa, enlaces de hidrógeno entre cadenas contiguas de celobiosas (unión de dos glucosas). (B) Hemicelulosa, unión de los monómeros  $\beta$  (1,4)-Xilosa-  $\beta$  (1,4)-Manosa-  $\beta$  (1,4)-Glucosa-  $\alpha$  (1,3)-Galactosa (C) Lignina, unión de alcoholes coniferílico, p-cumárico y sinapílico mediante seis enlaces diferentes. Adaptado de Huang *et al.* (2015) y Kai *et al.* (2016)

Carrillo *et al.* (2008) reportaron la composición lignocelulítica del mezquite, la cual se compone de los siguientes monómeros tanto en la parte exterior como interior del duramen (Tabla 1):

**Tabla 1. Contenido de monómeros y lignina en el duramen de *P. laevigata*.** Porcentajes en peso seco.

Sección	Xilosa (%)	Arabinosa (%)	Ácido 4-O-metilglucurónico (%)	Ramnosa (%)	Galactosa (%)	Manosa (%)	Glucosa (%)	$\Sigma$ Carbohidratos (%)	Lignina klon (%)
Duramen exterior	12	0.9	0.9	0.3	1.7	0.2	45.7	61.7	31.4
Duramen interior	12.4	0.6	0.9	0.3	1.5	0.2	48.6	64.5	29.8

El duramen exterior del mezquite está principalmente compuesto por monómeros de glucosa, seguido de lignina y monómeros de xilosa; en el duramen interior pasa algo similar. Es importante conocer específicamente la composición lignocelulítica del mezquite ya que la corteza del árbol es la primera barrera de defensa del mezquite en contra de la infección por muérdago. Sin embargo, las plantas parásitas para su asentamiento en un huésped son capaces de degradar los componentes lignocelulósicos mediante la síntesis de enzimas del tipo celulasas, xilanasas, peroxidasas, poligalacturonasas y pectin esterases como ha sido reportado en *Cuscuta reflexa* (Nagar *et al.*, 1984; Albert *et al.*, 2004, Olsen & Krause, 2017), *Cuscuta jalapensis* (López-Curto *et al.*,



2006), *Orobanche aegyptiaca* (Singh & Singh, 1993) y *Striga hermonthica* (Wada *et al.*, 2019). Sin embargo, en *P. calyculatus* infectando mezquites, no existe hasta la fecha un reporte que indique secrete este tipo de enzimas.

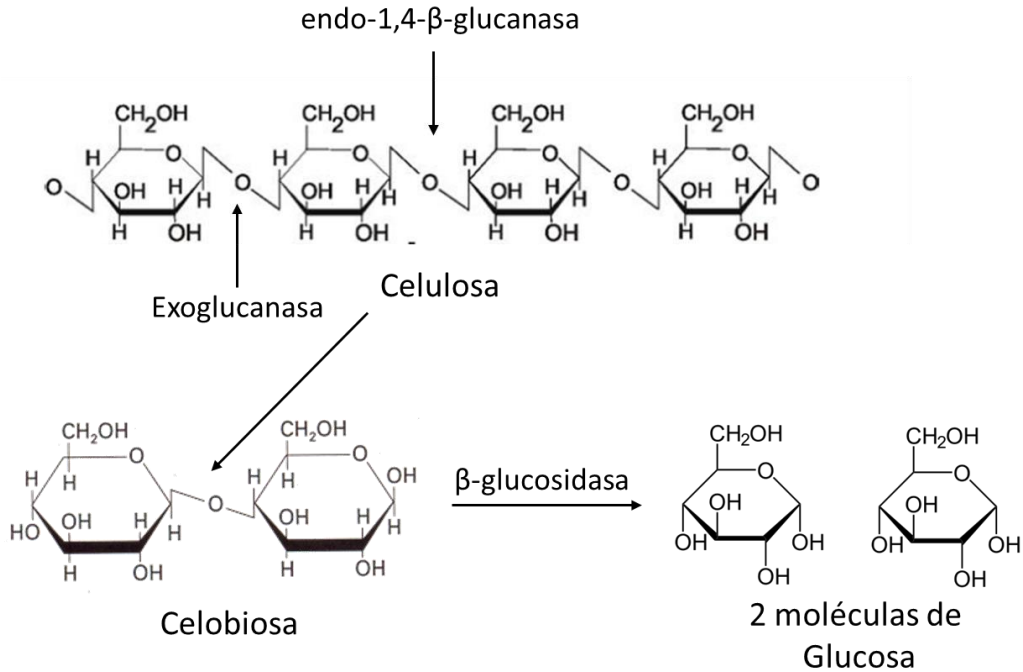
#### 4.5.1 Enzimas degradativas de material lignocelulósico secretadas por plantas parásitas

Los organismos capaces de degradar el material lignocelulósico deben producir un arsenal de enzimas con diferentes actividades enzimáticas, que al combinarse puedan degradar todos los componentes lignocelulósicos de la pared celular de una planta (Pérez *et al.*, 2002). Existen reportes de enzimas principalmente de microorganismos fitopatógenos como son bacterias y hongos que las utilizan para la degradación de la celulosa con el fin de invadir y desarrollarse dentro del huésped (Flint *et al.*, 2008; Gruninger *et al.*, 2018; Kamimura *et al.*, 2019).

Con respecto al asentamiento de plantas parásitas, se creía que la penetración de la radícula infectiva era ocasionada sólo por presión mecánica (Mathiasen *et al.*, 2008), y poca atención se le daba al posible papel de las enzimas que degradan la pared celular como responsables del mecanismo principal de infección (Kuijt, 1969). Nagar *et al.* (1984) proporcionaron el primer reporte en *Cuscuta reflexa* de enzimas que degradan la celulosa, hemicelulosa y la pectina en 12 hospederos compatibles y uno incompatible. Albert *et al.* (2004) reportaron en *C. reflexa* la expresión de la enzima xiloglucano endotransglucosilasa/hidrolasa durante la infección en tomate. De forma similar, Olsen & Krause (2017) reportaron la actividad de esa misma enzima en *C. reflexa* durante la invasión en *Pelargonium zonale*. Singh & Singh (1993) encontraron actividad de celulasa, poligalacturonasa y xilanasas en *Orobanche aegyptiaca* en la infección con *Brassica campestris*. López-Curto *et al.* (2006) detectaron actividad de la enzima peroxidasa en *Cuscuta jalapensis* infectando *Coffea arabica*. Wada *et al.* (2019) recientemente reportaron que la producción de las especies reactivas de oxígeno (ROS) son indispensables para la formación del haustorio en *Striga hermonthica*. Con respecto al proceso infectivo en *P. calyculatus*, no existe algún reporte sobre la secreción de enzimas degradativas de la corteza de su hospedero, sin embargo, podría ocurrir de una manera similar con la síntesis y secreción de este tipo de enzimas.

##### 4.7.1.1 Celulasas

Las principales enzimas que degradan la celulosa se dividen en Endoglucanasas y Exoglucanasas (Celobiohidrolasas) y  $\beta$ -glucosidasas (Pérez *et al.*, 2002). Las Endoglucanasas (endo-1,4- $\beta$ -glucanasas, tamaño molecular 30-100 kDa) se unen al polímero de celulosa aleatoriamente en los enlaces glucosídicos intermonómeros y actúan óptimamente en un ambiente de pH 5.0-5.5 y en temperatura de 55-80°C, las Exoglucanasas (tamaño molecular 40-70 kDa) quitan monómeros y dímeros de los extremos de la cadena de glucosas y su temperatura óptima es de 50-75°C, y las  $\beta$ -glucosidasas (tamaño molecular 45-250 kDa) hidrolizan los dímeros de glucosa bajo un pH óptimo ácido de 4.1-8.1 y una temperatura de 35-71°C (Mackulak *et al.*, 2010) (Figura 8). Los productos de la hidrólisis de la celulosa se vuelven disponibles para microorganismos u otros organismos celulolíticos como fuente de carbono y energía (Doi & Kosugi, 2004). Una característica importante en la mayoría de las celulasas es la presencia de un dominio de unión a polisacáridos conectado por una región en forma de bucle y que permite la unión a su sustrato insoluble (Kubicek *et al.*, 2014).

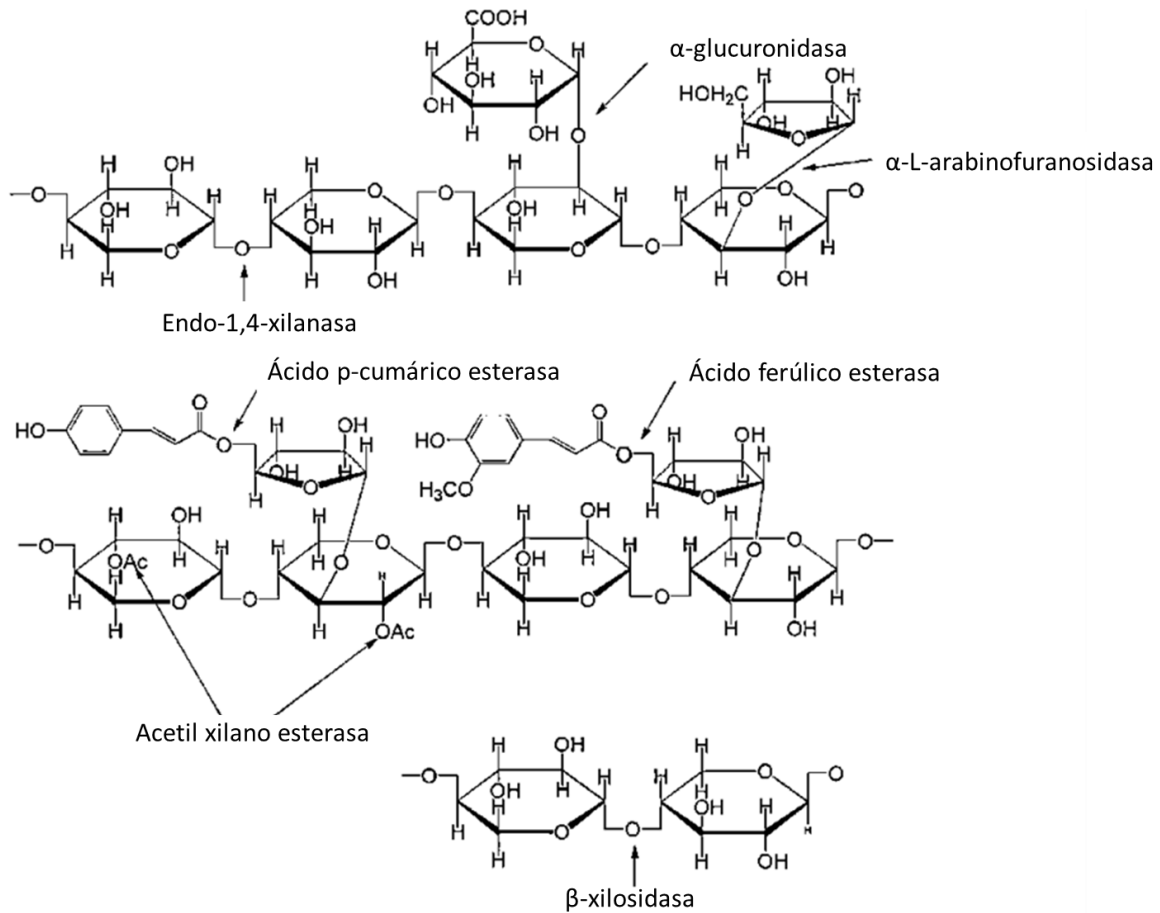


**Figura 8. Sitios de acción y productos de endoglucanasas, exoglucanasas y  $\beta$ -glucosidasas en la estructura molecular de la celulosa.** Modificado de Mackulak *et al.* (2010).

#### 4.7.1.2 Xilanasas

Dado que los sustituyentes de cadena lateral son los mismos azúcares en la hemicelulosa que en la celulosa y el mismo enlace, se pueden considerar las mismas enzimas para la degradación de la hemicelulosa (Figura 9) (Kubicek *et al.*, 2014). La biodegradación de la hemicelulosa da como resultado azúcares monoméricas y ácido acético (Pérez *et al.*, 2002).

La endo- $\beta$ -1,4-glucanasa con actividad de xiloglucanasa puede degradar la cadena de xiloglucano, afectando su composición en las microfibrillas que entrecruzan la celulosa. La endo-1,4- $\beta$ -xilanasas se une a los enlaces glicosídicos en la cadena de xilanos. Las enzimas que degradan mananos incluyen  $\beta$ -mananasa y  $\beta$ -manosidasa (Kubicek *et al.*, 2014). Para una completa degradación del xilano, el carbohidrato con mayor presencia en la hemicelulosa, se requiere de la cooperación de diferentes enzimas. La endo-1,4- $\beta$ -xilanasas genera oligosacáridos a partir de la unión al xilano, y la xilano 1,4- $\beta$ -xilosidasa genera xilosa a partir de los oligosacáridos. También se requiere de xilano esterasas, ferúlico y p-cumárico esterasas,  $\alpha$ -l-arabinofuranosidasas y  $\alpha$ -4-O-metilglucuronosidasas para la completa hidrólisis de xilanos y mananos (Pérez *et al.*, 2002).



**Figura 9. Sitios de acción y productos de enzimas involucradas en la degradación de la hemicelulosa.** La enzima endo-1,4-xilanasa rompe los enlaces internos  $\beta$ -1,4-xilosídicos en el polisacárido de xilano. Los productos son una mezcla de oligómeros de  $\beta$ -D-xilopiranosilo de varias longitudes, que después sirven como sustrato para las  $\beta$ -xilosidasas que las hidrolizan a xilosa. La  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa rompe los enlaces  $\alpha$ -glicosídicos entre las moléculas de arabinosa y xilosa en el xilano. La  $\alpha$ -glucuronidasa rompe los enlaces  $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 2) que unen las unidades (metil)GlcU en el xilano. La Acetil xilano esterasa quita los grupos O-acetil de los residuos  $\beta$ -D-xilopiranosil en las posiciones 2- y 3-. La ácido ferúlico esterasa rompe los enlaces éster entre las cadenas de arabinosa y ácido ferúlico. La Ácido p-cumárico esterasa rompe los enlaces éster entre la arabinosa y el ácido p-cumárico. Modificado de Wang *et al.* (2012).

#### 4.7.1.3 Lacasas y peroxidasas

La degradación enzimática de la lignina involucra principalmente las enzimas (i) lacasa, (ii) peroxidasa de lignina (Lip), (iii) peroxidasa dependiente de manganeso (MnP), (iv) peroxidasa versátil y (v) peroxidasa decolorante (DyP) (Figura 10) (Martínez *et al.*, 2018). Lip y MnP requieren peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) como oxidante. La MnP oxida Manganese II en Manganese III que después oxida los anillos de fenol en radicales fenoxi que da como resultado la descomposición de la lignina. La lacasa es una fenoloxidante con cobre que utiliza el oxígeno molecular. Actúa sobre moléculas fenólicas y no fenólicas, el núcleo fenólico es oxidado por la eliminación de un electrón, generando productos con radicales fenoxi libres, que sirven para la unión al polímero. La peroxidasa versátil tiene actividades manganeso peroxidasa y peroxidasa de lignina, utilizando los mismos mecanismos de degradación. Esta enzima puede oxidar hidroquinona en la ausencia de  $H_2O_2$  exógeno cuando hay Mn(II) presente en la reacción. Finalmente, la DyP es una peroxidasa con grupo hemo que provoca la degradación de la lignina mediante procesos de oxidación por liberación de radicales (Gómez-Toribio *et al.*, 2011; Pérez *et al.*, 2002; Singh *et al.*, 2018).

La degradación de la lignina da como origen a los factores de inducción del haustorio (HIFs), en donde se da la formación de 2,6-dimetoxi-1,4-benzoquinona (DMQB) a partir de compuestos fenólicos provenientes de la vía de degradación de la lignina como el ácido siríngico (Wada *et al.*, 2019).



#### 4.6 Proteómica molecular como herramienta de estudio en el establecimiento de la infección

El número de estudios bioquímicos moleculares (referente a enzimas y proteínas) en plantas parásitas es limitado, y se han enfocado esencialmente en el estudio de señales inductoras de la germinación y la formación del haustorio (Nagar *et al.*, 1984; Singh & Singh, 1993; Losner-Goshen *et al.*, 1998; Yoder, 1999; Watson, 2001; Matusova *et al.*, 2005; Benvenuti, 2005; Glatzel & Geils, 2008; Johnsen, 2014; Yoshida *et al.*, 2016; Těšitel, 2016; Griebel *et al.*, 2017; Clarke *et al.*, 2019), esto relacionado a aquellas parásitas que afectan cultivos agronómicos, dejando a un lado las parásitas que afectan árboles de interés ecológico como *P. calyculatus*.

El uso de las ciencias –“ómicas” han sido de gran ayuda para identificar factores de transcripción implicados en procesos de preinfección, como en el caso de *Orobanche ramosa* (González-Verdejo *et al.*, 2008), otros estudios se enfocaron en caracterizar genes sobreexpresados y relacionados a la defensa contra patógenos en cultivos de arroz resistentes a *Striga hermonthica* y una supresión de genes relacionados con la regulación del crecimiento, metabolismo y biogénesis de componentes celulares en cultivos susceptibles (Swarbrick *et al.*, 2008). En *Cuscuta pentagona* se determinaron genes relacionados con el parasitismo (Ranjan *et al.*, 2014), así como el establecimiento en la diferenciación alélica entre poblaciones de *Striga hermonthica* parasitando maíz y sorgo, encontrando transcritos relacionados con el parasitismo específicos de cada hospedero (Lopez *et al.*, 2019). De una manera similar, se ha descubierto la transferencia horizontal génica entre el hospedero hacia la parásita (*Rafflesia cantleyi* parasitando *Tetrastigma rafflesiae*), sugiriendo que el mantenimiento de estos genes es benéfico para las condiciones óptimas de la parásita (Xi *et al.*, 2012). Por otro lado, Aly *et al.* (2009) detectaron el silenciamiento de un gen relacionado con la biosíntesis de manitol en tomate por *Orobanche aegyptiaca*, mediante la producción de RNA de doble cadena (dsRNA). Shahid *et al.* (2018) reportaron la presencia de microRNAs en *Cuscuta campestris* como mecanismo de bloqueo del sistema inmune de su hospedero *Arabidopsis thaliana*.

La proteómica se encarga del estudio y caracterización de todas las proteínas presentes en un organismo en un estado específico de desarrollo determinado y en diferentes condiciones bióticas y abióticas (Jorrín *et al.*, 2006).

En la actualidad los reportes que han usado proteómica en la interacción planta parásita-hospedero son limitados. El primero fue en 1995, donde Stranger *et al.* (1995) reportaron los patrones de la síntesis de proteínas en el desarrollo del haustorio de *Striga hermonthica*. Castillejo *et al.* (2004) identificaron proteínas que decrecieron su intensidad relacionadas con el metabolismo del nitrógeno y carbono en el hospedero *Pisum sativum* infectado con *Orobanche crenata*, mientras que las proteínas relacionadas con la defensa en patógenos aumentaron. Similarmente, Castillejo *et al.* (2009) estudiaron la resistencia y respuesta de *Medicago truncatula* con *Orobanche crenata*, en donde las proteínas que mostraron diferencias significativas pertenecieron a la categoría funcional de defensa y estrés, e inhibidores de proteasas presentes en una rápida respuesta a la infección. Li *et al.* (2010) analizaron los efectos de la luz blanca y azul en la respuesta de *Cuscuta australis* para el reconocimiento del hospedero y preformación del haustorio, concluyendo que en el reconocimiento inducido por respuesta a la luz azul están involucradas proteínas responsables de la transducción de señales de luz, degradación de la pared celular y metabolismo y finalmente,

Castillejo *et al.* (2011) analizaron la respuesta inicial de dos genotipos de *Pisum sativum* con diferentes niveles de resistencia a *Orobanche crenata*, encontrando proteínas relacionadas con estrés y metabolismo en su gran mayoría, así como proteínas con actividad de proteasa que previenen la penetración y la conexión al sistema vascular.

Las informaciones proporcionadas por estas herramientas bioquímicas moleculares son de gran valor y necesitan ser explotadas para estudios de las interacciones planta parásita-hospedero, principalmente en especies que infectan otro tipo de plantas que no sean cultivos.

#### 4.7 Fitohormonas relacionadas con el proceso de infección

Las fitohormonas son moléculas químicamente variables y reguladoras del crecimiento de las plantas interviniendo en diferentes procesos fisiológicos y del desarrollo durante toda su vida (Diopan *et al.*, 2009). Entre las fitohormonas más importantes destacan auxinas, citocininas, giberelinas, etileno, brasinoesteroides, ácido abscísico, ácido jasmónico y ácido salicílico, todas estas fitohormonas son sintetizadas a muy bajas concentraciones y sus funciones son muy variadas (Bajguz & Piotrowska, 2009; Peres *et al.*, 2019). En la tabla 2 se mencionan las funciones de las fitohormonas más importantes en diferentes procesos fisiológicos.

**Tabla 2. Funciones importantes de las principales fitohormonas a lo largo de la vida de la planta.**

Tipo de fitohormona	Formas activas	Función	Referencias
Auxinas	Ácido Indol-3-acético (IAA), ácido 4-cloroindol-3-acético (4-Cl-IAA), ácido fenilacético (PAA), indol-3-acetonitrilo y ácido indol-3-pirúvico	Respuestas trópicas a luz y gravedad, arquitectura radicular y de partes aéreas, elongación celular, patrones de desarrollo de los órganos y desarrollo vascular	Woodward & Bartel (2005)
Citocininas	Isopenteniladenina (iP), zeatina (Z), dihidrozeatina (DZ)	Crecimiento de la raíz y partes aéreas, ramificaciones, control de la dominancia apical en la parte aérea, división celular, desarrollo del cloroplasto y senescencia de las hojas	Werner <i>et al.</i> (2001)
Giberelinas	Ácido giberélico 1, 3, 4 y 7 (GA <sub>1</sub> , GA <sub>3</sub> , GA <sub>4</sub> , y GA <sub>7</sub> )	Germinación, elongación del tallo, expansión de las hojas, desarrollo de las flores y frutos	Yamaguchi (2008)
Etileno	Etileno (Et)	Germinación, desarrollo de pelos radiculares, nodulación, senescencia floral, abscisión y maduración del fruto, producción regulada por ataques bióticos y estrés abiótico	Wang <i>et al.</i> (2002)

**Tabla 2. Continuación.**

Tipo de fitohormona	Formas activas	Función	Referencias
Brasinosteroides	24-epibrassinolida (EBL)	Elongación del tallo, crecimiento del tubo polínico, diferenciación del xilema, resistencia a estrés abiótico, epinastia de las hojas e inhibición radicular	Krishna (2003)
Ácido abscísico	Ácido abscísico (ABA)	Adaptación a estrés abiótico, desarrollo de la semilla, germinación, cierre de los estomas y modificación en la expresión génica	Leung & Giraudat, (1998).
Jasmonato	Ácido jasmónico (JA)	Maduración del fruto, producción de polen viable, crecimiento de la raíz, enrollamiento del zarcillo, respuesta a heridas por ataques bióticos y defensa contra insectos y patógenos	Turner <i>et al.</i> (2002)
Salicilato	Ácido salicílico (SA)	Germinación, establecimiento de la plántula, crecimiento celular, respiración, cierre estomatal, expresión génica relacionada a la senescencia, respuesta a estrés abiótico, nodulación y rendimiento de frutos	Vlot <i>et al.</i> (2009)

Si bien todas las fitohormonas juegan un papel importante durante todo el desarrollo de la planta, las auxinas y citocininas son claves para los procesos fisiológicos iniciales, algo que nos concierne debido al establecimiento del muérdago en sus estadios iniciales de infección. Estas fitohormonas interactúan para regular procesos de desarrollo en raíz, tallo, la dominancia apical (Nordström *et al.*, 2004), la formación y el mantenimiento de los meristemas necesarios para el desarrollo de la planta (Su *et al.*, 2011).

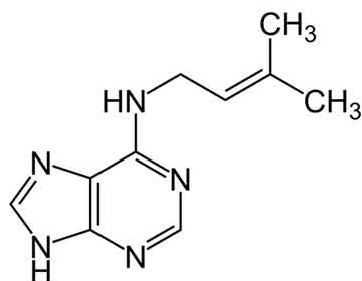
#### 4.7.1 Citocininas

Las citocininas son moléculas derivadas de la adenina sustituidas con derivados de isopreno (citocininas isoprenoides) o una cadena aromática (citocininas aromáticas) (Kieber & Schaller, 2014). Estas fitohormonas juegan un papel importante en la proliferación y diferenciación celular, retardación de la senescencia, distribución nutricional, fotosíntesis y formación del cloroplasto, productividad y desarrollo vascular (Mok, 1994; Sakakibara, 2006; Spallek *et al.*, 2017). Las formas más comunes de las citocininas isoprenoides son N<sup>6</sup>-( $\Delta^2$ -isopentenil)-adenina (iP), trans-zeatina (tZ), cis-zeatina (cZ) y dihidrozeatina (DZ). Los derivados más comunes son tZ e iP, al igual que sus

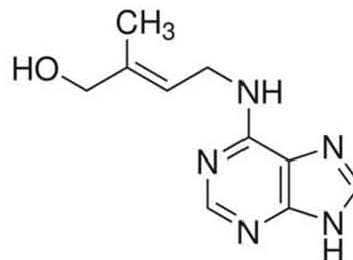


conjugados con azúcares, sin embargo, hay una gran variabilidad dependiendo de la especie, tejido y estado de desarrollo. Las citocininas aromáticas más comunes son orto-topolin (oT), meta-topolin (mT) y benciladenina (BA) (Sakakibara, 2006) (Figura 11).

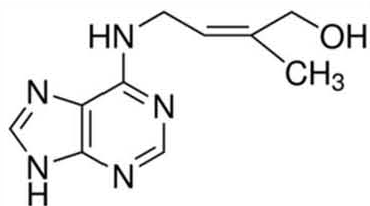
#### Citocininas isoprenoides



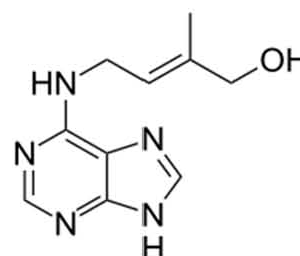
N<sup>6</sup>-( $\Delta^2$ -isopentenil)-adenina  
(iP)



trans-Zeatina  
(tZ)

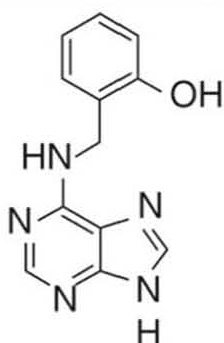


cis-Zeatina  
(cZ)

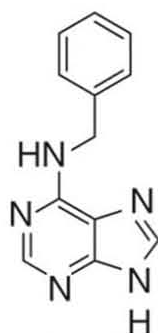


Dihidrozeatina  
(DZ)

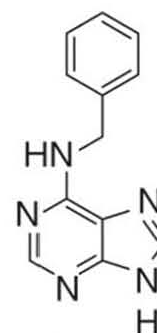
#### Citocininas aromáticas



orto-topolin  
(oT)



meta-topolin  
(mT)



Benciladenina  
(BA)

**Figura 11. Formas más comunes y activas de las citocininas.** Se muestran los nombres comunes y las abreviaciones entre paréntesis. Modificado de Sakakibara, (2006).

El catabolismo de las citocininas está ampliamente regulado por siete Citoquinina Oxidasa/Deshidrogenasa (CKXs, CYTOKININ OXIDASE/DEHYDROGENASEs), que catalizan irreversiblemente la degradación de citocininas, dando como resultado bases libres de citocininas biológicamente activas. Su expresión depende el estado de crecimiento y tejido, siendo más activas en el tejido que se encuentre creciendo (Perilli *et al.*, 2010).

La glucosilación de citocininas es un proceso para liberar formas activas de citocininas a partir de compuestos de almacenamiento. Se da en las posiciones N<sup>3</sup>, N<sup>7</sup> y N<sup>9</sup> de la purina (N-Glucósidos) y en el grupo hidroxilo de las cadenas laterales de tZ, DZ y cZ (O-Glucósidos y O-Xilósidos). La O-glucosidación es reversible, donde la  $\beta$ -glucosidasa cataliza la desglucosilación, mientras que la N-glucosidación es irreversible puesto que la  $\beta$ -glucosidasa no se une correctamente en los N-glucoconjugados (Sakakibara, 2006).

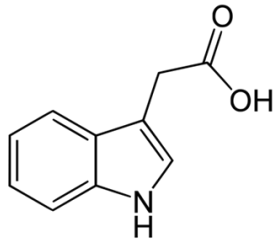
#### 4.7.2 Auxinas

Las auxinas son importantes para el crecimiento y desarrollo de la planta pues están involucradas en la regulación de procesos a nivel de toda la planta como tropismo, dominancia apical, iniciación de la raíz, y respuestas a nivel celular como elongación, división y diferenciación celular (Bajguz & Piotrowska, 2009).

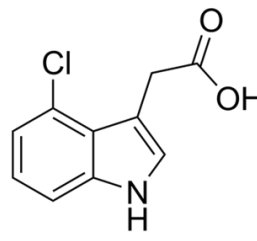
La mayoría de las estructuras moleculares de las auxinas contienen un sistema aromático con un anillo de indol, fenilo o naftaleno con un grupo carboxilo unido (López, 2016). La clasificación de las auxinas son auxinas naturales comunes y sintéticas (Figura 12). Las auxinas naturales incluyen la forma más abundante, Ácido indol-3-acético (IAA), ácido 4-cloroindol-3-acético (4-Cl- IAA) y el ácido fenilacético (PAA), mientras que en las auxinas sintéticas se puede incluir el Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido 1-naftalenacético (NAA), ácido 3,6-dicloro-2-metoxibenzoico (dicamba) y ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico (picloram), que inducen una respuesta de auxinas (Korasick *et al.*, 2013).

Lo reportado sobre IAA que más prevalece es que se sintetiza tejidos jóvenes y metabólicamente activos y se transporta en una vía de célula a célula con diferente polaridad (Baker, 2000).

