

UNIVERSIDAD DE CIEGO DE ÁVILA  
CENTRO DE BIOPLANTAS

**A**lternativas para la obtención de proteasas a partir de  
*Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez.

**T**esis presentada en opción al grado científico de  
Doctor en Ciencias Agrícolas.

Aurora Terylene Pérez Martínez.

Ciego de Ávila

2012

UNIVERSIDAD DE CIEGO DE ÁVILA  
CENTRO DE BIOPLANTAS

**A**lternativas para la obtención de proteasas a partir de  
*Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez.

**T**esis presentada en opción al grado científico de  
Doctor en Ciencias Agrícolas.

Autora: Lic. Aurora Terylene Pérez Martínez, MSc.

Tutores: Ing. Martha Hernández de la Torre, Dra C.  
Ing. José Carlos Lorenzo Feijoo, Dr C.

Ciego de Ávila

2012

*A Alfre, por ser la luz de cada día. Hijo, solo por ti no abandoné el camino.*

*A mis padres, por seguir siendo mi pedestal inquebrantable. Por su amor infinito.*

*A Iosva, por acompañarme en la conquista de otro sueño. Por el amor que nos une.*

*A mis hermanos y sobrinos, por la felicidad de tenerlos.*

## AGRADECIMIENTOS

- Al Trujo (*Dr. Reinaldo Trujillo Sánchez*) por ayudarme a conquistar mi sueño de estudiante y desde entonces acompañarme siempre.
- A Mongui (*Dr. Ramón Santos Bermúdez*) por darme la oportunidad de pertenecer al colectivo del Centro de Bioplantas.
- A Martha (*Dra. Martha Hernández de la Torre*) por abrir la puerta, dejarme entrar y llevarme de la mano. Por su entrega infinita. Por el tiempo compartido y los sueños conquistados.
- A Jose (*Dr. José Carlos Lorenzo Fejoo*) por el empuje para alcanzar la meta. Por creer siempre que era posible.
- A Maritza (*Dra. Maritza Escalona Morgado*) por transitar conmigo este camino rectificando muchas veces mis errores.
- A Carli (*Dr. Carlos Aragón Abreu*) y Marcos (*Dr. Marcos Daquinta Gradaille*) porque los frutos de sus manos y sus mentes forman parte de esta tesis.
- Al Crio (*Dr. Marcos E. Martínez Montero*), Baby (*Dra. Barbarita Companioni*), Romelio (*Dr. Romelio Rodríguez*), Evelio (*Dr. Evelio Báez Pérez*), Oscar (*Dr. Oscar Concepción Laffitte*) y al Profe (*Dr. Justo González Olmedo*) por escucharme tantas veces y enseñarme siempre.
- A Roly (*Dr. Rolando Morán Valdivia*) por acudir siempre a mi llamado. Por el aliento para conquistar el reto.
- A Tere (*Dra. María Caridad Nápoles García*) por su ayuda infinita. Por allanar el camino.
- A Cacho (*Dr. Néstor Oscar Caffini*), Claudia (*Dra. Claudia Natalucci*), Jesús (*Dr. Jesús Jorrín Novo*), Anita (*Dra. Ana Maldonado*), Avilés (*Dr. Francesc Xavier Avilés*) y Julia (*Dra. Julia Lorenzo*) por abrirme las puertas de sus laboratorios y hacerme sentir como en casa. Por ayudarme a crecer profesionalmente.
- A Sebas (*Dr. Sebastián Trejo*), Silvia (*Dra. Silvia Bronsoms*), Marigeles (*Dra. María Ángeles Castillejos*), Jose (*Dra. María José Torres*), David (*Dr. Walter David Obregón*) y Mariela (*Dra. Mariela Anahí Bruno*) por entregarme sus conocimientos y sus manos. Por estar cada vez que los necesito.
- A mi amiga Carol por estar siempre ahí, al alcance de mi mano.
- A Maye porque en este andar nació la amistad.
- A Leya y Lola por ser el dúo de la buena ventura.
- A Janet, Yanelis, Janetsy, Maribel y Yemeys por compartir la travesía en estos días que ya son meses, en estos meses que ya son años.
- A Danilo y Ferna por buscar conmigo los curujeyes.
- A Yaima, Mariela, Luly, Iris, Yarianne, René, Gladys, Octavio, Ermis, Nicolás y Dayamí por las veces que necesité su ayuda.
- A Nora, Pablo, Dany y Anita por el cariño que llega desde la distancia.
- A Mirtha y el Moro por quererme como una hija. Por darme la tranquilidad de cuidar de mis tesoros.
- A todos los que me ayudaron a llegar a la meta...

...sin ustedes nada hubiese sido posible.

Eternamente gracias!!!

## Citación correcta Norma ISO 690

### **Según Sistema de Referencia Numérico**

Pérez Martínez, Aurora Terylene. Alternativas para la obtención de proteasas a partir de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez. [Tesis en opción al grado de Doctor en Ciencias Agrícolas] Ciego de Ávila: Universidad. Centro de Bioplantas, 2012. 131 p.

### **Según Sistema de Referencia Apellido, año**

Pérez Martínez, Aurora Terylene. 2012. Alternativas para la obtención de proteasas a partir de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez. [Tesis en opción al grado de Doctor en Ciencias Agrícolas] Ciego de Ávila: Universidad. Centro de Bioplantas. 131 p.

## ABREVIATURAS

**2iP:** 2-isopentil adenina.

**Abs.:** Absorbancia.

**Act.:** Actividad.

**AIB:** Ácido indolbutírico.

**ANA:** Ácido naftalenacético.

**ANOVA:** Análisis de varianza.

**AP:** Actividad proteolítica.

**ARN:** Ácido ribonucleico.

**BA:** 6-benciladenina.

**Conc.:** Concentración.

**DMSO:** Dimetil sulfóxido.

**E-64:** Trans-(Epoxisuccinil)-L-leucilamino-4-guadino butano.

**EDTA:** Ácido etilendiaminotetracético.

**ERO:** Especies reactivas del oxígeno.

**Ethrel:** Ácido 2-cloroetilfosfónico.

**FPLC:** *Fast protein liquid chromatography* (siglas en inglés).

**G.P:** Grado de purificación.

**KIN:** Kinetina.

**Kinetina:** 6-furfuril aminopurina.

**MALDI–TOF:** *Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight* (siglas en inglés).

**MDA:** Malondialdehído.

**Pepstatina A:** Ácido isovaleril-L-valil-L-valil-4-amino-3-hidroxi-6-metilheptanoil-L-alanil-4-amino-3-hidroxi-6-metilheptanoico.

**pI:** Punto isoeléctrico.

**PMSF:** Fluoruro de fenilsulfonilmetano.

**Rend:** Rendimiento.

**SDS:** Duodecil sulfato de sodio.

**SDS-PAGE:** Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida con duodecil sulfato de sodio.

**SOD:** Superóxido dismutasa.

**TDZ:** N-phenyl-N´-1,2,3–thidiazol-5-ylurea.

**Tris:** Tris(hidroximetil) aminometano.

**UV:** Ultravioleta.

**UV-Vis:** Ultravioleta-visible.

## SÍNTESIS

Las plantas de la familia Bromeliaceae son una fuente natural rica en cisteino proteasas, las cuales se utilizan en la industria alimenticia, biotecnológica y farmacéutica. Esto hace que se incremente el interés por estudiar nuevas fuentes para la obtención de fitoproteasas. *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez. es una planta que pertenece a esta familia y hasta la fecha no se conocen sus potencialidades en ese sentido. El lento crecimiento de esta planta unido a la ocurrencia de una sola floración por año limitan la disponibilidad de material vegetal en su hábitat natural. La presente investigación se realizó con los objetivos de: Aislar, purificar y caracterizar proteasas a partir de plantas de *H. penduliflora* crecidas en su hábitat natural; Establecer una metodología de propagación *in vitro* de *H. penduliflora* para incrementar la disponibilidad de material vegetal a usar como fuente de extracciones de proteasas y Determinar el efecto del ácido 2-cloroetilfosfónico (ethrel) en la inducción de proteasas y en indicadores bioquímicos y fisiológicos en plantas de *H. penduliflora* aclimatizadas. Inicialmente, se colectaron plantas adultas en el Área Protegida Loma de Cunagua y se obtuvieron extractos protelíticos crudos de hojas, tallos y frutos. Se identificó la presencia de cisteino proteasas activas y estables en tallos, con masas molares entre 21 000 y 30 000 Da y punto isoeléctrico a pH ácido. Además, se aisló, purificó y caracterizó parcialmente una nueva proteasa: la pendulifloraina I, con masa molar de 23 412 Da. Esta enzima mostró elevada homología con cisteino proteasas de la familia C1 aisladas de plantas de la familia Bromeliaceae. Por otra parte, se estableció una metodología para la propagación *in vitro* de esta planta, la desinfección de las semillas se logró con hipoclorito de sodio (2%, v:v) durante 20 minutos. La mayor multiplicación de los brotes se obtuvo en medio líquido de Murashige y Skoog suplementado con  $8,8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de 6-benciladenina y  $1,61 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de ácido naftalenacético. El corte desde la región apical hasta la base del brote favoreció la multiplicación. El tiempo de cultivo adecuado para la multiplicación fue de 45 días hasta 6 subcultivos. El enraizamiento *in vitro* fue mejor en el medio de Murashige y Skoog suplementado con  $3,22 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de ácido naftalenacético. Con la utilización del sustrato cachaza se logró el mayor índice de supervivencia en la aclimatización de los brotes. Se comprobó que la actividad proteolítica específica en extractos de tallos de plantas aclimatizadas tratadas con ethrel ( $4,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) fue 2,5 veces superior a los obtenidos en los tallos de plantas provenientes del hábitat natural. El ethrel provocó cambios en indicadores bioquímicos y fisiológicos asociados a la senescencia en hojas de plantas aclimatizadas.

## 1. INTRODUCCIÓN

La biodiversidad y los ecosistemas son una riqueza a explotar y su uso racional incrementa la posibilidad de obtener fuentes seguras de alimentos y nuevos productos para las industrias médico farmacéutica y biotecnológica. Las plantas producen más de 20 000 compuestos químicos diferentes de los que cada año se descubren alrededor de 1 600 (Sajc *et al.*, 2000). Esto implica que las alteraciones que se provocan al medio ambiente se traduzcan en pérdida de compuestos naturales diversos, antes de conocerse sus propiedades y posibles aplicaciones.

Las enzimas proteolíticas se encuentran dentro de la lista de compuestos naturales aislados a partir de las plantas (González-Rábade *et al.*, 2011). Las proteasas catalizan la hidrólisis de los enlaces peptídicos de las proteínas y péptidos (Barrett, 1989). Estas moléculas ocupan la posición más relevante entre las enzimas industriales y representan el 60% del total de enzimas comercializadas en el mundo (Feijoo-Siota y Villa, 2011). Durante años se han utilizado en la medicina, la fabricación de detergentes, la industria alimenticia y biotecnológica, por lo que generan ganancias de tres billones de USD por año (Leary *et al.*, 2009). Sin embargo, el número de proteasas obtenidas de plantas que se utilizan industrialmente es pequeño (Aehle, 2004). La mayoría de estas son de tipo cisteino como la papaina, la bromelina y la ficina.

La familia Bromeliaceae, mayoritariamente oriunda de América, incluye 3 172 especies de 58 géneros (Luther, 2008). Su hábitat es muy amplio, abarca desde los trópicos húmedos y calientes, a los subtropicos fríos y secos, lo que cubre una extensa área que comprende desde el centro de los Estados Unidos hasta la región Norte de Argentina y Chile (Smith, 1934). A estas plantas se les atribuye gran importancia por su utilidad al hombre desde el punto de vista social y económico (Bennett, 2000). Además, se conoce que son una fuente natural rica en cisteino proteasas (Rowan y Buttle, 1994; Rowan, 1998). Estas enzimas inciden de manera positiva en la alimentación, la salud y el bienestar de la humanidad (Barrett *et al.*, 2004, Dubey *et al.*, 2007).

Se reconoce que el número de proteasas vegetales aisladas y caracterizadas es aún muy bajo, sólo se ha estudiado menos del 1% de las especies vegetales que se conocen (Kasche, 2001). En la literatura se ha informado sobre el aislamiento, purificación y caracterización de cisteino proteasas de plantas de la familia Bromeliaceae, pero aun quedan muchos representantes por

explorar, entre los que se encuentra *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez. El renovado interés en la búsqueda de nuevas fuentes vegetales para la obtención de estas moléculas está sustentado en su amplio espectro de usos y en especial por el reconocimiento de la actividad antitumoral y antimetastizante que poseen frente a algunos tumores, descrita por Lotz (1991) y Batkin *et al.*, (1998). Adicionalmente, existe una demanda creciente de vías alternativas para la alimentación animal y humana que mantiene la necesidad, en especial en los países en vías de desarrollo, de contar con enzimas naturales capaces de hidrolizar eficientemente fuentes no convencionales de alimentación (Maehashi *et al.*, 1999; Morris *et al.*, 2002, 2003).

La obtención de proteasas a partir de plantas que crecen en su hábitat natural se ve afectada por factores como: las condiciones ambientales (luz, temperatura, precipitaciones), la infección por patógenos, el decrecimiento de las producciones agrícolas y la explotación indiscriminada de los hábitats naturales, lo que incide considerablemente en la biodiversidad y los ecosistemas (Jaenicke y Bohm, 1998; Mosolov *et al.*, 2001; Margesin *et al.*, 2007). Las plantas de la familia Bromeliaceae poseen una amplia radiación adaptativa que está sustentada por su anatomía, fisiología y la amplificación de sus formas de vida (Vásquez, 2003), lo que les permite ocupar diversos hábitats y nichos ecológicos (Medina, 1990). Esto hace que sus poblaciones se vean severamente afectadas por el cambio climático global y la antropización, lo que contribuye a la pérdida de material genético y a la disminución del número de individuos que integran las poblaciones vegetales (Guerra y Dal Vesco, 2010). Por eso se hace necesario el estudio de vías alternativas para la obtención de estas enzimas sin afectar la ecología.

En Cuba, país antillano de gran biodiversidad biológica, un alto porcentaje de sus especies, subespecies, poblaciones y comunidades bióticas se hallan en áreas naturales protegidas. De allí que encontrar un balance entre la necesidad imperiosa de explotar los recursos naturales y proteger el medio ambiente, es uno de los mayores retos que se enfrenta en la actualidad (González y Fontenla, 2007). Las instituciones científicas y docentes del país desarrollan proyectos de investigación con el fin de garantizar la conservación *in situ* y *ex situ* de plantas de interés social o económico (González y Fontenla, 2007), a cuyo empeño se une el Programa Nacional de Biotecnología Vegetal. Este tiene entre sus vertientes la obtención de productos naturales de alto valor agregado sin afectar los recursos naturales (Hernández *et al.*, 2003;

Borroto *et al.*, 2008; Izquierdo *et al.*, 2010). El cultivo de células y tejidos vegetales se ha enfocado hacia la producción de compuestos naturales, los cuales pueden ser utilizados en diversas esferas de la sociedad (Pérez-Alonso *et al.*, 2009; Borroto *et al.*, 2010).

El cultivo *in vitro* de células, tejidos y órganos se ha utilizado como herramienta para la conservación de plantas de la familia Bromeliaceae, que están en peligro de extinción (Rech Filho *et al.*, 2005, 2009; Tarré *et al.*, 2007; Aranda-Peres y Pinheiro, 2009; Dal Vesco y Guerra, 2010; Dal Vesco *et al.*, 2011, 2012), para el mejoramiento genético (Vervaeke *et al.*, 2004a, b) y para la propagación masiva de especies de interés comercial (Lin y Yeh, 2008; Duarte *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2010; Zuraida *et al.*, 2011). Hasta la fecha, no se ha descrito el uso de estas técnicas para la propagación de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez.

Las células vegetales poseen totipotencia biosintética, lo que les permite producir durante el cultivo *in vitro* los mismos compuestos químicos que se encuentran en las plantas madres (Tamer y Mavituna, 1996). En el género *Ananas*, estas técnicas se han usado para obtener proteasas a partir del material vegetal y del medio de cultivo (Apte *et al.*, 1979; Hernández *et al.*, 1999, 2009; Fernández y Pomilio, 2003; Pérez *et al.*, 2003, 2004). Sin embargo, el rendimiento obtenido es bajo, lo que limita sus potencialidades de uso (González-Rábade *et al.*, 2011). Las enzimas proteolíticas se distribuyen de manera diferencial en los órganos de la planta, de ahí que en ocasiones sea necesario un mayor grado de diferenciación celular del que se alcanza durante el cultivo *in vitro* para inducir su biosíntesis y acumulación (Yamamoto y Tabata, 1989).

El crecimiento y el desarrollo de las plantas está influenciado, en gran medida, por los reguladores de crecimiento (Gray, 2004; Ross y Reid, 2010). Las proteasas juegan un papel importante en diferentes etapas del desarrollo, facilitando los cambios de un estado a otro (Viestra, 1996). Esto hace que la biosíntesis y acumulación de estas enzimas pueda ser inducida por fitohormonas (Jones *et al.*, 1995; Ye y Varner, 1996; Martínez *et al.*, 2003, 2009). El etileno o un inductor de esta fitohormona se ha utilizado para lograr este propósito (Chen *et al.*, 2002; Jing *et al.*, 2005; Kaushal *et al.*, 2009; Schaller, 2012).

De los antecedentes descritos y a partir de la hipótesis: “*Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez produce proteasas que no se han identificado hasta el momento, y su propagación *in vitro* y la inducción de estas enzimas en plantas aclimatizadas constituye una alternativa para obtener extractos proteolíticos”, el presente trabajo experimental abordó como objetivos:

1. Aislar, purificar y caracterizar proteasas a partir de plantas de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez. crecidas en su hábitat natural.
2. Establecer una metodología de propagación *in vitro* de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez para incrementar la disponibilidad de material vegetal a usar como fuente de extracciones de proteasas.
3. Determinar el efecto del ácido 2-cloroetilfosfónico (ethrel) en la inducción de proteasas y en indicadores bioquímicos y fisiológicos en plantas aclimatizadas de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez.

#### **NOVEDAD CIENTÍFICA**

Se describe una nueva cisteino proteasa aislada a partir de tallos de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez. Además, por primera vez se establece una metodología para la propagación *in vitro* de esta planta. Son los primeros estudios donde se utiliza el ethrel para la inducción de proteasas en tallos de plantas aclimatizadas *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez.

#### **VALOR PRÁCTICO**

Los nuevos preparados proteolíticos obtenidos en esta investigación podrían utilizarse en la biotecnología, la industria médico-farmacéutica y alimenticia. Con la metodología de propagación propuesta se incrementa la disponibilidad de material vegetal para la obtención de proteasas, lo que reduce los daños ambientales que ocasiona la extracción de las plantas de su hábitat natural. Con la aplicación del ethrel a plantas aclimatizadas se alcanzan y superan los niveles de actividad proteolítica detectados en el material vegetal proveniente del hábitat natural.

## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Generalidades de la familia Bromeliaceae y características de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez.

Los miembros de la familia Bromeliaceae se caracterizan por ser plantas herbáceas o subarborescentes con tallo muy reducido. Esta familia de monocotiledóneas poseen hojas alargadas, enteras o aserradas (que pueden terminar en espinas), con frecuencia jaspeadas o coloreadas, dispuestas a manera de roseta. Las flores son hermafroditas y surgen del centro de la roseta en espiga o solitarias, generalmente con brácteas conspicuas de colores vivos. El periantio tiene tres sépalos y tres pétalos. Los estambres son seis, soldados a la corola. Poseen ovario tricarpelar, ínfero o súpero. El fruto es baya o cápsula, con semillas numerosas (Coppens d'Eeckenbrugge y Leal, 2003).

Los estudios anatómicos muestran que esta es una familia natural y bien diferenciada, que se caracteriza por la presencia de tricomas foliares peltados de morfología muy variable los cuales poseen un largo pedicelo uniseriado completamente embutido en la epidermis. Las células epidérmicas poseen paredes marcadamente sinuosas, las interiores más engrosadas que las exteriores, y usualmente incluyen un cuerpo silicoso grande. Las hojas presentan una hipodermis que se diferencia en secciones externas e internas, la última desarrolla por lo general un tejido acuífero profundo en la región adaxial. El tallo incluye una capa meristemática bien diferenciada asociada con la inserción de trazas radicales entre la corteza y el cilindro central. La corteza incluye numerosas raíces intracaulinares (Medina, 1990).

Algunos géneros pertenecientes a esta familia poseen alto valor ornamental, entre los que se encuentran: *Vriesea*, *Nidularium*, *Guzmania*, *Aechmea* y *Billbergia* (Company listing, 2005). Pocos miembros de la familia Bromeliaceae se han estudiado en busca de constituyentes químicos (Coelho *et al.*, 2010). La especie mejor estudiada y más comercializada es *Ananas comosus* (L.) Merr (Davey *et al.*, 2007; Van de Poel *et al.*, 2009). Esta familia se caracteriza por poseer proteasas en cantidades superiores a las fisiológicamente necesarias (Barrett, 1989), lo que constituye una potencialidad muy atractiva debido a las múltiples aplicaciones atribuidas a dichas enzimas.

Esta familia se subdivide en tres subfamilias de acuerdo, esencialmente, a la estructura del aparato reproductor: *Pitcairnioideae*, *Tillandsioideae* y *Bromelioideae*. Los miembros de la subfamilia *Pitcairnioideae* son los menos especializados y más primitivos de la familia, casi todos son terrestres. En el caso de los representantes de la subfamilia *Tillandsioideae*, aunque poseen caracteres florales y frutales relativamente primitivos, se caracterizan por contar con tricomas epidérmicos y poseen la morfología y anatomía más avanzada dentro de la familia. La mayoría de sus especies son epífitas, un estilo de vida evolucionado (Coppens d'Eeckenbrugge y Leal, 2003).

Por su parte, la subfamilia *Bromelioideae* constituye la más evolucionada según la estructura de sus órganos reproductores. Es la más diversa, tiene el mayor número de géneros (32), pero el menor número de especies (800) con un amplio rango de vida: terrestre, epífita o rupícola (Schulte *et al.*, 2009). Su centro de origen se localiza en los bosques lluviosos de la Mata Atlántica del Oriente en Brasil y se distribuye por toda la América tropical y subtropical (Bennett, 2000). Martin (1994) informó que las plantas de esta subfamilia poseen un mecanismo fotosintético CAM (metabolismo ácido de las crasuláceas) obligado tanto para plantas terrestres como epífitas. Poseen una fitotelma (cavidad, cisterna o tanque formado por la base de las hojas envainadoras en roseta) mejor desarrollada, la cual se llena de agua y está a menudo habitada por organismos acuáticos (Bennett, 2000). En Cuba esta subfamilia está representada de manera natural por cuatro géneros con cinco especies: *Aechmea nudicaulis* (L.) Griseb., *Ananas comosus* (L.) Merrill, *Bromelia pinguin* L., *Bromelia karatas* L. y *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez, distribuidas en todo el país (Sauget, 1946).

El género *Hohenbergia* está formado por 61 especies (Luther, 2008). Su centro de origen se ubica en Colombia, al oeste de la Cordillera de los Andes y está distribuido por toda América, con la mayor representación de las especies en Brasil (73%) y las Antillas (27%). Las plantas pertenecientes a este género pueden tener hábito de vida terrestre, saxícola o epífita. Se caracterizan por poseer hojas con espinas en los bordes, dispuestas en roseta que cubren al tallo reducido y forman una fitotelma casi cerrada donde se acumula el agua. La inflorescencia es una espiga bien desarrollada, generalmente el raquis es bipinnado aunque también puede ser digitado o simple. Las flores están sobre conos cilíndricos o en ramas sésiles. Los sépalos

son asimétricos, muy poco connatos. Los pétalos tienen un apéndice con escamas bien desarrolladas. En las flores el tubo epígino es poco profundo o está ausente. Los restos de los ovarios se distinguen en el pedicelo de los frutos. El polen posee dos o cuatro poros. Las placentas son apicales y los óvulos son obtusos o alargados (Smith y Till, 1998).

*Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez. es una planta epífita que se encuentra distribuida por toda Cuba y Jamaica. Posee hojas anchas (50-100 cm) con espinas en el limbo que pueden alcanzar hasta 2 mm de tamaño. Las flores se agrupan en una inflorescencia a manera de espiga. Son hermafroditas con pétalos no linguados. El ovario es ínfero con tres lóbulos y posee numerosos óvulos. El fruto es una baya subglobosa que posee numerosas semillas (Sauget, 1946). En esta planta, las raíces tienen solamente función mecánica. La base de las hojas es tiesa y expandida y forman una fitotelma bien desarrollada, casi cerrada donde pueden almacenar cantidades considerables de agua y nutrientes. La región de la vaina de las hojas posee numerosos pelos escamosos con el margen ligeramente lobado que garantizan la absorción del agua y los nutrientes hacia el interior de los tejidos de almacenamiento (Proença y Sajo, 2004). Los estudios anatómicos de las hojas demostraron la presencia de una cutícula gruesa, una sola capa de hipodermis mecánica con paredes finas y extensiones esclerenquimatosas de la vaina de los haces (Campos, 2010). Los estomas se caracterizan por tener las células subsidiarias y vecinas más hundidas que las células epidérmicas; con ello, las células guardianes pueden reducir la transpiración por oclusión de la cámara subestomática o por no apertura del interior del poro (Tomlinson, 1969).

Las plantas de la familia Bromeliaceae constituyen un subsistema ecológico complejo que influye en la estabilidad de los ecosistemas. El proceso progresivo de devastación que sufren los hábitats naturales causa una marcada reducción de la biodiversidad. Estas pérdidas también se observan en la flora epífita, rica en especies de esta familia (Coffani Nunes, 2002). Varias especies de esta familia se encuentran en peligro de extinción o amenazadas (Mercier y Kerbauy, 1995; Pompelli y Guerra, 2005, Rech Filho *et al.*, 2005, Droste *et al.*, 2005, Tarré *et al.*, 2007; Aranda-Peres y Pinheiro, 2009). Actualmente, *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez no se encuentra contemplada entre las plantas en peligro de extinción o amenazadas en Cuba (Berazaín *et al.*, 2005). Sin embargo, sus hábitats naturales están sufriendo serias

afectaciones debido a la acción del hombre y a los fenómenos naturales (González y Fontenla, 2007). Es por ello que un manejo adecuado de esta especie garantizaría su conservación y permitiría realizar estudios en busca de constituyentes químicos que puedan utilizarse en diversas esferas de la vida sin afectar la biodiversidad.

## **2.2 Aislamiento, purificación y caracterización de proteasas de origen vegetal y en particular de la familia Bromeliaceae.**

El análisis de secuencias completas de varios genomas ha mostrado que aproximadamente el 2% de la información genética son proteasas, lo que indica que es éste uno de los grupos funcionales de enzimas más grande y mejor caracterizado (Barrett *et al.*, 1998). Las enzimas proteolíticas pueden clasificarse de acuerdo con el mecanismo catalítico, la especificidad del sustrato, la localización celular, la estructura y la función. Rawlings *et al.* (2010) propusieron un sistema en el que las proteasas se agrupan según los residuos del centro activo y su mecanismo de acción en siete grupos: serino, cisteino, aspártico, metalo, glutámico, aspargina y treonina. En las plantas solo se han descrito cinco grupos: serino, cisteino, aspártico, metalo y treonina.