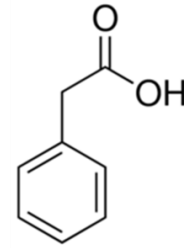
### Auxinas naturales



Ácido indol-3-acético  
(IAA)

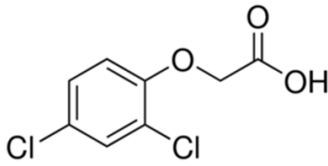


Ácido 4-cloroindol-3-acético  
(4-Cl-IAA)

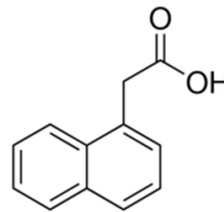


Ácido fenilacético  
(PAA)

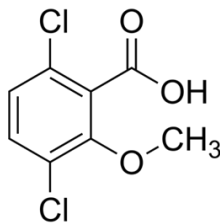
### Auxinas sintéticas



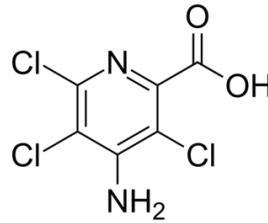
Ácido 2,4-diclorofenoxiacético  
(2,4-D)



Ácido 1-naftalenacético  
(NAA)



Ácido 3,6-dicloro-2-metoxibenzoico  
(dicamba)



Ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico  
(picloram)

**Figura 12. Formas comunes de auxinas naturales y sintéticas.** Se muestran los nombres comunes y las abreviaciones entre paréntesis. Modificado de Korasick *et al.* (2013).

### 4.7.3 Funciones de fitohormonas en plantas parásitas

Las plantas parásitas modifican tanto la morfología como la fisiología del hospedero, y la síntesis de fitohormonas no es la excepción (Pennings & Callaway, 2002). La parásita estimula la producción de fitohormonas de crecimiento en el hospedero o suministra directamente las mismas en el hospedero (Knutson, 1979), dependiendo de estos reguladores del crecimiento para el desarrollo del haustorio (Clarke *et al.*, 2019).

Actualmente, lo que se conoce de estas fitohormonas es que tienen una alta actividad en la interacción planta parásita-hospedero en procesos fisiológicos y del desarrollo de la parásita (Johnsen, 2014) y del haustorio (Clarke *et al.*, 2019). Se ha reportado que en la parásita de raíz *Phtheirospermum japonicum* los niveles de citocininas bioactivas aumentan y hay una movilidad

hacia su hospedero *Arabidopsis*, provocando cambios en respuestas celulares, división y diferenciación celular, modificando la morfología de la raíz e impactando con la estabilidad del hospedero (Spallek *et al.*, 2017).

Löffler *et al.* (1999) reportaron que IAA es importante en la formación de un epitelio adhesivo-secretorio en *Cuscuta reflexa* al tener contacto con tomate (*Lycopersicon esculentum*), y que también hay modificaciones en el tejido del hospedero, ambos correlacionándose con un incremento en los niveles de IAA en ambos tejidos, llegando a la conclusión de que durante el establecimiento del parasitismo hay acumulación de IAA en regiones del haustorio en *C. reflexa* y que son exudados desde las células epiteliales para ser transmitidos al hospedero. Tomilov *et al.* (2005) observaron que existe una acumulación de auxinas y etileno en eventos tempranos de la formación del haustorio en plántulas de *Triphysaria versicolor*. Zhang *et al.* (2016) encontraron que en *Thesium chinense* hubo una sobreexpresión de genes relacionados con auxinas en el haustorio, indicando un papel de las auxinas en el desarrollo del haustorio. Delavault *et al.* (2017) sugirieron que la biosíntesis y vía de regulación de las auxinas es requerida en la formación temprana del haustorio de *Phtheirospermum japonicum*, así como para el transporte y utilización de nutrientes. También reportaron que existe liberación de IAA en semillas de *Phelipanche ramosa* y *Orobancha cumana* al tener contacto con los exudados de las raíces de tabaco y girasol, respectivamente, sugiriendo que las auxinas pueden estar involucradas en el proceso de germinación. También se ha reportado que *Cuscuta pentagona* activa las vías de defensa del Ácido Jasmónico (JA) y Ácido Salicílico (SA) en tomate, similar al sistema de defensa en contra de herbívoros y patógenos (Runyon *et al.*, 2008, 2010). Hu *et al.* (2017) detectaron un incremento en las concentraciones de citocininas, ácido jasmónico y ácido abscísico en el muérdago europeo *Viscum album* en infección con el hospedero *Pinus sylvestris*, así también detectaron una disminución en las concentraciones de IAA y ácido salicílico y solo fueron detectadas en la corteza del hospedero, resultado que asociaron con los procesos fisiológicos del muérdago, como cambios en la relación de agua en el hospedero y remodelación en la composición de carbohidratos.

En la actualidad, estudios sobre fitohormonas en muérdagos aéreos son nulos, por lo que es una buena oportunidad para poder generar nuevo conocimiento sobre el efecto de fitohormonas que tengan relación con los estadios infectivos en la interacción *P. calyculatus* y árboles de mezquite.

## 4.8 Daños económicos e impacto ambiental

Los muérdagos son ampliamente distribuidos geográficamente y son patógenos que causan daños en árboles, siendo plagas forestales en diversas partes del mundo. Estas parásitas son capaces de afectar la fisiología del hospedero, ocasionando su defoliación, muerte gradual a partir de las hojas hasta la sequía completa de la rama, reducción en el crecimiento, reproducción y supervivencia, así como una mayor susceptibilidad a otros daños y enfermedades ocasionadas por fitopatógenos y herbívoros (Geils & Vázquez-Collazo, 2002). En conjunto y a largo plazo, la deformación de las copas de los árboles y la muerte de estos perjudica también el dosel arbóreo, afectando al ecosistema (Pérez & Isabel, 2016).

*Psittacanthus calyculatus* se encuentra en al menos 25 estados del país (Azpeitia & Lara, 2006) y ocasiona graves daños y pérdidas ecológicas y económicas, como está sucediendo principalmente en Guanajuato, Guerrero, Jalisco, México, Michoacán, Morelos, Nayarit, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Quintana Roo, Sinaloa, Sonora, Tabasco, Tamaulipas, Tlaxcala, Veracruz y Yucatán (Pérez & Isabel, 2016). Se conocen más de 50 géneros de hospederos de *P. calyculatus* de importancia ecológica y agronómica. El mezquite (*Prosopis laevigata*), uno de los hospederos más recurrentes en la zona del Bajío, se desarrolla en zonas áridas y semiáridas de México, y su importancia ecológica y económica radica en el enriquecimiento del suelo, infiltración de agua, refugio para insectos y aves, captura de dióxido de carbono, regulación de la temperatura y retención de partículas contaminantes (Buendía-González et al., 2010; Gobierno Municipal de León, 2014), además de la utilización de su madera como combustible y para construcción de muebles y cercas, la vaina es usada como forraje, la resina que produce se usa para la fabricación de pegamentos y barnices, y sus flores para producción de miel orgánica (Rodríguez Saucedo et al., 2014). Tan sólo en el estado de Jalisco, se les atribuye una merma anual en la cosecha de madera del orden de dos millones de metros cúbicos, equivalente a unos mil millones de pesos de pérdida (Del Castillo, 2016).

En la ciudad de León Guanajuato el número de árboles de mezquite reportado en el Censo Forestal Urbano en 2018 fue de 836 en 147 hectáreas, de un total de 30 mil árboles de 103 especies (Dirección de Gestión Ambiental, 2018), de los cuales no se menciona si están infectados pero es un dato alarmante pues esto sugiere que ya es una especie en vías de extinción (Méndez-Valadez, 2018), siendo aún más preocupante el tema de que es una especie considerada como endémica de la región (Rzedowski, 1998; Frías-Hernández et al., 2000). En la ciudad se han hecho esfuerzos en conjunto con asociaciones civiles sin fines de lucro y el gobierno municipal y estatal para combatir con esta plaga, tal es el caso de la Asociación Civil “Mezquite sin Muérdago, A.C.” (<https://yellow.place/es/mezquite-sin-mu%C3%A9rdago-a-c-le%C3%B3n-mexico>), la cual se encarga de realizar podas preventivas a los mezquites infectados controlando el problema temporalmente, pero no se elimina la posibilidad de que vuelva a aparecer (Figura 13). El primer reporte de alarma por infestación de muérdago en árboles de mezquite fue en 2016 (Figura 14) donde informaron que aproximadamente el 65% del arbolado urbano del Estado estaba infectado, y los reportes de este tipo han ido creciendo desde entonces (Figura 14). Cuando la infestación es muy severa, la única solución es derribar el árbol (Castro, 2019). Para combatir los daños, a partir de abril y hasta septiembre del presente año el gobierno Municipal en conjunto con la Dirección de Parques y Jardines del Municipio de León, invirtieron 1.6 millones de pesos en acciones sin tener que realizar talas (Rendón, 2019).

El Malecón del Río es una de las zonas que presenta una mayor afectación a causa del muérdago. / José Antonio Castro



**Figura 13. Infestación de muérdago en la zona del Malecón del Río en León, Guanajuato.** Poda como forma de control empleada por el gobierno municipal. (Castro, 2019.)

A pesar de todos estos aspectos negativos, en la medicina tradicional mexicana las hojas de *P. calyculatus* se han usado por sus propiedades antimicrobianas contra bacterias Gram negativas (Cervantes *et al.*, 2016), efecto vasodilatador, citotóxico (Cervantes, 2006) e hipoglucemiante (Hernández *et al.*, 2015).

Por sus características y distribución geográfica, las plantas parásitas establecen interacciones mutualistas y antagonistas con múltiples especies (Kuijt, 1964). Los muérdagos son considerados una especie clave en el ecosistema debido a su interacción con varias especies de las que dependen como polinizadores y aves frugívoras, ofreciéndoles recursos como producción de frutos y néctar de alta calidad y su función como refugio para varios insectos y aves (Watson, 2001), por lo que debemos entender estas interacciones en su ciclo de vida como una señal de perturbación para adoptar prácticas de manejo y control.



Figura 14. Diversas noticias en diferentes periódicos y páginas informativas de los últimos años relacionados a la infestación por muérdago en los árboles de la ciudad de León, Gto.

## 5 MATERIALES Y MÉTODOS

La estrategia general y experimental para evaluar las biomoléculas en diferentes estadios infectivos en la interacción planta parásita y huésped se muestra a continuación (Figura 15). Los detalles se encuentran en esta sección.

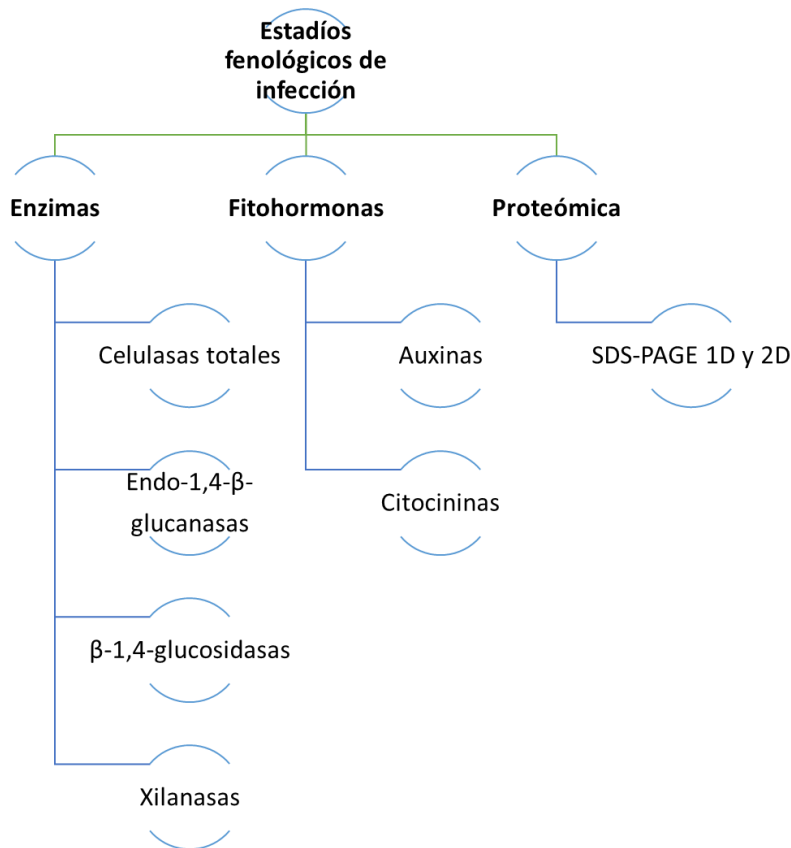


Figura 15. Estrategia general del estudio.

### 5.1 Sitio de estudio

Guanajuato cuenta con clima seco y semiseco en el 43% del estado, principalmente al norte. Un 33% se presenta como clima cálido y subhúmedo al suroeste y este, y el 24% restante como clima templado subhúmedo. La temperatura media anual es de 18°C, la más alta promedio de 30°C en los meses de mayo y junio, y la más baja promedio de 5.2°C en el mes de enero (INEGI, 2008). La colecta de cada uno de los estadios fenológicos fue realizada en los meses de enero y mayo de 2019 en un área suburbana con presencia de mezquites (*P. laevigata*) altamente infectados con *P. calyculatus* en Irapuato, Guanajuato (20° 43' N; 101° 19' O) (Figura 16).





**Figura 16. Sitio de estudio y recolección de material vegetal.** (A) En naranja se muestra el área de estudio para la colecta de los diferentes materiales. (B) Colección de material vegetal con un cortador de ramas.

## 5.2 Análisis de los diferentes estadios fenológicos infectivos

La identificación y colección de los estadios fenológicos se realizó de acuerdo a lo reportado por Geils *et al.* (2002). Se hizo una observación del asentamiento de la semilla, penetración, desarrollo de hojas y haustorio. Se identificaron aquellos que pertenecieran a los cinco primeros estadios y se colectaron para estudios posteriores (Figura 17). La recolección fue únicamente del haustorio del estadio correspondiente, sin embargo, también incluían partes vegetales del muérdago, por esta razón también colectamos hojas de muérdago como control. De manera similar se recolectaron semillas maduras que aún estaban unidas al muérdago y también fueron usadas como control. De los demás estadios solamente se documentaron para la realización de un esquema del ciclo de vida, pero no se trabajó con ellos debido a su gran cantidad de material lignocelulósico. El material vegetal fue congelado al momento en hielo seco y fue transportado en hielera, posteriormente el tejido fue molido con nitrógeno líquido y almacenado en un ultracongelador Thermo Scientific™ a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento.



Figura 17. Estadios fenológicos identificados en este estudio. Adaptado de Geils *et al.* (2002).

### 5.3 Extracción enzimática

Se evaluó la capacidad enzimática de aquellas enzimas que degradan la corteza de mezquite provenientes de todos los estadios de crecimiento en especial del haustorio. Para la extracción enzimática se siguió el método reportado por Singh y Singh (1993) con modificaciones. A partir de 50 mg de muestra en peso húmedo se añadieron 500  $\mu$ l de Buffer de extracción (0.1 M de acetato de sodio, pH 5.2 y 10 % de cloruro de sodio) y fue homogenizado durante 1 min en vórtex, posteriormente la mezcla fue centrifugada a 12,000 rpm a 4°C por 30 min. El sobrenadante fue colectado y colocado en tubos de 1.5 ml a 4°C y el pellet fue desechado.

### 5.4 Actividades enzimáticas

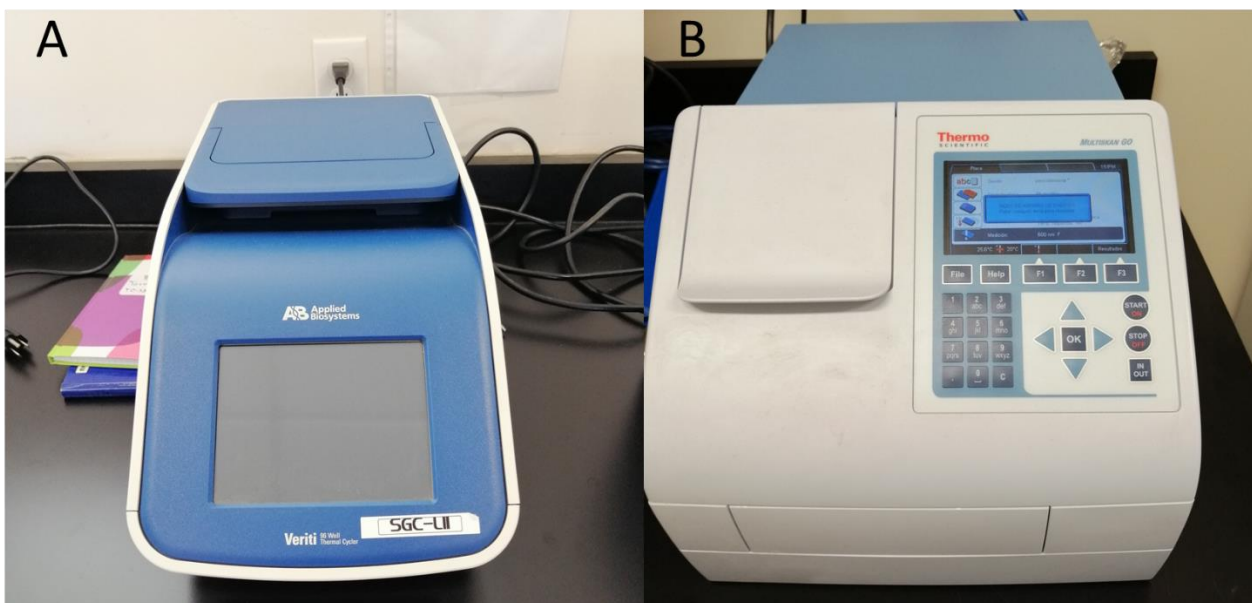
#### 5.4.1 Método cualitativo

Para darnos una idea inicial de las actividades enzimáticas y establecer un método de extracción, y dada la composición lignocelulítica del mezquite, se utilizó el método cualitativo de detección para celulasas (Johnsen & Krause, 2014).

Para la detección se utilizaron placas con agar al 1% ( $P/V$ ) suplementado con 0.2% de carboximetilcelulosa (CMC) y 50  $\mu$ l del extracto enzimático fue añadido a la superficie. Las placas con el extracto se dejaron secar a temperatura ambiente por aproximadamente 1 h y posteriormente se incubaron a 27°C durante 16 h. Después de ese periodo de incubación, se visualizaron zonas de hidrólisis llenando completamente la caja Petri con una preparación de coloración de yodo (2 % yoduro de potasio y 1% yodo).

#### 5.4.2 Método cuantitativo

Una vez establecida la presencia de una actividad enzimática, se midieron las actividades de celulasa total Ghose (1987; Xiao *et al.*, 2004), endo-1,4- $\beta$ -glucanasas (Xiao *et al.* (2005),  $\beta$ -1,4-glucosidasas (Sigma-Aldrich, MAK129) y xilanasas (Saha, 2002; Olajuyigbe & Ogunyewo, 2016). Los protocolos fueron realizados con modificaciones para poder hacer la reacción en tubos de PCR de 0.2 ml. Todas las incubaciones se llevaron a cabo en un termociclador Veriti (Applied Biosystems) y la absorbancia se midió en un espectrofotómetro de microplacas Multiskan™ GO (Thermo Scientific™) (Figura 18).



**Figura 18. Equipo utilizado para la cuantificación de actividades enzimáticas.** (A) Termociclador Veriti 96 pozos, Applied Biosystems™. (B) Espectrofotómetro de microplacas Multiskan™ GO (Thermo Scientific™).

En todas las actividades se usó el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) preparado previamente (ácido 3,5-dinitrosalicílico 7 g/L, hidróxido de sodio 13.2 g/L y tartrato de sodio y potasio 204 g/L). Con este método el reactivo DNS se agrega en exceso a los grupos reductores y se determina la cantidad de azúcares reductores por intensidad del color, que puede medirse a 550 nm (Miller, 1959). La formación del color se debe a la conversión del DNS en ácido 3-amino-5-nitrosalicílico por los grupos aldehídos de los azúcares reductores (Marsden *et al.*, 1982).

Todas las reacciones se realizaron en buffer acetato de sodio 5 mM, pH 4.8, más el sustrato correspondiente y el extracto enzimático.

#### 5.4.2.1 Actividad de celulasa

La actividad enzimática de celulasa total se calculó con la fórmula de Unidades Internacionales de Papel Filtro (FPU/ml) siguiendo el protocolo reportado por Ghose (1987) y Xiao *et al.* (2004). Partiendo de 20  $\mu$ l de cada uno de los extractos enzimáticos obtenidos anteriormente, en un tubo de PCR se colocó un círculo de papel filtro Whatman #41, 5 mm de diámetro y 40  $\mu$ l de Buffer de acetato de sodio 5 mM pH 4.8, se mezcló por pipeteo. Las reacciones se incubaron a 50°C durante 1 hora. Posterior a este tiempo se le adicionaron 120  $\mu$ l del Reactivo DNS para cuantificar los azúcares reductores, se homogenizaron por pipeteo y se incubaron a 95°C por 5 min. Finalmente se transfirieron 36  $\mu$ l de cada reacción a una microplaca de 96 pozos y se adicionaron 160  $\mu$ l de agua desionizada, finalmente la absorbancia de la mezcla se midió a 550 nm. Los valores de absorbancia de las muestras se restaron al promedio del control del reactivo y el control del sustrato para corregirlos. Estos controles consistieron en 60  $\mu$ l de Buffer acetato de sodio 5 mM pH 4.8 (control del reactivo) y 60  $\mu$ l de buffer acetato de sodio 5 mM pH 4.8 con papel filtro (control del sustrato).

Se construyó una curva estándar de glucosa con concentraciones de 0, 0.5, 1, 1.5, 2 y 2.5 mg/ml para el cálculo de la actividad FPU/ml. Se utilizó el valor de 1 mg de glucosa de la curva estándar para convertir los datos de absorbancia en concentración de azúcares reductores liberada por la hidrólisis enzimática.

Para la expresión de FPU/ml, se utilizó la siguiente ecuación:

$$\frac{FPU}{ml} = \left( \frac{A_{550} \text{ muestra}}{A_{550} \text{ estándar}} \right) \left( 5.55 \frac{\mu mol}{mg} \right) \left( \frac{1}{60 \text{ min}} \right) \left( \frac{1}{0.02 \text{ ml}} \right)$$

Donde:

FPU/ml = Actividad de celulasa por mililitro

$A_{550}$  muestra = Absorbancia de las muestras obtenidas en el espectrofotómetro con el método DNS

$A_{550}/mg$  estándar = Absorbancia para 1 mg de glucosa obtenida de la curva estándar de glucosa

5.55  $\mu mol/mg$  = Número de  $\mu moles$  de glucosa en 1 mg

60 min = Tiempo de incubación del ensayo

0.02 ml = Volumen del extracto enzimático añadido a la reacción

Una Unidad Internacional de Papel Filtro se define como 1  $\mu mol$  de equivalentes de glucosa liberados por minuto bajo las condiciones de reacción usadas (60 min y 20  $\mu l$  del extracto enzimático). Los valores FPU/ml se expresaron en  $\mu mol$  de glucosa liberada/mg/min.

#### 5.4.2.2 Actividad de endo-1,4- $\beta$ -glucanasas

La actividad de la endo-1,4- $\beta$ -glucanasa se calculó con las Unidades Internacionales (IU/ml) descrito por Xiao *et al.* (2005). Partiendo de 30  $\mu l$  de cada uno de los extractos enzimáticos obtenidos, en un tubo de PCR se añadieron 30  $\mu l$  del sustrato CMC al 2% (p/v) disuelto en buffer acetato de sodio 5 mM a pH 4.8, la mezcla se homogenizó por pipeteo. Las reacciones se incubaron a 50°C por 30 min. Posteriormente se le adicionaron 60  $\mu l$  de DNS para cuantificar la cantidad de azúcares reductores, nuevamente se homogenizaron por pipeteo y se incubaron a 95°C por 5 min. Finalmente se transfirieron 100  $\mu l$  de la reacción a una microplaca de 96 pozos y se midió la absorbancia a 550 nm. Los valores de la absorbancia de las muestras se restaron al promedio del control del reactivo y el control del sustrato para corregirlos. Los controles consistieron en 60  $\mu l$  de buffer acetato de sodio 5 mM, pH 4.8 (control del reactivo) y 60  $\mu l$  de CMC 2% disuelto en buffer acetato de sodio 5 mM, pH 4.8 (control del sustrato). Se utilizó el valor de 1  $\mu g$  de glucosa de la curva estándar para convertir los datos de absorbancia en concentración de azúcares reductores liberada por la hidrólisis enzimática.

El valor de IU/ml fue calculado de la siguiente forma:

$$\frac{IU}{ml} = \left( \frac{A_{550} \text{ muestra}}{A_{550} \frac{\mu g}{\mu g} \text{ estándar}} \right) \left( \frac{1}{180 \frac{\mu g}{\mu mol} \text{ glucosa}} \right) \left( \frac{1}{30 \text{ min}} \right) \left( \frac{1}{0.03 \text{ ml}} \right)$$

Donde:

IU/ml = Actividad de endo-1,4-β-glucanasa obtenida por mililitro

A<sub>550</sub> muestra = Absorbancia de las muestras obtenidas en el espectrofotómetro con el método DNS

A<sub>550</sub>/μg estándar = Absorbancia para 1 μg de glucosa obtenida de la curva estándar de glucosa

180 μg/μmol = Cantidad de glucosa en 1 μmol

30 min = Tiempo de incubación del ensayo

0.03 ml = Volumen del extracto enzimático añadido a la reacción

Una Unidad Internacional se define como 1 μmol de equivalentes de glucosa liberado por minuto bajo las condiciones de reacción usadas (30 min con 30 μl del extracto enzimático). Los valores IU/ml se convirtieron para ser expresados en μmol de glucosa liberada/mg/min.

#### 5.4.2.3 Actividad de β-1,4-glucosidasas

La determinación de la actividad de la β-1,4-Glucosidasa se calculó como Unidades por litro (U/L) siguiendo las instrucciones del fabricante del kit β-Glucosidase Activity Assay (Sigma-Aldrich, MAK129). A partir de 20 μl de cada uno de los extractos enzimáticos, en una microplaca de 96 pozos se añadieron 200 μl del Buffer de ensayo y 1 mM p-Nitrofenilo- β-D-Glucopiranosido (β-NPG) como sustrato. Los controles consistieron en una reacción con actividad de β-1,4-glucosidasa conocida con 200 μl de calibrador y 20 μl agua y otro con 220 μl de agua. Se midió una absorbancia inicial a 405 nm, después se incubó la reacción a temperatura ambiente durante 20 min y transcurrido este tiempo se midió una absorbancia final a la misma longitud de onda.

El cálculo de U/L se determinó usando la siguiente ecuación:

$$\frac{U}{L} = \left( \frac{A_{405} \text{ final muestra} - A_{405} \text{ inicial muestra}}{A_{405} \text{ final calibrador} - A_{405} \text{ final agua}} \right) \times 250 \text{ U/L}$$

Donde:

U/L = Unidades de β-1,4-Glucosidasa por litro

A<sub>405</sub> final muestra = Absorbancia de cada muestra después de 20 min de incubación

A<sub>405</sub> inicial muestra = Absorbancia de cada muestra antes del tiempo de incubación

A<sub>405</sub> final calibrador = Absorbancia del control calibrador después de 20 min de incubación

A<sub>405</sub> final agua = Absorbancia del control agua después de 20 min de incubación

250 U/L = Cantidad de unidades por litro equivalentes en el control calibrador

Una unidad de  $\beta$ -1,4-Glucosidasa es la cantidad enzimática necesaria para catalizar la hidrólisis de 1  $\mu$ mol de sustrato por minuto a pH 7. Los valores U/L se convirtieron para ser expresados en  $\mu$ mol de glucosa liberada/mg/min.

#### 5.4.2.4 Actividad de xilanasas

La actividad de xilanasas se determinó con las Unidades Internacionales (IU/ml) siguiendo lo reportado por Saha (2002) y Olajuyigbe & Ogunyewo (2016), con modificaciones. A partir de 30  $\mu$ l de cada uno de los extractos enzimáticos se le añadieron 30  $\mu$ l del sustrato xilano 1% (P/V) disuelto en buffer de acetato de sodio 5 mM, pH 4.8 y se homogenizó por pipeteo. Las reacciones se incubaron a 50°C por 40 min. Transcurrido ese tiempo se le adicionaron 120  $\mu$ l de DNS y se incubaron a 95°C por 5 min. Finalmente se transfirieron 36  $\mu$ l de la reacción a una microplaca de 96 pozos con 160  $\mu$ l de agua desionizada y se midió la absorbancia a 550 nm. Los valores de la absorbancia de las muestras se restaron al promedio del control del reactivo y el control del sustrato para corregirlos, que consistieron en 60  $\mu$ l de buffer de acetato de sodio 5 mM, pH 4.8 (control del reactivo) y 60  $\mu$ l de xilano 1% disuelto en buffer de acetato de sodio 5 mM, pH 4.8 (control del sustrato).

Se construyó una curva estándar de xilosa con concentraciones de 0, 0.5, 1, 1.5, 2 y 2.5 mg/ml para el cálculo de la actividad IU/ml. Se utilizó el valor de 1  $\mu$ g de xilosa de la curva estándar para convertir los datos de absorbancia en concentración de azúcares reductores liberada por la hidrólisis enzimática.

El cálculo de IU/ml se hizo con la siguiente ecuación:

$$\frac{IU}{ml} = \left( \frac{A_{550} \text{ muestra}}{A_{550} \text{ estándar}} \right) \left( \frac{150 \mu g}{\mu mol \text{ xilosa}} \right) \left( \frac{1}{40 \text{ min}} \right) \left( \frac{1}{0.03 \text{ ml}} \right)$$

Donde:

IU/ml = Actividad de xilanasas obtenida por mililitro

$A_{550}$  muestra = Absorbancia de las muestras obtenidas en el espectrofotómetro con el método DNS

$A_{550}/\mu g$  estándar = Absorbancia para 1  $\mu$ g de xilosa obtenida de la curva estándar de xilosa

150  $\mu g/\mu mol$  = Cantidad de xilosa en 1  $\mu mol$

40 min = Tiempo de incubación del ensayo

0.03 ml = Volumen del extracto enzimático añadido a la reacción

Una unidad de actividad de xilanasas es definida como la cantidad de enzima que libera 1  $\mu$ mol de xilosa por minuto en las condiciones de reacción usadas (40 mins y 30  $\mu$ l del extracto enzimático). Los valores IU/ml se convirtieron para ser expresados en  $\mu$ mol de xilosa/mg/min.

## 5.5 Extracción de proteínas totales

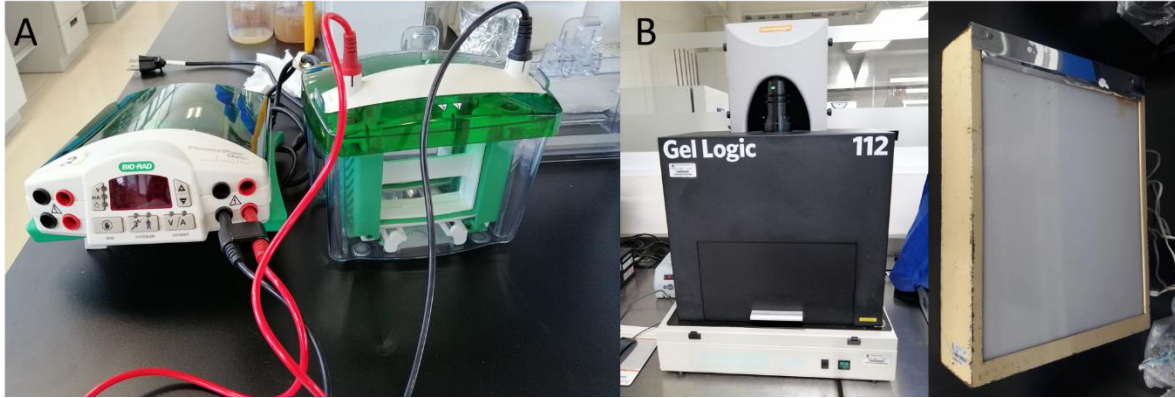
La extracción de proteínas se realizó de acuerdo a la técnica descrita por Orona-Tamayo *et al.* (2013). Se usaron 200 mg de tejido y fueron colocados en tubos de 1.5 ml con 1 ml de TCA 10%/acetona 100%, se homogenizó y se centrifugó a 12,000 rpm por 3 min a 4°C. Las muestras se lavaron con 1 ml de metanol 80%/acetato de amonio 0.1 M y se centrifugaron como anteriormente, posteriormente fueron lavadas con acetona 80% y centrifugadas como anteriormente y fueron resuspendidas en una mezcla 1:1 de 0.4 ml de fenol (Tris-buffered, pH 8.0; Sigma St. Louis, MO) y 0.4 ml de Buffer SDS (30% Sucrosa, 2% SDS, Tris-HCl 0.1 M pH 8, 5% 2-mercaptoetanol). La mezcla fue homogenizada durante 30 segundos y se centrifugó a 12,000 rpm durante 3 min a temperatura ambiente. Se recuperó la fase fenólica y se le añadió 0.4 ml de Buffer SDS dos veces y se procesó como anteriormente. A los tubos con la fase fenólica fueron llenados con acetato de amonio 0.1 M/metanol 80%, almacenados por 30 min a -20°C y centrifugados a 12,000 rpm por 5 min a 4°C. La pastilla formada fue lavada dos veces con etanol 80%.

## 5.6 Cuantificación de proteínas

La cantidad de proteína se cuantificó de acuerdo al método de Bradford (1976) usando como estándar albúmina de suero de bovino (BSA). El reactivo Bradford se diluyó 1:4 con agua destilada y se construyó la curva estándar de BSA con concentraciones de 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 mg/ml. A 10  $\mu$ l de muestra (5  $\mu$ l muestra + 5  $\mu$ l de agua) se añadieron 200  $\mu$ l del reactivo Bradford en una microplaca de 96 pozos. La microplaca se incubó a temperatura ambiente durante 15 min. Finalmente, la absorbancia fue medida a 595 nm. La cantidad de proteína obtenida se calculó usando la ecuación de la recta obtenida de la curva estándar de BSA y expresada en  $\mu$ g/ $\mu$ l.

## 5.7 Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE)

Las muestras extraídas de cada estadio fueron resuspendidas en una solución de detergente CHAPS 2% (ThermoFisher, 28300) y desnaturalizadas por 5 min a 95°C con buffer de carga Laemmli 2X y 5% de mercaptoetanol. La separación de proteínas se realizó en un gel SDS-PAGE discontinuo de 4 y 12% (Laemmli 1970). Extractos protéicos de 25  $\mu$ g de cada muestra se cargaron y se cargaron 5  $\mu$ l de marcador molecular (BenchMark Protein Ladder) en una cámara de electroforesis vertical (Mini-PROTEAN® Tetra Vertical Electrophoresis Cell, Bio-Rad, Hercules, CA, Figura 19a) con condiciones de precorrida de 80 V y 60 mA y de corrida de 160 V y 60 mA. El gel se tiñó con azul de Coomassie ( $P/V$ ) en una solución metanol:ácido acético (40%/10%  $V/V$ ) toda la noche en agitación, se destiñó con una solución de metanol:ácido acético (30%/10%  $V/V$ ) durante 1 h y se analizó al día siguiente en un transiluminador con un sistema de imágenes Kodak Gel Logic Imaging System GL 112 (Figura 19b).



**Figura 19. Sistema de electroforesis SDS-PAGE y de revelado.** (A) Cámara de electroforesis Mini-PROTEAN® Tetra Vertical Electrophoresis Cell, Bio-Rad, Hercules, CA (B) Sistema de imágenes Kodak Gel Logic Imaging System GL 112 y transiluminador.

### 5.8 Electroforesis en dos dimensiones (2-DE)

Para analizar el proteoma de los estadios fenológicos del muérdago, las proteínas extraídas fueron separadas en geles de electroforesis de dos dimensiones (2DE). Extractos protéicos (60 µg) de cada muestra fueron resuspendidos en 125 µl de buffer de rehidratación [Urea 7 M, tiourea 2 M, CHAPS 2%, IPG Buffer 2% (pH 3-10 y 4-7, respectivamente), y ditiotretitol (DTT) 18 mM], posteriormente cada muestra individual fue cargada en tiras de 7 cm en geles de gradiente de pH inmovilizado [Immobilized pH Gradient (IPG) Gels], pH 3-10 y 4-7, y fueron hidratadas durante 16 h. La primera dimensión (punto isoeléctrico, IEF) se llevó a cabo de acuerdo a las instrucciones del fabricante en el sistema Ettan IPGphor 3 (GE-Amersham, Figura 20) con rehidratación pasiva. Las condiciones iniciales se observan en la tabla 3.

**Tabla 3. Parámetros utilizados para el isoelectroenfoque.**

Paso	Voltaje (V)	Tiempo (hrs)
Stop & Hold	500	1
Gradiente	1500	1
Gradiente	6000	1.5
Gradiente	8000	2.5

Después del IEF, las tiras fueron equilibradas en dos pasos con buffer SDS conteniendo DTT 100 mg/10 ml e incubado por 15 min, posteriormente, las tiras fueron colocadas en buffer SDS con iodoacetamida 250 mg/10 ml e incubados como en el paso anterior. Las tiras fueron fijadas en un gel continuo de SDS-PAGE al 12% a 160 V y 60 mA. El gel se tiñó con azul de Coomassie como lo ya descrito y posteriormente se reveló.





**Figura 20. Sistema GE Healthcare Ettan™ IPGphor™ 3 Isoelectric Focusing System.**

### **5.9 Análisis bioinformático de los perfiles en 2-DE**

Las imágenes de los perfiles en 2-DE fueron analizadas utilizando el programa Melanie 2D gel analysis software (Genebio) para la detección de los puntos isoeléctricos y pesos moleculares de las proteínas de interés, que permitieron establecer su identidad utilizando la base de datos ExpASY (<http://www.expasy.ch/tools/tagident.html>), comparando con las anotaciones en *Arabidopsis*. Los parámetros utilizados dependieron de cada proteína, pero en general fueron pI mínimo de 4.243, máximo de 6.393 y rango de peso molecular del 3-5%.

### **5.10 Perfil de fitohormonas**

Se analizaron 15 auxinas y citocininas de los primeros estadios y la hoja de *P. calyculatus* mediante Cromatografía Líquida acoplada en tándem a un espectro de masas (LC-MS/MS) realizado en el Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. (CICY), con el fin de conocer la presencia y los niveles de estas fitohormonas relacionadas con el crecimiento vegetal y desarrollo del haustorio. Para ambas fitohormonas se usaron controles internos deuterados y las concentraciones fueron determinadas usando el área bajo la curva generada por los picos del LC-MS/MS (Pan & Wang, 2009).

Se analizaron las auxinas Ácido Indol-3-Acetil-L-Aspártico (IAAD), Ácido Indol-3-Acetil-L-Glutámico (IAG), Ácido Indol-3-Acetil-Alanina (IAA-la); Ácido-3-Indol acético (IAA) y como control interno la auxina deuterada 13C-[<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]Ácido-3-Indol acético (13C-IAA). Las citocininas analizadas fueron O-Glucósido-trans-Zeatina (tZOG), O-Glucósido-cis-Zeatina (cZOG), 9-Glucósido-trans-Zeatina (tZ9G), 9-Glucorónido-trans-Zeatina (tZ9GN), trans-Zeatina (tZ), Dihidrozeatina (DZ), Ribósido-cis-Zeatina (cZR), N<sup>6</sup>-Isopenteniladenina (iP), N<sup>6</sup>-Benciladenina (BA) y como control interno la citocinina deuterada [<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]N<sup>6</sup>-Isopenteniladenina (D-iP).

### **5.11 Análisis estadístico**

Las actividades enzimáticas y las cuantificaciones de fitohormonas se examinaron con un análisis de varianza (ANOVA) univariado seguido de un test Tukey post hoc. Letras diferentes son usadas para indicar que las medias difieren significativamente utilizando una probabilidad menor de 0.05 ( $P < 0.05$ ). Estos análisis se realizaron con el paquete estadístico Statistical Package for the Social Sciences 17.0 (SPSS Inc., Chicago, USA).

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Fenología de infección

Se realizaron observaciones de la fenología de infección de *P. calyculatus* y se adaptaron los estadios a lo reportado por Geils *et al.* (2002) (Figura 21 y Tabla 4). Estas observaciones se describen de acuerdo a las características morfológicas de los estadios correspondientes en un periodo de 5 años. Sin embargo, nuestro trabajo sólo lo enfocamos a determinar los primeros estadios de infección.

**Tabla 4. Eventos del desarrollo de *P. calyculatus* asociados a su estadio fenológico de infección en *P. laevigata*.**







Estadio	Características morfológicas	Fotografías
<b>Primer año</b>		
I	Inicia con la semilla madura producida y su adhesión por la viscina contenida que ha endurecido. Se encuentra cubierta por el endocarpo. Después de la defecación, los restos de viscina ayudan en la adhesión con el huésped.	
II	Semilla con cotiledones descubiertos pero aún sin abrir, aumento del embrión, la semilla permanece adherida sin indicios de penetración, la viscina ha endurecido más tornándose en un color negro y se comienza a formar el disco radicular que dará origen al haustorio. La semilla se puede despegar manualmente de la rama, pero no por el viento o el movimiento.	
III	Apertura total de los cotiledones y penetración evidente en el hospedero. En la rama del hospedero ya se ven los indicios de la formación de un haustorio debido al agrietamiento de la corteza y la penetración es evidente, ya que la radícula ha penetrado la rama para conectarse con el sistema vascular (xilema y floema). Aquí es necesario el uso de alguna herramienta para separar la semilla de la rama que se presenta fuertemente adherida.	



Tabla 4. Continuación.

Estadio	Características morfológicas	Fotografías
<b>Primer año</b>		
<b>IV</b>	<p>Aparición de las primeras hojas verdaderas, penetración completa, desarrollo y maduración del haustorio.</p>	
<b>V</b>	<p>Crecimiento vegetativo avanzado con varias hojas verdaderas y haustorio completamente formado. Se observan los remanentes de los cotiledones abiertos y se observa con claridad la zona de penetración en la rama.</p>	
<b>Segundo año</b>		
	<p>Continúa el crecimiento vegetativo y del haustorio. Se comienza a observar una protuberancia saliente de la rama hospedera que ya se encuentra lignificado.</p>	

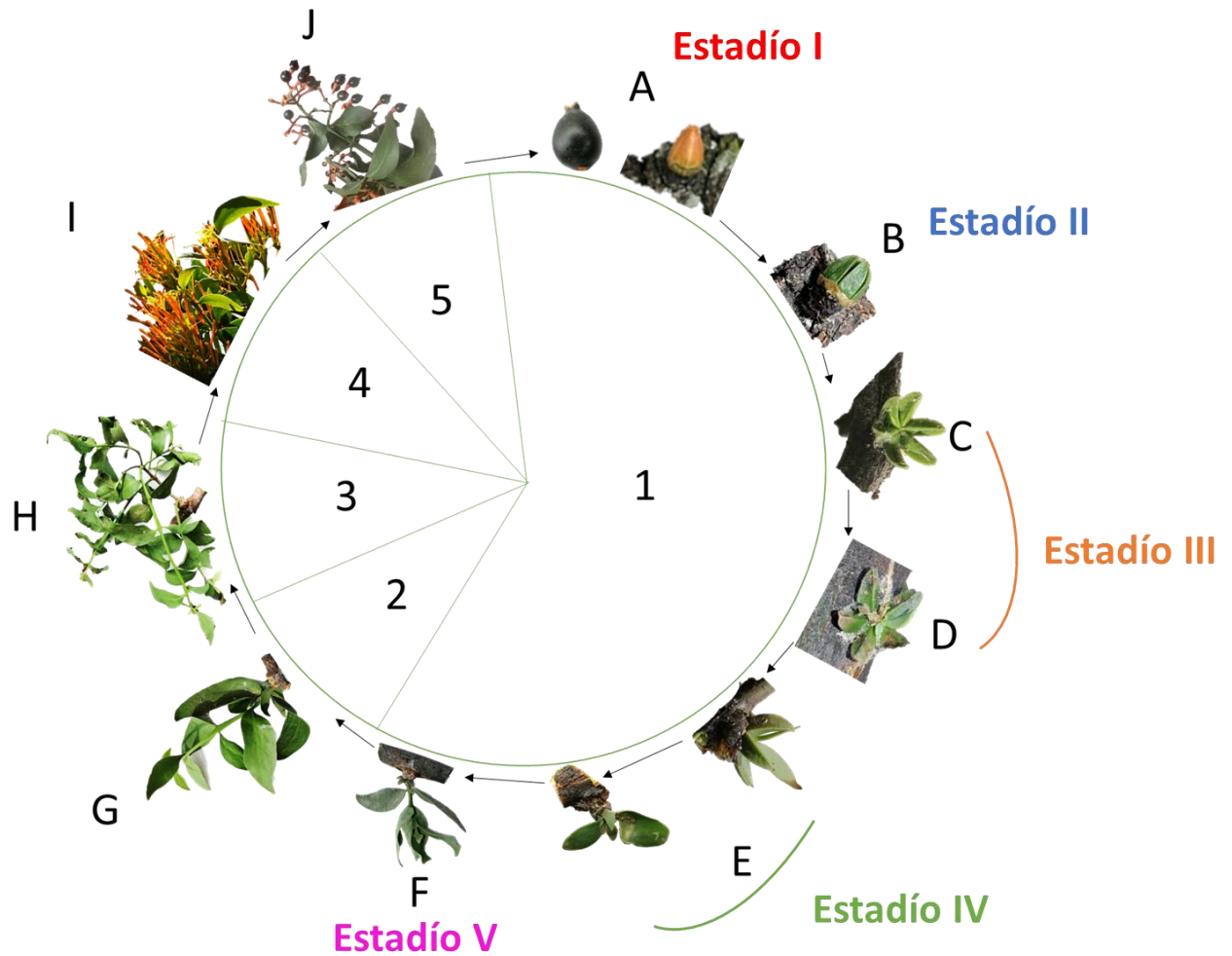
**Tabla 4. Continuación.**

Características morfológicas	Fotografías
<b>Tercer año</b>	
<p>Aparición de brotes adicionales, haustorio completamente lignificado y en crecimiento. Se observa como el haustorio va adquiriendo cada vez más una estructura lignocelulítica propia al despegarse de la rama del hospedero.</p>	
<b>Cuarto año</b>	
<p>Floración y polinización. Haustorio muy grande del que salen varias ramificaciones y resalta en las ramas infectadas. Ya cuenta con forma propia y se distingue fácilmente de la rama del hospedero.</p>	

**Tabla 4. Continuación.**

Características morfológicas	Fotografías	
<b>Quinto año</b>		
<p>Producción y dispersión de frutos por aves frugívoras. El haustorio ha crecido y es completamente visible en el árbol infectado incluso a distancia. Del haustorio salen ramificaciones adicionales lignificadas.</p>		

Para visualizarlo de una manera mas simple, en la Figura 21 se presenta una adaptación del ciclo de vida de *P. calyculatus* con observaciones en campo. La fenología de infección se basa en los eventos de maduración de la semilla, adhesión al hospedero, penetración, conexión y establecimiento de la infección, desarrollo vegetativo, floración, polinización y dispersión de la semilla (Vázquez-Collazo & Geils, 2002).

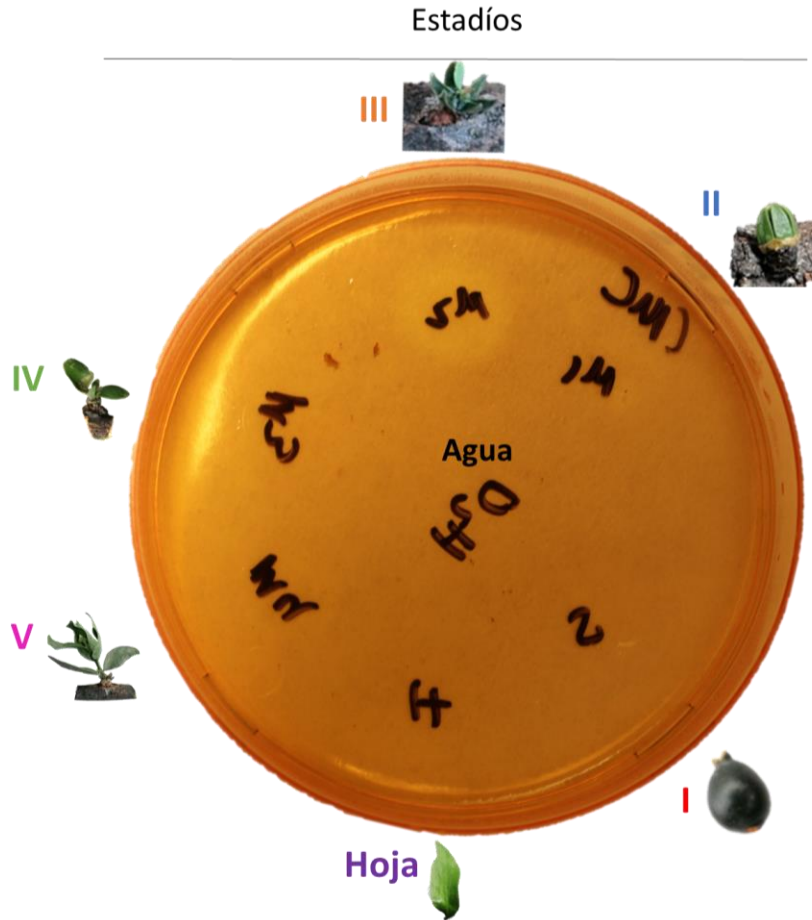


**Figura 21. Ciclo de vida de *P. calyculatus* en un periodo de 5 años.** La recolección y muestreo se llevó a cabo en enero y mayo de 2019 en un área suburbana donde había gran cantidad de árboles de mezquite (*P. laevigata*) altamente infectados con *P. calyculatus* en Irapuato, Guanajuato (20° 43' N; 101° 19' O). La semilla defecada en la rama del hospedero germina, abre sus cotiledones y establece la infección. Después de 5 meses se producen las primeras hojas verdaderas y durante el primer año se continúa con el crecimiento vegetativo y la producción de brotes adicionales. La infección es perenne y la planta produce un haustorio grande con un gran número de ramas largas. La producción de flores se da en el cuarto año y en noviembre del quinto año ocurre la polinización y la producción de frutos, que maduran en un año desde noviembre hasta febrero del quinto año (Vázquez-Collazo & Geils, 2002). Las observaciones se hicieron en base a lo reportado en Geils *et al.* (2002).

## 6.2 Actividades enzimáticas en haustorios de *P. calyculatus*

### 6.2.1 Actividad cualitativa de celulasas

Analizamos cualitativamente en medios con CMC la actividad enzimática tipo celulasas (Figura 22). Se observa en las zonas de hidrólisis, que en el estadio III fue el que presentó una mayor actividad cualitativa de celulasa, seguido del estadio II, IV y V.

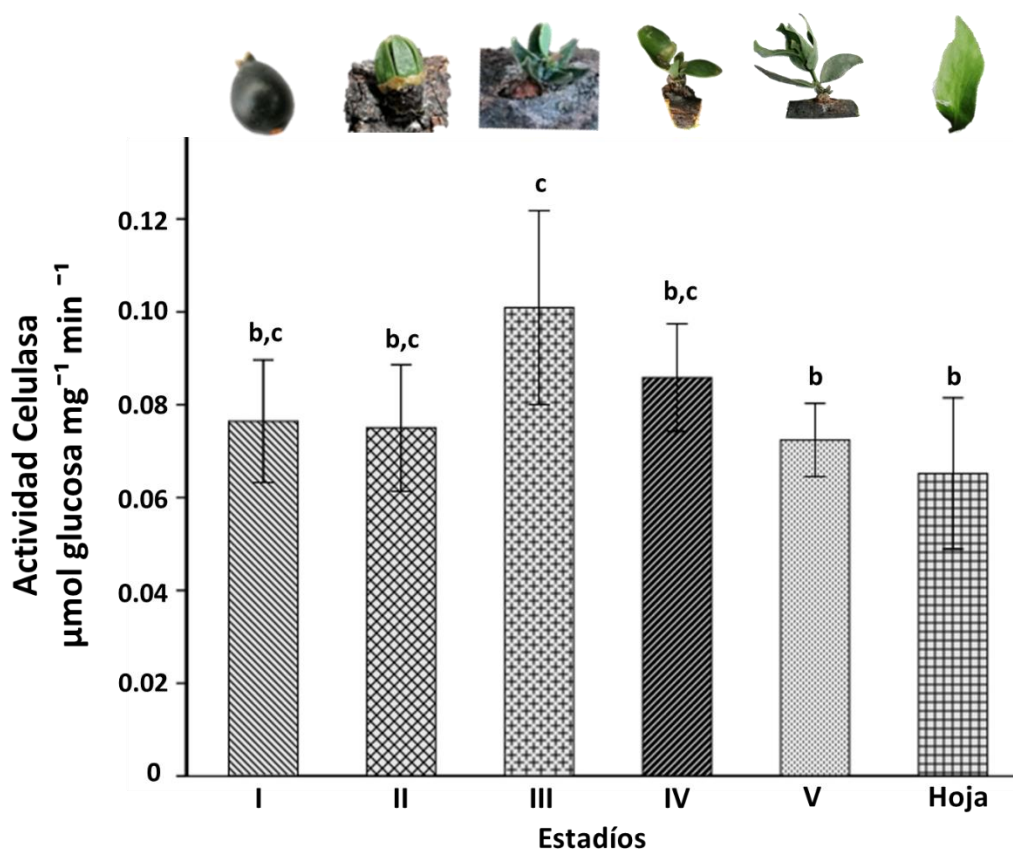


**Figura 22. Detección cualitativa de celulasas en estadíos de infección.** Medio con agar 1% y 0.2% CMC con 50  $\mu$ l de los extractos enzimáticos de los estadíos fenológicos para actividad tipo celulasa.



## 6.2.2 Actividad enzimática de celulasas

La actividad de celulasa se cuantificó con 20  $\mu\text{l}$  de los extractos enzimáticos de cada estadio y papel filtro como sustrato. Detectamos la actividad de esta enzima en todos los estadios de infección en *P. calyculatus* (Figura 23). En el estadio I se obtuvo una actividad enzimática de 0.0764  $\mu\text{mol}$  glucosa/mg/min, en el estadio II, una actividad de 0.075  $\mu\text{mol}$  glucosa/mg/min. El estadio III presentó la actividad máxima de 0.1009  $\mu\text{mol}$  glucosa/mg/min significativo ( $P = 0.032$ ), sin embargo, esta actividad fue disminuyendo en los estadios IV y V. Observamos que la actividad de esta enzima en la hoja, se encuentra al mismo nivel que los estadios I, II, IV y V (Figura 23).



**Figura 23. Actividad de celulasa en estadios diferenciales de *P. calyculatus*.** La actividad de celulasa total fue determinada en los estadios I-V y la hoja.  $n = 8$ , se presenta el valor promedio de la actividad y las barras representan  $\pm$  el error estándar; las letras representan diferencias significativas entre las condiciones ( $P < 0.05$  de acuerdo al test ANOVA univariante y Tukey).

### 6.2.3 Actividad enzimática de endo-1,4- $\beta$ -glucanasas

La actividad de endo-1,4- $\beta$ -glucanasas se cuantificó con 30  $\mu$ l de los extractos enzimáticos de cada estadio y CMC como sustrato. Detectamos una actividad de esta enzima en todos los estadios de infección en *P. calyculatus* (Figura 24). Se observó un incremento inicial de la actividad estadísticamente significativo ( $P < 0.000$ ) en el estadio I (valor de 0.00097  $\mu$ mol glucosa/mg/min), decae gradualmente en los estadios II y III y vuelve a incrementar en el estadio IV (valor de 0.0010  $\mu$ mol glucosa/mg/min) alcanzando su mayor actividad en este estadio y decayendo nuevamente en el estadio V. Se detectó una alta actividad de esta enzima en la hoja, en comparación con los demás estadios.

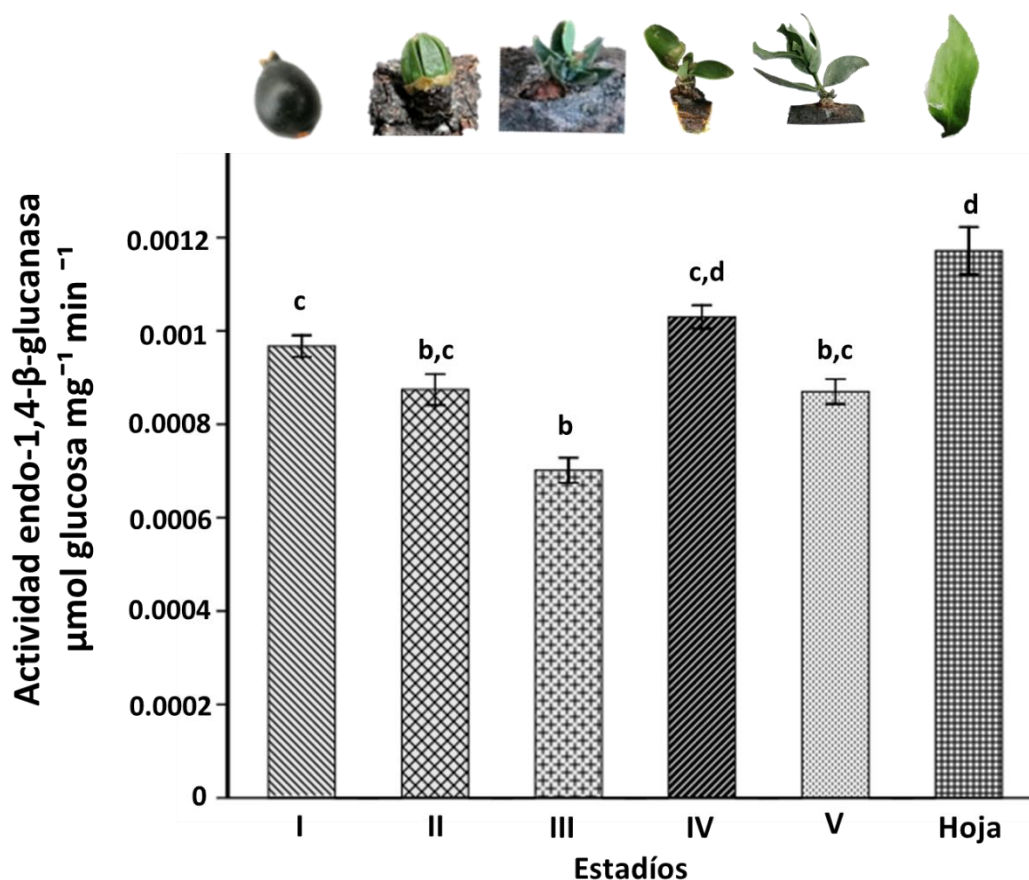
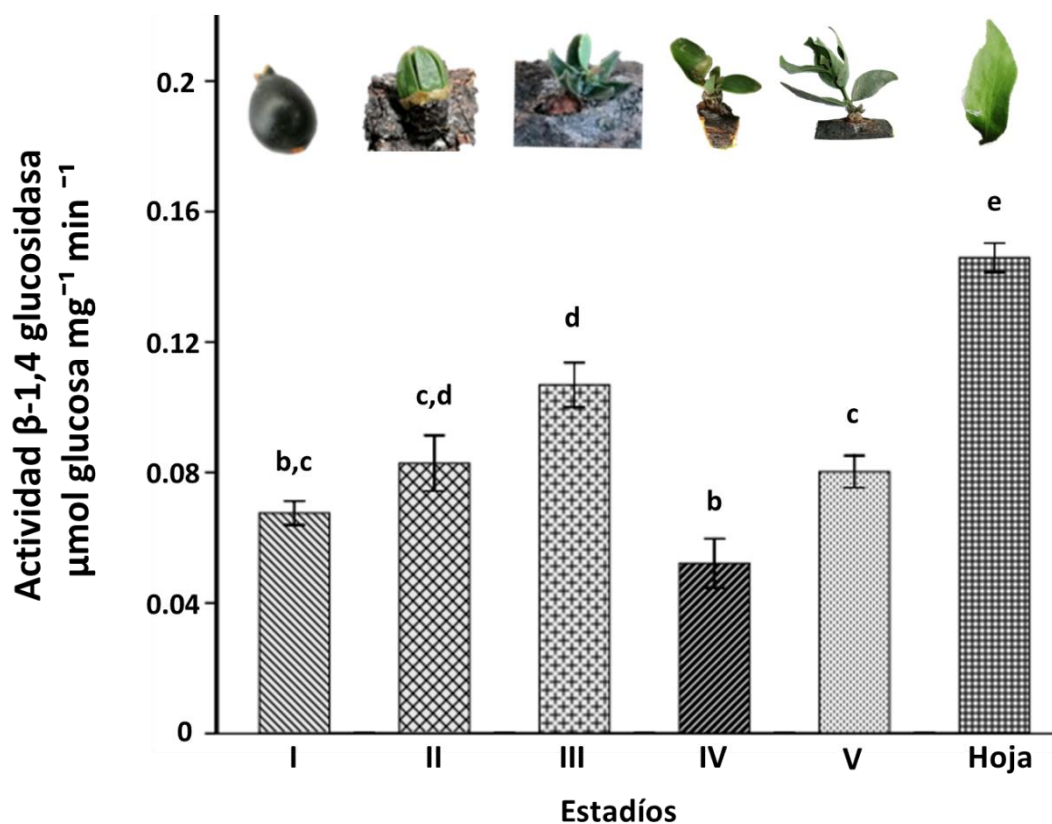


Figura 24. Actividad de endo-1,4- $\beta$ -glucanasa en estadios diferenciales de *P. calyculatus*. La actividad endo-1,4- $\beta$ -glucanasa fue determinada en los estadios I-V y la hoja.  $n = 11$ , se presenta el valor promedio de la actividad y las barras representan  $\pm$  el error estándar; las letras representan diferencias significativas entre las condiciones ( $P < 0.05$  de acuerdo al test ANOVA univariante y Tukey).