Las cisteino proteasas están ampliamente distribuidas entre los organismos vivos (Grzonka, *et al.*, 2001). Incluyen varias catepsinas lisosomales, calpains (proteínas citosólicas activadas por calcio) y proteasas de plantas. Las cisteino proteasas de la familia C1 son las más abundante dentro de esta clase, la integran la papaina, otras proteasas de plantas (quimopapaina, caricaina, bromelina, actinidina, ficina, aleuraina) y catepsinas lisosomales B, H, L, S, C y K. Son relativamente pequeñas con valores de masa molar de 20 000 a 35 000 Da (Turk *et al.*, 1999). Son activas a pH ligeramente ácido y su pH óptimo en la hidrólisis de sustratos sintéticos varía entre 5,6 y 6,8. En animales se localizan en lisosomas y en el citosol (Grzonka *et al.*, 2001), mientras que en plantas generalmente pueden encontrarse en las vacuolas y la pared celular (Grudkowska y Zagdanska, 2004).

De acuerdo con el sistema de clasificación MEROPS, las cisteino proteasas comprenden más de 40 familias que se agrupan en seis superfamilias o clanes (Barrett *et al.*, 2001). La mayor parte de las cisteino proteasas de plantas pertenecen a la familia de la papaina y la legumaina. Se conoce la secuencia aminoacídica de más de 50 cisteino proteasas de la familia de la papaina y 15 de la familia de la legumaina (Fisher *et al.*, 2000). En las plantas, estas enzimas son las

responsables del 30% de la actividad proteolítica total en órganos maduros no senescentes (Grudkowska y Zagdanska, 2004). Además se activan rápidamente ante estímulos internos y externos, incrementándose su actividad hasta el 90% de la actividad proteolítica total (Wisniewski y Zagdanska, 2001).

Varias proteasas se han aislado de plantas de diferentes familias botánicas, entre las que se encuentran: Euphorbiaceae (Domsalla y Melzig, 2008), Asclepiadaceae (Trejo *et al.*, 2001; Liggieri *et al.*, 2009); Asteraceae (Duarte *et al.*, 2007, 2008; Vairo Cavalli *et al.*, 2008); Apocynaceae (Freitas *et al.*, 2007; Tomar *et al.*, 2008; Holenarasipura *et al.*, 2010); Meliaceae (Uchikoba *et al.*, 1999); Poaceae (Martínez *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2011); Iridaceae (Uchikoba *et al.*, 2002); Phytolaccaceae (Sussner *et al.*, 2004); Fabaceae (Zhang *et al.*, 2006; Jinka *et al.*, 2009); Solanaceae (Vallés *et al.*, 2008); Moraceae (Devaraj *et al.*, 2008, Singh *et al.*, 2008, Sharma *et al.*, 2009; Corrons *et al.*, 2012); Zingiberaceae (Nagarathnam *et al.*, 2010; Karnchanatat *et al.*, 2011) Caricaceae (Kyndt *et al.*, 2007; Gavira *et al.*, 2007; Torres *et al.*, 2010) y Bromeliaceae (Rowan y Buttle, 1994; Hernández *et al.*, 1999; Bruno *et al.*, 2003, 2006, 2008; Abreu *et al.*, 2005, 2008; Cabral *et al.*, 2006).

Las plantas de la familia Bromeliaceae producen gran cantidad de proteasas. Aparentemente estas enzimas no tienen una función biológica definida en el crecimiento de las plantas (Boller, 1986; Van der Hoorn, 2008). Hasta la fecha se han aislado y caracterizado parcialmente varias proteasas de esta familia: la ananina, comasaina, bromelina de fruto y bromelina de tallo a partir de varios órganos de *Ananas comosus* (L.) Merrill (Napper *et al.*, 1994; Rowan y Buttle, 1994; Hernández *et al.*, 1997, 1999), la hemisfericina a partir de *Bromelia hemisphaerica* Lamarck (Agundis *et al.*, 1977; Ochoa *et al.*, 1987), la pinguinaina a partir de frutos de *Bromelia pinguin* L. (Abreu *et al.*, 2005, 2008); la karatasina de frutos de *Bromelia plumieri* (E. Morren) L.B. Smith (Montes, 1990), la macrodentina I y II de frutos inmaduros de *Pseudananas macrodentes* (Morr.) Harms (Natalucci *et al.*, 1996; López *et al.* 2000, 2001); la balansaina I de frutos inmaduros de *Bromelia balansae* Mez (Pardo *et al.*, 2000). Además se han obtenido la hieronymaina I, II y III aisladas de frutos inmaduros de *Bromelia hieronymii* Mez (Bruno *et al.*, 2003, 2006, 2008) y la fastuosaina extraída de frutos inmaduros de *Bromelia fastuosa* Lindl (Cabral *et al.*, 2006). También se han aislado proteasas de frutos de *Bromelia*

serra Griseb. (Caffini *et al.*, 1988), *Bromelia palmeri* Mez y *Bromelia sylvestris* Willd. ex Link (Hernández Arana *et al.*, 1983), *Bromelia laciniosa* Mart. (Buttazzoni *et al.*, 1984; Priolo *et al.*, 1986) y *Bromelia antiacantha* Bertoloni (Vallés *et al.*, 2007).

Las cisteino proteasas que se obtienen de plantas de la familia *Bromeliaceae* se utilizan en la industria alimenticia como tenderizador de carnes (Foda *et al.*, 1980; Sullivan y Calkis, 2010), para obtener huevos deshidratados (Lawrie, 1985; Bailey y Light, 1989), para la clarificación de vinos y cervezas (Jones, 2005; Benucci *et al.*, 2011), para hidrolizar gluten (Wang *et al.*, 2007) y para obtener hidrolizados proteicos de pollo y pescado (Aspmo *et al.*, 2005). También se usan en la industria farmacéutica para tratar trastornos del sistema digestivo (Chandler y Mynott, 1998; Kane y Goldberg, 2000; Mynott *et al.*, 2002; Stepek *et al.*, 2005); como antiinflamatorio (Kelly, 1996; Heyll *et al.*, 2003; Fitzhugh *et al.*, 2008; Onken *et al.*, 2008; Chobotova *et al.*, 2009; Aiyegbusi *et al.*, 2011); para el tratamiento de la artritis (Brien *et al.*, 2004), en oncología (Guimarães-Ferreira *et al.*, 2007; Beuth, 2008; Salas *et al.*, 2008; Bhui *et al.*, 2010; Otsuki *et al.*, 2010), para eliminar tejidos necrosados (Rosenberg *et al.*, 2004) y en la identificación de anticuerpos (Rookard *et al.*, 2009).

En la purificación de proteínas y péptidos usualmente se utilizan diferentes tipos de cromatografías, técnicas electroforéticas, ultrafiltración, precipitación u otros procedimientos (Safarik y Safarikova, 2004). No existe una metodología única mediante la cual puedan purificarse todas las cisteino proteasas. Para establecer un esquema de purificación se hace necesario contar con un método de extracción adecuado, conocimiento relativo de la enzima y establecer con que propósito la enzima purificada será utilizada (Chávez *et al.*, 1990, 2002).

A partir de plantas de la familia *Bromeliaceae* se han purificado varias cisteino proteasas con el uso de diferentes métodos cromatográficos por FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*), por ejemplo: se logró la purificación de balansaina I a partir de extractos de frutos inmaduros de *Bromelia balansae* Mez. El procedimiento consistió en una precipitación fraccionada con etanol y luego el intercambio aniónico en una matriz de DEAE-Sefarosa, tampón Tris-HCl 50 mmol·L<sup>-1</sup>, pH 8,0 a 4°C y gradiente lineal de cloruro de sodio entre 0-0,25 mol·L<sup>-1</sup>. Se obtuvo un rendimiento de 48,3% (Pardo *et al.*, 2000). López *et al.* (2001) purificaron dos cisteino proteasas (macrodontina I y II) a partir de frutos de *Pseudoananas macrodentes* (Morr.)

Harms, mediante precipitación fraccionada con acetona seguida de intercambio aniónico en matriz Q-Sefarosa, pH 8,3 y elución con gradiente lineal de cloruro de sodio entre 0,05-0,30 mol·L<sup>-1</sup>. Los rendimientos fueron de 21 y 10% para macrodentina I y II respectivamente.

Bruno *et al.* (2003, 2006, 2008) purificaron hieronymaina I, II y III a partir de extractos de frutos inmaduros de *Bromelia hieronymii* Mez. Inicialmente realizaron un fraccionamiento acetónico y obtuvieron un preparado parcialmente purificado. Luego, estos autores realizaron un intercambio catiónico utilizando como matriz CM-Sefarosa y purificaron la hieronymaina I. Para purificar la hieronymaina II y III siguieron la misma secuencia de purificación. Primeramente realizaron una cromatografía de intercambio aniónico con matriz Q-Sefarosa. Seguidamente la fracción de interés en cada caso se recromatografió por intercambio catiónico en SP-Sefarosa.

La bromelina de tallo es la proteasa mayoritaria en los extractos de piña, de ahí que la mayoría de los procesos de purificación para diferentes órganos de *Ananas comosus* (L.) Merrill están relacionados con esta enzima (Rowan, 1998). Las múltiples formas cromatográficas mostradas por esta enzima es un tema muy debatido en la literatura especializada. La presencia de moléculas de características muy similares en el extracto de partida hace que los rendimientos de las purificaciones sean bajos.

Los primeros datos de bromelina purificada proceden de estudios realizados por Murachi *et al.* (1964). Estos autores extrajeron el jugo de frutas verdes y maduras a presión con una prensa hidráulica. Luego precipitaron las proteínas con acetona fría y purificaron la bromelina por cromatografía de intercambio iónico en DEAE-Celulosa. Murachi, (1970) usó el mismo proceso pero precipitó el jugo de tallo con sulfato de amonio al 70% y logró un preparado proteolítico con una actividad específica de 1,15 U·mg<sup>-1</sup> de proteínas.

Thomson *et al.* (1980) patentaron un procedimiento de purificación de bromelina a partir de extracto crudo de tallo, que se purificó de forma combinada con el uso de un intercambiador catiónico con grupos funcionales ácidos (en forma de H<sup>+</sup> ó NH<sup>4+</sup>) y un segundo intercambiador aniónico en forma de bicarbonato. Tisseau (1986) sugirió un método similar, en el que, al preparado precipitado se le ajustó el pH de 3 a 6, se trató la solución con óxido o hidróxido de

magnesio. El jugo se pasó por resinas de intercambio iónico y se colectaron las fracciones con actividad biológica.

Con el objetivo de completar la caracterización de las proteasas presentes en extractos de tallos de piña, Rowan y Buttle (1994) purificaron el preparado proteolítico por cromatografía de intercambio catiónico en columnas Mono S HR 5/5 en FPLC. En investigaciones posteriores el preparado crudo de tallos se fraccionó, de manera similar en dos etapas (FPLC, columnas Mono S HR 5/5 equilibradas en tampón bicina). Los componentes básicos se separaron y caracterizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida, espectrometría de masa y secuencia aminoacídica parcial (Harrach *et al.*, 1995). En otros estudios se aislaron y caracterizaron dos formas ácidas de una proteasa de tallo mediante dos pasos de purificación: primero intercambio catiónico para remover los componentes básicos y luego intercambio aniónico en FPLC (Harrach *et al.*, 1998).

Hernández *et al.* (2003) informaron sobre la obtención y purificación de bromelina a partir de tallos de *Ananas comosus* (L.) Merrill. La extracción de proteasas se logró con el uso de una metodología que diseñaron y patentaron Hernández *et al.* (1997) en la que se emplean protectores del centro activo de la enzima a un pH cercano al fisiológico de la planta y alejado del óptimo, para evitar la autoproteólisis. La purificación de bromelina se realizó mediante la combinación de cromatografía de exclusión en geles de Sefadex G-100 e intercambio iónico en Carboximetilcelulosa-52. El rendimiento informado fue de 42% y el grado de pureza de 2,47.

Hale *et al.* (2005) lograron la purificación de tres fracciones activas a partir de extractos de frutos de *Ananas comosus* (L.) Merrill por intercambio catiónico con una matriz SP-Sefarosa de flujo rápido en FPLC. La columna se estabilizó con tampón acetato  $20,0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , pH 5. Las proteínas retenidas en la columna se eluyeron con un gradiente lineal en  $0-1,0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de cloruro de sodio en el tampón de corrida. Las fracciones de interés se colectaron, se dializaron y luego se concentraron para su posterior caracterización.

Los estudios de cinética enzimática permiten dilucidar los factores que afectan la velocidad de las reacciones enzimáticas, los más importantes son: la concentración de enzima, la concentración de los ligandos (sustratos, productos, activadores e inhibidores), el pH, la fuerza iónica y la temperatura. Cuando todos estos factores se analizan de una manera adecuada se

puede conocer mucho acerca de la naturaleza de una enzima y constituyen una herramienta analítica muy poderosa no sólo para la bioquímica, sino también para la biotecnología (Chávez *et al.*, 1990). Las cisteino proteasas de la familia C1 se caracterizan por presentar actividad proteolítica variable en dependencia del sustrato que se utilice (Barrett *et al.*, 2004).

El pH afecta de diversos modos la velocidad de las reacciones enzimáticas. Los estudios de pH brindan información valiosa sobre el modo de acción de las enzimas y los grupos presentes en el centro activo. La determinación de la eficiencia catalítica en dependencia del pH frente a diferentes sustratos ha permitido realizar importantes deducciones de los mecanismos de acción de las cisteino proteasas. Estas enzimas exhiben perfiles amplios de actividad en función del pH para sustratos naturales y sintéticos. Grzonka *et al.* (2001) informaron que las cisteino proteasas poseen elevada actividad hidrolítica en un rango de pH entre 4,0 y 6,5.