### 6.2.4 Actividad enzimática de $\beta$ -1,4-glucosidasas

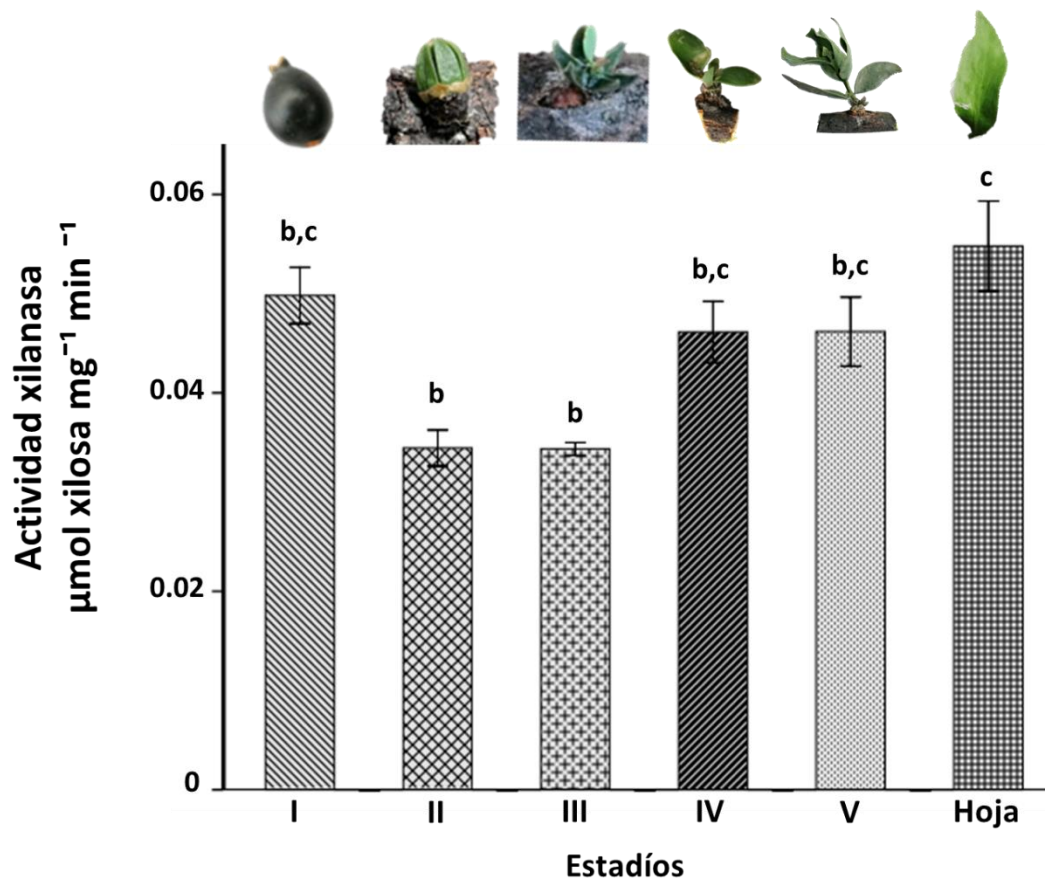
La actividad de  $\beta$ -1,4-glucosidasas se cuantificó con 20  $\mu$ l de los extractos enzimáticos de cada estadio y  $\beta$ -NPG como sustrato. Detectamos la actividad de esta enzima en todos los estadios de infección en *P. calyculatus* (Figura 25). La actividad fue creciendo en los estadios I y II y en el estadio III alcanza su máxima actividad (valor de 0.107  $\mu$ mol glucosa/mg/min) ( $P < 0.000$ ). Tuvo un decremento significativo en el estadio IV y volvió a aumentar en el estadio V, casi igualando la actividad inicial del estadio I. La actividad en la hoja en esta enzima también superó las de los estadios fenológicos.



**Figura 25. Actividad de  $\beta$ -1,4-glucosidasa en estadios diferenciales de *P. calyculatus*.** La actividad  $\beta$ -1,4-glucosidasa fue determinada en los estadios I-V y la hoja.  $n = 4$ , se presenta el valor promedio de la actividad y las barras representan  $\pm$  el error estándar; las letras representan diferencias significativas entre las condiciones ( $P < 0.05$  de acuerdo al test ANOVA univariante y Tukey).

### 6.2.5 Actividad enzimática de xilanasas

La actividad de xilanasas se cuantificó con 30  $\mu\text{l}$  de los extractos enzimáticos de cada estadio y xilano como sustrato. Detectamos la actividad de esta enzima en todos los estadios de infección en *P. calyculatus* (Figura 26). La actividad tuvo un incremento significativo ( $P < 0.000$ ) en el estadio I (valor de 0.050  $\mu\text{mol xilosa}/\text{mg}/\text{min}$ ). En los estadios II y III disminuyó considerablemente y en el estadio IV y V volvió a aumentar manteniendo el mismo nivel. La actividad en la hoja mostró ser mayor que en los estadios.



**Figura 26. Actividad de xilanasas en estadios diferenciales de *P. calyculatus*.** La actividad xilanasas fue determinada en los estadios I-V y la hoja.  $n = 10$ , se presenta el valor promedio de la actividad y las barras representan  $\pm$  el error estándar; las letras representan diferencias significativas entre las condiciones ( $P < 0.05$  de acuerdo al test ANOVA univariante y Tukey).

### 6.3 Perfiles de proteínas unidimensionales en SDS-PAGE

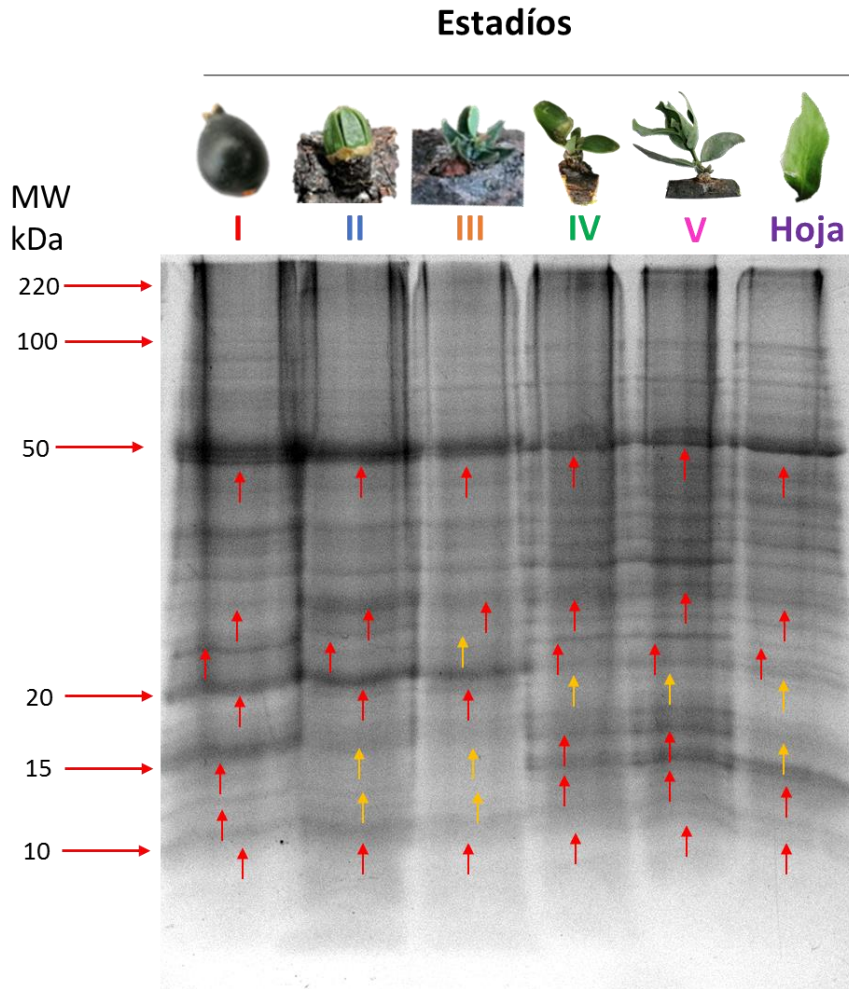
El contenido de proteína total de los estadíos fue de  $0.017 \pm 0.0003$ ,  $0.021 \pm 0.0002$ ,  $0.021 \pm 0.00005$ ,  $0.010 \pm 0.0002$  y  $0.007 \pm 0.0003$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  de peso fresco para los estadíos I, II, III, IV y V, respectivamente, siendo los estadíos II y III los de mayor contenido. Mientras que la hoja presentó un contenido de proteína total de  $0.014 \pm 0.0004$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  (Tabla 5).

**Tabla 5. Contenido total de proteínas en estadíos diferenciales de *P. calyculatus*.**

Estadío	I	II	III	IV	V	Hoja
Proteína total ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	$0.017 \pm 0.0003$	$0.021 \pm 0.0002$	$0.021 \pm 0.00005$	$0.010 \pm 0.0002$	$0.007 \pm 0.0003$	$0.014 \pm 0.0004$

Los valores están dados por el promedio del contenido de la proteína  $\pm$  el error estándar en  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de peso fresco.

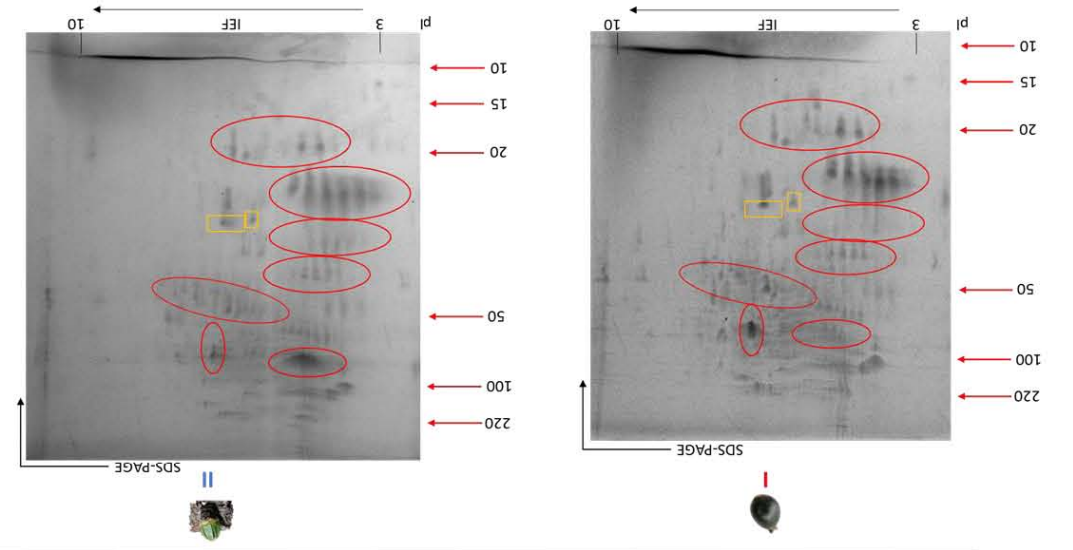
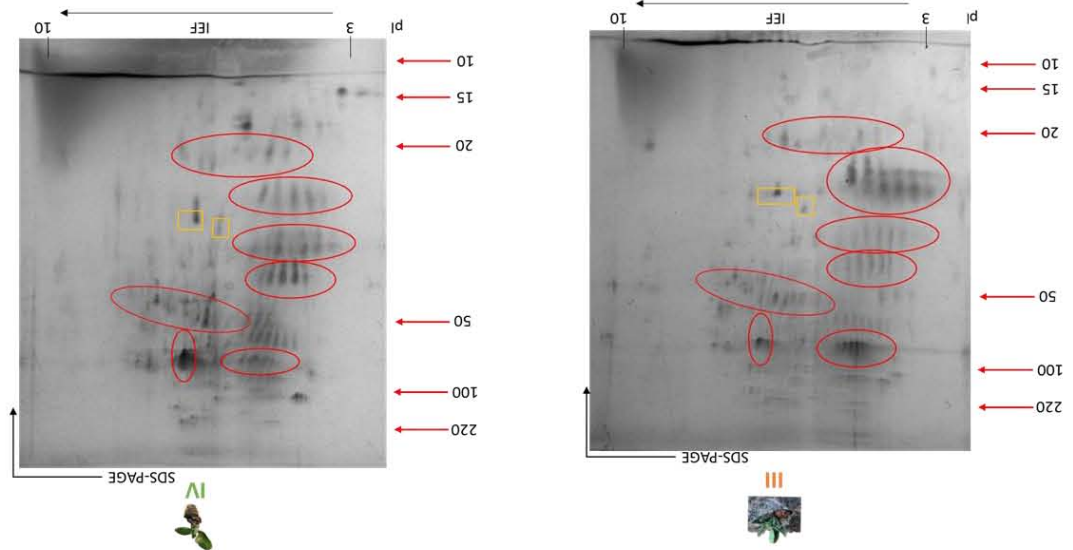
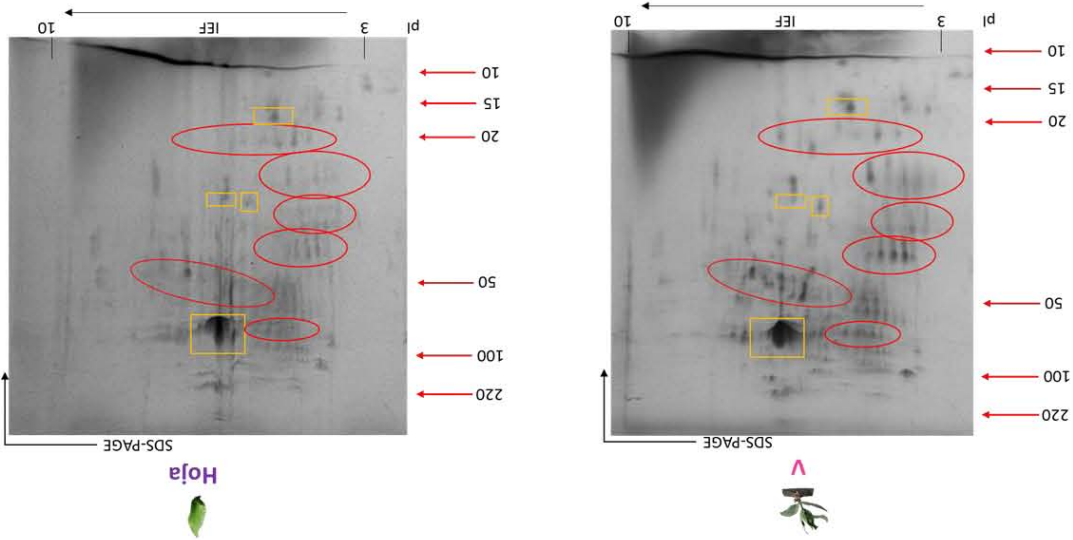
Los perfiles de proteínas unidimensionales derivados de los estadíos de infección se muestran en la figura 27. Se detectaron aproximadamente 20 bandas separadas para cada uno de los estadíos de infección con rangos de tamaño de 10-120 kDa. Específicamente, los estadíos I, IV y V son muy similares en sus perfiles, en cambio en los estadíos II y III se notan cambios en los patrones de bandeado analizados. Estos cambios se indican en la figura 26 con flechas rojas y amarillas.



**Figura 27.** Perfil de SDS-PAGE de estadíos diferenciales de *P. calyculatus*. Separación unidimensional de 25  $\mu\text{g}$  de las proteínas totales en un gel discontinuo y teñido con azul de Coomassie. Los cambios cualitativos en los bandeos proteómicos se indican con flechas rojas (aumento o disminución en la intensidad de la banda) y con flechas amarillas (desaparición de alguna banda presente en otros estadíos).

## 6.4 Electroforesis de 2-DE

Se analizaron los proteomas de todos los estadios de *P. calyculatus* en dos dimensiones, en un rango de pH de 3-10 (Figura 28) y de 4-7 (Figura 29). Se detectaron aproximadamente 105 spots de proteínas con rangos de peso molecular de 10-220 kDa y la mayoría de las proteínas se encontraron en los rangos de pH de 4-7. Algunas de las bandas detectadas en el gel unidimensional se mostraron como un conjunto sobrepuesto de proteínas en el de dos dimensiones. Se detectaron cambios en las intensidades de las proteínas entre los geles así como el desvanecimiento o aparición de otras, esto se encuentra representado gráficamente con recuadros naranjas y círculos rojos como se explica en los pies de cada figura. El conjunto de proteínas detectadas entre el rango de 20-30 kDa junto con las del rango de 60-90 kDa fueron las proteínas que mayor variabilidad en intensidades mostraron, por lo que se seleccionaron para su posterior identificación (las proteínas seleccionadas para este análisis se muestran en la Figura 30 y la descripción de estas en la Tabla 6). En el rango de pH 3-10 (Figura 28) los estadios I, II y III mostraron patrones similares, y al igual que la observación en el gel unidimensional a partir del estadio IV se comenzaron a mostrar diferencias en las proteínas detectadas. Lo mismo se observó en las proteínas de los rangos de pH 4-7 (Figura 29), en donde los estadios IV, V y la hoja prácticamente solo difieren en las intensidades de las proteínas.

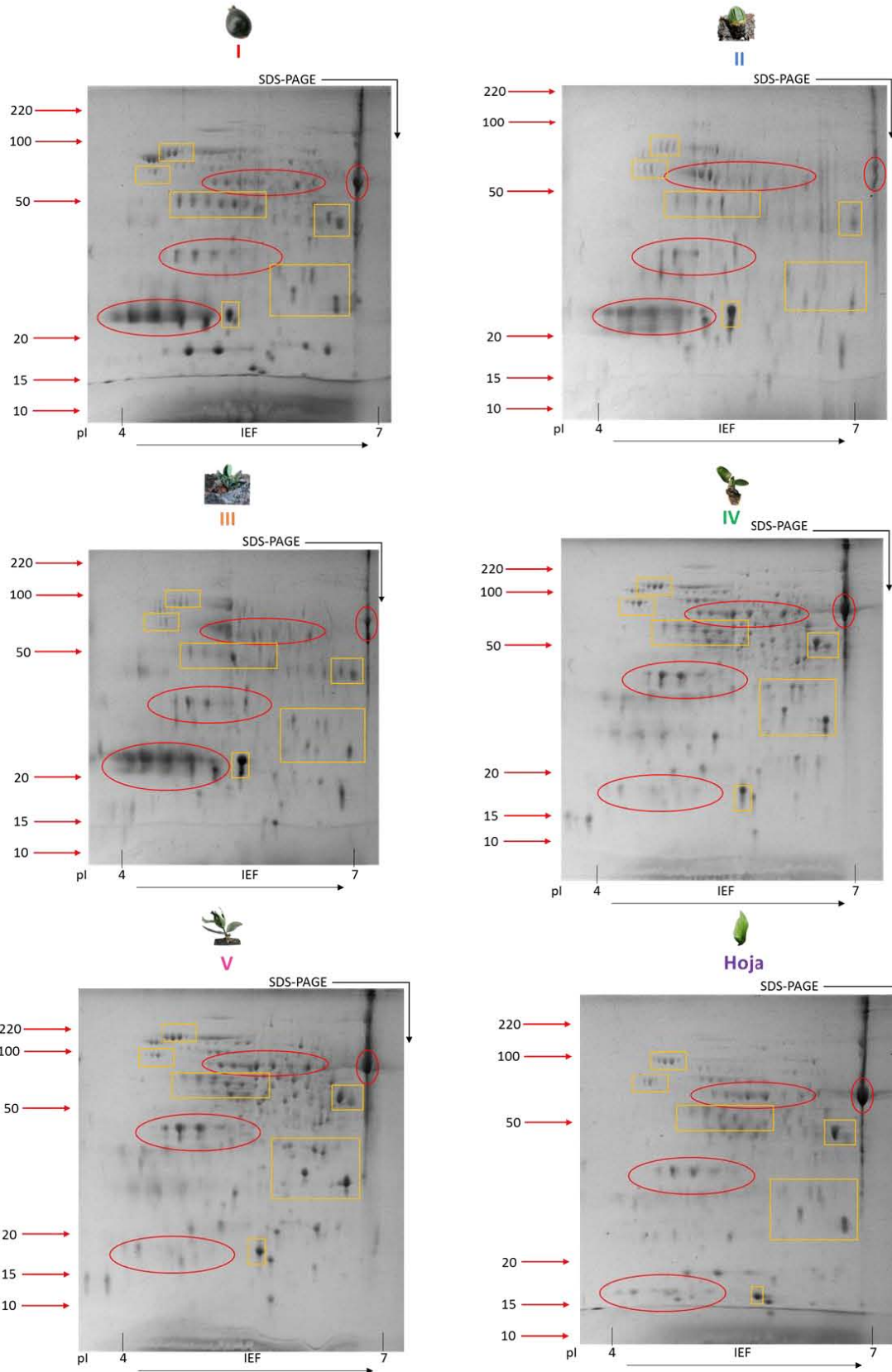


Estados



**Figura 28. Perfiles proteómicos en 2-DE pH 3-10 para los estadios diferenciales de *P. calyculatus*.** Los círculos rojos indican los patrones proteómicos que cambian en los diferentes estadios y los cuadros naranjas representan aquellos que se mantienen. Separación en dos dimensiones de 60 µg de las proteínas totales extraídas de cada estadio en tiras de pH 3-10 y gel de poliacrilamida 12%. La tinción se realizó con azul de Coomassie.

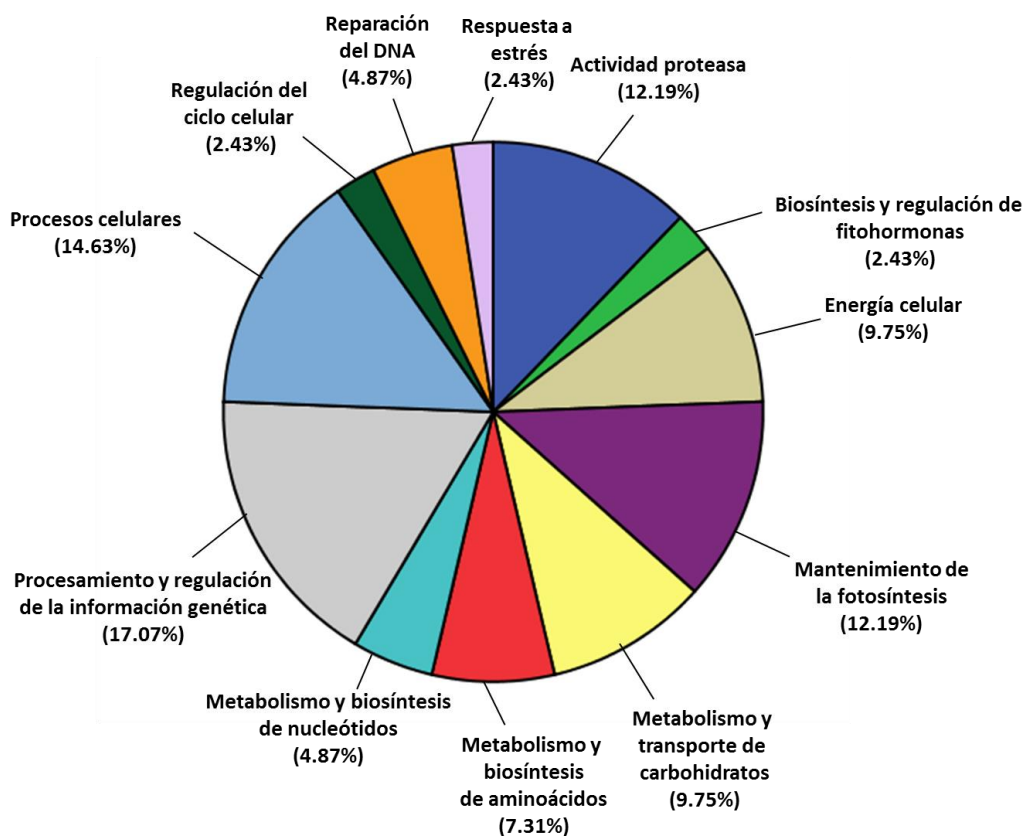
# Estadíos



**Figura 29. Perfiles proteómicos en 2DE pH 4-7 para los estadios diferenciales de *P. calyculatus*.** Los círculos rojos indican los patrones proteómicos que cambian en los diferentes estadios y los cuadros naranjas representan aquellos que se mantienen. Separación en dos dimensiones de 60 µg de las proteínas totales extraídas de cada estadio en tiras de pH 4-7 y gel de poliacrilamida 12%, la tinción se realizó con azul de Coomassie.

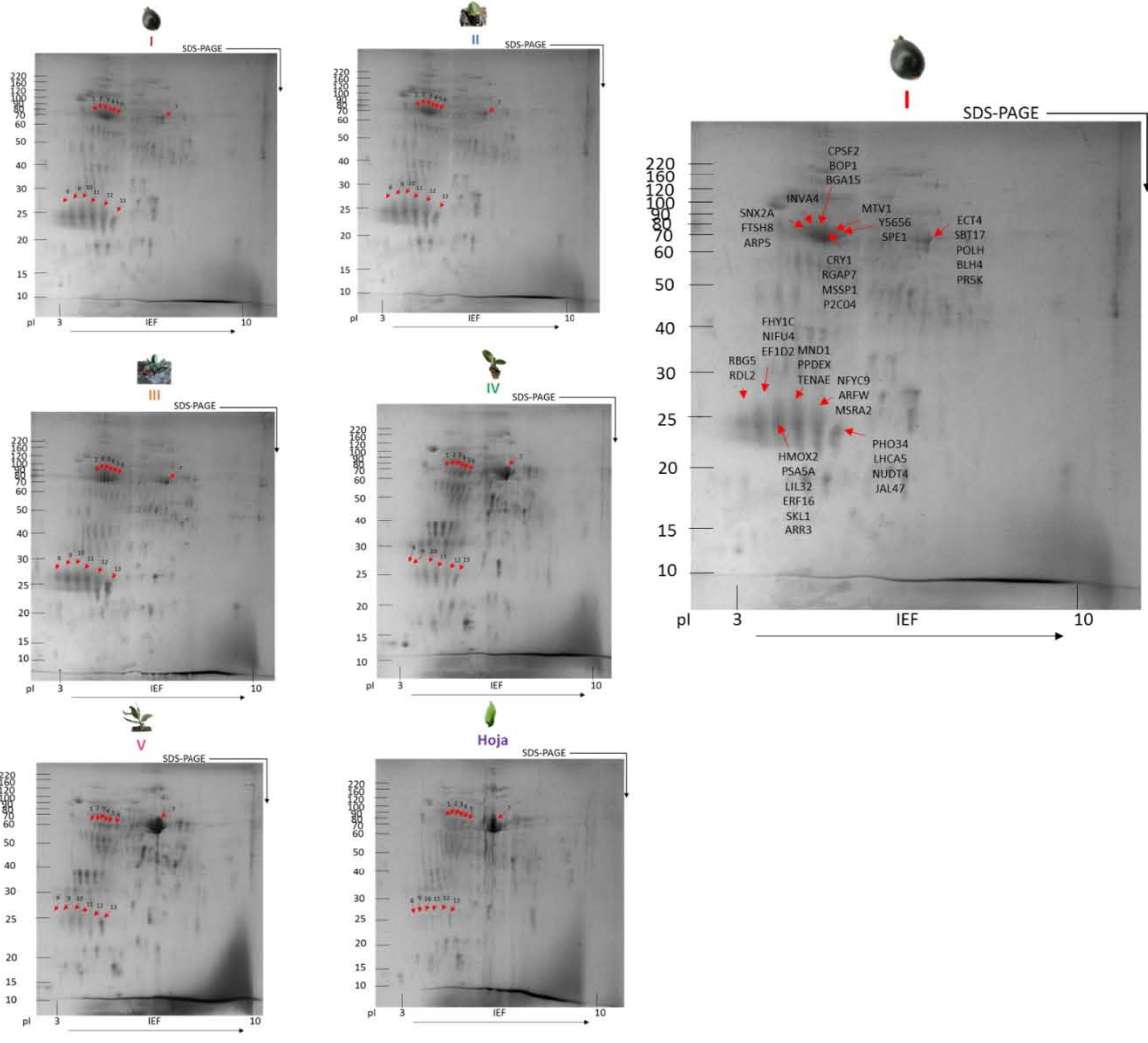
### 6.5 Categorización funcional de las proteínas de los estadios diferenciales de *P. calyculatus*

De las proteínas totales detectadas de los perfiles de 2-DE (aproximadamente 105) se seleccionaron 13, pertenecientes a los rangos de 20-30 kDa y 60-90 kDa por ser las proteínas con mayores cambios en intensidades entre los diferentes estadios (Figura 31). Como resultado de este análisis las proteínas identificadas se clasificaron en categorías funcionales de acuerdo a la actividad celular asignada (Figura 30). Se identificaron un total de 41 proteínas debido a que los rangos de algunas de las 13 proteínas fueron identificados como más de una proteína putativa.



**Figura 30. Categoría funcional de las 41 proteínas identificadas en los estadios diferenciales de *P. calyculatus*.** Se muestra la categoría funcional y entre paréntesis el porcentaje de proteínas pertenecientes a dicha categoría.

Estadios



**Figura 31. Proteínas seleccionadas para su identificación en base a su punto isoeléctrico (pI) y peso molecular (Mw) en perfiles proteómicos en 2-DE de 3-10.** La determinación del pI y Mw se realizó con el programa Melanie (GeneBio) y la identificación con la herramienta TagIdent (ExpASy) como lo descrito en materiales y métodos.

Como se muestra en la figura 30, la mayoría de las proteínas están en la categoría de procesamiento y regulación de la información genética (17.07%), seguido de las categorías de procesos celulares (14.63%), actividad de proteasas y mantenimiento de la fotosíntesis con 12.19% cada una. En la figura 30 se muestra la posición de las proteínas identificadas en el estadio I y que se tomaron como referencia para los demás estadios.

En la tabla 6 se describen las 41 proteínas identificadas en 2-DE de los diferentes estadios.

**Tabla 6. Identificación teórica individual de las proteínas separadas por 2-DE de los diferentes estadios diferenciales de *P. calyculatus*.**

Categoría <sup>1</sup>	Abreviatura <sup>2</sup>	Función de la proteína <sup>3</sup>	pI <sup>4</sup>	Mw (kDa) <sup>5</sup>	Expresión (estadio) <sup>6</sup>					
					I	II	III	IV	V	Hoja
Metabolismo y biosíntesis de aminoácidos	SPE1	Arginina descarboxilasa 1	5.38	76.2				X	X	X
	ARR3	Regulador de la conversión histidina-asparagina	4.68	25.3	X	X	X	X	X	X
	MSRA2	Metionina sulfóxido reductasa A2	5.11	24.4	X	X	X	X	X	
Metabolismo y biosíntesis de nucleótidos	FHY1C	Flavina mononucleótido hidrolasa, mantiene la homeostasis de la flavina	4.51	24.8	X	X	X	X	X	X
	NUDT4	Nudix hidrolasa, hidrólisis de algunos nucleósidos difosfatos	5.27	23.70	X	X	X	X	X	X

Tabla 6. Continuación.

Categoría <sup>1</sup>	Abreviatura <sup>2</sup>	Función de la proteína <sup>3</sup>	pI <sup>4</sup>	Mw (kDa) <sup>5</sup>	Expresión (estadio) <sup>6</sup>					
					I	II	III	IV	V	Hoja
Reparación del DNA	ARP5	Probable subunidad de un complejo de remodelación de cromatina	5.17	67.9			X	X	X	X
	POLH	Polimerasa encargada de la reparación de DNA	6.38	65.2	X	X	X	X	X	X
Procesamiento y regulación de la información genética	ECT4	Probable regulador de mRNA, regulación de formación de hojas	6.38	66.6	X	X	X	X	X	X
	BLH4	Factor de transcripción que establece la forma de las hojas por la represión de subdominios específicos	6.38	69.3	X	X	X	X	X	X
	PR5K	Receptor de quinasa	6.38	71.3	X	X	X	X	X	X
	CPSF2	Poliadenilación	5.14	82.1	X	X	X	X	X	X
	RBG5	Proteína de unión a RNA rica en glicina	4.34	25.4	X	X	X	X		
	ERF16	Factor de transcripción responsivo a etileno	4.63	24.4	X	X	X	X	X	X
	NFYC9	Factor Y de transcripción nuclear subunidad C9	5.09	25.6	X	X	X	X	X	X

Tabla 6. Continuación.

Categoría <sup>1</sup>	Abreviatura <sup>2</sup>	Función de la proteína <sup>3</sup>	pI <sup>4</sup>	Mw (kDa) <sup>5</sup>	Expresión (estadio) <sup>6</sup>					
					I	II	III	IV	V	Hoja
Regulación del ciclo celular	MND1	Proteína de división nuclear meiótica	4.87	24.6	X	X	X	X	X	X
Metabolismo de carbohidratos	JAL47	Transporte de carbohidratos	5.3	24.3	X	X	X	X	X	X
	INVA4	Ácido beta-fructofuranosidasa 4, movilización de sucrosa	5.27	61.9	X	X	X	X	X	X
	BGA15	Beta-galactosidasa	5.14	84.4	X	X	X	X	X	X
	MSSP1	Sensor de monosacáridos	5.22	79.5	X	X	X	X	X	X
Energía celular	RGAP7	Activador de GTPasa del tipo Rac	5.23	78.6	X	X	X	X	X	X
	EF1D2	Intercambio de GDP unido al factor de elongación 1 a ATP	4.48	25.1	X	X	X	X	X	X
	SKL1	Probable shiquimato kinasa inactivo	4.65	24.7	X	X	X	X	X	X
	ATP7	Probable ATP sintasa subunidad 24 kDa	5.3	24	X	X	X	X	X	X
Respuesta a estrés	PHO34	Proteína universal del estrés	5.33	24.4	X	X	X	X	X	X

Tabla 6. Continuación.

Categoría <sup>1</sup>	Abreviatura <sup>2</sup>	Función de la proteína <sup>3</sup>	pI <sup>4</sup>	Mw (kDa) <sup>5</sup>	Expresión (estadio) <sup>6</sup>					
					I	II	III	IV	V	Hoja
Fotosíntesis y fotorreparación	FTSH8	Metaloproteinasa dependiente de ATP encargada de la formación del tilacoide y reparación del fotosistema II	5.17	65.6			X	X	X	X
	CRY1	Criptocromo 1, fotoreceptor que regula respuestas por luz	5.23	76.7	X	X	X	X	X	X
	HMOX2	Probable hemo oxigenasa inactiva, precursor de la biosíntesis de clorofila	4.7	25.2	X	X	X	X	X	X
	LIL32	Complejo cosechador de luz necesario para la biosíntesis de clorofilas fitiladas y alfa-tocoferol en plántulas	4.65	24.1	X	X	X	X	X	X
	LHCA5	Proteína de unión 5 Fotosistema I clorofila a / b	5.33	24.3	X	X	X	X	X	X



Tabla 6. Continuación.

Categoría <sup>1</sup>	Abreviatura <sup>2</sup>	Función de la proteína <sup>3</sup>	pI <sup>4</sup>	Mw (kDa) <sup>5</sup>	Expresión (estadio) <sup>6</sup>					
					I	II	III	IV	V	Hoja
Procesos celulares	SNX2A	Desarrollo, maduración y transporte de proteínas	5.17	65.5	X	X	X	X	X	X
	BOP1	Síntesis de la subunidad grande del ribosoma	5.14	85.4	X	X	X	X	X	X
	NIFU4	Maduración de proteínas por transferencia de hierro-azufre	4.46	25.5	X	X	X	X	X	X
	P2C04	Probable fosfatasa	5.22	74.3	X	X	X	X	X	X
	MTV1	Transporte vacuolar en el aparato de Golgi	5.31	76.2		X	X	X	X	X
	TENAE	Hidrolización del producto de tiamina	4.9	25.1	X	X	X	X	X	X
Biosíntesis y regulación de fitohormonas	ARFW	Probable factor 23 de respuesta a auxina	5.08	24.8	X	X	X	X	X	X

Tabla 6. Continuación.

Categoría <sup>1</sup>	Abreviatura <sup>2</sup>	Función de la proteína <sup>3</sup>	pI <sup>4</sup>	Mw (kDa) <sup>5</sup>	Expresión (estadio) <sup>6</sup>					
					I	II	III	IV	V	Hoja
Actividad de proteasa	RDL2	Posible cisteín-proteasa	4.32	25.2	X	X	X	X		
	SBT17	Proteasa que genera la salida de mucílago de la cubierta de la semilla y la acumulación y/o activación de enzimas que modifican la pared celular	6.38	67.6	X	X	X	X	X	X
	PPDEX	Peptidasa	4.87	25.3	X	X	X	X	X	X
	Y5656	Adaptador de sustrato de un complejo de ubiquitina E3	5.39	74.5				X	X	X
	PSA5A	Proteasoma subunidad alfa tipo 5A	4.7	25.9	X	X	X	X	X	X

<sup>1</sup> Categoría funcional y celular donde se encuentra la proteína ubicada identificada con las bases de datos.

<sup>2</sup> Nombre abreviado del gen que codifica la proteína y con el cual fue identificada en *Arabidopsis*.

<sup>3</sup> Indica la función específica de la proteína.

<sup>4</sup> Punto isoeléctrico de la proteína en pH detectado por el programa de análisis de geles 2-DE.

<sup>5</sup> Peso molecular de la proteína en kDa detectado por el programa de análisis de geles 2-DE.

<sup>6</sup> La marca indica en que condición específica la proteína fue expresada en los diferentes estadios fenológicos. Esta expresión es únicamente cualitativa.

## 6.6 Perfiles de fitohormonas en los estadios de infección

Los diferentes tipos de auxinas y citocininas analizadas fueron detectadas mediante LC-MS/MS como área bajo la curva, y se expresaron como porcentaje total de concentración de ambas fitohormonas en función del estadio (Tablas 7 y 8).

### 6.6.1 Citocininas

Encontramos que en los estadios I, II y III la citocinina más abundante fue DZ (0.7, 18.7 y 4.1%, respectivamente), el estadio IV tuvo un mayor porcentaje de cZOG (28.4%) y el estadio V de cZR (16.8%), al igual que la hoja, que a pesar de haber tenido poca detección de citocininas, fue el único tejido donde se encontró tZ9GN. En todos los estadios y en la hoja tuvieron concentraciones basales de D-iP (Tabla 7).

**Tabla 7. Perfiles de citocininas en los estadios diferenciales de infección de *P. calyculatus*.**

	Fitohormona <sup>2</sup>	Función <sup>3</sup>	Detección en estadios <sup>4</sup>					Hoja
			I	II	III	IV	V	
Citocininas <sup>1</sup>	O-Glucósido-trans-Zeatina (tZOG)	Responsable de la coloración verde en partes aéreas proporcionado por la raíz. Regulación de síntesis de clorofila en plantas de pepino (Kato <i>et al.</i> , 2002)	0.2 ± 0.2 b	0.5 ± 0.6 a,b	0.9 ± 1.4 a,b	ND	8.3 ± 13.6 a,b	ND
	O-Glucósido-cis-Zeatina (cZOG)	Regulación de niveles de cis-Zeatina, compuesto de almacenamiento y menor resistencia a degradación por oxidasas de citocininas. Se encuentra en la savia del xilema y se cree que son formas de transporte de Zeatina (Letham, 1994; Veach <i>et al.</i> , 2003; Stirk <i>et al.</i> , 2012).	0.4 ± 0.1 a,b	2.0 ± 21 b	2.5 ± 4.6 a,b	28.4 ± 19.6 a,b	5.8 ± 7.4 a,b	ND

Tabla 7. Continuación.

	Fitohormona <sup>2</sup>	Función <sup>3</sup>	Detección en estadios <sup>4</sup>					
			I	II	III	IV	V	Hoja
Citocininas <sup>1</sup>	9-Glucósido-trans-Zeatina (tZ9G)	Forma estable de almacenamiento de citocininas (Scott <i>et al.</i> , 1980).	ND	ND	ND	1.9 ± 1.6 b	ND	ND
	9-Glucurónido-trans-Zeatina (tZ9GN)	No hay estudios de funciones en plantas	ND	ND	ND	ND	ND	0.5 ± 0.8 a
	trans-Zeatina (tZ)	Responsable del desarrollo vascular y del xilema secundario. Disminuye en condiciones de estrés, incluyendo infecciones virales, estrés por temperatura y agua. Su movimiento se relaciona con la señalización raíz/partes aéreas (Li <i>et al.</i> , 2000; Sakakibara, 2006; Bajguz & Piotrowska, 2009; De Zio <i>et al.</i> , 2019).	ND	0.3 ± 0.4 b	ND	ND	ND	ND

Tabla 7. Continuación.

	Fitohormona <sup>2</sup>	Función <sup>3</sup>	Detección en estadíos <sup>4</sup>					
			I	II	III	IV	V	Hoja
Citocininas <sup>1</sup>	Dihidrozeatina (DZ)	Se encuentra en algunas semillas latentes de chinchilla ( <i>Tagetes minuta</i> ) y en el endospermo de semillas maduras de frijol ( <i>Phaseolus vulgaris</i> ). Responsable del crecimiento de hojas. Es importante para la inducción de botones florales en cultivos <i>in vitro</i> (Matsubara <i>et al.</i> , 1968; Martin <i>et al.</i> , 1989; van der Krieken <i>et al.</i> , 1991; Hluska <i>et al.</i> , 2016)	0.7 ± 0.3 a	18.7 ± 24.7 b	4.1 ± 5.5 a	1.5 ± 0.8 a	ND	ND
	Ribósido o-cis-Zeatina (cZR)	De menor actividad que su isómero Ribósido-trans-Zeatina (tZR) y se requiere en mayores concentraciones, pero es el más eficiente de las cis-Zeatinas. Es importante en la inducción de la división celular del cámbium en álamo negro, en callos de tabaco y soya, síntesis de clorofila en senescencia de hojas de avena. La acumulación de cZR se relaciona con la distribución de nutrientes en el tubérculo de papas para la formación de estolones, y en embriones de chícharos para detener el proceso de crecimiento. Tiene una alta resistencia a la degradación por oxidación en <i>Arabidopsis thaliana</i> expresada en la senescencia (Martin <i>et al.</i> , 1989; Hluska <i>et al.</i> , 2016).	0.1 ± 0.0 a,b	0.6 ± 0.4 b,c	0.8 ± 0.9 a,b	2.6 ± 2.1 a,b	16.8 ± 14.9 c	1.8 ± 2.5 a,b

Tabla 7. Continuación.

	Fitohormona <sup>2</sup>	Función <sup>3</sup>	Detección en estadíos <sup>4</sup>					
			I	II	III	IV	V	Hoja
Citocininas <sup>1</sup>	Cinetina	Estimulación de la división y elongamiento celular. Formación de brotes e iniciación del crecimiento de partes aéreas. Crecimiento de las hojas, promoción de la germinación de semillas. Inducción de raíces adventicias en presencia de IAA (DeRopp, 1956; Miller, 1961)	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	N <sup>6</sup> -Isopenteniladenina (iP)	Estabilización de los patrones vasculares, uso eficiente del agua. Acumulación en el floema. Su movimiento se relaciona con la señalización raíz/partes aéreas. Participación en el proceso de antesis y desarrollo de la floración e inducción fotoperiódica de la floración (Sakakibara, 2006); Flórez, 2008; De Zio <i>et al.</i> , 2019).	0.1 ± 0.0 a	7.6 ± 22.9 a	0.8 ± 0.7 a	ND	ND	ND
	N <sup>6</sup> -Benciladenina (BA)	Responsable de retención de clorofila y germinación de semillas. No juega un papel en la germinación pero está relacionada en la movilización de nutrientes. Responsable del retraso de senescencia y extensión de la vida de anaquel en vegetales cosechados (Zink, 1961; Tuli <i>et al.</i> , 1964; Matsubara <i>et al.</i> , 1968; Stirk <i>et al.</i> , 2012).	ND	ND	ND	ND	ND	ND

**Tabla 7. Continuación.**

Citocininas <sup>1</sup>	Fitohormona <sup>2</sup>	Función <sup>3</sup>	Detección en estadios <sup>4</sup>					
			I	II	III	IV	V	Hoja
	[ <sup>2</sup> H <sub>6</sub> ]N <sup>6</sup> - Isopenteniladenina (D-iP)	Control interno	0.5 ± 0.2 b	1.6 ± 1.3 b	4.5 ± 4.1 a,b	29.1 ± 12.0 b	27.4 ± 8.7 b	24.8 ± 22.8 a,b

<sup>1</sup> Categoría de las fitohormonas analizadas.

<sup>2</sup> Tipo de fitohormona detectada, con abreviatura entre paréntesis.

<sup>3</sup> Descripción conocida de la función de la fitohormona en otros modelos de plantas.

<sup>4</sup> Porcentaje detectado de la fitohormona en cada estadio infeccioso, ND = No detectada.

### 6.6.2 Auxinas

En auxinas (Tabla 8), encontramos que en el estadio I, IV y la hoja, la principal fitohormona es IAAD (15.6, 24.1 y 38.1%, respectivamente). De la misma manera, encontramos que la fitohormona IAG está mayor concentrada en el estadio I (90.8%), seguido del estadio II (62.5%) y III (78.7%), y las fitohormonas IAA y la 13C-IAA tuvieron concentraciones basales en los diferentes estadios. Comparando estos perfiles con las hojas las concentraciones cambian y por lo tanto la mayoría de estas fitohormonas están concentradas en el haustorio diferencialmente.

**Tabla 8. Perfiles de auxinas en los estadios diferenciales de infección de *P. calyculatus*.**

Auxinas <sup>1</sup>	Fitohormona <sup>2</sup>	Función <sup>3</sup>	Detección en estadios <sup>4</sup>					
			I	II	III	IV	V	Hoja
	Ácido Indol-3-Acetil-L-Aspártico (IAAD)	Detoxificación y catabolismo de IAA. Producto de principal vía de desactivación de auxinas, se oxida para ser glicosilado (Bajguz & Piotrowska (2009)).	6.9 ± 6.5 b	5.6 ± 5.1 a	6.3 ± 6.3 a	15.6 ± 13.9 a	24.1 ± 34.5 a	38.1 ± 44.5 a
	Ácido Indol-3-Acetil-L-Glutámico (IAG)	Detoxificación y catabolismo de IAA (Staswick <i>et al.</i> , 2005).	90.8 ± 92.6 b	62.5 ± 41.8 a	78.7 ± 75.3 a	9.7 ± 6.4 a	11.6 ± 14.2 a	17.0 ± 15.6 a

Tabla 8. Continuación.

	Fitohormona <sup>2</sup>	Función <sup>3</sup>	Detección en estadíos <sup>4</sup>					
			I	II	III	IV	V	Hoja
Auxinas <sup>1</sup>	Ácido Indol-3-Acetil-Alanina (IAA-Ala)	Presente en altos niveles en partes aéreas. Forma de almacenamiento de auxinas, se convierte rápidamente vía aminohidrolasas en IAA activo. Su hidrólisis está relacionada con expansión y división celular (Bajguz & Piotrowska, 2009)	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	Ácido Indol-3-acético (IAA)	Responsable del desarrollo del tejido vascular, iniciación de la radícula, desarrollo embrionario, control de la elongación y división celular y estructuración meristemática. Transmisor de señales ambientales (Sztein <i>et al.</i> , 1995; Vega-Celedón <i>et al.</i> , 2016).	0.2 ± 0.1 c	0.3 ± 0.4 b	ND	2.3 ± 2.3 a,b	1.4 ± 1.7 a,b	ND



**Tabla 8. Continuación.**

	Fitohormona <sup>2</sup>	Función <sup>3</sup>	Detección en estadíos <sup>4</sup>					
			I	II	III	IV	V	Hoja
Auxinas <sup>1</sup>	289	Sin etiqueta encontrada	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	[ <sup>13</sup> C <sub>6</sub> ]Ácido Indol-3-acético (13C-IAA)	Control interno	0.2 ± 0.1 b	0.4 ± 0.3 a,b	1.3 ± 1.2 a,b	9.0 ± 41.3 a,b	4.7 ± 5.1 a,b	14.2 ± 13.7 b

<sup>1</sup> Categoría de las fitohormonas analizadas.

<sup>2</sup> Tipo de fitohormona detectada, con abreviatura entre paréntesis.

<sup>3</sup> Descripción conocida de la función de la fitohormona en otros modelos de plantas.

<sup>4</sup> Porcentaje detectado de la fitohormona en cada estadio infectivo , ND = No detectada.

## 7 DISCUSIÓN

### 7.1 Fenología de infección

Esta es la primera vez que se realiza un estudio en un muérdago aéreo del género *P. calyculatus*, donde combinamos estudios fisiológicos y bioquímicos moleculares. Para ello analizamos los estadíos iniciales de *P. calyculatus* basándonos en lo ya reportado por Geils *et al.* (2002). Nos enfocamos en observaciones en cuanto al haustorio de los estadíos infectivos. Encontramos un crecimiento gradual relacionado a los diferentes estadíos fenológicos (Musselman & Dickson, 1975). Se han identificado “el cuerpo” y la “parte parental” de los haustorios de parásitas de raíz, las células intrusivas que comienzan la penetración se consideran la parte del haustorio denominada “endófito” encargado de la conexión más íntima con el hospedero (Musselman & Dickson, 1975), el cual fue identificado en nuestras observaciones a partir de la apertura de los cotiledones en *P. calyculatus*. La maduración del haustorio no depende de su tamaño como lo sugieren Musselman & Dickson (1975), ellos identificaron la existencia de haustorios de 11 mm de diámetro que son maduros, por lo que en *P. calyculatus* se podría inferir la maduración a partir del estadio III considerando su crecimiento vegetativo, las que incluyen hojas, flores y frutos en estado adulto. En contraste la floración y producción de frutos de *Psittacanthus schiedeanus* se da en la etapa de defoliación del hospedero *Liquidambar styraciflua* de noviembre a febrero (Cocoletzi *et al.*, 2016). Este evento disminuye la transpiración y provoca la acumulación de nutrientes en las ramas, los cuales son aprovechados por *P. schiedeanus* para producir las flores y frutos (Cocoletzi *et al.*, 2016), lo que sugiere que *P. calyculatus* tiene la capacidad de aprovechar los nutrientes del mezquite en etapas variadas de su ciclo de vida y no en una en específico. Los diferentes periodos de floración en *P. calyculatus* se deben a las distintas sincronías de infección de las semillas. La semilla siempre permanece adherida a la rama del hospedero en dirección de donde saldrá la radícula para comenzar la penetración, en cambio en otras especies de muérdago como *Struthanthus interruptus* (Tapia, 2016), donde la semilla tiene que direccionarse mediante la elongación del hipocótilo y la incorporación del embrión en posición vertical, teniendo una germinación epigea parecida a lo reportado en otras parásitas como *Agalinis aphylla* (Azevedo *et al.*, 2018). Esto pudiera estar relacionado con las señales de germinación abióticas como percepción de la luz y generación de tropismo hacia el hospedero, similar a lo que ocurre en *Cuscuta* spp. (Benvenuti *et al.*, 2005; Meulebrouck *et al.*, 2008). No se puede descartar la importancia de la presencia de luz como inducción de la germinación en la semilla de *P. calyculatus* por lo ya reportado (Knutson, 1983; Mathiasen *et al.*, 2008), sin embargo es necesario un estudio de las señales dadas por el hospedero para el reconocimiento y la compatibilidad de la infección, así como de los factores de inducción del haustorio, como lo recientemente reportado por Wada *et al.* (2019), que identificaron el compuesto 2,6-dimetoxi-p-benzoquinona (DMBQ) producido por el precursor ácido sirínigico cuya reacción involucra la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y todo está involucrado con el proceso de la formación del haustorio en *Striga hermonthica*. Si bien la viscina juega un papel importante en la adhesión de la semilla en los estadíos I y II, aún se podían remover fácilmente de la rama. Fue hasta el estadio III donde la semilla se encontraba fuertemente unida a la rama y logramos ver una penetración inicial evidente, sugiriendo una probable actividad enzimática.

## 7.2 Actividades de enzimas involucradas en el proceso infectivo

En este estudio se demostró por primera vez que el muérdago *P. calyculatus* utiliza enzimas para degradar y penetrar al hospedero y así iniciar la infección, contrario a lo que se creía antes donde la penetración sólo se le atribuía a una fuerza mecánica para conectarse al sistema vascular donde se encuentra el xilema y floema (Mathiasen *et al.*, 2008). Actualmente existen estudios en *Cuscuta reflexa* (Nagar *et al.*, 1983; Johnsen & Krause, 2014) y en *Orobancha aegyptiaca* (Singh & Singh, 1993) sobre actividades de celulasa responsables del proceso de penetración al hospedero, y de otras enzimas como xilanasa, proteasa, poligalacturonasa y pectin esterasa. Actualmente ya se considera la combinación de presión mecánica y actividades enzimáticas como los responsables de la penetración, tanto en plantas parásitas como en muérdagos (Pérez-de-Luque, 2013; Wahid *et al.*, 2015).

Reportamos que en *P. calyculatus* existe una alta actividad de celulasa tanto en ensayos cualitativos y cuantitativos. La actividad enzimática de celulasa fue mayor en el estadio III. Estos resultados están relacionados con lo que observamos inicialmente en la fenología, donde encontramos una penetración inicial en dicho estadio. La actividad de celulasa es activa desde el estadio de semilla madura, sin embargo, su actividad se magnifica en el estadio III, esto correlaciona con lo que observamos en el campo, que la radícula de infección penetró la corteza y posiblemente conectarse con los tejidos vasculares del hospedero. La cantidad de monómeros de glucosa en el duramen exterior del mezquite (45.7%) forma la mayor parte de su composición lignocelulítica (Carrillo *et al.*, 2008) y nos brinda una explicación de la alta actividad de esta enzima; de la misma manera, la enzima glucosidasa encargada de la disociación de la molécula de celobiosa en glucosa tuvo un incremento gradual en los primeros estadios teniendo su mayor actividad en el estadio III, disminuyendo en los estadios IV y V, sugiriendo que durante la penetración inicial en el estadio III también se genera la mayor incorporación de moléculas de glucosa en el metabolismo del muérdago, lo cual tiene sentido puesto que en el estadio IV ya se produjeron las primeras hojas verdaderas. La enzima endoglucanasa encargada de disociar los enlaces glucosídicos internos del polímero de celulosa tuvo sus mayores actividades en los estadios I, II y IV, sugiriendo el requerimiento de su acción en los estadios iniciales antes de que ocurra la penetración, y probablemente no se requiera en gran magnitud debido a la poca fuerza de los enlaces glucosídicos por los puentes de hidrógeno. Nagar *et al.* (1984) analizaron las actividades de las enzimas celulasa, exoglucosidasa y glucosidasa, donde la glucosidasa presentó mayor actividad en *Cuscuta reflexa*, seguido de exoglucosidasa y celulasa, sugiriendo que se requiere mayor concentración de la enzima exoglucosidasa que de la enzima glucosidasa. La hemicelulosa se encuentra en secciones más profundas de los tejidos de la corteza en comparación con la celulosa, y ya se había sugerido que la actividad de xilanasa en función con el proceso de infección comienza una vez que enzimas como celulosa, poligalacturonasa y proteasa iniciaran la degradación y apertura de los tejidos (Singh & Singh, 1993). Nuestras observaciones fueron que la actividad de xilanasa fue mayor en el estadio I, disminuyendo en los estadios II y III y volvió a incrementar en el estadio IV, y V, similar a lo reportado (Singh & Singh, 1993), ya que la actividad incrementa en los últimos estadios donde la actividad de celulasa disminuye, sugiriendo el inicio de la actividad de xilanasa una vez que la celulasa ya penetró los tejidos más externos. Similar a nuestros resultados, Singh & Singh (1993) encontraron una mayor actividad de celulasa y menor actividad de xilanasa en *Orobancha aegyptiaca* en la infección con *Brassica campestris*. En contraste con *Cuscuta reflexa*, Olsen & Krause (2017) encontraron una

mayor actividad de la enzima xiloglucano endotransglicosilasa/hidrolasa (XTH), encargada de disociar las moléculas de xiloglucano, en la etapa de penetración en el hospedero *Pelargonium zonale*. Esta diferencia de actividad se podría explicar con la composición lignocelulítica del hospedero, ya que en la composición química del mezquite, el 12.0% del total es de monómeros de xilosa, menor al de los monómeros de glucosa, por lo que se justifica las magnitudes menores de la actividad de xilanasa en comparación con la de celulasa. Las asimilaciones de los monómeros liberados por las actividades enzimáticas se podrían explicar con la expresión de proteínas relacionadas con el metabolismo de carbohidratos, así como otros procesos celulares importantes para el crecimiento del muérdago.