La determinación del pH óptimo de cisteino proteasas aisladas a partir de plantas de la familia Bromeliaceae con caseína como sustrato evidenció que la balansaina I posee un rango de pH óptimo entre 8,8-9,2 (Pardo *et al.*, 2000, 2001), la macrodontaína I entre 6,1-8,5 (Natalucci *et al.*, 1996, López *et al.*, 2000); la macrodontaína II entre 7,5-8,5 (López *et al.*, 2000), la hironymaina I y III entre 8,5-9,5 (Bruno *et al.*, 2003, 2008) y la hemisfericina aproximadamente 8 (Agundis *et al.*, 1977; Montes *et al.*, 1990).

En el caso de la ananaina el pH óptimo es aproximadamente 7 para azocaina como sustrato (Barrett *et al.*, 1998). Por su parte, el pH óptimo de la bromelina para la hidrólisis varía entre 5 y 7 en dependencia del sustrato que se use. Los principales valores informados son: pH 7, si se utiliza como sustrato azocoll (Daley y Vines, 1978), entre pH 6-8 para caseína y hemoglobina y pH 5 cuando se usa gelatina como sustrato (Awang y Razak, 1978).

La velocidad de la mayoría de las reacciones enzimáticas aumenta con la temperatura, pero hasta un valor determinado que no conspira con la estabilidad estructural de la molécula. La actividad catalítica de las enzimas depende entre otros factores del mantenimiento de la estructura tridimensional, que se mantiene por un número grande de enlaces no covalentes débiles. Si la molécula absorbe demasiada energía, la estructura tridimensional se altera, la enzima se desnatura y pierde la actividad catalítica. Si la reacción enzimática ocurre a una temperatura a la cual no hay desnaturación y la enzima exhibe una actividad constante

durante un período de tiempo tan largo como el de duración del ensayo se puede hablar de temperatura "óptima". Independientemente de la importancia de la temperatura para las reacciones enzimáticas, la mayoría de los ensayos se realizan por conveniencia a 25 ó 37°C. (Chávez *et al.*, 2002).

En investigaciones de hidrólisis de proteínas naturales con bromelina la enzima demostró ser relativamente estable a temperaturas superiores a 40°C. Para procesos de hidrólisis se recomienda trabajar de 50-60°C, valores para los que se observa la mejor velocidad de reacción (Awang y Razak, 1978). La curva de máxima capacidad calórica de bromelina ocurrió a 59,3°C. La pérdida de estructura terciaria de la bromelina, la papaina y la caricaina por efecto de la temperatura es totalmente irreversible. A temperaturas inferiores a 20°C no se observa un incremento considerable de la velocidad de reacción, a temperaturas superiores a 90°C es evidente la pérdida de actividad por desnaturalización (Arroyo-Reyna y Hernández-Arena, 1995).

El uso de inhibidores de proteasas facilita la determinación del mecanismo catalítico de estas enzimas. Salvesen y Nagase (2001) informaron el uso de diferentes inhibidores irreversibles en ensayos de inhibición que permiten dilucidar el tipo catalítico de las enzimas presentes en los extractos. Estos autores plantearon que las metalo proteasas se inhiben irreversiblemente con 1,10-fenantrolina, las serino proteasas con fluoruro de fenilsulfonilmetano (PMSF), las proteasas aspárticas con ácido isovaleril-L-valil-L-valil-4-amino-3-hidroxi-6-metilheptanoil-L-alanil-4-amino-3-hidroxi-6-metilheptanoico (pepstatina A) y las cisteínicas con el *trans*-(Epoxisuccinil)-L-leucilamino-4-guadino butano (E-64).

Varias cisteino proteasas de plantas se han ensayado frente a E-64. Araujaina I se vio inhibida totalmente frente a este inhibidor (Priolo *et al.*, 2000). Resultados similares obtuvieron Morcelle *et al.* (2004), Vallés *et al.* (2008) y Liggieri *et al.* (2009) cuando utilizaron funastraina cII, granulosaína I y asclepaina cII, respectivamente. Entre las cisteino proteasas obtenidas de plantas de la familia Bromeliaceae, la macrodontaina I y II (López *et al.*, 2000), la balansaina I (Pardo *et al.*, 2000) y la hironymaina I, II y III (Bruno *et al.*, 2003, 2006, 2008) se inhiben con este compuesto. La bromelina exhibe una inhibición cinética inusual frente a E-64 lo que difiere

del resto de la endoproteasas cisteínicas. Por su parte, la ananaina es eficientemente inhibida por E-64 (Rowan *et al.*, 1990; Napper *et al.*, 1994).

Para los estudios de caracterización enzimática resulta muy útil la electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en presencia de duodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE). Este método permite determinar la masa molar aparente de cualquier proteína comparada con proteínas patrones de masas molares conocidas (Laemmli, 1970). El isoelectroenfoque (IEF) es otro método electroforético de alta resolución que permite analizar muestras muy complejas y determinar el punto isoeléctrico de las proteínas (pI). En el IEF, las proteínas se separan en un gradiente continuo de pH al aplicar un campo eléctrico (Voet y Voet, 1992). Por su parte, la electroforesis bidimensional combina la separación por masa molar y punto isoeléctrico. Esto permite una caracterización más completa de la proteína objeto de análisis (O' Farrel, 1975; Wang *et al.*, 2006). El zimograma es una técnica que permite determinar las fracciones activas presentes en la muestra de interés después que se realiza la corrida electroforética (Westergaard *et al.*, 1980).

La identificación de una nueva proteína se logra cuando se conoce su masa molar y la secuencia aminoacídica, al menos de su extremo amino terminal. El conocimiento de estos aspectos, generalmente permite establecer la similitud y/o la diferencia de la proteína aislada con las descritas en las bases de datos de secuencias de nucleótidos y de genomas (Obregón *et al.*, 2009a). La espectrometría de masas se reconoce como el método más seguro y sensible para obtener la información sobre la masa molar de moléculas pequeñas. La incorporación de procesos suaves de ionización como el de desorción/ionización por matriz asistida con láser (MALDI) permite la detección de proteínas y de otros biopolímeros (Thiede, 1997, Obregón *et al.*, 2009a). La comparación de las secuencias amino terminal de las proteasas aisladas de plantas de la familia Bromeliaceae demuestra que están estrechamente relacionadas. Estas enzimas se asemejan más entre sí que con otros miembros de la familia de la papaina, lo que evidencia una divergencia evolutiva relativamente reciente (Rowan y Buttle, 1994).

### **2.3 Propagación de plantas de la familia Bromeliaceae.**

Las plantas de la familia Bromeliaceae se propagan de manera natural a partir de semillas o por la separación de brotes laterales (Jones y Murashige, 1974). La propagación sexual es un

proceso muy lento y en ocasiones depende de las condiciones ambientales (Rauh, 1990; Landgraf y Paiva, 2009). La reproducción sexual también se ve limitada porque la floración de algunas especies de esta familia ocurre una sola vez en su ciclo de vida o una vez por año (Cândido, 1995, 1996). Por su parte, la propagación asexual depende de la aparición de brotes después del período de la floración. Estos crecen a partir de las yemas axilares y se pueden independizar cuando hayan alcanzado un tercio del tamaño de la planta madre, en este momento ocurre el enraizamiento espontáneo. En general las bromelias producen uno o dos brotes, pero cuando el primero se remueve, el otro brote que se encuentran en estado de dormancia se desarrolla para formar una nueva planta. Esta vía tiene como inconveniente que el material vegetal es escaso y conlleva a la introducción de enfermedades (Wall, 1988).

Los protocolos de propagación *in vitro* para las plantas de esta familia se han establecido a partir del cultivo de ápices, yemas axilares y explantes de hojas provenientes de plantas adultas (Pierik y Sprenkles, 1991; Barboza *et al.*, 2004; Pereira *et al.*, 2008), a partir de la germinación de las semillas (Mercier y Kerbauy, 1997; Alves y Guerra, 2001, Pompelli y Guerra, 2005, Duarte *et al.*, 2009), y por la formación de yemas adventicias a partir de la parte basal de las hojas removidas de cultivos asépticos (Carneiro *et al.*, 1999).

La germinación *in vitro* de semillas de plantas de esta familia es una posibilidad para la propagación rápida de estas especies. Además, constituye una estrategia interesante para mantener la variabilidad genética existente en las poblaciones naturales (Rech Filho *et al.*, 2005). Generalmente, los resultados obtenidos con este procedimiento son superiores al método convencional (Pierik *et al.*, 1984; Mercier y Kerbauy, 1995).

En los protocolos de micropropagación de varias plantas de esta familia, las semillas se han utilizado como explante inicial, entre las que se encuentran: *Tillandsia circinata* Schelecht (Benzing, 1970), *Guzmania minor* Mez, *Guzmania lingulata* (L.) Mez y *Vriesea splendens* (Brongniart) Lemaire (Pierik *et al.*, 1984), *Vriesea hieroglyphica* (Carriere) E. Morren (Mercier y Kerbauy, 1994; Aranda-Peres *et al.*, 2009), *Puya raimondii* Harms. (Suni *et al.*, 2001), *Vriesea reitzii* Leme y Costa (Rech Filho *et al.*, 2005, 2009), *Dyckia distachya* Hassler (Pompelli y Guerra, 2005), *Dyckia maritima* Baker (Lopes *et al.*, 2008); *Vriesea gigantea* Gaudichaud y *Vriesea philippocoburgii* Wawra (Droste *et al.*, 2005), *Tillandsia eizii* L.B. Smith (Pickens *et al.*,

2003; Toledo-Aceves y Wolf, 2008), *Nidularium fulgens* Lemaire (Duarte *et al.*, 2009), *Vriesea scalaris* E. Morren (Lopes *et al.*, 2009); *Neoglaziovia variegata* (Arr. Cam.) Mez (García *et al.*, 2009); *Vriesea friburguensis* Mez, *Vriesea unilateralis* (Baker) Mez (Aranda-Peres *et al.*, 2009) y *Billbergia zebrina* (Herbert) Lindley (Dal Vesco *et al.*, 2011).

Una práctica muy generalizada para lograr la desinfección de las semillas que muestra buenos porcentajes de germinación (92-100%) en esta familia es el uso de etanol 70% (v:v) por cortos períodos de tiempo (2-5 minutos) seguido de hipoclorito de sodio (1,5-5%, v:v) durante 20-30 minutos (Pompelli y Guerra, 2005; Rech Filho *et al.*, 2005; García *et al.*, 2009; Duarte *et al.*, 2009; Guerra y Dal Vesco 2010; Santos *et al.*, 2010).

Para desarrollar una metodología de propagación *in vitro*, es esencial establecer la fase de multiplicación. Determinar el tipo y la concentración de los reguladores de crecimiento resulta de suma importancia para lograr el éxito en dicha fase. Los reguladores del crecimiento que se añaden al medio de cultivo interactúan con las fitohormonas endógenas controlando el crecimiento y la morfogénesis (George *et al.*, 2008). Varias citoquininas: 6-benciladenina (BA); 6-furfuril aminopurina (kinetina); N-phenyl-N'-1,2,3-thidiazol-5-ylurea (TDZ) y 2-isopentiladenina (2iP) se utilizan para promover los diferentes eventos morfogenéticos en plantas de la familia Bromeliaceae. En el caso de las auxinas, generalmente se usa el ácido naftalenacético (ANA) durante esta fase del crecimiento *in vitro*. El efecto de la combinación de la BA y el ANA se ha estudiado con frecuencia dentro de la micropropagación de esta familia (Guerra y Dal Vesco, 2010).

Hosoki y Asahira (1980) utilizaron  $4,4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de BA y  $5,37 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de ANA en la multiplicación de *Vriesea poelmanii* L.B. Smith, *Aechmea fasciata* (Lindley) Baker y *Quesnelia quesneliana* (Brongniart) L.B. Smith. Moore *et al.* (1992) obtuvieron los mejores resultados en la multiplicación de brotes de *Ananas comosus* (L.) Merrill con  $8,8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de BA y  $10,74 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de ANA. Por su parte, Daquinta y Benegas (1997) recomendaron  $9,3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  BA y  $1,61 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de ANA para el ahijamiento exitoso de esta misma especie. Para el ahijamiento de los brotes obtenidos a partir de semillas germinadas *in vitro* de *Vriesea hieroglyphica* (Carriere) E. Morren y *Vriesea fosteriana* L.B. Smith, Mercier y Kerbauy (1992, 1994) utilizaron el medio de cultivo Knudson (1946) suplementado con  $2,2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ANA y  $8,9 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  BA.

Pierik y Sprenkles (1991) utilizaron yemas apicales y axilares de *Tillandsia cyanea* Linden ex K. Koch como material inicial para la multiplicación *in vitro* de esta especie. Estos autores lograron la mejor tasa de multiplicación con el medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962) suplementado con  $0,0265 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de ANA y  $0,886 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de BA luego de 10 semanas de cultivo. Por su parte, Carneiro *et al.* (1998) informaron la mejor multiplicación *in vitro* de *Cryptanthus sinuosus* L.B. Smith cuando utilizaron  $10,22 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  BA y  $1,34 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ANA en el medio de cultivo.

Carneiro *et al.* (1999) establecieron un sistema eficiente de regeneración de plantas de *Neoregelia cruenta* (Graham) L.B. Smith a partir de explantes de hojas. Estos autores informaron la formación de brotes adventicios a partir de la base de las hojas de plantas adultas después de cinco semanas de cultivo en medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962) suplementado con  $22 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de BA y  $2,5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de ANA. La formación de brotes múltiples de manera acelerada se presentó a partir de los cuatro meses de cultivo bajo las mismas condiciones.

La multiplicación de *Aechmea fasciata* (Lindley) Baker, *Aechmea kertesziae* Reitz, *Aechmea blumenavii* Reitz, *Neoregelia carolinae* (Beer) L.B. Smith, *Cryptanthus bromeloides* Otto y Dietrich y *Ananas nanus* (L.B. Smith) L.B. Smith se logró en medio de cultivo líquido de Murashige y Skoog (1962) suplementado con  $8,87 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  BA y  $1,59 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ANA y  $0,4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  paclobutrazol. Esta combinación de reguladores promovió la formación de brotes compactos con limitado desarrollo de las hojas (Daquinta *et al.*, 2001). En la micropropagación de *Ananas comosus* (L.) Merrill, Dal Vesco *et al.* (2001) obtuvieron la mayor tasa de multiplicación cuando le añadieron al medio de cultivo  $4,0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de BA y  $2,0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de ANA.