### 7.3 Perfiles proteómicos de los estadios de infección

Nuestro estudio demostró diferencias cualitativas en patrones proteómicos en los diferentes estadios de infección de *P. calyculatus* en una y dos dimensiones. Estos cambios se pudieron observar principalmente en la subunidad grande de la Rubisco (Ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa) con un rango de peso de 50-55 kDa, la cual tiene una mayor intensidad en los estadios I y II y disminuye subsecuentemente. En la hoja se mantiene aproximadamente de la misma intensidad que en el estadio III, la cual tomamos como referencia, dado que se trata de una enzima que cataliza el primer paso de asimilación del dióxido de carbono fotosintético y la oxidación del carbono fotorrespiratorio (Spreitzer & Salvucci, 2002). Su actividad es inhibida por la presencia de oxígeno que probablemente es lo que sucede en los estadios donde disminuye su intensidad. También se muestra una variación interesante en la región de peso de los 15 kDa, siendo más intensa en los estadios I, IV y V y desapareciendo en los demás. Todos estos cambios son cualitativos y no se puede concluir nada concreto al respecto, sin embargo, se llevó a cabo la identificación bioinformática y putativa de algunas proteínas detectadas en los perfiles en 2-DE, de las cuales la mayoría pertenece a la categoría de procesamiento y regulación de la información genética como factores de transcripción (NFY5 y ERF16) y reguladores del mRNA para la formación de la hoja (ECT4 y BLH4), cuya intensidad en los geles 2-DE fue aumentando conforme el muérdago crecía. La segunda categoría más abundante fue la de procesos celulares, en donde se encuentran proteínas relacionadas con la síntesis de proteínas (SNX2A y NIFU4), el ribosoma (BOP1) y transporte en el aparato de Golgi (MTV1). No se descarta la posibilidad de que alguna de estas proteínas pertenezca al hospedero y no solo se encargue de los procesos celulares del muérdago, sin embargo, solo fueron detectadas proteasas relacionadas con la salida de mucílago de la semilla y activación de enzimas que modifican la pared celular (SBT17), posiblemente relacionadas con la germinación de la semilla mediante la degradación de los componentes del endocarpo (Hung & Lai, 2019), además de la posible función para la degradación de la pared celular del hospedero; otras relacionadas con la ubiquitinación (Y5656) y otras proteasas sin función específica reportada (PPDEX y PSA5A) cuya intensidad también fue creciendo conforme avanzaba el establecimiento del muérdago, sugiriendo una relación de estas proteínas en el proceso de degradación de las proteínas del hospedero como mecanismo de supresión del sistema inmune y un establecimiento de la infección exitosa. Algunas de estas proteínas disminuían en el estadio IV donde ya se había establecido la conexión, sugiriendo una relación con el proceso inicial de penetración, sin embargo la actividad de estas proteínas seguía ya que es probable que las respuestas de defensa del mezquite hayan seguido activas. La posible cisteína proteasa (RDL2) detectada con los mismos patrones de intensidades como las demás

proteasas está documentada ser la responsable de distintos procesos importantes como el desarrollo de reservas nutricionales, degradación de proteínas de almacenamiento en la germinación de la semilla y activación de proenzimas (Castillejo *et al.*, 2004), todas estas proteínas posiblemente están relacionadas con procesos metabólicos en el muérdago, sin embargo también se conoce que están relacionadas con la defensa contra predadores mediante la degradación de proteínas exógenas (Boller, 1986), sugiriendo también una posible función proveniente del mezquite mediante inhibidores de proteasas. Como se sugirió en la sección de actividades enzimáticas, fueron identificadas varias proteínas relacionadas con el transporte de carbohidratos (JAL47), movilización de sucrosa (INVA4), sensor de monosacáridos (MSSP1) y beta-galactosidasa (BGA) probablemente relacionadas con la asimilación inicial de monómeros producto de la degradación de la pared celular ya que disminuyen a partir del estadio IV. Castillejo *et al.* (2004) reportaron proteínas relacionadas con el metabolismo de carbohidratos como fructoquinasa y fructosa-bifosfato aldolasa en la interacción *Orobanche crenata-Pisum sativum*, que fueron sugeridas como una forma regulatoria del flujo de carbono. En relación a la energía celular, se encontraron posibles proteínas relacionadas con la activación de la GTPasa (RGAP7), el intercambio de GDP a ATP (EF1D2), una posible ATPasa (ATP7), y una posible shiquimato quinasa inactiva (SKL1), utilizada para sintetizar shiquimato-3-fosfato, precursor de aminoácidos y metabolitos secundarios responsables del desarrollo y crecimiento de la planta, así como respuestas a estrés (Fucile *et al.*, 2008). Otra categoría con importante cantidad de proteínas identificadas fue la de mantenimiento de la fotosíntesis, donde se encuentran proteínas con relación a la reparación del fotosistema II, un criptocromo, precursor de biosíntesis de clorofila y proteína de unión al fotosistema I, todas estas pudiendo tener una relación con las altas tasas respiratorias observadas en las parásitas como mecanismo para la toma de nutrientes del hospedero hacia ellas, consecuencia del bajo estrés hídrico que genera un flujo de agua y sales minerales (Jiang *et al.*, 2003; Raya-Pérez *et al.*, 2014). En relación a la respuesta generada por el mezquite, se puede relacionar la identificación de la proteína PHO34 relacionada con la respuesta a estrés, similar a lo encontrado en el análisis proteómico en *Cuscuta australis* (Li *et al.*, 2010) los cuales reportaron la presencia de la proteína GAPDH involucrada en la glicólisis y glucogénesis y también relacionada con estrés anaerobio, choque térmico, distribución de sucrosa y estrés por daño mecánico, y en *Orobanche crenata* (Castillejo *et al.*, 2011), quienes sugirieron que existe un mecanismo de defensa actuando en etapas tempranas de infección mediado por *Pisum sativum*, encontrando proteínas con actividad de proteasa que también pudieran estar relacionadas con mecanismos de bloqueo de la penetración. Interesantemente, se encontró una proteína posiblemente relacionada con la respuesta a auxina (ARFW) que fue disminuyendo conforme al desarrollo del muérdago.

Estos eventos moleculares nos permiten entender mejor los procesos en la germinación de la semilla y otras enzimas involucradas en el proceso de infección. Como aproximación molecular, hemos avanzado rápidamente en el entendimiento de la comunicación entre un muérdago y un árbol.

#### 7.4 Perfiles de fitohormonas en estadíos de infección

Realizamos la cuantificación de 5 auxinas y 10 citocininas en los estadíos de infección de *P. calyculatus*. En auxinas, los estadíos I, II y III el mayor porcentaje fue de IAG, la cual tiene funciones en la detoxificación de exceso de auxinas. En los estadíos IV, V y en la hoja fue de IAAD, que tiene función parecida para desactivación de auxinas. De acuerdo con Delavault *et al.* (2017), la vía de regulación de las auxinas es requerida en la formación temprana del haustorio de *Phtheirospermum japonicum* así como para el transporte y utilización de nutrientes, lo cual sugiere que en los cinco estadíos existe una importante regulación de IAA relacionada con la formación del haustorio y una correcta utilización de los nutrientes, muy similar a lo reportado por Tomilov *et al.* (2005), quienes reportaron que en *Triphysaria versicolor* existe una acumulación de auxinas en etapas tempranas del desarrollo del haustorio y que ocasiona que la parásita genere mecanismos específicos relacionadas con la infección. Similarmente, Zhang *et al.* (2016) encontraron que en *Thesium chinense* existe una sobreexpresión de genes relacionados con auxinas en el haustorio, indicando la importancia de estas fitohormonas en el desarrollo del haustorio. Esto sugiere que los conjugados de auxinas como IAG y IAAD están presentes como forma de regulación de IAA y que se puedan desarrollar correctamente los mecanismos relacionados con la infección como lo es la formación del haustorio, el transporte y la utilización de nutrientes por parte del hospedero. Como fue hipotetizado, IAA fue detectado en menores proporciones en todos los estadíos, sugiriendo una expresión basal. Esta forma activa de las auxinas es responsable del desarrollo del tejido vascular, iniciación de la radícula, control de la elongación y división celular y transmisor de señales ambientales, y en parásitas como *Cuscuta reflexa* se encontró una relación en la formación de un epitelio adhesivo-secretorio en tomate (Löffler *et al.*, 1999), así como en la germinación de semillas de *Phelipanche ramosa* y *Orobancha cumana* al tener contacto con los exudados de las raíces de tabaco y girasol (Spallek *et al.*, 2017). IAAla no fue detectada en ninguno de los estadíos. Esta auxina está relacionada con liberación de auxinas activas y expansión celular, lo que sugiere que probablemente no se requiera de su vía de regulación de auxinas en los estadíos estudiados.

En citocininas, en los estadíos I, II y III DZ fue la detectada en mayor proporción, responsable del crecimiento de hojas y altamente presente en semillas latentes y en endospermos, relacionándose con el proceso de expansión del endospermo, germinación y utilización de los nutrientes para el desarrollo de las hojas verdaderas. En el estadío IV, cZOG fue la más detectada, una forma de almacenamiento de cis-Zeatinas presente en la savia del xilema y se cree que es una forma de liberación de Zeatinas activas, sugiriendo que en este estadío se genera en mayor proporción la división celular y la formación de órganos, que es donde se genera el crecimiento vegetativo evidente en el muérdago, así como el crecimiento del haustorio. En el estadío V y la hoja cZR es importante en la inducción de la división celular del cámbium, síntesis de clorofila y para retardar la senescencia. En *Phtheirospermum japonicum*, una planta parásita de raíz en *Arabidopsis*, los niveles de citocininas bioactivas aumentaron con una movilización de esta fitohormona hacia el hospedero, provocando cambios en respuestas celulares, división y diferenciación celular, modificando la morfología de la raíz e impactando negativamente con la estabilidad del hospedero (Spallek *et al.*, 2017), por lo que también se puede relacionar la cantidad de citocininas activas como cis-Zeatinas en el proceso de infección del muérdago. Las fitohormonas Cinetina y BA no fueron detectadas en ninguno de los estadíos. Son importantes para la estimulación de la división y elongamiento celular, y retardar la senescencia, respectivamente. Esto no quiere decir que no se

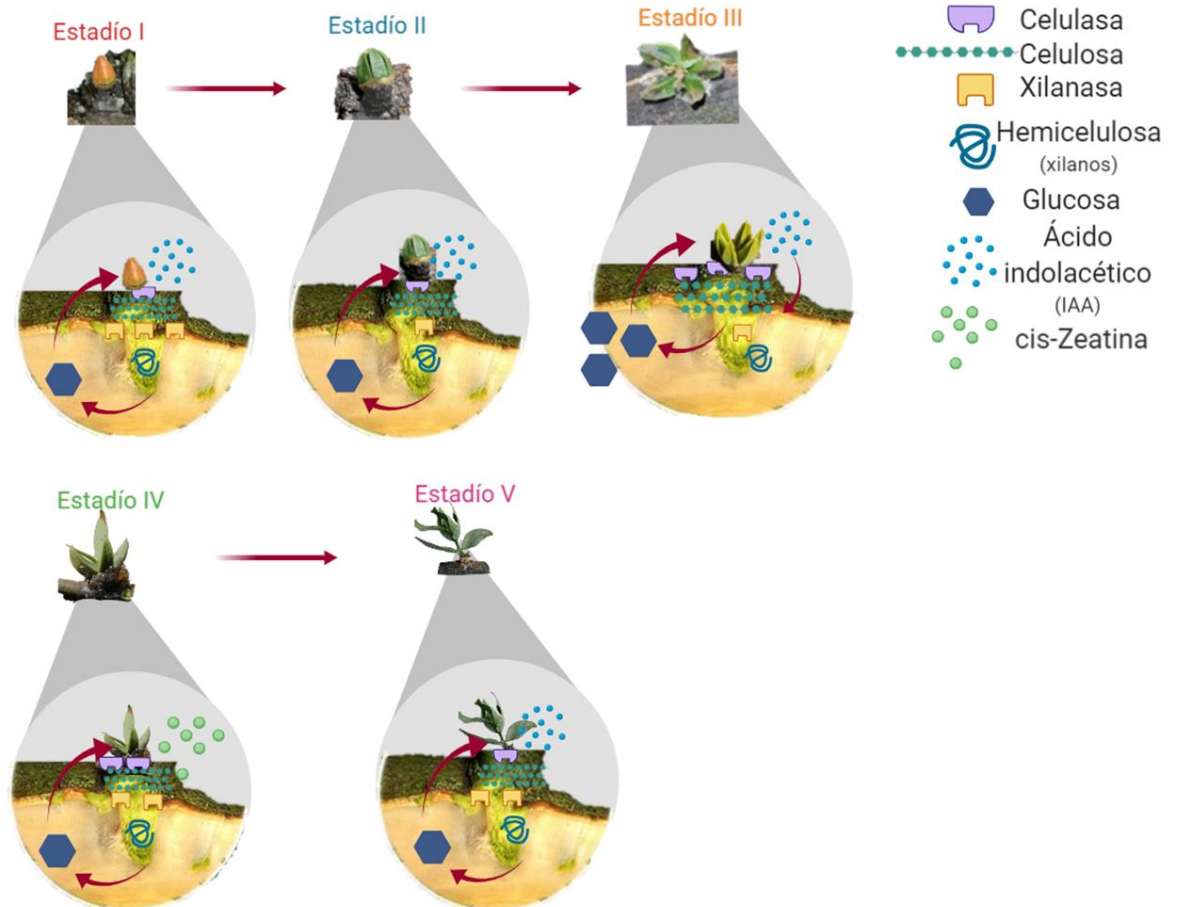
estén llevando a cabo estos procesos celulares en los estadios de infección, sugiriendo que quizá esos procesos los esté realizando alguna otra forma de citocinina. tZ9G sólo fue detectada en el estadio IV, es una forma estable de almacenamiento de citocininas que sirve como liberación de citocininas activas, sugiriendo que se mantiene una concentración moderada de citocinas activas de forma que se activan en el momento biológico requerido. tZ9GN sólo fue detectada en hojas y su función en plantas no ha sido documentada. tZ sólo fue detectado en el estadio II, esta es la citocinina más importante dada su alta actividad, es responsable del desarrollo vascular y desarrollo del xilema secundario y tiene función en la señalización raíz/partes aéreas, pudiendo estar relacionada con el asentamiento inicial del muérdago y la posterior penetración que se generó en el estadio III. iP no fue detectada en estadios IV, V y en la hoja, citoquinina relacionada con el uso eficiente del agua y es acumulada en el floema, lo cual se correlaciona con el establecimiento del muérdago una vez que se realizó la conexión con el sistema vascular.

Tomando en cuenta estos resultados, se puede inferir que en los estadios I, II y III, ocurrió una dominancia apical para el crecimiento y desarrollo de las hojas, con la presencia de DZ y la detoxificación de IAA. En estos estadios también hubo una mayor proporción de iP. En los estadios IV, V y en la hoja también hubo una represión de auxinas con IAAD y una inducción de citocininas con cZOG que además es una forma de transporte de Zeatinas para llevarlos a los demás tejidos y cZR, que se presentó en mayor proporción en el estadio V y en la hoja para síntesis de clorofila. IAA es importante para la iniciación de la radícula y fue detectada principalmente en los estadios IV y V. La citoquinina tZOG responsable del coloramiento verde y síntesis de clorofila fue aumentando gradualmente en los estadios, aunque no fue detectada en la hoja. La variación en los conjugados O-Glucósidos de las citocininas (tZOG y cZOG) están relacionados con el aumento de la actividad  $\beta$ -glucosidasa, que es capaz de liberar formas libres de citocininas a partir de sus conjugados de glucósidos (Scott *et al.*, 1980; Estruch *et al.*, 1991). Estos compuestos están menos presentes en los primeros estadios ya que no se presentan durante la germinación de la semilla (Li *et al.*, 2000), por lo cual la liberación de las citocininas se da en estadios posteriores.

### **7.5 Modelo de infección inicial de *P. calyculatus* en árboles de mezquite**

Mostramos un modelo generalizado donde se incorporan las biomoléculas encontradas como responsables del proceso de infección (Figura 32). Podemos hipotetizar que en el estadio I las condiciones ambientales como temperatura, luz y procesos de degradación del endocarpo podrían disparar la germinación en conjunto con otras moléculas del hospedero (COVs, compuestos degradados de la corteza por las enzimas, estrés oxidativo, etc.), posteriormente en el estadio II, donde aún no hay indicios de penetración, se genera la compatibilidad con el hospedero mediante estas moléculas liberadas producto de la degradación de la corteza. Los resultados encontrados sugieren que la celulosa degradada por cada uno de los estadios generará moléculas de glucosa que serán asimiladas por *P. calyculatus*, usándolas para su metabolismo en la incorporación de la glucólisis, y por lo tanto generando ATP (Kleczkowski, 1994). La mayor producción de glucosa estaría en el estadio III dada la alta actividad de celulasas en esta etapa, en donde ya comenzó la penetración al hospedero, así como la acción de otras proteínas con actividad de proteasa para la degradación de la madera del mezquite. Esta fuente de glucosa sólo es una parte del total que genera el muérdago mediante la fotosíntesis, y una vez que establece la conexión con el sistema

vascular del mezquite en el estadio IV, se genera la formación del haustorio, adquiriendo las moléculas directamente del flujo de nutrientes, puesto que el suministro de carbono del hospedero representa más del 60% del requerimiento de la parásita (Marshall and Ehleringer, 1990). La actividad de xilanasa aparece después de la degradación inicial de la celulosa, también contribuyendo a la incorporación de monómeros de carbono para el desarrollo inicial de la radícula de infección y subsecuentemente de la planta parásita, involucrando proteínas relacionadas con el almacenamiento y transporte de moléculas de carbono. Las fitohormonas IAA y cis-Zeatina están involucradas en los procesos de formación del haustorio y división celular, respectivamente, donde IAA se mantuvo presente en todos los estadios y cis-Zeatina incrementó en el estadio IV donde en conjunto con la acumulación de IAA observamos que se forma el haustorio, relacionado a la acción de la división celular. En el estadio V se eficientiza el uso y transporte de los nutrientes, así como la regulación de la fotosíntesis y la fotorrespiración para la generación del gradiente necesario en las parásitas para direccionar el flujo de nutrientes hacia ellas.



**Figura 32. Modelo hipotetizado de la utilización de biomoléculas involucradas en el proceso de infección en estadios diferenciales de *P. calyculatus*.** La semilla del muérdago germina gracias a las condiciones ambientales favorables como temperatura y luz, y una posible inducción mediada por moléculas liberadas por el hospedero (estadio I), una vez que se establece la compatibilidad (estadio



II) así como una probable supresión de los mecanismos de defensa del mezquite con la presencia de proteínas relacionadas con el procesamiento de la información genética, la semilla se asienta y comienza el proceso de penetración gracias a la presencia de IAA para la formación de la radícula (estadio III), penetrando al floema y después al xilema, utilizando primero celulasas, luego xilanasas (estadio IV), así como otras proteínas con actividad de proteasa para la degradación de la madera del mezquite; en este estudio se desconoce la acción de enzimas importantes como pectin esterasa relacionada con la degradación de la pectina, así como de peroxidasas y lacasas relacionadas con la degradación de la lignina. Los monómeros generados por estos procesos de degradación son utilizados para la integración en el metabolismo del mezquite y así la división celular que da origen a la formación de hojas verdaderas en el estadio IV así como la formación del haustorio en este mismo estadio. Finalmente, en el estadio V se llegó al sistema vascular del mezquite obteniendo los nutrientes directamente del mezquite, concentrándose en la correcta utilización de estos y de una regulación de la fotosíntesis y la fotorrespiración para la generación del gradiente necesario en las parásitas para direccionar el flujo de nutrientes hacia ellas.

## 8 CONCLUSIONES

Analizamos la fenología de infección de *P. calyculatus* en árboles de mezquite. Observamos que la penetración comienza en el estadio III y la formación del haustorio en el estadio IV.

Determinamos que en el estadio III la enzima que mostró mayor actividad fue celulasa, seguido de glucosidasa, xilanasa y gluconasa. Esto concuerda con el inicio de la penetración y desarrollo del haustorio. De igual manera, los perfiles de proteínas tienen cambios a partir del estadio III.

La detección de proteínas putativas provenientes de la separación 2-DE con mayor diferencia cualitativa en intensidad reveló que la mayoría están involucradas con la actividad de proteasas, procesos celulares, procesamiento y regulación de la información génica.

La cuantificación de las fitohormonas mostró auxinas y citocininas involucradas en señales del desarrollo, establecimiento de la plántula, aparición de cotiledones y emergencia de la radícula.

Este estudio sienta las bases para el entendimiento de las biomoléculas involucradas en el proceso de infección del muérdago en mezquite lo cual en un futuro permitirá desarrollar un método de control.

## 9 PERSPECTIVAS

Se necesita realizar la secuenciación *de novo* de las proteínas separadas por 2-DE y obtener exactamente la función de cada proteína involucrada en los procesos iniciales de infección.

Realizar un análisis de microRNAs de los estadios con mayor nivel de diferenciación para estudiar su posible relación con la supresión del sistema inmune del hospedero, tal como sucede en *Cuscuta campestris* infectando *Arabidopsis thaliana* (Shahid *et al.*, 2018). En este sentido, también se analizarían los niveles de expresión de los genes involucrados en procesos como actividad de proteasa, los genes codificantes de enzimas degradativas del material lignocelulósico y la producción de microRNAs.

Se ha detectado que existen flavonoides, quinonas y polifenoles derivados de la corteza que estimulan la generación y desarrollo del haustorio, para ello se deben realizar estudios metabolómicos por cada estadio para conocer los cambios metabólicos celulares entre el huésped y la planta parásita. Nos serviría de apoyo ya que ciertos metabolitos están involucrados en el desarrollo del haustorio.

Determinar otras actividades enzimáticas para enzimas como peroxidasas, superóxido dismutasa y catalasa involucradas en el proceso de infección importante para la formación del haustorio (Wada & Yoshida, 2019).

## 10 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abúndez, A. (2016, agosto 22).** Muérdago: una amenaza para nuestros árboles. **Instituto Cultural de León.** Recuperado el 02 de julio de 2019 de <http://institutoculturaldeleon.org.mx/icl/story/4437/Mu-rdago-una-amenaza-para-nuestros-rboles#.XP8I4BZKjIU>.
- Akhter, G., & Khan, T. A. (2018).** First report of *Orobanche cernua* parasitism on *Allium sativum* in Banda district of Uttar Pradesh, India. **Indian Phytopathology**, 71(3), 463-464.
- Alakonya, A., Kumar, R., Koenig, D., Kimura, S., Townsley, B., Runo, S., Garces, H. M., Kang, J., Yanez, A., David-Schwartz, R., Machuka, J. & Sinha, N. (2012).** Interspecific RNA interference of SHOOT MERISTEMLESS-like disrupts *Cuscuta pentagona* plant parasitism. **The Plant Cell**, 24(7), 3153-3166.
- Albert, M., Werner, M., Proksch, P., Fry, S. C., & Kaldenhoff, R. (2004).** The cell wall-modifying xyloglucan endotransglycosylase/hydrolase LeXTH1 is expressed during the defence reaction of tomato against the plant parasite *Cuscuta reflexa*. **Plant Biology**, 6(04), 402-407.
- Aly, R., Cholakh, H., Joel, D. M., Leibman, D., Steinitz, B., Zelcer, A., Naglis, A., Yarden, O. & Gal-On, A. (2009).** Gene silencing of mannose 6-phosphate reductase in the parasitic weed *Orobanche aegyptiaca* through the production of homologous dsRNA sequences in the host plant. **Plant biotechnology journal**, 7(6), 487-498.
- Arriola-Padilla, V. J., Velasco-Bautista, E., Hernández-Tejeda, T., González-Hernández, A., & Romero-Sánchez, M. E. (2013).** Los muérdagos verdaderos del arbolado de la Ciudad de México. **Revista mexicana de ciencias forestales**, 4(19), 34-45.
- Auger, B., Pouvreau, J. B., Pouponneau, K., Yoneyama, K., Montiel, G., Le Bizec, B., Yoneyama, K., Delavault, P., Delourme, R., & Simier, P. (2012).** Germination stimulants of *Phelipanche ramosa* in the rhizosphere of *Brassica napus* are derived from the glucosinolate pathway. **Molecular plant-microbe interactions**, 25(7), 993-1004.
- Azevedo, J. M. L., Santos, C. G. G., Caires, C. S., Araujo Neto, J. C., & Souza, R. C. (2018).** Morphometry and Germination of *Passovia pyrifolia*, *Struthanthus marginatus* and *Phoradendron mucronatum* Diaspores. **Planta Daninha**, 36.
- Azpeitia, F., & Lara, C. (2006).** Reproductive biology and pollination of the parasitic plant *Psittacanthus calyculatus* (Loranthaceae) in central México. **The Journal of the Torrey Botanical Society**, 133(3), 429-439.
- Bajguz, A., & Piotrowska, A. (2009).** Conjugates of auxin and cytokinin. **Phytochemistry**, 70(8), 957-969.

- Baker, D. (2000).** Vascular transport of auxins and cytokinins in *Ricinus*. **Plant Growth Regulation**, 32(2-3), 157-160.
- Barkman, T. J., McNeal, J. R., Lim, S. H., Coat, G., Croom, H. B., & Young, N. D. (2007).** Mitochondrial DNA suggests at least 11 origins of parasitism in angiosperms and reveals genomic chimerism in parasitic plants. **BMC Evolutionary Biology**, 7(1), 248.
- Béguin, P., & Aubert, J. P. (1994).** The biological degradation of cellulose. **FEMS microbiology reviews**, 13(1), 25-58.
- Bello Gonzales, M.A., & Gutiérrez Garduño, M. (1985).** Clave para la identificación de la familia Loranthaceae en la porción del Eje Neovolcánico localizado dentro del Estado de Michoacán. **Ciencia Forestal**. 10(54), 3-33.
- Benvenuti, S., Dinelli, G., Bonetti, A., & Catizone, P. (2005).** Germination ecology, emergence and host detection in *Cuscuta campestris*. **Weed Research**, 45(4), 270-278.
- Boerjan, W., Ralph, J., & Baucher, M. (2003).** Lignin biosynthesis. **Annual review of plant biology**, 54(1), 519-546.
- Boller, T. (1986).** Roles of proteolytic enzymes in interactions of plants with other organisms. **Plant proteolytic enzymes**, 1, 67-96.
- Bradford, M. M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, 72(1-2), 248-254.
- Buendía-González, L., Orozco-Villafuerte, J., Cruz-Sosa, F., Barrera-Díaz, C. E., & Vernon-Carter, E. J. (2010).** *Prosopis laevigata* a potential chromium (VI) and cadmium (II) hyperaccumulator desert plant. **Bioresource Technology**, 101(15), 5862-5867.
- Carrillo, A., Mayer, I., Koch, G., & Hapla, F. (2008).** Wood anatomical characteristics and chemical composition of *Prosopis laevigata* grown in the northeast of Mexico. **IAWA journal**, 29(1), 25-34.
- Castillejo, M. A., Amiour, N., Dumas-Gaudot, E., Rubiales, D., & Jorrín, J. V. (2004).** A proteomic approach to studying plant response to crenate broomrape (*Orobanche crenata*) in pea (*Pisum sativum*). **Phytochemistry**, 65(12), 1817-1828.
- Castillejo, M. A., Maldonado, A. M., Dumas-Gaudot, E., Fernández-Aparicio, M., Susín, R., Diego, R., & Jorrín, J. V. (2009).** Differential expression proteomics to investigate responses and resistance to *Orobanche crenata* in *Medicago truncatula*. **BMC Genomics**, 10(1), 294.
- Castillejo, M. A., Fernández-Aparicio, M., & Rubiales, D. (2011).** Proteomic analysis by two-dimensional differential in gel electrophoresis (2D DIGE) of the early response of *Pisum sativum* to *Orobanche crenata*. **Journal of experimental botany**, 63(1), 107-119.

- Castillo-Campos, G., Medina-Abreo, M. E., & Acevedo-Rosas, R. (2018).** El género *Psittacanthus* (Loranthaceae) en Veracruz, México. **Acta botánica mexicana**, (124).
- Castro, A. (2019, abril 15).** Combaten “a ciegas” muérdago. **Periódico AM**. Recuperado el 13 de agosto de 2019.
- Cervantes Badillo, M. G. (2006).** Escrutinio de compuestos bioactivos en especies americanas de muérdago. **Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica**. Tesis de maestría.
- Cervantes, J. M. O., Rodríguez, E. Q., Ramírez, V. L., & Alvarez, R. M. A. (2016).** Actividad antimicrobiana de extractos de hoja de muérdago *Psittacanthus calyculatus*. **JÓVENES EN LA CIENCIA**, 2(1), 21-25.
- Cházaro, M., & Oliva, R. (1988).** Loranthaceae del centro de Veracruz y zona limítrofe de Puebla, IV. **Cactáceas y Suculentas Mexicanas**, 33(1), 14-19.
- Clarke, C. R., Timko, M. P., Yoder, J. I., Axtell, M. J., & Westwood, J. H. (2019).** Molecular Dialog Between Parasitic Plants and Their Hosts. **Annual review of phytopathology**, 57(1).
- Comisión Nacional Forestal (2010).** Manual de sanidad forestal. Recuperado el 12 agosto de 2019  
<http://www.conafor.gob.mx:8080/documentos/ver.aspx?articulo=810>
- Cocolezzi, E., Angeles, G., Ceccantini, G., Patrón, A., & Ornelas, J. F. (2016).** Bidirectional anatomical effects in a mistletoe–host relationship: *Psittacanthus schiedeanus* mistletoe and its hosts *Liquidambar styraciflua* and *Quercus germana*. **American journal of botany**, 103(6), 986-997.
- Cosgrove, D. J. (2000).** Loosening of plant cell walls by expansins. **Nature**, 407(6802), 321.
- Davies, P. J. (Ed.). (2004).** Plant hormones: biosynthesis, signal transduction, action!. **Springer Science & Business Media**, 3-14.
- Delavault, P., Estabrook, E., Albrecht, H., Wrobel, R., & Yoder, J. I. (1998).** Host-root exudates increase gene expression of asparagine synthetase in the roots of a hemiparasitic plant *Triphysaria versicolor* (Scrophulariaceae). **Gene**, 222(2), 155-162.
- Delavault, P., Montiel, G., Brun, G., Pouvreau, J. B., Thoiron, S., & Simier, P. (2017).** Communication between host plants and parasitic plants. **En Advances in Botanical Research**, 55-82. Academic Press.
- Del Castillo, A. (2016, abril 25).** Muérdago, azote de los árboles, tiene nueva cura. **Periódico Milenio**. Recuperado de <https://www.milenio.com/estados/muerdago-azote-de-los-arboles-tiene-nueva-cura> el 20 de agosto de 2019
- DeRopp, R. S. (1956).** Kinetin and auxin activity. **Plant physiology**, 31(3), 253.