Por su parte, Arrabal *et al.* (2002) obtuvieron los mejores resultados en la multiplicación *in vitro* de brotes de *Cryptanthus sinuosus* L.B. Smith cuando utilizaron el medio de cultivo sin reguladores del crecimiento y suplementado con  $2,2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de BA y  $0,05 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de ANA. Rech Filho *et al.* (2005) durante la fase de multiplicación de *Vriesea reitzii* Leme y Costa, a partir de brotes provenientes de semillas germinadas *in vitro*, lograron la mejor tasa de multiplicación cuando utilizaron el medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962) suplementado con  $17,75 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de BA y  $10,74 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de ANA. Pompelli y Guerra (2005) establecieron un

protocolo para la micropropagación de *Dyckia distachya* Hassler a partir de semillas. Estos autores obtuvieron el mayor número de brotes por explante cuando usaron el medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962) suplementado con 2,0 mmol·L<sup>-1</sup> de ANA; 4,0 mmol·L<sup>-1</sup> de BA y 6,0 mmol·L<sup>-1</sup> de paclobutrazol después de 142 días de cultivo. Por otra parte, Pickens *et al.* (2006) utilizaron 8,8 µmol·L<sup>-1</sup> de BA y 0,54 µmol·L<sup>-1</sup> de ANA en el ahijamiento de *Tillandsia eizii* L.B. Smith.

Hamad y Taha (2008a, b) utilizaron el medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962) enriquecido con 14,43 mmol·L<sup>-1</sup> de ANA y 9.40 mmol·L<sup>-1</sup> de BA para la multiplicación de brotes de *Ananas comosus* (L.) Merrill var. Cayena Lisa. Estos autores, además, evaluaron el número (1, 2, 3 y 4) y el tiempo de subcultivo (30, 45, 60 y 75 días). Por su parte, García *et al.* (2009) obtuvieron la mayor cantidad de brotes por explante durante la multiplicación de *Neoglaziovia variegata* (Arr. Cam.) Mez cuando usaron 0,5 µmol·L<sup>-1</sup> de ANA y 4,4 µmol·L<sup>-1</sup> de BA después de 35 días de cultivo. Duarte *et al.* (2009) evaluaron el efecto de las concentraciones de BA (0; 2,2; 4,4; 8,8 y 17,8 µmol·L<sup>-1</sup>) y ANA (0; 0,58; 2,69 y 5,37 µmol·L<sup>-1</sup>) en la multiplicación de brotes provenientes de semillas germinadas *in vitro* de *Nidularium fulgens* Lemaire. El mayor número de brotes por explante lo obtuvieron cuando utilizaron la combinación de 4,4 µmol·L<sup>-1</sup> de BA y 5,37 µmol·L<sup>-1</sup> de ANA. García *et al.* (2009) informaron los mejores resultados en la multiplicación de los brotes de *Neoglaziovia variegata* (Arr. Cam.) Mez con 4,4 µmol·L<sup>-1</sup> de BA y 0,50 µmol·L<sup>-1</sup> de ANA.

Dentro de un protocolo de micropropagación, el enraizamiento de los brotes puede lograrse *in vitro* o durante la etapa de aclimatización *ex vitro*. Este proceso puede inducirse en diferentes tejidos vegetales y su éxito depende en gran medida del balance hormonal que se establezca. Generalmente, para promover la formación de raíces se necesita la presencia de auxinas en el medio de cultivo (George *et al.*, 2008). Guerra y Dal Vesco (2010) informaron que no es necesario el enraizamiento *in vitro* de la plantas de la familia Bromeliaceae para tener éxito en la aclimatización. Sin embargo, en la mayoría de las investigaciones se realiza el enraizamiento *in vitro*, ya sea en medio de cultivo libre de reguladores de crecimiento o que contenga auxinas.

En el enraizamiento de los brotes de *Ananas erectifolius* L.B. Smith, Pereira *et al.* (2008) obtuvieron 98% de brotes enraizados cuando utilizaron el medio de cultivo líquido de Murashige y Skoog (1962) sin reguladores del crecimiento. Por su parte, Lopes *et al.* (2008) lograron una

eficiencia de 33% en el enraizamiento de *Dyckia maritima* Baker en el medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962) suplementado con  $0,5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de ácido indolbutírico (AIB).

Duarte *et al.* (2009) evaluaron diferentes concentraciones de ANA en el enraizamiento *in vitro* de los brotes de *Nidularium fulgens* Lemaire. El mayor porcentaje de brotes enraizados (100%) lo obtuvieron cuando no utilizaron regulador del crecimiento en el medio de cultivo. Por su parte, Lopes *et al.* (2009) evaluaron el efecto del AIB en el enraizamiento *in vitro* de *Vriesea scalaris* E. Morren. La mayor emisión de raíces se presentó en los brotes cultivados en medio de cultivo sin reguladores del crecimiento.

La aclimatización *ex vitro* es una fase importante y necesaria en cualquier protocolo de micropropagación. La deshidratación es la principal causa de los bajos niveles de supervivencia. Los factores ambientales que más afectan este indicador son: la humedad relativa, la luz y la temperatura, por lo que se hace necesario el control riguroso de las condiciones de cultivo para lograr con éxito la aclimatización de las plantas. También, influyen de manera notable en esta etapa el tipo de sustrato, el control fitosanitario y la aplicación de reguladores del crecimiento (Preece y Sutter, 1991). Para el caso de la aclimatización *ex vitro* de las plantas de la familia Bromeliaceae se sugiere que los brotes posean un tamaño mínimo de 3 cm (Guerra y Dal Vesco, 2010) y se utilicen sustratos aireados, capaces de retener la humedad (Couvillon, 1998). Mercier y Kerbauy (1994) informaron el 100% de supervivencia y un desarrollo fenotípico normal para los brotes de *Vriesea hieroglyphica* (Carriere) E. Morren y *Vriesea fosteriana* L. B. Smith obtenidos a partir de semillas germinadas *in vitro*. Rech Filho *et al.* (2005) aclimatizaron brotes de *Vriesea reitzii* Leme y Costa utilizando como sustrato la mezcla de paja de arroz y el suplemento mineral Turfa fértil<sup>®</sup> (1:1, v:v). Estos autores obtuvieron el 100% de supervivencia de los brotes después de nueve semanas de cultivo. Por su parte, Alves *et al.* (2006) aclimatizaron brotes de *Vriesea reitzii* Leme y Costa y obtuvieron una supervivencia del 90%.

Carneiro *et al.* (1999) establecieron un sistema eficiente de regeneración de plantas de *Neoregelia cruenta* (Graham) L.B. Smith a partir de explantes de hojas. Las plantas regeneradas mostraron un fenotipo normal después de un año de crecimiento en las casas de cultivo. Pompelli y Guerra (2005) realizaron la aclimatización de los brotes de *Dyckia distachya* Hassler. Estos autores utilizaron como sustrato una mezcla de turba, vermiculita y arena (2:2:1, v:v:v). Luego de 120 días de cultivo obtuvieron un 92,6% de supervivencia. En la

aclimatización de los brotes de *Ananas erectifolius* L.B. Smith, Pereira *et al.* (2008) informaron un 100% de supervivencia. Por su parte, Duarte *et al.* (2009) obtuvieron el 100% de supervivencia de los brotes de *Nidularium fulgens* Lemaire cuando utilizaron el sustrato comercial Plantmax<sup>®</sup> HA (Ferreira *et al.*, 2007).

Santos *et al.* (2010) utilizaron como sustrato corteza de pino pulverizada para aclimatizar brotes de *Acanthostachys strobilacea* (Schult. f.) Klotzsch. Además, estos autores evaluaron el efecto de la fortaleza de las sales de Murashige y Skoog (1962) (0; 1; 10; 20; 50 y 100%) como suplemento de nutrientes en esta etapa. El mejor porcentaje de supervivencia (95%) lo obtuvieron cuando utilizaron el 100% de las sales de Murashige y Skoog (1962) luego de ocho meses de cultivo.

El cultivo *in vitro* de células y tejidos vegetales de plantas de la familia Bromeliaceae para la obtención de proteasas se ha explotado poco (Apte *et al.*, 1979; Fernández y Pomilio, 2003; Pérez *et al.*, 2003, 2004). Su principal limitación radica en que se logran muy bajos rendimientos. Esto está relacionado con los niveles de diferenciación celular que se alcanzan durante el cultivo *in vitro*.

#### **2.4 Papel bioquímico y fisiológico de las proteasas. Inducción de estas enzimas.**

Las proteasas vegetales se encuentran relacionadas con múltiples procesos fisiológicos y con el desarrollo de las plantas (Schaller, 2004). La degradación de las proteínas en las plantas es un proceso complejo, que envuelve múltiples vías proteolíticas y puede ocurrir en varios compartimentos celulares, como son: pared celular, vacuolas, cloroplastos, complejo de Golgi, microsomas, mitocondrias, citosol (Distefano *et al.*, 1997; Buchanan *et al.*, 2000) y peroxisomas (Palma *et al.*, 2002).

Las funciones asignadas a la proteólisis son: modificar o eliminar proteínas erróneas, proporcionar aminoácidos necesarios para la síntesis de nuevas proteínas, contribuir a la maduración de zimógenos y hormonas peptídicas. También, procesa señales para integrar proteínas a los organelos y participa en el control del metabolismo y la homeostasis al reducir la abundancia de enzimas y proteínas reguladoras (Viestra *et al.*, 1996, Van der Hoorn, 2008).

Independientemente del papel importante de las proteasas en distintos eventos fisiológicos, la función de estas enzimas puede ser dañina para la célula si no se expresa en el lugar y momento adecuado, por eso los procesos proteolíticos están sometidos a un complejo sistema

de regulación mediante dos mecanismos generales: activación de zimógenos e interacción proteasa-inhibidor (Avilés *et al.*, 1994; Turk *et al.*, 1997; Demidyuk *et al.*, 2010). Esto hace que la proteólisis sea limitada y dirigida hacia la ruptura de uniones peptídicas específicas en proteínas determinadas. La especificidad de corte depende de la accesibilidad de la unión peptídica a escindir, de los aminoácidos involucrados en el enlace peptídico y del entorno aportado por otros aminoácidos cercanos a la unión (Neurath, 1993).

Las cisteino proteasas juegan un papel importante en la senescencia de tejidos y órganos, en la muerte celular programada (Beers *et al.*, 2000; Suárez, 2004; Woltering, 2004; Gradzka, 2006; Esteban-García *et al.*, 2010; Parrot *et al.*, 2010, Guan-Hong *et al.*, 2012), y en la respuesta a la infección de patógenos en los tejidos de plantas (Van der Hoorn y Jones, 2004; Mc Lellan *et al.*, 2009; Kaschani *et al.*, 2010; Konno *et al.*, 2011). Participan en la diferenciación de las células del mesófilo en elementos traqueales y en la xilogénesis (Fukuda, 1997; Woltering, 2004). Intervienen en la movilización de proteínas durante la germinación de las semillas (Sheokand *et al.*, 2005; Sreenivasulu *et al.*, 2008; Martínez *et al.*, 2009; Shi y Xu, 2009; Finni *et al.*, 2011) y están relacionadas con los procesos de fenolización (Ueda *et al.*, 2000; Azarkan *et al.*, 2004). De ahí que la inducción de alguno de estos procesos puede provocar incrementos en su acumulación.

Los reguladores del crecimiento influyen tanto en el crecimiento como en el desarrollo de las plantas (Gray, 2004; Ross y Reid, 2010). Actualmente, estas moléculas juegan un papel importante en la agricultura moderna pues se utilizan para incrementar la productividad de las cosechas (Ashraf *et al.*, 2010; Ouzounidou *et al.*, 2011). Además, se usan para aumentar la biomasa y la producción de biomoléculas en plantas que no poseen interés agrícola (Ross y Reid, 2010). Se reconoce que las proteasas tienen amplia participación en los procesos del desarrollo, de ahí que las fitohormonas incidan directamente en la expresión o represión de estas enzimas (Hammerton y Ho, 1986; Watanabe *et al.*, 1991; Cervantes *et al.*, 1994; Alonso y Granell, 1995; Jones *et al.*, 1995; Ye y Varner, 1996; Cercos *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2002; Martínez *et al.*, 2003, 2009).

En particular las citoquininas favorecen la división celular y retardan la senescencia, lo que impide la acumulación de las proteasas (Martin y Thimann, 1972). Por su parte, el ácido giberélico incrementa la expresión de las enzimas proteolíticas durante la germinación de las

semillas de diferentes especies (Hammerton y Ho, 1986; Watanabe *et al.*, 1991; Cervantes *et al.*, 1994; Martínez *et al.*, 2003, 2009). También, el etileno o un inductor de esta fitohormona se utiliza para lograr este propósito (Jones *et al.*, 2005; Weaver *et al.*, 1998; Cercos *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2002; Jing *et al.*, 2005; Kaushal *et al.*, 2009; Schaller, 2012).

El etileno es un regulador del crecimiento gaseoso con una estructura química sencilla ( $C_2H_4$ ). Esta fitohormona influye en varios procesos del crecimiento y desarrollo de las plantas (Abeles *et al.*, 1992; Fiorani *et al.*, 2002; Pierik *et al.*, 2006; Acharya y Assmann, 2009). Respecto al crecimiento, se considera que el etileno regula el tamaño de las células y la división celular (Abeles *et al.*, 1992). En términos de desarrollo se plantea que es una hormona de envejecimiento ya que puede favorecer la maduración de los frutos, la senescencia y la abscisión. Además, en algunas especies puede estimular la germinación de las semillas y el inicio de la rizogénesis, inhibir la formación de órganos de almacenamiento como tubérculos y bulbos y alterar los patrones de floración (Santner *et al.*, 2009; Schaller, 2012).