- De Zio, E., Trupiano, D., Karady, M., Antoniadi, I., Montagnoli, A., Terzaghi, M., Chiantotec, D., Ljung, K., & Scippa, G. S. (2019). Tissue-specific hormone profiles from woody poplar roots under bending stress. *Physiologia plantarum*, 165(1), 101-113.
- Diopan, V., Adam, V., Havel, L., & Kizek, R. (2009). Phytohormones as important biologically active molecules—their simple simultaneous detection. *Molecules*, 14(5), 1825-1839.
- Doi, R. H., & Kosugi, A. (2004). Cellulosomes: plant-cell-wall-degrading enzyme complexes. *Nature reviews microbiology*, 2(7), 541.
- Estruch, J. J., Chriqui, D., Grossmann, K., Schell, J., & Spena, A. (1991). The plant oncogene rolC is responsible for the release of cytokinins from glucoside conjugates. *The EMBO journal*, 10(10), 2889-2895.
- Fischer, L., Lipavska, H., Hausman, J. F., & Opatrny, Z. (2008). Morphological and molecular characterization of a spontaneously tuberizing potato mutant: an insight into the regulatory mechanisms of tuber induction. *BMC plant biology*, 8(1), 117.
- Flores, P. (2018, marzo 29). En Parque Panorama abunda el muérdago. *Milenio*. Recuperado el 12 agosto de 2019 <https://www.milenio.com/estados/en-parque-panorama-abunda-el-muerdago>.
- Flint, H. J., & Bayer, E. A. (2008). Plant cell wall breakdown by anaerobic microorganisms from the mammalian digestive tract. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1125(1), 280-288.
- Flórez, V. J. (2008). Las citoquininas están asociadas al desarrollo floral de plantas de *Solidago x luteus* en días cortos. *Agronomía Colombiana*, 26(2), 226-236.
- Frías-Hernández J. Olalde-Portugal V. & Vernon-Carter E. (2000). El Mezquite árbol de usos múltiples. Estado actual del conocimiento en México. *Universidad de Guanajuato*, p. 247
- Fucile, G., Falconer, S., & Christendat, D. (2008). Evolutionary diversification of plant shikimate kinase gene duplicates. *PLoS genetics*, 4(12).
- Fulbright, T. E., & Ortega-Santos, J. A. (2007). *Ecología y manejo de venado cola blanca*. Texas A&M University Press.
- Furuhashi, T., Furuhashi, K., & Weckwerth, W. (2011). The parasitic mechanism of the holostemparasitic plant *Cuscuta*. *Journal of plant interactions*, 6(4), 207-219.
- Gaertner, E. E. (1950). Studies of seed germination, seed identification, and host relationships in dodders, *Cuscuta* spp. *Memoirs. Cornell Agricultural Experiment Station*, 294.
- Gajdošová, S., Spíchal, L., Kamínek, M., Hoyerová, K., Novák, O., Dobrev, P. I., Galuszka, P., Klíma, P., Gaudinová, A., Hanuš, J., Dancák, M., Trávníček, B., Pesek, B.,

- Krupicka, M., Vanková, R., Strnad, M., & Motyka V. (2011).** Distribution, biological activities, metabolism, and the conceivable function of cis-zeatin-type cytokinins in plants. *Journal of Experimental Botany*, 62(8), 2827-2840.
- Gedalovich-Shedletzky, E., Delmer, D. P., & Kuijt, J. (1989).** Chemical composition of viscin mucilage from three mistletoe species—a comparison. *Annals of botany*, 64(3), 249-252.
- Geils, B. W., Cibrian-Tovar, J., & Moody, B. (2002).** Mistletoes of North American conifers. Gen. Tech. Rep. RMRS-GTR-98. **Ogden, UT: US Department of Agriculture, Forest Service, Rocky Mountain Research Station**, 98, 123.
- Geils, B. W., & Vázquez-Collazo, I. (2002).** Loranthaceae and Viscaceae in North America. En: Geils, Brian W.; Cibrián Tovar, Jose; Moody, Benjamin, tech. coords. Mistletoes of North American Conifers. Gen. Tech. Rep. RMRS-GTR-98. **Ogden, UT: US Department of Agriculture, Forest Service, Rocky Mountain Research Station**. 98, 1-8.
- Ghose, T. K. (1987).** Measurement of cellulase activities. *Pure and applied Chemistry*, 59(2), 257-268.
- Glatzel, G., & Geils, B. W. (2008).** Mistletoe ecophysiology: host–parasite interactions. *Botany*, 87(1), 10-15.
- Gobierno Municipal de León (2014).** Paleta Vegetal. Recuperado el 15 de junio de 2019 <https://www.leon.gob.mx/leon/gestionambiental/articulo.php?a=36>.
- Goldwasser, Y., Westwood, J. H., & Yoder, J. I. (2002).** The use of Arabidopsis to study interactions between parasitic angiosperms and their plant hosts. *The Arabidopsis Book/American Society of Plant Biologists*, 1.
- Gómez-Toribio, V., Martínez, A. T., Martínez, M. J., & Guillén, F. (2001).** Oxidation of hydroquinones by the versatile ligninolytic peroxidase from *Pleurotus eryngii*: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation and the influence of Mn<sup>2+</sup>. *European journal of biochemistry*, 268(17), 4787-4793.
- González-Verdejo, C. I., Die, J. V., Nadal, S., Jiménez-Marín, A., Moreno, M. T., & Román, B. (2008).** Selection of housekeeping genes for normalization by real-time RT–PCR: analysis of Or-MYB1 gene expression in *Orobancha ramosa* development. *Analytical biochemistry*, 379(2), 176-181.
- Goycoolea, F. M., Valdez, M. A., & Calderón de la Barca, A. M. (2006).** Goma de mezquite: una alternativa de uso industrial. *Interciencia*, 31(3), 183-189.
- Griebel, A., Watson, D., & Pendall, E. (2017).** Mistletoe, friend and foe: synthesizing ecosystem implications of mistletoe infection. *Environmental Research Letters*, 12(11), 115012.
- Gruninger, R. J., Nguyen, T. T. M., Reid, I. D., Yanke, J., Wang, P., Abbott, D. W., Tsang, A., & McAllister, T. (2018).** Application of transcriptomics to compare the



- carbohydrate active enzymes that are expressed by diverse genera of anaerobic fungi to degrade plant cell wall carbohydrates. **Frontiers in Microbiology**, 9, 1581.
- Heide-Jørgensen, H. S. (2013)**. Introduction: the parasitic syndrome in higher plants. En Parasitic Orobanchaceae. **Springer, Berlin, Heidelberg**, 1-18.
- Heil, M. (2011)**. Nectar: generation, regulation and ecological functions. **Trends in plant science**, 16(4), 191-200.
- Hernández, T., García-Bores, A. M., Serrano, R., Ávila, G., Dávila, P., Cervantes, H., Peñalosa, I., Flores-Ortiz, C. & Lira, R. (2015)**. Fitoquímica y actividades biológicas de plantas de importancia en la medicina tradicional del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. **Revista especializada en ciencias químico-biológicas**, 18(2), 116-121.
- Hettenhausen, C., Li, J., Zhuang, H., Sun, H., Xu, Y., Qi, J., Zhang, J., Lei, Y., Qin, Y., Sun, G., Wang, L., Baldwin, I. T., & Wu, J. (2017)**. Stem parasitic plant *Cuscuta australis* (dodder) transfers herbivory-induced signals among plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 114(32), 6703-6709.
- Hluska, T., Dobrev, P. I., Tarkowská, D., Frébortová, J., Zalabák, D., Kopečný, D., Plíhal, O., Kokáš, F., Briozzo, P., Zatloukal, M., Motyka, V., & Galuszka, P. (2016)**. Cytokinin metabolism in maize: novel evidence of cytokinin abundance, interconversions and formation of a new trans-zeatin metabolic product with a weak anticytokinin activity. **Plant Science**, 247, 127-137.
- Hu, B., Sakakibara, H., Takebayashi, Y., Peters, F. S., Schumacher, J., Eiblmeier, M., Arab, L., Kreuzwieser, J., Polle, A., & Rennenberg, H. (2017)**. Mistletoe infestation mediates alteration of the phytohormone profile and anti-oxidative metabolism in bark and wood of its host *Pinus sylvestris*. **Tree physiology**, 37(5), 676-691.
- Huang, T. H., & Streitwieser, D. A. (2015)**. Estudio comparativo de la compostabilidad de fundas plásticas de PEBD, oxo-biodegradables y de papel distribuidas en el Distrito Metropolitano de Quito. **ACI Avances en Ciencias e Ingenierías**, 7(1).
- INEGI (2008)**. Cartas Climatológicas. Recuperado el 01 de julio de 2019 <http://cuentame.inegi.org.mx/monografias/informacion/gto/territorio/clima.aspx?tema=me&e=11>
- Irving, L. J., & Cameron, D. D. (2009)**. You are what you eat: interactions between root parasitic plants and their hosts. **Advances in Botanical Research**, 50, 87-138.
- Jiang, F., Jeschke, W. D., & Hartung, W. (2003)**. Water flows in the parasitic association *Rhinanthus minor*/*Hordeum vulgare*. **Journal of Experimental Botany**, 54(389), 1985-1993.
- Joel, D. M. (2013)**. Functional structure of the mature haustorium. **Parasitic Orobanchaceae**, 25-60. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Johnsen, H. R. (2014)**. Analysis of processes at the haustorial interfaces between *Cuscuta reflexa* and its hosts. **University of Tromsø**. Tesis de doctorado.

- Johnsen, H., & Krause, K. (2014).** Cellulase activity screening using pure carboxymethylcellulose: application to soluble cellulolytic samples and to plant tissue prints. *International journal of molecular sciences*, 15(1), 830-838.
- Johnson, N. R., & Axtell, M. J. (2019).** Small RNA warfare: exploring origins and function of trans-species microRNAs from the parasitic plant *Cuscuta*. *Current opinion in plant biology*, 50, 76-81.
- Jorrín, J. V., Rubiales, D., Dumas-Gaudot, E., Recorbet, G., Maldonado, A., Castillejo, M. A., & Curto, M. (2006).** Proteomics: a promising approach to study biotic interaction in legumes. A review. *Euphytica*, 147(1-2), 37-47.
- Kai, D., Tan, M. J., Chee, P. L., Chua, Y. K., Yap, Y. L., & Loh, X. J. (2016).** Towards lignin-based functional materials in a sustainable world. *Green Chemistry*, 18(5), 1175-1200.
- Kaiser, B., Vogg, G., Fürst, U. B., & Albert, M. (2015).** Parasitic plants of the genus *Cuscuta* and their interaction with susceptible and resistant host plants. *Frontiers in plant science*, 6, 45.
- Kamimura, N., Sakamoto, S., Mitsuda, N., Masai, E., & Kajita, S. (2019).** Advances in microbial lignin degradation and its applications. *Current opinion in biotechnology*, 56, 179-186.
- Kelly, C. K., & Horning, K. (1999).** Acquisition order and resource value in *Cuscuta attenuata*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(23), 13219-13222.
- Keyes, W. J., O'malley, R. C., Kim, D., & Lynn, D. G. (2000).** Signaling organogenesis in parasitic angiosperms: xenognosin generation, perception, and response. *Journal of Plant Growth Regulation*, 19(2), 217-231.
- Kleczkowski, L. A. (1994).** Glucose activation and metabolism through UDP-glucose pyrophosphorylase in plants. *Phytochemistry*, 37(6), 1507-1515.
- Knutson, D.M. (1979)** How parasitic seed plants induce disease in other plants. En Horsfall J.G., Cowling E.B. (eds) *Plant disease, an advanced treatise*. Academic Press, San Diego, 293–312.
- Knutson, D.M. (1983).** Physiology of mistletoe parasitism and disease responses in the host. *En Calder & Bernhardt*, 295–316.
- Korasick, D. A., Enders, T. A., & Strader, L. C. (2013).** Auxin biosynthesis and storage forms. *Journal of experimental botany*, 64(9), 2541-2555.
- Krishna, P. (2003).** Brassinosteroid-mediated stress responses. *Journal of Plant Growth Regulation*, 22(4), 289-297.
- Kubicek, C. P., Starr, T. L., & Glass, N. L. (2014).** Plant cell wall–degrading enzymes and their secretion in plant-pathogenic fungi. *Annual review of phytopathology*, 52, 427-451.

- Kuhad, R. C., Singh, A., & Eriksson, K. E. L. (1997).** Microorganisms and enzymes involved in the degradation of plant fiber cell walls. **Biotechnology in the pulp and paper industry**, 45-125. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Kuijt, J. (1964).** Critical observations on the parasitism of New World mistletoes. **Canadian Journal of Botany**, 42(9), 1243-1278.
- Kuijt, J. (1969).** The biology of parasitic flowering plants. **University of California Press**, 246.
- Kuijt, J. (2009).** Monograph of Psittacanthus (Loranthaceae). **Systematic botany monographs**, 86.
- Kuijt, J., & Hansen, B. (2015).** Loranthaceae. **Flowering Plants. Eudicots**, 73-119. Springer, Cham.
- Laemmli, U. K. (1970).** SDS-page Laemmli method. **Nature**, 227, 680-5.
- Letham, D. S. (1994).** Cytokinins as phytohormones-sites of bioynthesis, translocation, and function of translocated cytokinin. **Cytokinins chemistry, activity, and function**, 57-80.
- Leung, J., & Giraudat, J. (1998).** Abscisic acid signal transduction. **Annual review of plant biology**, 49(1), 199-222.
- Llugany, M., Lombini, A., Dinelli, E., Poschenrieder, C., & Barceló, J. (2009).** Transfer of selected mineral nutrients and trace elements in the host-hemiparasite association, *Cistus-Odontites lutea*, growing on and off metal polluted sites. **Plant Biology**, 11, 170–177.
- Li, J., & Timko, M. P. (2009).** Gene-for-gene resistance in *Striga*-cowpea associations. **Science**, 325(5944), 1094-1094.
- Li, R., Sosa, J. L., & Zavala, M. E. (2000).** Accumulation of zeatin O-glycosyltransferase in *Phaseolus vulgaris* and *Zea mays* following cold stress. **Plant growth regulation**, 32(2-3), 295-305.
- Li, D., Wang, L., Yang, X., Zhang, G., & Chen, L. (2010).** Proteomic analysis of blue light-induced twining response in *Cuscuta australis*. **Plant molecular biology**, 72(1-2), 205.
- Löffler, C., Czygan, F. C., & Proksch, P. (1999).** Role of indole-3-acetic acid in the interaction of the phanerogamic parasite *Cuscuta* and host plants. **Plant Biology**, 1(06), 613-617.
- López, R. E. M. (2016).** Análisis del transporte del ácido-3-indol acético durante la embriogénesis somática en *Coffea canephora*. **Centro de Investigación Científica de Yucatán. Tesis de doctorado.**

- López-Curto, L., Márquez-Guzmán, J., & Díaz-Pontones, D. M. (2006).** Invasion of *Coffea arabica* (Linn.) by *Cuscuta jalapensis* (Schlecht): in situ activity of peroxidase. **Environmental and experimental botany**, 56(2), 127-135.
- López-de Buen, L., & Ornelas, J. F. (1999).** Frugivorous birds, host selection and the mistletoe *Psittacanthus schiedeanus*, in central Veracruz, Mexico. **Journal of Tropical Ecology**, 15(3), 329-340.
- López-de Buen, L., & Ornelas, J. F. (2001).** Seed Dispersal of the Mistletoe *Psittacanthus schiedeanus* by Birds in Central Veracruz, Mexico. **Biotropica**, 33(3), 487-494.
- Lopez, L., Bellis, E. S., Wafula, E., Hearne, S. J., Honaas, L., Ralph, P. E., Timko, M., Unachukwu, N., dePamphilis, C., & Lasky, J. R. (2019).** Transcriptomics of host-specific interactions in natural populations of the parasitic plant purple witchweed (*Striga hermonthica*). **Weed Science**, 1-15.
- Losner-Goshen, D., Portnoy, V. H., Mayer, A. M., & Joel, D. M. (1998).** Pectolytic activity by the haustorium of the parasitic Plant *Orobancha* L.(Orobanchaceae) in host roots. **Annals of Botany**, 81(2), 319-326.
- Mackulak, T., Prousek, J., Olejnikova, P., & Bodik, I. (2010).** The using of enzymes for degradation of cellulose substrate for the production of biogas, Editor: Markos, J. **En Proceedings of the 37th International Conference of Slovak Society of Chemical Engineering, Tatranské Matliare, Slovakia**, 1407-1412.
- Marsden, W. L., Gray, P. P., Nippard, G. J., & Quinlan, M. R. (1982).** Evaluation of the DNS method for analysing lignocellulosic hydrolysates. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, 32(7-12), 1016–1022.
- Marshall, J. D., & Ehleringer, J. R. (1990).** Are xylem-tapping mistletoes partially heterotrophic?. **Oecologia**, 84(2), 244-248.
- Martin, R. C., Mok, M. C., Shaw, G., & Mok, D. W. (1989).** An enzyme mediating the conversion of zeatin to dihydrozeatin in *Phaseolus* embryos. **Plant physiology**, 90(4), 1630-1635.
- Martínez, Á. T., Speranza, M., Ruiz-Dueñas, F. J., Ferreira, P., Camarero, S., Guillén, F., Martínez, M., Gutiérrez, A., & Río Andrade, J. C. D. (2005).** Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. **International Microbiology**, 8, 195-204.
- Martínez, A. T., Camarero, S., Ruiz-Dueñas, F. J., & Martínez, M. J. (2018).** Biological lignin degradation. **Lignin Valorization: Emerging Approaches**, 19, 199-207.
- Mathiasen, R. L., Nickrent, D. L., Shaw, D. C., & Watson, D. M. (2008).** Mistletoes: pathology, systematics, ecology, and management. **Plant disease**, 92(7), 988-1006.
- Matsubara, S., Koshimizu, K., & Nakahira, R. (1968).** Cytokinin Activities of Dihydrozeatin in Several Bioassays (A. NATURAL SCIENCE). **The scientific reports of**

- the Kyoto Prefectural University. *Natural science, living science and welfare science*, 19, 19-24.
- Matusova, R., Rani, K., Verstappen, F. W., Franssen, M. C., Beale, M. H., & Bouwmeester, H. J. (2005). The strigolactone germination stimulants of the plant-parasitic *Striga* and *Orobancha* spp. are derived from the carotenoid pathway. *Plant physiology*, 139(2), 920-934.
- Méndez-Valadez, J. T. (2018, marzo 21). Se extinguen mezquites. *Periódico AM*. Recuperado el 12 agosto de 2019 <https://www.am.com.mx/noticias/Se-extinguen-mezquites-20180331-0100.html>
- Meulebrouck, K., Ameloot, E., Van Assche, J. A., Verheyen, K., Hermy, M., & Baskin, C. C. (2008). Germination ecology of the holoparasite *Cuscuta epithimum*. *Seed Science Research*, 18(1), 25-34.
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry*, 31(3), 426-428.
- Miller, C. O. (1961). Kinetin and related compounds in plant growth. *Annual Review of Plant Physiology*, 12(1), 395-408.
- Mok, M. C. (1994). Cytokinins and plant development. Cytokinins: chemistry, activity, and function. *CRC Press, Boca Raton*, 155-166.
- Mosquin, D. (2018, mayo 16). *Cassipourea menlantha*. University of British Columbia, Botanical Garden. Recuperado el 20 de agosto de 2019 <https://botanyphoto.botanicalgarden.ubc.ca/2018/05/cassipourea-melantha/>
- Mower, J. P., Stefanović, S., Young, G. J., & Palmer, J. D. (2004). Plant genetics: gene transfer from parasitic to host plants. *Nature*, 432(7014), 165.
- Musselman, L. J., & Dickison, W. C. (1975). The structure and development of the haustorium in parasitic Scrophulariaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 70(3), 183-212.
- Nagar, R., Singh, M., & Sanwal, G. G. (1984). Cell wall degrading enzymes in *Cuscuta reflexa* and its hosts. *Journal of Experimental Botany*, 35(8), 1104-1112.
- Nickrent, D. L., Duff, R. J., Colwell, A. E., Wolfe, A. D., Young, N. D., & Steiner, K. E. (1998). Molecular phylogenetic and evolutionary studies of parasitic plants. *Molecular systematics of plants II*, 211-241. Springer, Boston, MA.
- Nickrent, D. L., Malécot, V., Vidal-Russell, R., and Der, J. P. (2010). A revised classification of Santalales. *Taxon* 59, 538–558.
- Nordström, A., Tarkowski, P., Tarkowska, D., Norbaek, R., Åstot, C., Dolezal, K., & Sandberg, G. (2004). Auxin regulation of cytokinin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*: a factor of potential importance for auxin–cytokinin-regulated

- development. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 101(21), 8039-8044.
- Olajuyigbe, F. M., & Ogunyewo, O. A. (2016).** Enhanced production and physicochemical properties of thermostable crude cellulase from *Sporothrix carnis* grown on corn cob. **Biocatalysis and agricultural biotechnology**, 7, 110-117.
- Olivier, A., Benhamou, N., & Leroux, G. D. (1991).** Cell surface interactions between sorghum roots and the parasitic weed *Striga hermonthica*: cytochemical aspects of cellulose distribution in resistant and susceptible host tissues. **Canadian Journal of Botany**, 69(8), 1679-1690.
- Olsen, S., & Krause, K. (2017).** Activity of xyloglucan endotransglucosylases/hydrolases suggests a role during host invasion by the parasitic plant *Cuscuta reflexa*. **PLoS one**, 12(4).
- Orona-Tamayo, D., Wielsch, N., Blanco-Labra, A., Svatos, A., Farías-Rodríguez, R., & Heil, M. (2013).** Exclusive rewards in mutualisms: ant proteases and plant protease inhibitors create a lock–key system to protect *Acacia* food bodies from exploitation. **Molecular Ecology**, 22(15), 4087-4100.
- Orozco-Villafuerte, J., Cruz-Sosa, F., Ponce-Alquicira, E., & Vernon-Carter, E. J. (2003).** Mesquite gum: fractionation and characterization of the gum exuded from *Prosopis laevigata* obtained from plant tissue culture and from wild trees. **Carbohydrate Polymers**, 54(3), 327-333.
- Ortíz, W. G. C. (2011).** Materiales lignocelulosicos como fuente de biocombustibles y productos químicos. **TecnoESUFA: revista de tecnología aeronáutica**, 16.
- Pan, X., & Wang, X. (2009).** Profiling of plant hormones by mass spectrometry. **Journal of chromatography B**, 877(26), 2806-2813.
- Pennings, S. C., & Callaway, R. M. (2002).** Parasitic plants: parallels and contrasts with herbivores. **Oecologia**, 131(4), 479-489.
- Peres, A. L. G., Soares, J. S., Tavares, R. G., Righetto, G., Zullo, M. A., Mandava, N. B., & Menossi, M. (2019).** Brassinosteroids, the sixth class of phytohormones: a molecular view from the discovery to hormonal interactions in plant development and stress adaptation. **International journal of molecular sciences**, 20(2), 331.
- Pérez-de-Luque, A. (2013).** Haustorium invasion into host tissues. **Parasitic Orobanchaceae**, 75-86. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Pérez, J., Muñoz-Dorado, J., De la Rubia, T. D. L. R., & Martínez, J. (2002).** Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. **International microbiology**, 5(2), 53-63.
- Pérez, J., & Isabel, J. (2016).** Impacto del muérdago (*Psittacanthus calyculatus*) en la economía de las familias campesinas en una región del Subtrópico Mexicano. **Universidad Nanzan**.

- Perilli, S., Moubayidin, L., & Sabatini, S. (2010).** The molecular basis of cytokinin function. *Current opinion in plant biology*, 13(1), 21-26.
- Press, M. C., & Phoenix, G. K. (2005).** Impacts of parasitic plants on natural communities. *New phytologist*, 166(3), 737-751.
- Pettersen, R. C. (1984).** The chemical composition of wood. *The chemistry of solid wood*, 207, 57-126.
- Queijeiro-Bolaños, M. E., & Cano-Santana, Z. (2015).** Dinámica temporal de la infestación por muérdago enano (*Arceuthobium globosum* y *A. vaginatum*) en Zoquiapan (Parque Nacional Iztaccíhuatl Popocatepetl), México. *Ciencia UAT*, 9(2), 6-14.
- Quesnelle, P. E., & Emery, R. N. (2007).** cis-Cytokinins that predominate in *Pisum sativum* during early embryogenesis will accelerate embryo growth in vitro. *Botany*, 85(1), 91-103.
- Quintana-Rodríguez, E., Ramírez-Rodríguez, A. G., Ramírez-Chávez, E., Molina-Torres, J., Camacho-Coronel, X., Esparza-Claudio, J., Heil, M., & Orona-Tamayo, D. (2018).** Biochemical traits in the flower lifetime of a Mexican mistletoe parasitizing mesquite biomass. *Frontiers in plant science*, 9:1031.
- Ramírez, M. M., & Ornelas, J. F. (2009).** Germination of *Psittacanthus schiedeanus* (mistletoe) seeds after passage through the gut of Cedar Waxwings and Grey Silky-Flycatchers. *The Journal of the Torrey Botanical Society*, 136(3), 322-331.
- Ramírez, M. M., & Ornelas, J. F. (2010).** Polinización y producción de néctar de *Psittacanthus schiedeanus* (Loranthaceae) en el centro de Veracruz, México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, (87), 61-67.
- Ranjan, A., Ichihashi, Y., Farhi, M., Zumstein, K., Townsley, B., David-Schwartz, R., & Sinha, N. R. (2014).** De novo assembly and characterization of the transcriptome of the parasitic weed dodder identifies genes associated with plant parasitism. *Plant Physiology*, 166(3), 1186-1199.
- Raya-Pérez, J. C., Ramírez-Pimentel, J. G., Covarrubias-Prieto, J., Acevedo-Lara, B., & Aguirre-Mancilla, C. (2014).** Contenido mineral y de clorofila de la hemiparásita *Psittacanthus calyculatus* (DC) G. Don y de cuatro de sus árboles hospederos. *Revista Chapingo. Serie ciencias forestales y del ambiente*, 20(1), 109-117.
- Reid, N. (1991).** Coevolution of mistletoes and frugivorous birds?. *Australian journal of ecology*, 16(4), 457-469.
- Rendón, C. (2019, abril 15).** Combaten muérdago detectado en los árboles de León. *El Sol de León*. Recuperado el 13 de agosto de 2019 <https://www.elsoldeleon.com.mx/local/combaten-muerdago-detectado-en-los-arboles-de-leon-3324781.html>
- Riches, C. R., & Parker, C. (1995).** Parasitic plants as weeds. *Parasitic plants*, 226-255.

- Rodríguez Saucedo, E. N., Rojo Martínez, G. E., Ramírez Valverde, B., Martínez Ruiz, R., Cong Hermida, M. D. L. C., Medina Torres, S. M., & Piña Ruiz, H. H. (2014). Análisis técnico del árbol del mezquite (*Prosopis laevigata* Humb. & Bonpl. ex Willd.). *México. Ra Ximhai*, 10(3).
- Runyon, J. B., Mescher, M. C., & De Moraes, C. M. (2008). Parasitism by *Cuscuta pentagona* attenuates host plant defenses against insect herbivores. *Plant Physiology*, 146(3), 987-995.
- Runyon, J. B., Mescher, M. C., Felton, G. W., & De Moraes, C. M. (2010). Parasitism by *Cuscuta pentagona* sequentially induces JA and SA defence pathways in tomato. *Plant, cell & environment*, 33(2), 290-303.
- Rzedowski, J. (1988). Análisis de la distribución geográfica del complejo *Prosopis* (Leguminosae, Mimosoideae) en Norteamérica. *Acta Botánica Mexicana*, (3), 7-19.
- Saha, B. C. (2002). Production, purification and properties of xylanase from a newly isolated *Fusarium proliferatum*. *Process Biochemistry*, 37(11), 1279-1284.
- Saha, B. C. (2003). Hemicellulose bioconversion. *Journal of industrial microbiology and biotechnology*, 30(5), 279-291.
- Sakakibara, H. (2006). Cytokinins: activity, biosynthesis, and translocation. *Annual Review of Plant Biology*, 57, 431-449.
- Salas, P.M.A. (1988). Aves dispersoras de muérdago. Informe Técnico. **Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias.**
- Scott, I. M., Horgan, R., & McGaw, B. A. (1980). Zeatin-9-glucoside, a major endogenous cytokinin of *Vinca rosea* L. crown gall tissue. *Planta*, 149(5), 472-475.
- Shahid, S., Kim, G., Johnson, N. R., Wafula, E., Wang, F., Coruh, C., Bernal-Galeano, V., dePamphilis, C., Westwood, J., & Axtell, M. J. (2018). MicroRNAs from the parasitic plant *Cuscuta campestris* target host messenger RNAs. *Nature*, 553(7686), 82.
- Singh, A., & Singh, M. (1993). Cell wall degrading enzymes in *Orobanche aegyptiaca* and its host *Brassica campestris*. *Physiologia Plantarum*, 89(1), 177-181.
- Singh, R., Upadhyay, S. K., Rani, A., Kumar, P., Kumar, A., & Singh, C. (2018). Lignin biodegradation in nature and significance. *Vegetos*, 31(4), 39-44.
- Smith, S., & Stewart, G. R. (1990). Effect of potassium levels on the stomatal behavior of the hemi-parasite *Striga hermonthica*. *Plant Physiology*, 94(3), 1472-1476.
- Spallek, T., Melnyk, C. W., Wakatake, T., Zhang, J., Sakamoto, Y., Kiba, T., Yoshida, S., Matsunaga, S., Sakakibara, H., & Shirasu, K. (2017). Interspecies hormonal control of host root morphology by parasitic plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(20), 5283-5288.



- Spreitzer, R. J., & Salvucci, M. E. (2002).** Rubisco: structure, regulatory interactions, and possibilities for a better enzyme. **Annual review of plant biology**, 53(1), 449-475.
- Staswick, P. E., Serban, B., Rowe, M., Tiryaki, I., Maldonado, M. T., Maldonado, M. C., & Suza, W. (2005).** Characterization of an Arabidopsis enzyme family that conjugates amino acids to indole-3-acetic acid. **The Plant Cell**, 17(2), 616-627.
- Stranger, A., Murphy, A., Corbett, J. M., Dunn, M. J., Bolwell, G. P., & Stewart, G. R. (1995).** Changes in patterns of protein synthesis during haustorial development of *Striga hermonthica* (Del.) Benth. seedlings. **Journal of Experimental Botany**, 46(3), 277-283.
- Stirk, W. A., Václavíková, K., Novák, O., Gajdošová, S., Kotland, O., Motyka, V., Strnad, M., & van Staden, J. (2012).** Involvement of cis-zeatin, dihydrozeatin, and aromatic cytokinins in germination and seedling establishment of maize, oats, and lucerne. **Journal of plant growth regulation**, 31(3), 392-405.
- Su, Y. H., Liu, Y. B., & Zhang, X. S. (2011).** Auxin–cytokinin interaction regulates meristem development. **Molecular plant**, 4(4), 616-625.
- Sunitha, V. H., Nirmala Devi, D., & Srinivas, C. (2013).** Extracellular enzymatic activity of endophytic fungal strains isolated from medicinal plants. **World Journal of Agricultural Sciences**, 9(1), 1-9.
- Swarbrick, P. J., Huang, K., Liu, G., Slate, J., Press, M. C., & Scholes, J. D. (2008).** Global patterns of gene expression in rice cultivars undergoing a susceptible or resistant interaction with the parasitic plant *Striga hermonthica*. **New Phytologist**, 179(2), 515-529.
- Sztejn, A. E., Cohen, J. D., Slovin, J. P., & Cooke, T. J. (1995).** Auxin metabolism in representative land plants. **American journal of Botany**, 82(12), 1514-1521.
- Tapia, B. E. J. R. (2016).** Anatomía e histoquímica del establecimiento del haustorio de *Struthanthus interruptus* (Kunth) Blume, planta parásita de *Populus tremuloides* Michx. Especie abundante en el arbolado del Distrito Federal. **Universidad Autónoma Metropolitana**. Tesis de doctorado.
- Tennakoon, K. U., & Pate, J. S. (1996).** Effects of parasitism by a mistletoe on the structure and functioning of branches of its host. **Plant, Cell & Environment**, 19(5), 517-528.
- Těšitel, J. (2016).** Functional biology of parasitic plants: a review. **Plant Ecology and Evolution**, 149(1), 5-20.
- Tomilov, A. A., Tomilova, N. B., Abdallah, I., & Yoder, J. I. (2005).** Localized hormone fluxes and early haustorium development in the hemiparasitic plant *Triphysaria versicolor*. **Plant Physiology**, 138(3), 1469-1480.