El ethrel o etefón es una formulación comercial que induce la síntesis de etileno (Warner y Leopold, 1969). En algunas especies se usa para acelerar la maduración de los frutos (Ban *et al.*, 2007; Dhillon y Majan, 2011). En plantas de la familia Bromeliaceae este compuesto se ha utilizado para promover la floración (De Proft *et al.*, 1986; Dukovski *et al.*, 2006; Ojeda *et al.*, 2007). No existen evidencias en la literatura que demuestren el uso de ethrel en la inducción de proteasas en plantas de esta familia.

El ethrel favorece la senescencia, la cual se caracteriza por el reemplazo de la asimilación del carbono por la degradación de las clorofilas (Hörtensteiner, 2006; Ougham *et al.*, 2008; Büchert *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2011) y otras macromoléculas como proteínas, lípidos de membranas y ARN (Meir *et al.*, 1992; Yang *et al.*, 2004; Gregersen *et al.*, 2008; Martínez *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2011). Esto trae consigo un incremento considerable en la actividad de las enzimas hidrolíticas entre las que se encuentran las proteasas, las cuales juegan un papel primordial en la degradación de las proteínas en la etapa inicial de este proceso (Huffaker, 1990; Del Río *et al.*, 1998; Palma *et al.*, 2002, Wagstaff *et al.*, 2002, Jones *et al.*, 2005; Kaushal *et al.*, 2009; Parrott *et al.*, 2010). Por otra parte, las sustancias de reserva se transforman en nutrientes transportables hacia los órganos afectados y en desarrollo (Lim *et al.*, 2007). Parte de la

energía que se requiere para la movilización de estos nutrientes se obtiene por el aumento de la respiración (Hopkins *et al.*, 2007).

Durante esta etapa, también se pueden formar especies reactivas del oxígeno (ERO) como productos naturales de la fotosíntesis y la respiración (Chen *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2010). La sobreproducción de estos compuestos puede provocar daños a los componentes celulares, incluyendo proteínas y lípidos que forman las membranas de la célula vegetal (Mittler, 2002). Los cambios en el contenido de malondialdehído (MDA) y otros aldehídos son indicativos de la peroxidación lipídica (Tang *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2011). Las plantas poseen un sistema antioxidante eficiente que permite reducir los efectos del estrés oxidativo (Asada, 1999, Foyer y Noctor, 2000). Dentro de este sistema se encuentran las enzimas superóxido dismutasas, catalasas y peroxidasas (Morsya *et al.*, 2003) que evitan fundamentalmente, la acción del anión superóxido ( $O_2^-$ ) y el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), minimizando su efecto destructor (Jaleel *et al.*, 2009). La acumulación de MDA inhibe la actividad de estas enzimas, lo que hace que los daños que se producen en las membranas sean mayores (Ge *et al.*, 2006; Tang *et al.*, 2010).

Aunque existen múltiples investigaciones relacionadas con el aislamiento, purificación y caracterización de proteasas de plantas de la familia Bromeliaceae y se conoce su amplia aplicación en la industria alimenticia, biotecnológica y la medicina, aun existen numerosas especies por explorar. Muchos aspectos relacionados con las endopeptidasas de plantas tropicales son desconocidos, de allí la importancia de aislar y caracterizar nuevas enzimas proteolíticas a partir de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez. Por otra parte, resulta de gran utilidad establecer una metodología para la propagación *in vitro* de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez que permita la obtención de material vegetal para extraer cisteino proteasas sin afectar la biodiversidad y los ecosistemas. Hasta la fecha no existen trabajos donde se estudien las condiciones de cultivo *in vitro* para esta especie. El estado de diferenciación celular de las plantas influye en la expresión de las cisteino proteasas. El efecto del ethrel en la inducción de proteasas en tallos de plantas aclimatizadas de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez así como los cambios bioquímicos y fisiológicos asociados a este proceso no se han informado en la literatura. Tales aspectos se abordan en la presente tesis doctoral.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### Procedimientos generales.

Las investigaciones se realizaron en el Centro de Bioplantas de la Universidad de Ciego de Ávila, Cuba; en el Laboratorio de Investigaciones de Proteínas Vegetales (LIPROVE) de la Universidad Nacional de La Plata, Argentina; en el Instituto de Biotecnología y Biomedicina de la Universidad Autónoma de Barcelona, España y en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Córdoba, España.

Como material vegetal se utilizaron plantas de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez procedentes del área protegida de la Loma de Cunagua, Ciego de Ávila, Cuba. La clasificación de esta especie se efectuó en el herbario "Julián Acuña" del Centro de Estudios de Medio Ambiente y Educación Ambiental (CEMAEA) de Camagüey, Cuba, de acuerdo con las claves dicotómicas que se establecieron para la familia Bromeliaceae (Sauget, 1946). La muestra se depositó con el número de *voucher* 10 460.

Para el tratamiento estadístico se empleó el utilitario SPSS, versión 11.5 para Windows (Pérez, 2003). Se usaron pruebas paramétricas (t-Student, ANOVA, Tukey  $p \leq 0,05$ ) después de chequear el ajuste de los datos a la distribución normal (Kolmogorov-Smirnov,  $p \leq 0,05$ ) y la homogeneidad de varianzas (Levene,  $p \leq 0,05$ ). En algunos casos fue necesaria la transformación de los datos para lograr los supuestos de las pruebas paramétricas que se utilizaron. El diseño experimental que se utilizó se describe en cada experimento. Las tablas y figuras en el acápite de Resultados y Discusión incluyen la información de las pruebas estadísticas que se realizaron en cada caso.

#### 3.1 Obtención de proteasas a partir de plantas de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez.

##### 3.1.1 Efecto del pH de extracción en la actividad proteolítica de extractos crudos de diferentes órganos de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez.

Con el propósito de evaluar la influencia del pH en la conservación de la actividad funcional de las enzimas, se realizó el procedimiento de extracción patentado por Hernández *et al.* (1997). Inicialmente se colectaron 10 plantas y se separaron los órganos de cada una. Luego se lavaron y cortaron en pequeños fragmentos. La homogeneización se realizó en una batidora comercial WARING (2 L). Las proporciones de material vegetal y solución de extracción que se utilizaron fueron: 1:1,5 para los tallos y frutos (m/v) y 1:4,0 para hojas (m/v). La mezcla se agitó

durante 30 minutos a 4°C. El homogenato se filtró por gasa y se centrifugó (Centrifuga Beckman, Modelo J2-21) a 10 290×g durante 20 minutos a 4°C. Se colectó el sobrenadante. En todos los casos la extracción se hizo por triplicado a pH 3, pH 4 y pH 5 a partir de tallos, hojas y frutos. A los extractos crudos obtenidos para cada órgano a los diferentes pH se les determinó la concentración de proteínas y la actividad proteolítica. Se realizaron tres determinaciones en cada caso.

La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford (1976). Se midió la absorbancia a 595 nm en espectrofotómetro UV-Vis (LKB-Pharmacia) y el contenido de proteínas se expresaron en mg·mL<sup>-1</sup> ó mg·kg<sup>-1</sup> de masa fresca, referidos a una curva patrón de albúmina de suero bovino. La actividad proteolítica se cuantificó por el método de Anson (1938). El ensayo típico contiene 1,6 mL de volumen final. Se usó hemoglobina desnaturalizada al 2%, pH 6,8. La mezcla de reacción contenía 500 µL de Hb y 100 µL del extracto. Las muestras se incubaron a 37°C durante 20 minutos, se detuvo la reacción con ácido tricloroacético al 5% (m/v). El sobrenadante se ensayó con reactivo fenólico de Folin-Ciocalteu. Se midió la absorbancia a 650 nm. Se utilizó una curva patrón de tirosina y se expresó la actividad proteolítica en U·mL<sup>-1</sup> o U·kg<sup>-1</sup> de masa fresca. Una unidad (U) de actividad proteolítica se definió como la cantidad de enzima que catalizó la formación de 1 µmol de tirosina por minuto a 37°C y pH 6,8.

La actividad proteolítica (AP) se calculó a partir de la fórmula: **AP = (A<sub>650 nm</sub>/t)·cot tir·K·1/Ve·dil** donde: **AP** es la actividad proteolítica (U·mL<sup>-1</sup>), **t** es el tiempo de reacción, **cot tir** es la cotangente de la curva patrón de tirosina, **K** es una constante de dilución (V<sub>T</sub>/V<sub>S</sub>) que relaciona el volumen total de ensayo (1,6 mL) y el volumen que reacciona en medio alcalino con reactivo de Folin-Ciocalteu (0,5 mL), **Ve** es el volumen de enzima (0,1 mL) y **dil** es la dilución de la enzima. La actividad proteolítica específica se calculó como la relación entre la actividad proteolítica y la concentración de proteínas obtenida para cada tratamiento.

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) bifactorial. Se seleccionó el pH de extracción y el órgano donde se obtuvo la mayor actividad proteolítica específica para realizar el siguiente experimento.

### ***3.1.2 Caracterización molecular del preparado proteolítico parcialmente purificado.***

Para caracterizar molecularmente el preparado proteolítico parcialmente purificado proveniente del extracto crudo que mostró la mayor actividad proteolítica específica en el experimento del

acápite 3.1.1 se realizó este experimento. Inicialmente, al extracto crudo (10 mL) se le añadió lentamente igual volumen de etanol 95% (v:v) frío (-20°C), se dejó reposar por 30 minutos a 4°C y se centrifugó a 10 290×g durante 20 minutos a 4°C. Se recuperó el sobrenadante, al que se añadieron lentamente cuatro volúmenes más de etanol 95% (v:v) frío (-20°C), se dejó reposar por una hora a 4°C y se centrifugó a 10 290×g durante 20 minutos a 4°C. Finalmente se recuperó el precipitado (preparado proteolítico parcialmente purificado) y se disolvió en 10 mL de agua destilada.

Para estimar el punto isoeléctrico aproximado de las fracciones proteicas del preparado proteolítico parcialmente purificado se realizó el isoelectroenfoque. Se utilizó un equipo Mini IEF Cell (Modelo 111, Bio-Rad). Los geles de poliacrilamida al 5%, con anfolitos de rango de pI 2,8–6,5 se prepararon sobre una película plástica (Gel support film, Bio-Rad). La mezcla de patrones (Pharmalyte pI 2,5-5,5) contenía: pepsinógeno (pI 2,8), amiloglucosidasa (pI 3,55), glucosa oxidasa (pI 4,15), tripsina de soya (pI 4,55), β-lactoglobulina A (pI 5,20). El enfoque se desarrolló bajo condiciones de voltaje constante en un procedimiento gradual: 100 V por 30 minutos, 200 V por 30 minutos y 450 V por 60 minutos. Las proteínas se fijaron al gel con una solución de ácido sulfosalicílico (40 mg·mL<sup>-1</sup>), metanol (30%, v:v) y ácido tricloroacético (125 mg·mL<sup>-1</sup>) durante 30 minutos. Luego se realizó la tinción durante 60 minutos con una solución que contenía Coomassie Brilliant Blue R-250 (40 mg·mL<sup>-1</sup>), ácido acético glacial (10%, v:v) y etanol (27%, v:v). Posteriormente, el gel se lavó tres veces con una solución que contenía sulfato de cobre II (500 mg·mL<sup>-1</sup>), ácido acético glacial (7%, v:v) y etanol (12%, v:v) y seguidamente se lavó con otra solución decolorante de ácido acético glacial (7%, v:v) y etanol (12%, v:v). Se aplicaron 5 µg de la mezcla de patrones de pI conocido y 10 µg del preparado proteolítico parcialmente purificado.

Además, se determinaron las fracciones con actividad proteolítica por zimograma de acuerdo con el método de Westergaard *et al.* (1980). Los geles provenientes del isoelectroenfoque se pusieron en contacto con un gel de agarosa 1% (m/v) en tampón Tris-HCl (0,1 mol·L<sup>-1</sup>; pH 8) durante 10–15 minutos a 55°C. El gel de agarosa 1% (m/v) se embebió previamente en una solución de caseína 1% (m/v) en tampón Tris-HCl 0,1 mol·L<sup>-1</sup>; pH 8 y 20 mmol·L<sup>-1</sup> de cisteína durante 20 minutos, luego se lavó dos veces con agua destilada. Las placas de agarosa 1% (m/v) se prepararon sobre el lado hidrofílico de una película de Gel Bond (Pharmacia) a razón de 0,15 mL·cm<sup>-2</sup>. Después de la incubación, la placa de agarosa se colocó por 60 minutos en una solución fijadora que contenía ácido acético glacial (10%, v:v) y metanol (45%, v:v). Se

realizó la deshidratación del gel entre papeles de filtro (Whatman 3MM) y se aplicó una presión de  $7,5 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-2}$  por 20 minutos. Luego, se secó con pistola de aire y finalmente la placa se sumergió en una solución colorante de Coomassie Brilliant Blue R-250 ( $250 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) durante 10 minutos. Para eliminar el exceso de colorante se sumergió la placa de agarosa en la solución fijadora durante 10 minutos. La actividad proteolítica se hizo visible como bandas claras sobre el gel de agarosa teñido.

Para determinar la masa molar aparente de las proteínas presentes en el preparado proteolítico parcialmente purificado se realizó la electroforesis en geles de poliacrilamida (12,5%) en condiciones desnaturalizantes con duodecil sulfato de sodio (SDS) y tricina en el tampón catódico, de acuerdo con el protocolo de Shägger y Von Jagow (1987). Los patrones y las muestras se disolvieron en un tampón que contenía Tris ( $0,0625 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), SDS (2%, m/v),  $\beta$ -mercaptoetanol (5%, v:v), glicerol (10%, v:v) y bromofenol azul (0,006%, m/v), se ajustó el pH a 6,8 con HCl ( $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ). A las muestras además se le adicionó ácido iodoacético ( $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) para evitar la autoproteolisis. Luego se desnaturalizaron con calor (a ebullición) durante 3 minutos. Las electroforesis se desarrollaron en un equipo vertical, Mini-Protean III Dual Slab Cell (BIO-RAD). Se utilizó un voltaje eléctrico de 40 V durante el paso de las proteínas por el gel concentrador. Luego se incrementó a 150 V y se mantuvo constante durante la corrida por el gel separador. Posteriormente, los geles se colocaron en solución fijadora que contenía metanol, ácido acético y agua (45:1:54, v:v:v) durante 20 minutos. Se utilizaron como patrones de masa molar: fosforilasa b (94 000 Da), albúmina (67 000 Da), ovalbúmina (43 000 Da), anhidrasa carbónica (30 000 Da), inhibidor de tripsina (20 100 Da) y  $\alpha$ -lactalbumina (14 400 Da). La tinción del gel se realizó con una solución colorante de Coomassie Brilliant Blue G-250 ( $0,2 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). Se aplicaron  $10 \mu\text{g}$  de patrones de masa molar conocida y  $30 \mu\text{g}$  del preparado proteolítico parcialmente purificado.

### **3.1.3 Caracterización cinética del preparado proteolítico parcialmente purificado.**

#### *3.1.3.1 Determinación del pH óptimo y la estabilidad en función del pH.*

Este experimento se realizó para conocer el pH donde el preparado proteolítico parcialmente purificado que se obtuvo en el experimento 3.1.2 posee la mayor actividad proteolítica. El extracto de partida contenía  $0,10 \text{ mg}$  de proteínas  $\cdot\text{mL}^{-1}$ . Se determinó la actividad enzimática frente a caseína a valores de pH 6,0; 7,0; 7,5; 8,0; 8,5; 9,0 y 10,0. El sustrato se preparó al 1% (m/v),  $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  de cisteína en tampón de Good ( $25,0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) (Good e Izawa, 1972).

El tampón de Good ( $25 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) contenía:  $5,78 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  de ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico;  $5,03 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  de ácido 3-(ciclohexilamino)-1-propanosulfónico;  $6,23 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  de ácido 3-(1,1-dimetil-2-hidroxi-etilamino)-2-hidroxi-propanosulfónico;  $6,63 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  de ácido N-tris(hidroxi-metil)metil-3-aminopropanosulfónico;  $6,86 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  de ácido (2-hidroxi-1,1-bis(hidroxi-metil)etil)-amino-1-propanosulfónico y  $5,43 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  de ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico. El ensayo se realizó a  $37^\circ\text{C}$  durante 4 minutos, tiempo al cual la reacción ocurre en zona de velocidad inicial para las condiciones de pH y temperatura establecidas. La actividad proteolítica se determinó por el protocolo de Arribére *et al.* (1998). La mezcla de reacción contenía  $100 \mu\text{L}$  de extracto crudo y  $100 \mu\text{L}$  de caseína hidrolizada 1% (m/v) en tampón Tris-HCl  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , pH 8,  $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  de cisteína. Las muestras se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  durante cuatro minutos. La reacción se detuvo con  $100 \mu\text{L}$  de ácido tricloroacético al 5% (m/v). La absorbancia del sobrenadante se midió a 280 nm. Una unidad de actividad proteolítica para caseína como sustrato (Ucas) se definió como la cantidad de enzima que produjo un incremento de una unidad de absorbancia por minuto en las condiciones del ensayo. La actividad proteolítica se expresó en  $\text{Ucas}\cdot\text{mL}^{-1}$  o  $\text{Ucas}\cdot\text{kg}^{-1}$  de masa fresca. Se realizaron tres determinaciones para cada pH.

La actividad proteolítica se determinó según la fórmula:  $\text{AP} = (\text{A}_{280 \text{ nm}}/\text{t}) \cdot 1/\text{Ve} \cdot \text{Fd} \cdot \text{dil}$  donde **AP** es la actividad proteolítica ( $\text{Ucas}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), **t** es el tiempo de reacción, **Fd** es una constante de dilución (10), **Ve** es el volumen de enzima (0,1 mL) y **dil** la dilución de la enzima.

Se calculó la actividad proteolítica residual como la relación entre la actividad proteolítica para cada tratamiento y la máxima actividad proteolítica obtenida en el ensayo. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) monofactorial. Los resultados se expresaron en porcentaje. Se graficó el porcentaje de actividad proteolítica residual en función del pH.

La estabilidad en función del pH se determinó para establecer el rango de pH donde el preparado proteolítico parcialmente purificado que se obtuvo en el experimento descrito en el acápite 3.1.2 conserva su actividad proteolítica en el tiempo. Se prepararon diluciones (1:2, v:v) del preparado proteolítico parcialmente purificado que se obtuvo en el experimento 3.1.2 en tampón de Good ( $25 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) (Good e Izawa, 1972) a pH 6,0; 7,0; 8,0; 9,0 y 10,0 y se incubaron en baño de hielo. La concentración de proteínas final del preparado fue  $0,1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Se determinó la actividad proteolítica por triplicado frente a caseína (1% (m/v),  $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  de cisteína, pH 8,  $37^\circ\text{C}$ , 4 minutos) para diferentes tiempos (0, 5, 10, 20, 40, 60, 90 y

120 minutos) como se describió anteriormente. Luego se calculó el porcentaje de actividad proteolítica residual para cada valor de pH a cada tiempo como se refirió en el párrafo anterior. Se determinó el logaritmo del porcentaje de la actividad proteolítica residual en función del tiempo de incubación para cada pH y se obtuvo la ecuación de cada recta. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) monofactorial. Finalmente se graficó la constante de inactivación de primer orden ( $k$ , pendiente de las rectas obtenidas para cada pH) en función del pH.

#### *3.1.3.2 Determinación de la temperatura "óptima" y la estabilidad en función de la temperatura.*

Este experimento se realizó para determinar la temperatura a la que el preparado proteolítico parcialmente purificado ( $0,10 \text{ mg de proteínas} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) que se obtuvo en el experimento 3.1.2 tiene su mayor actividad proteolítica. La actividad proteolítica se determinó por triplicado a 20, 25, 35, 37, 45, 55, 65 y  $75^\circ\text{C}$ . La mezcla de reacción se incubó durante 4 minutos y se cuantificó la actividad proteolítica como se describió en el acápite 3.1.3.1. Se calculó la actividad proteolítica residual (acápite 3.1.3.1). Los resultados se expresaron en porcentaje. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) monofactorial. Se graficó el porcentaje de actividad proteolítica residual en función de la temperatura.

La estabilidad en función de la temperatura se estudió para establecer el rango de temperatura donde el preparado proteolítico parcialmente purificado que se obtuvo en el experimento 3.1.2 conserva su actividad proteolítica en el tiempo. El preparado proteolítico parcialmente purificado ( $0,1 \text{ mg de proteínas} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) se incubó a 20, 25, 37, 45, 55, 65 y  $75^\circ\text{C}$ . Se determinó la actividad proteolítica por triplicado frente a caseína (1% (m/v),  $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  de cisteína, pH 8,  $37^\circ\text{C}$ , 4 minutos) como se describió en el acápite 3.1.3.1 para diferentes tiempos (0, 5, 10, 20, 40, 60, 90 y 120 minutos). Se calculó el porcentaje de actividad proteolítica residual para cada valor de temperatura a cada tiempo como se refirió en el acápite 3.1.3.1. Se determinó el logaritmo del porcentaje de la actividad proteolítica residual en función del tiempo de incubación para cada temperatura y se obtuvo la ecuación de cada recta. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) monofactorial. Finalmente se graficó la constante de inactivación de primer orden ( $k$ , pendiente de las rectas obtenidas para cada temperatura) en función de la temperatura.

#### ***3.1.4 Efecto de inhibidores sobre la actividad proteolítica del preparado proteolítico parcialmente purificado.***

Para dilucidar el mecanismo catalítico de las enzimas presentes en el preparado proteolítico parcialmente purificado como se describió en el acápite 3.1.2 se estudiaron varios inhibidores

irreversibles de proteasas: PMSF, pepstatina A, E-64 y 1,10-fenantrolina (Salvesen y Nagase, 2001). Inicialmente se determinó la concentración de proteínas del preparado proteolítico parcialmente purificado por el método de Bradford (1976) y se preparó a una concentración de  $20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Se utilizaron las siguientes concentraciones de inhibidores:  $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  de PMSF;  $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  de pepstatina A,  $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  de E-64 y  $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  de 1,10 fenantrolina, propuestas por Dunn (1989).

Las mezclas del preparado proteolítico parcialmente purificado y las soluciones de inhibidores se incubaron durante 30 minutos a  $25^{\circ}\text{C}$ . Como testigos positivos del ensayo se usaron los solventes de los distintos inhibidores (agua y dimetilsulfóxido). Luego se cuantificó la actividad proteolítica por triplicado durante 20 minutos. Para los inhibidores PMSF, pepstatina A y E-64 se utilizó caseína como sustrato (acápite 3.1.3.1). En el caso específico de la inhibición con 1,10-fenantrolina se realizó el ensayo de actividad proteolítica con azocaseína como sustrato. Se siguió el protocolo propuesto por Trejo *et al.* (2001). La mezcla de reacción contenía  $150 \mu\text{L}$  de muestra y  $250 \mu\text{L}$  de azocaseína al 1% (m/v) en tampón Tris-HCl  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  de cisteína, pH 8. Esta mezcla de reacción se incubó a  $37^{\circ}\text{C}$ , durante 20 minutos. Luego, se detuvo la reacción con  $1\ 000 \mu\text{L}$  de ácido tricloroacético al 10% (m/v). Posteriormente se añadieron  $1\ 000 \mu\text{L}$  de hidróxido de sodio ( $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) a  $900 \mu\text{L}$  del sobrenadante obtenido y se midió la absorbancia a  $440 \text{ nm}$ . Una unidad de actividad azocaseinolítica (Uazocas) se definió como la cantidad de enzima que produce el incremento en una unidad de absorbancia por minuto bajo las condiciones del ensayo. La actividad proteolítica frente a azocaseína como sustrato se determinó según la fórmula:  $\text{AP} = (\text{A}_{440 \text{ nm}}/\text{t}) \cdot 1/\text{Ve} \cdot \text{dil}$  donde **AP** es la actividad proteolítica (Uazocas $\cdot\text{mL}^{-1}$ ), **t** es el tiempo de reacción, **Ve** es el volumen de enzima ( $0,1 \text{ mL}$ ) y **dil** la dilución de la enzima.

En todos los casos se calculó la actividad proteolítica residual como se describió en el acápite 3.1.3.1. Los resultados se expresaron en porcentaje. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) monofactorial. Se graficó el porcentaje de actividad proteolítica residual para cada inhibidor.

### ***3.1.5 Purificación de cisteino proteasas a partir del preparado proteolítico parcialmente purificado.***

Con el objetivo de purificar las fracciones con actividad proteolítica del preparado proteolítico parcialmente purificado que se obtuvo en el acápite 3.1.2 se utilizó un sistema FPLC de Amersham Pharmacia Biotech, con bombas peristálticas B-500, unidad de control UV-1,

programador GP-250 Plus, unidad óptica UV-1; válvula V-7, mezclador Mixer, colector de fracciones FRAC-100 y registrador REC 112. Como soporte cromatográfico se utilizó el intercambiador aniónico Q-Sefarosa, en una columna XK 16/40 con adaptadores K16.

La columna se lavó y equilibró con tampón Tris-HCl 50 mmol·L<sup>-1</sup>; pH 7,6; 5 mmol·L<sup>-1</sup> de tetrionato de sodio dihidratado (Na<sub>2</sub>S<sub>4</sub>O<sub>6</sub>·2H<sub>2</sub>O); 20°C. Se realizó la elución con gradientes lineales de cloruro de sodio (0-0,15; 0,15-0,6; 0-1,0 mol·L<sup>-1</sup> de NaCl) en el tampón de partida. La velocidad de flujo lineal se mantuvo constante a 30 cm·h<sup>-1</sup>. Al preparado proteolítico parcialmente purificado se le adicionó 5 mmol·L<sup>-1</sup> de Na<sub>2</sub>S<sub>4</sub>O<sub>6</sub>·2H<sub>2</sub>O para evitar la autoproteólisis y se filtró con membrana de 0,22 µm (Millipore Corporation). Se aplicaron 4 mL de muestra (0,74 mg·mL<sup>-1</sup> de proteínas). Se colectaron entre 100 y 120 fracciones de 2 mL. La cromatografía se monitoreó por absorbancia a 280 nm en espectrofotómetro UV-Vis (LKB-Pharmacia) y por ensayo de actividad proteolítica utilizando caseína como sustrato según se describió en el acápite 3.1.3.1. Las corridas cromatográficas se repitieron nueve veces.

A las fracciones de interés se les determinó la concentración de proteínas y la actividad proteolítica utilizando caseína como sustrato según se describió en el acápite 3.1.3.1. Además se calculó la actividad específica como se refirió en el acápite 3.1.1. Las fracciones con actividad proteolítica se almacenaron a -20°C para estudios posteriores. La fracción con mayor actividad proteolítica específica se seleccionó para realizar su purificación.

Se determinaron los indicadores de control de la purificación. El rendimiento (Ren %) para cada etapa se calculó a partir de la actividad proteolítica total. Para la cuantificación del grado de purificación (GP en veces) se tuvo en cuenta las veces que se incrementó la actividad específica con relación a la primera etapa (Chávez *et al.*, 1990).

### **3.1.6 Caracterización molecular de la proteasa purificada.**

#### *3.1.6.1 Estudios electroforéticos.*

La masa molar aparente de la proteasa purificada se estimó por electroforesis en geles de poliacrilamida (12,5%) en condiciones desnaturalizantes con SDS y tricina en el tampón catódico, de acuerdo con el protocolo de Shägger y Von Jagow (1987) como se describió en el acápite 3.1.2. Se aplicaron 10 µg de patrones de masa molar conocida y 20 µL de la proteasa purificada.