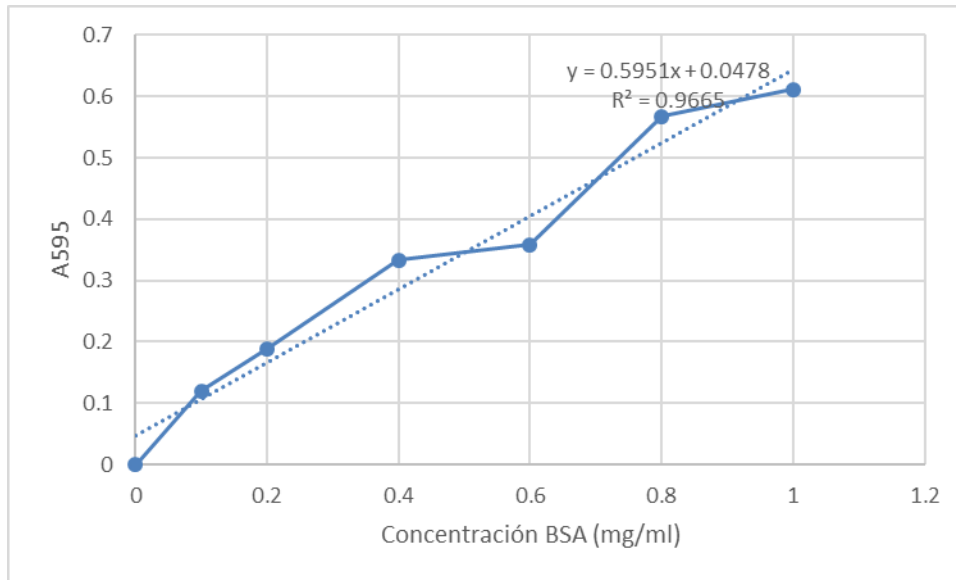
- Tomilov, A. A., Tomilova, N. B., Wroblewski, T., Michelmore, R., & Yoder, J. I. (2008).** Trans-specific gene silencing between host and parasitic plants. **The Plant Journal**, 56(3), 389-397.
- Tuli, V., Dilley, D. R., & Wittwer, S. H. (1964).** N<sup>6</sup>-benzyladenine: inhibitor of respiratory kinases. **Science**, 146(3650), 1477-1479.
- Turner, J. G., Ellis, C., & Devoto, A. (2002).** The jasmonate signal pathway. **The Plant Cell**, 14(1), 153-164.
- Valdés-Pirck, L. E. (2017).** Censo forestal urbano de las áreas verdes prioritarias. **Instituto de Gestión Ambiental de León**.
- Van der Krieken, W. M., Croes, A. F., Hermans, M., & Wullems, G. J. (1991).** Induction of flower bud formation in vitro by dihydrozeatin. **Journal of Plant Growth Regulation**, 10(1-4), 79.
- Vázquez-Collazo, I., & Geils, B. W. (2002).** Psittacanthus in Mexico. **Mistletoes of north American conifers**, 9-17.
- Vázquez Collazo, I. & Pérez Chávez, R. (1989).** Efecto del parasitismo del muérdago verdadero (Psittacanthus spp.) en la producción de semilla de tres especies de pino. **V simposio sobre parasitología foresta**; 1989 Octubre. 4-6; Juarez, Chihuahua. México, DF: Sociedad Mexicana de Entomología, AC: 64.
- Veach, Y. K., Martin, R. C., Mok, D. W., Malbeck, J., Vankova, R., & Mok, M. C. (2003).** O-glucosylation of cis-zeatin in maize. Characterization of genes, enzymes, and endogenous cytokinins. **Plant physiology**, 131(3), 1374-1380.
- Vega-Celedón, P., Canchignia Martínez, H., González, M., & Seeger, M. (2016).** Biosíntesis de ácido indol-3-acético y promoción del crecimiento de plantas por bacterias. **Cultivos Tropicales**, 37, 33-39.
- Vlot, A. C., Dempsey, D. M. A., & Klessig, D. F. (2009).** Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. **Annual review of phytopathology**, 47, 177-206.
- Wada, S., Cui, S., & Yoshida, S. (2019).** Reactive oxygen species (ROS) generation is indispensable for haustorium formation of the root parasitic plant *Striga hermonthica*. **Frontiers in Plant Science**, 10, 328.
- Wang, K. L. C., Li, H., & Ecker, J. R. (2002).** Ethylene biosynthesis and signaling networks. **The plant cell**, 14(1), 131-151.
- Wang, M., Li, Z., Fang, X., Wang, L., & Qu, Y. (2012).** Cellulolytic enzyme production and enzymatic hydrolysis for second-generation bioethanol production. **Biotechnology in China III: Biofuels and Bioenergy**, 1-24. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Watson, D. M. (2001).** Mistletoe—a keystone resource in forests and woodlands worldwide. **Annual Review of Ecology and Systematics**, 32(1), 219-249.

- Werner, T., Motyka, V., Strnad, M., & Schmülling, T. (2001).** Regulation of plant growth by cytokinin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(18), 10487-10492.
- Westwood, J. H., Yoder, J. I., Timko, M. P., & dePamphilis, C. W. (2010).** The evolution of parasitism in plants. *Trends in plant science*, 15(4), 227-235.
- Wing, R. A., Yamaguchi, J., Larabell, S. K., Ursin, V. M., & McCormick, S. (1990).** Molecular and genetic characterization of two pollen-expressed genes that have sequence similarity to pectate lyases of the plant pathogen *Erwinia*. *Plant molecular biology*, 14(1), 17-28.
- Woodward, A. W., & Bartel, B. (2005).** Auxin: regulation, action, and interaction. *Annals of botany*, 95(5), 707-735.
- Xi, Z., Bradley, R. K., Wurdack, K. J., Wong, K. M., Sugumaran, M., Bomblies, K., Rest, J., & Davis, C. C. (2012).** Horizontal transfer of expressed genes in a parasitic flowering plant. *BMC genomics*, 13(1), 227.
- Xiao, Z., Storms, R., & Tsang, A. (2004).** Microplate-based filter paper assay to measure total cellulase activity. *Biotechnology and Bioengineering*, 88(7), 832-837.
- Xiao, Z., Storms, R., & Tsang, A. (2005).** Microplate-based carboxymethylcellulose assay for endoglucanase activity. *Analytical biochemistry*, 342(1), 176-178.
- Yamaguchi, S. (2008).** Gibberellin metabolism and its regulation. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 225-251.
- Yang, H., Yan, R., Chen, H., Lee, D. H., & Zheng, C. (2007).** Characteristics of hemicellulose, cellulose and lignin pyrolysis. *Fuel*, 86(12-13), 1781-1788.
- Yoder, J. I. (1999).** Parasitic plant responses to host plant signals: a model for subterranean plant-plant interactions. *Current Opinion in Plant Biology*, 2(1), 65-70.
- Yoshida, S., Cui, S., Ichihashi, Y., & Shirasu, K. (2016).** The haustorium, a specialized invasive organ in parasitic plants. *Annual Review of Plant Biology*, 67, 643-667.
- Zamudio, S. & Galván, R. (2011).** La diversidad vegetal. *La Biodiversidad en Guanajuato: Estudio de Estado vol. II. México*. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (Conabio)/Instituto de Ecología del Estado de Guanajuato, 97-108.
- Zhang X.M., Liu B., Guo Q.S., Song L.S., Chen L. & Wang C.L. (2016).** Construction of a haustorium development associated SSH library in *Thesium chinense* and analysis of specific ESTs included by *Imperata cylindrica*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 64, 46-52
- Zink, F. W. (1961).** Vegetable Deterioration, N<sup>6</sup>-Benzyladenine, a Senescence Inhibitor for Green Vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 9(4), 304-307.

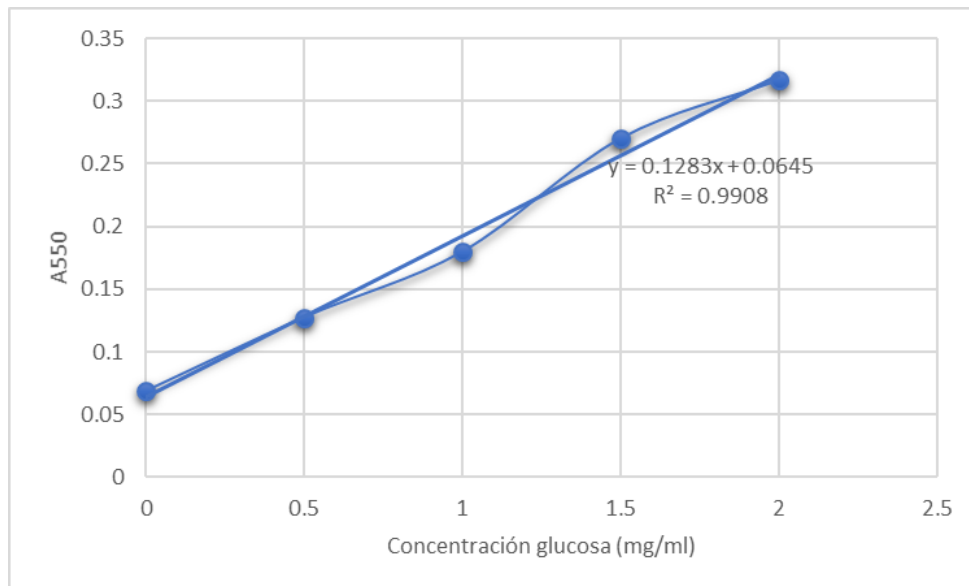
## 11 ANEXOS

En esta sección se adjuntan las curvas estándar utilizadas para generar las concentraciones de proteínas (Figura A1) y actividades enzimáticas (Figuras A2 y A3), las condiciones del IEF de salida de la separación en 2-DE pH 3-10 (Tabla A1) y pH 4-7 (Tabla A2), así como las constancias originadas de presentaciones de cartel, orales, carta de aceptación a congresos y publicaciones en proceso derivadas del desarrollo de esta tesis.

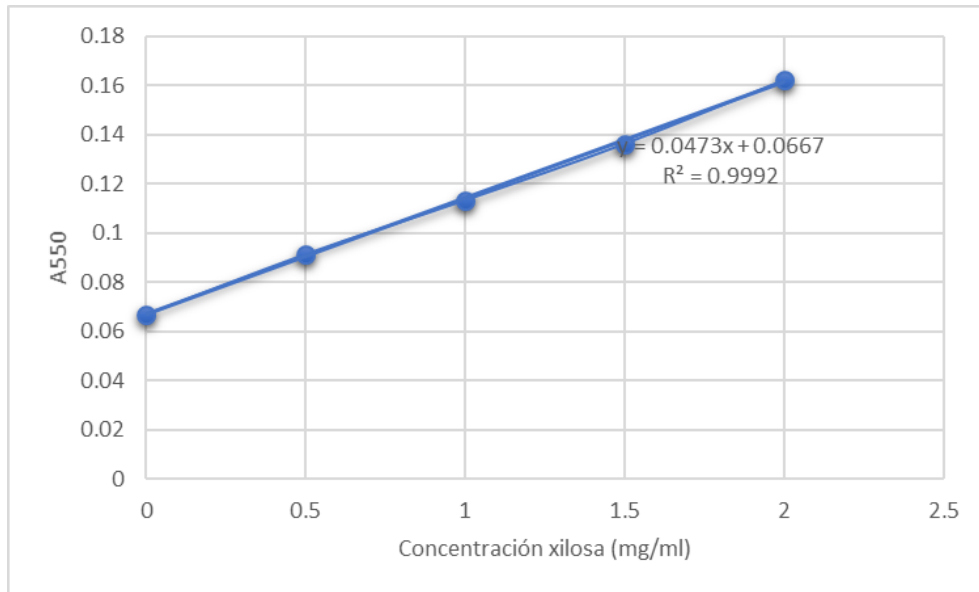
1. Aguilar-Venegas, J.M., Aguilar-Hernández, V., Brito-Argáez, L., Quintana-Rodríguez, E., Loyola-Vargas, V.M., Vega-Arreguín, J., Heil, M., y Orona-Tamayo, D. (2019). La herramienta de uno, puede ser el arma de otro: Biomoléculas involucradas en el proceso inicial infectivo del muérdago en árboles de mezquite. XVI encuentro Participación de la Mujer en la Ciencia, Centro de Investigaciones en Óptica (CIO). Presentación en póster el 30 de mayo de 2019.
2. Aguilar-Venegas, J.M., Quintana-Rodríguez, E., Aguilar-Hernández, V., Brito-Argáez, L., Loyola-Vargas, V.M., Vega-Arreguín, J., Heil, M., Paredes-López, O., y Orona-Tamayo, D. (2019). La herramienta de uno, puede ser el arma de otro: Biomoléculas involucradas en el proceso inicial infectivo del muérdago en árboles de mezquite. 12° Verano Estatal de Investigación, Secretaría de Innovación, Ciencia y Educación Superior. Publicación en revista *IDE@S* y presentación oral en clausura del Verano el 9 de agosto de 2019 en el Instituto Tecnológico Superior de Salvatierra.
3. Aguilar-Venegas, J.M., Quintana-Rodríguez, E., Aguilar-Hernández, V., Brito-Argáez, L., Loyola-Vargas, V.M., Vega-Arreguín, J., Heil, M., Paredes-López, O., y Orona-Tamayo, D. (2019). La herramienta de uno, puede ser el arma de otro: Biomoléculas involucradas en el proceso inicial infectivo del muérdago en árboles de mezquite. Aceptación como presentación oral en el VII Congreso Mexicano de Ecología, Sociedad Científica Mexicana de Ecología que se llevará a cabo del 29 de septiembre al 04 de octubre en la Universidad Autónoma de Querétaro.



**Figura A1. Curva estándar de albúmina de suero bovino (BSA) en concentraciones 0-1 mg/ml a una absorbancia de 595 nm.** Se muestra la  $R^2$  y la ecuación de la curva. La cantidad de proteína de cada muestra ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) se calculó despejando la  $x$  de la ecuación a  $x = ((y - 0.0478) / 0.5951)$ .



**Figura A2. Curva estándar de glucosa en concentraciones 0-2 mg/ml a una absorbancia de 550 nm.** Se muestra la  $R^2$  y la ecuación de la curva. Para el cálculo de las actividades de celulasa y endo-1,4- $\beta$ -glucanasa, se utilizó la absorbancia del valor de 1 mg y 1  $\mu\text{g}$  de glucosa, respectivamente, para lo que se sustituyó en la ecuación de la curva como  $y = (0.1283 * 0.001) + 0.065$ .



**Figura A3. Curva estándar de xilosa en concentraciones 0-2 mg/ml a una absorbancia de 550 nm.** Se muestra la  $R^2$  y la ecuación de la curva. Para el cálculo de la actividad de Xilanasas se utilizó la absorbancia del valor de 1  $\mu\text{g}$  de xilosa, para lo que se sustituyó en la ecuación de la curva como  $y=(0.0473*0.001)+0.0667$ .

**Tabla A1. Condiciones de salida del IEF de pH 3-10.**

<b>pH 3-10</b>				
<b>Estadío</b>	<b>V totales</b>	<b>V/hr</b>	<b>μA</b>	<b>Tiempo (hrs)</b>
<b>I</b>	1852	9469	50	6:00
<b>II</b>	1771	8891	50	6:00
<b>III</b>	1771	8891	50	6:00
<b>IV</b>	1971	9647	50	6:00
<b>V</b>	1971	9647	50	6:00
<b>Hoja</b>	1852	9469	50	6:00
<b>Promedio</b>	1864.67	9335.67	50	6:00

**Tabla A2. Condiciones de salida del IEF de pH 4-7.**

<b>pH 4-7</b>				
<b>Estadío</b>	<b>V totales</b>	<b>V/hr</b>	<b>μA</b>	<b>Tiempo (hrs)</b>
<b>I</b>	2194	11126	50	6:00
<b>II</b>	2191	10997	50	6:00
<b>III</b>	2191	10997	50	6:00
<b>IV</b>	2363	11761	50	6:00
<b>V</b>	2363	11761	50	6:00
<b>Hoja</b>	2194	11126	50	6:00
<b>Promedio</b>	2249.33	11294.67	50	6:00



León, Gto. 31 de Mayo de 2019

**A quien corresponda:**

Se hace constar que:

**Jessica Montserrat Aguilar Venegas**

Asistió al XVI Encuentro "Participación de la Mujer en la Ciencia" el día **30 de mayo del año en curso, cubriendo un total de 8 horas.**

Sin otro particular, se extiende la presente para los fines que el(la) interesado(a) estime conveniente.

ATENTAMENTE:

Dra. Amalia Martínez García  
POR EL COMITÉ ORGANIZADOR  
encuentro2019@cio.mx



**Artículo para revista IDE@S – Secretaría de Innovación, Ciencia y Educación Superior:  
La herramienta de uno, puede ser el arma de otro: Biomoléculas involucradas en el proceso  
inicial infectivo del muérdago en arboles de mezquite**

Jessica Montserrat Aguilar Venegas (ENES León, UNAM)

Dr. Domancar Orona Tamayo (CIATEC A.C.)

## RESUMEN

*Psittacanthus calyculatus* es una planta parásita que infecta diferentes árboles hospederos, al hacerlo es capaz de alimentarse por medio de una estructura llamada haustorio que penetra la corteza y llega a conectarse al sistema vascular obteniendo nutrientes para su desarrollo basado en sus estadíos de infección inicial. Encontramos que la fenología de infección está basada en cambios fenotípicos desde la semilla hasta la aparición de las primeras hojas verdaderas, y encontramos que en los primeros estadíos ocurre la penetración y formación del haustorio. Las enzimas involucradas en el proceso de degradación de la corteza y con mayor actividad fueron celulasas, glucosidasas, xilanasas y glucanasas. Así mismo, encontramos cambios espaciales y de síntesis en los perfiles de proteínas. Esta es la primera vez que se realiza un estudio bioquímico molecular relacionado al proceso de infección en el género *Psittacanthus*. Entender la biología de infección de *P. calyculatus* podría derivar en un método de control biológico futuro.

## INTRODUCCIÓN

*Psittacanthus calyculatus* es una planta parásita que ha ocasionado graves daños al arbolado urbano y suburbano de diferentes regiones del centro y sur del país, ya que se conecta al tejido vascular de las plantas hospederas para obtener agua, minerales, sales y azúcares que le permitan su desarrollo [1, 6, 7]. Solo en el estado de Guanajuato, el 65% del arbolado está infectado por este muérdago [7]. Para que se logre el establecimiento y penetración, se cree que la radícula de infección utiliza un arsenal enzimático que degrada la corteza del árbol hospedero, sin embargo, el proceso de establecimiento e infección no está estudiado. En el presente trabajo se identificaron los estadíos fenológicos de infección y se evaluaron actividades de enzimas que degradan la corteza de árboles de mezquite (*Prosopis laevigata*). El estudio de la biología de infección de *P. calyculatus* nos ayudará a entender los mecanismos utilizados por esta parásita para lograr la supresión del sistema inmune y penetración del hospedero, y con esto buscar una solución para el control de esta plaga que está acabando con árboles endémicos de la región.

## OBJETIVO

### Objetivo general

Identificar las biomoléculas involucradas en los estadíos de infección entre el muérdago *Psittacanthus calyculatus* y mezquite.

### Objetivos específicos

1. Identificar los estadíos fenológicos de infección del muérdago.
2. Determinar los tipos de enzimas responsables en el proceso de infección.
3. Cuantificar enzimas involucradas en la degradación de la corteza del hospedero.
4. Analizar los perfiles de proteínas de los estadíos infectivos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Colecta e identificación de los estadios fenológicos.** La identificación de los estadios fenológicos se hizo de acuerdo a [1], detectando el crecimiento e identificación de las etapas tempranas de infección.

**Determinación de actividades enzimáticas involucradas en degradación de la corteza.** Se obtuvieron extractos de los diferentes estadios de muérdago [8]. Se evaluaron las actividades cualitativas de celulasas y amilasas en placa [9], y para la medición cuantitativa de las actividades enzimáticas de celulasas, endo-1,4- $\beta$ -glucanasas,  $\beta$ -1,4-glucosidasas y xilanasas siguiendo la metodología de [2]. La medición de azúcares liberados se realizó con Ácido 3,5-Dinitrosalicílico (DNS) midiendo la absorbancia a 550 nm [4].

**Análisis proteómico en una dimensión de los estadios de infección.** Se extrajeron las proteínas totales de cada estadio de infección [10] y se corrió un gel discontinuo SDS-PAGE en una dimensión [3] con 25  $\mu$ g de proteína a 160 V y 60 mA. Se tiñó con azul de Coomassie y se reveló para su análisis.

## RESULTADOS

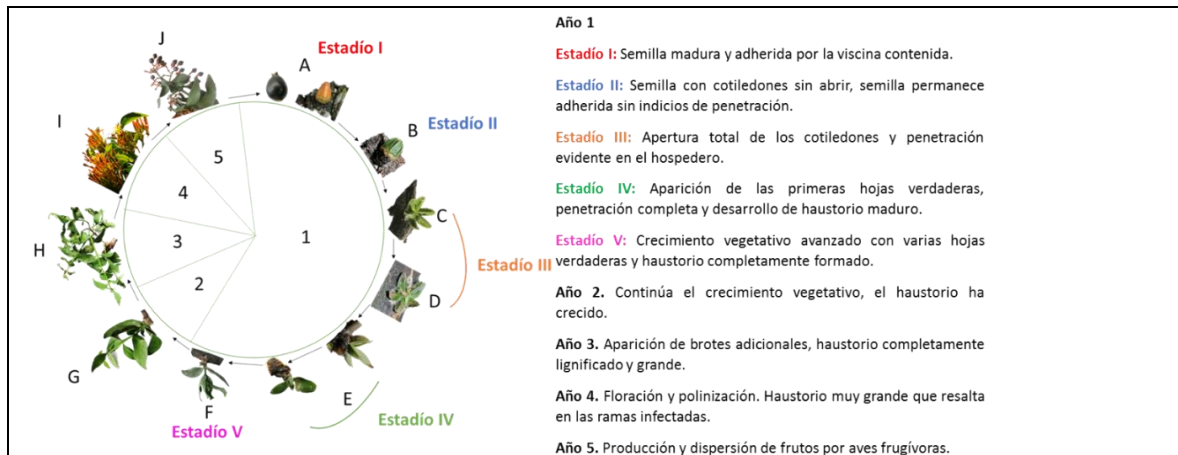


Figura 1. Ciclo de vida de *P. calyculatus*.

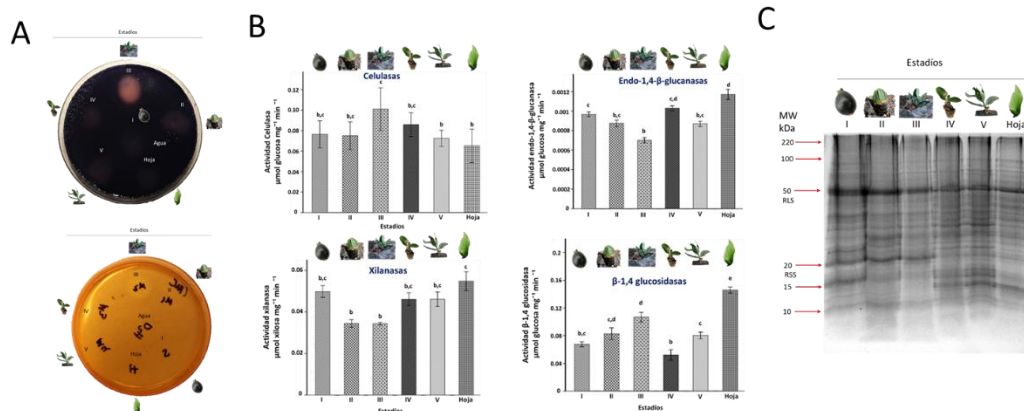


Figura 2. Detección de biomoléculas enzimáticas y proteínas involucradas en el proceso de infección de *P. calyculatus*. (A) Actividades tipo de amilasas y celulasas con extractos enzimáticos (B) Actividades cuantitativas de celulasas ( $n = 8$ ), endo-1,4- $\beta$ -glucanasa ( $n = 11$ ),  $\beta$ -1,4-glucosidasa ( $n = 4$ ) y xilanasas ( $n = 10$ ). Las barras representan media de la actividad y  $\pm$  errores estándar; letras representan las diferencias significativas entre las condiciones ( $P < 0.05$  de acuerdo al test ANOVA y Tukey) (C) Perfil proteómico en una dimensión de los estadios de infección.

## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Analizamos la fenología de infección de *P. calyculatus* en mezquite. Los primeros estadios del muérdago mostraron que es capaz de infectar desde el inicio, usando diferentes enzimas para degradar y penetrar al hospedero. Encontramos que en el estadio infectivo número III, ocurrió una degradación y penetración al hospedero, posteriormente, la formación del haustorio inició a partir del estadio IV. Esto se relaciona con la actividad de la enzima celulasa, que presentó una actividad mayoritaria en el estadio III seguido de las enzimas glucosidasas, xilanasas y glucanasas, estas actividades enzimáticas son similares a las encontradas en parásitas como *Cuscuta* [5] y *Orobancha* [7]. A su vez, también encontramos que los perfiles proteómicos tienen cambios a partir del estadio III, donde se detectó la ausencia y la síntesis de nuevas proteínas. Estos eventos fisiológicos y bioquímicos moleculares, están bien orquestados para que ocurra la degradación y penetración de la radícula para una conexión con el sistema vascular del hospedero, y posteriormente la parásita obtenga los nutrientes necesarios para la formación del haustorio y su desarrollo. Este es el primer estudio donde se encuentran diferentes biomoléculas que están involucradas en el proceso inicial infectivo para el asentamiento de la parásita.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Geils, B. W., Cibrian-Tovar, J., & Moody, B. (2002). Mistletoes of North American conifers. *Gen. Tech. Rep. RMRS-GTR-98. Ogden, UT: US Department of Agriculture, Forest Service, Rocky Mountain Research Station.* 123 p., 98.
2. Ghose, T. K. (1987). Measurement of cellulase activities. *Pure and applied Chemistry*, 59(2), 257-268.
3. Laemmli, U. K. (1970). SDS-page Laemmli method. *Nature*, 227, 680-5.
4. Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry*, 31(3), 426-428.
5. Nagar, R., Singh, M., & Sanwal, G. G. (1984). Cell wall degrading enzymes in *Cuscuta reflexa* and its hosts. *Journal of Experimental Botany*, 35(8), 1104-1112.
6. Pérez, J., & Isabel, J. (2016). Impacto del muérdago (*Psittacanthus calyculatus*) en la economía de las familias campesinas en una región del Subtrópico Mexicano. Universidad Autónoma del Estado de México.
7. Quintana-Rodríguez, E., Ramírez-Rodríguez, A. G., Ramírez-Chávez, E., Molina-Torres, J., Camacho-Coronel, X., Esparza-Claudio, J., Heil, M., & Orona-Tamayo, D. (2018). Biochemical traits in the flower lifetime of a Mexican mistletoe parasitizing mesquite biomass. *Frontiers in plant science*, 9:1031.
8. Singh, A., & Singh, M. (1993). Cell wall degrading enzymes in *Orobancha aegyptiaca* and its host *Brassica campestris*. *Physiologia Plantarum*, 89(1), 177-181.
9. Sunitha, V. H., Nirmala Devi, D., & Srinivas, C. (2013). Extracellular enzymatic activity of endophytic fungal strains isolated from medicinal plants. *World Journal of Agricultural Sciences*, 9(1), 1-9.
10. Wang, W., Vignani, R., Scali, M., & Cresti, M. (2006). A universal and rapid protocol for protein extraction from recalcitrant plant tissues for proteomic analysis. *Electrophoresis*, 27(13), 2782-2786.

# Verano Estatal de Investigación



Secretaría  
de Innovación  
Ciencia y  
Educación  
Superior

**EL GOBIERNO DEL ESTADO DE GUANAJUATO A TRAVÉS DE LA SECRETARÍA  
DE INNOVACIÓN, CIENCIA Y EDUCACIÓN SUPERIOR**

**OTORGA LA PRESENTE CONSTANCIA A:**

**AGUILAR VENEGAS JESSICA MONTSERRAT**

Por su participación como:

**PONENTE**

en el Congreso Académico del

**12° VERANO ESTATAL  
DE INVESTIGACIÓN**

Con el proyecto titulado:

La herramienta de uno, puede ser el arma de otro: Biomoléculas involucradas en el proceso inicial infectivo del muérdago en árboles de  
mezquite

Salvatierra, Gto. a 09 de agosto de 2019

Ing. Eusebio Vega Pérez  
Secretario de Innovación,  
Ciencia y Educación Superior



**VERANO ESTATAL  
DE INVESTIGACIÓN**

Dr. Antonio Vega Corona  
Subsecretario de Fomento a la  
Innovación, Ciencia y Tecnología



Julio 29, 2019

Asunto: DICTAMEN SOBRE PONENCIA ORAL  
mavenegas@comunidad.unam.mx

Estimad@

Jessica Montserrat Aguilar Venegas

Se ha evaluado el resumen sometido por Ud. para ser presentado en el **VII Congreso Mexicano de Ecología**, y tenemos el gusto de comunicarle que el comité evaluador correspondiente ha **aceptado** el trabajo

**ID 56** **La herramienta de uno, puede ser el arma de otro: Biomoléculas involucradas en el proceso inicial infectivo del muérdago en árboles de mezquite**

dentro del tema **Ecología molecular**, para ser presentado en forma de ponencia oral.

Le recordamos que al menos el primer autor del trabajo deberá estar inscrito al Congreso. Para más información sobre las cuotas de inscripción, consulte:

<http://www.scme.mx/scme/congreso/index.html>

Le recomendamos estar pendiente de la publicación del Programa del Congreso para presentarse a exponer su trabajo en el día, hora y sala indicados.

Atentamente  
Comité Organizador