El punto isoeléctrico aproximado de la proteasa purificada se estimó como se refirió en el acápite 3.1.2. Se aplicaron 5 µg de la mezcla de patrones de pI conocido, 15 µg del preparado proteolítico parcialmente purificado y 10 µg de la proteasa purificada. Además, se comprobó la actividad proteolítica de la fracción purificada por zimograma, de acuerdo con el método de Westergaard *et al.* (1980) como se refirió en el acápite 3.1.2.

#### *3.1.6.2 Determinación de la masa molar por espectrometría de masa.*

Para determinar la masa molar de la proteasa purificada se utilizó la espectrometría de masas MALDI-TOF (*Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight*). El espectro de masa se obtuvo en un equipo MALDI-TOF MS Bruker Daltonics®, modelo Ultraflex (Billerica, MA), con detector láser de nitrógeno (337 nm), en un modo lineal de iones positivos, se usó un voltaje de 25 kV de aceleración. Se mezclaron volúmenes iguales de la proteasa purificada y la solución matriz (solución saturada de ácido sinápico en ácido trifluoroacético 0,1% en agua (v:v): acetonitrilo (2:1, v:v)). De esta mezcla se colocó 1 µL sobre la placa de acero inoxidable y se dejó evaporar a sequedad. La muestra se bombardeó con pulsos de láser de corta duración (1-10 ns). Se usó tripsinógeno bovino para la calibración interna.

#### *3.1.6.3 Determinación de la secuencia amino terminal.*

La secuencia del extremo amino terminal de la proteasa purificada se obtuvo por degradación automatizada de Edman (Edman, 1949). Se utilizó un secuenciador de péptidos Beckman LF3000 (Beckman, Alemania). Se utilizó el servicio de la red BLAST (Altschul *et al.*, 1997) disponible en URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST> para la búsqueda de homología de proteínas. Se consideraron sólo los residuos específicos que son idénticos.

### **3.2 Propagación *in vitro* de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez.**

#### ***3.2.1 Establecimiento in vitro. Efecto del tiempo de desinfección de las semillas.***

Para evaluar el efecto del tiempo de desinfección de las semillas en el establecimiento *in vitro* se realizó este experimento. Las infrutescencias maduras se colectaron en horas tempranas de la mañana. Para la extracción de las semillas, los frutos se individualizaron previamente en el laboratorio. Las semillas se lavaron con abundante agua corriente y detergente comercial. Finalmente se enjuagaron tres veces con abundante agua destilada. La desinfección superficial de las semillas se realizó con hipoclorito de sodio 2,0% (v:v) en cámara de flujo laminar horizontal ICEM-A7 (RETOMED®) durante 5, 10, 15, 20 y 25 minutos. Para la eliminación del desinfectante se realizaron tres enjuagues con agua destilada estéril de 5 minutos cada uno.

El establecimiento de las semillas se realizó en cámara de flujo laminar horizontal. El instrumental que se utilizó se esterilizó previamente en estufa (MLW-WSU200) a 180°C durante 150 min. Para la inoculación de las semillas en el medio de cultivo el instrumental se sumergió en etanol 90% (v:v) y se flameó con mechero de gas licuado. El pH de los medios de cultivo se ajustó a 5,6 previo a la esterilización por vapor en autoclave (Sakura) a 121°C y 1,4 kg·cm<sup>-2</sup> y a la adición de 6,5 g·L<sup>-1</sup> de agar (Agar Técnico No 3, Oxoid LTD, England).

Las semillas se establecieron en un medio de cultivo semisólido que contenía: sales de Murashige y Skoog (1962), 100 mg·L<sup>-1</sup> de mio-inositol, 1 mg·L<sup>-1</sup> de tiamina-HCl y 30 g·L<sup>-1</sup> de sacarosa. Se utilizaron envases de vidrio de 300 mL de capacidad con tapas plásticas o metálicas y un volumen de medio de cultivo de 25 mL. Las semillas se colocaron en la cámara de cultivo a 25±1°C, lámparas fluorescentes de luz blanca (37 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>) y fotoperíodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad.

El experimento se realizó bajo un diseño completamente aleatorizado y se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) monofactorial para cada indicador evaluado. Se usaron 50 semillas por tratamiento (5 semillas/frasco). A los 11 días de cultivo se cuantificó el número de semillas contaminadas y a los 45 días el número de semillas germinadas. Se consideró una semilla germinada aquella que poseía la plúmula y la radícula bien diferenciada. Para ambos indicadores los resultados se expresaron en porcentaje. El mejor tratamiento sirvió de premisa para el siguiente experimento.

### **3.2.2 Multiplicación in vitro de los brotes.**

#### *3.2.2.1 Efecto del tipo de citoquinina.*

Este experimento se diseñó con el objetivo de evaluar la respuesta morfogénica de los brotes frente a diferentes citoquininas debido a que no existían referencias previas del cultivo *in vitro* de esta planta. Se utilizaron como explantes brotes de 1 cm de longitud provenientes de semillas germinadas *in vitro*, a los cuales se les eliminó previamente las raíces. Estos se colocaron en un medio de cultivo semisólido que contenía: sales de Murashige y Skoog (1962), 100 mg·L<sup>-1</sup> de mio-inositol, 1 mg·L<sup>-1</sup> de tiamina-HCl y 30 g·L<sup>-1</sup> de sacarosa, suplementado además, con 4,4 μmol·L<sup>-1</sup> de 6-furfuril aminopurina (kinetina); 6-benciladenina (BA) y N-phenyl-N'-1,2,3-thidiazol-5-ylurea (TDZ) (Guerra y Dal Vesco, 2010). Los brotes se transfirieron al medio de cultivo (5 explantes/frasco) y los frascos se colocaron en la cámara de cultivo bajo las condiciones descritas en el acápite 3.2.1.

El experimento se utilizó un diseño completamente aleatorizado y se realizó un análisis de varianza (ANOVA) monofactorial para cada indicador evaluado. Se usaron 50 explantes por tratamiento. A los 30 días de cultivo, se cuantificó el número de brotes/explante, la longitud promedio de los brotes/explante y la presencia de raíces. Los resultados de la presencia de raíces se expresaron en porcentaje. Se calculó el coeficiente de multiplicación, el cual se definió como el cociente del número final de brotes mayores de 0,8 cm entre el número de brotes iniciales. La citoquinina que mostró el mejor resultado se utilizó en el siguiente experimento.

#### *3.2.2.2 Efecto de la concentración de 6-benciladenina.*

Con el objetivo de incrementar la multiplicación de los brotes se evaluaron cuatro concentraciones de la citoquinina que mostró los mejores resultados en el acápite 3.2.2.1: 0; 4,4; 8,8 y 13,2  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . Las características de los brotes provenientes de la fase de establecimiento y la composición del medio de cultivo semisólido coinciden con lo descrito en el acápite 3.2.2.1. Los brotes se transfirieron al medio de cultivo (5 explantes/frasco) y los frascos se colocaron en la cámara de cultivo bajo las condiciones descritas en el acápite 3.2.1.

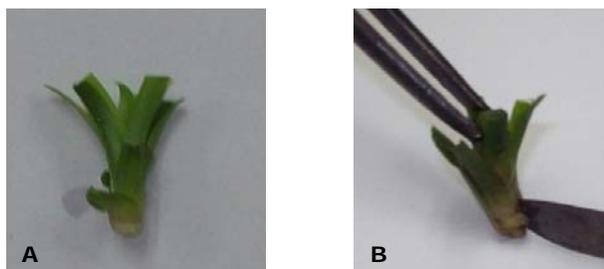
El experimento se realizó bajo un diseño completamente aleatorizado y se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) monofactorial para cada indicador evaluado. Se usaron 50 explantes por tratamiento. A los 30 días de cultivo se cuantificaron los indicadores descritos en el acápite 3.2.2.1. La concentración de citoquinina que mostró el mejor resultado se utilizó en el siguiente experimento.

#### *3.2.2.3 Efecto de la concentración de ácido naftalenacético.*

Este experimento tuvo como objetivo determinar el balance citoquinina/auxina favorable para la multiplicación, se utilizaron brotes provenientes de la fase de establecimiento con las características descritas en el acápite 3.2.2.1. Estos se colocaron en el medio de cultivo semisólido formulado de acuerdo al mejor resultado del experimento del acápite 3.2.2.2. Se evaluaron cinco concentraciones de ANA: 0; 1,61; 3,22; 4,83 y 6,44  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . Se utilizó un diseño experimental completamente aleatorizado y se realizó un análisis de varianza (ANOVA) monofactorial para cada indicador evaluado. Se utilizaron 50 explantes por tratamiento. Los brotes se transfirieron al medio de cultivo (5 explantes/frasco) y los frascos se colocaron en la cámara de cultivo como se refirió en el acápite 3.2.1. A los 30 días de cultivo, se cuantificaron los indicadores descritos en el acápite 3.2.2.1. La mejor concentración de la auxina se incorporó al medio de cultivo y se utilizó en el siguiente experimento.

#### 3.2.2.4 Efecto del corte del brote.

Con el objetivo de aumentar el nivel de respuesta morfogénica de los brotes se desarrolló este experimento. Se utilizaron 100 brotes provenientes de la fase de establecimiento de acuerdo con lo descrito en el acápite 3.2.2.1. A la mitad de estos se les realizó un corte vertical de 0,3 cm de profundidad desde la región apical hasta la base del brote (figura 1).



**Figura 1.** Brotes utilizados en el experimento. A) Sin corte y B) Con corte.

Todos los explantes (con corte y sin corte) se colocaron en el medio de cultivo semisólido que se formuló de acuerdo con el mejor resultado del experimento que se describió en el acápite 3.2.2.3. Los explantes se transfirieron al medio de cultivo (5 explantes/frasco) y se colocaron en la cámara de cultivo como se refirió en el acápite 3.2.1. El experimento se realizó bajo un diseño completamente aleatorizado y se utilizó la prueba t-Student para la comparación de las medias de cada indicador evaluado. A los 30 días de cultivo, se evaluaron los indicadores que se informaron en el acápite 3.2.2.1. El mejor resultado sirvió de premisa para el siguiente experimento.

#### 3.2.2.5 Efecto del estado físico del medio de cultivo.

Con el objetivo de continuar mejorando la capacidad proliferativa de los brotes se evaluó el efecto del medio de cultivo líquido en la multiplicación de los mismos. Se utilizó el tipo de brote que mostró la mayor capacidad proliferativa en el experimento del acápite 3.2.2.4. Se utilizaron 100 brotes. La mitad de los explantes se colocó en medio de cultivo líquido y la otra mitad en medio de cultivo semisólido. El medio de cultivo se formuló de acuerdo con el mejor resultado del experimento del acápite 3.2.2.3. En ambos casos se utilizaron 25 mL de medio de cultivo. Los brotes se transfirieron al medio de cultivo (5 explantes/frasco) y los frascos se colocaron en la cámara de cultivo como se refirió en el acápite 3.2.1. El experimento se realizó bajo un diseño completamente aleatorizado y se utilizó la prueba t-Student para la comparación de las medias de cada indicador evaluado. Se cuantificaron los indicadores descritos en el acápite 3.2.2.1 y la aparición de brotes hiperhídricos después de 30 días de cultivo. Como criterio de

hiperhidricidad se tuvo en cuenta la apariencia vítrea, flacidez y pérdida de coloración en las hojas. El mejor resultado sirvió de premisa para el siguiente experimento.

#### *3.2.2.6 Efecto del tiempo de cultivo.*

Con el objetivo de establecer la frecuencia del subcultivo, se utilizó el tipo de brote que mostró la mayor capacidad proliferativa en el experimento del acápite 3.2.2.4. La formulación del medio de cultivo y su estado físico estuvo de acuerdo con el mejor resultado del experimento del acápite 3.2.2.5. Los brotes se transfirieron al medio de cultivo (5 explantes/frasco) y los frascos se colocaron en la cámara de cultivo como se refirió en el acápite 3.2.1. Se utilizó un diseño experimental completamente aleatorizado y se realizó un análisis de varianza (ANOVA) monofactorial para cada indicador evaluado. Se usaron 50 explantes por tratamiento. Se cuantificaron los indicadores descritos en el acápite 3.2.2.1 a los 15, 30, 45 y 60 días de cultivo. El mejor tiempo de cultivo se utilizó en el siguiente experimento.

#### *3.2.2.7 Efecto del número de subcultivo.*

Con el objetivo de evaluar el efecto del número de subcultivo en la multiplicación de los brotes se utilizaron los brotes que mostraron mayor capacidad proliferativa en el experimento descrito en el acápite 3.2.2.4. Los resultados obtenidos en el experimento descrito en el acápite 3.2.2.5 se tomaron como premisa para formular el medio de cultivo. Los brotes se transfirieron al medio de cultivo (5 explantes/frasco) y los frascos se colocaron en la cámara de cultivo como se refirió en el acápite 3.2.1 durante el tiempo de cultivo que mostró el mejor resultado en el experimento que se refirió en el acápite 3.2.2.6. Inicialmente se usaron 50 brotes y se evaluaron 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 subcultivos. El experimento se realizó bajo un diseño completamente aleatorizado y se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) monofactorial para cada indicador evaluado. Luego de cada subcultivo se evaluaron los indicadores que se describieron en el acápite 3.2.2.1.

#### ***3.2.3 Efecto de la concentración de ácido naftalenacético en el enraizamiento in vitro de los brotes.***

Con el objetivo de evaluar el efecto de la concentración de ANA en el enraizamiento de los brotes se evaluaron cinco tratamientos: 0; 1,61; 3,22; 4,83 y 6,44  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . Se utilizaron brotes individuales de 2 cm de longitud provenientes de las mejores condiciones de cultivo que se obtuvieron como resultados de la experimentación que se describió en el acápite 3.2.2. Los

brotos se transfirieron al medio de cultivo semisólido que contenía: sales de Murashige y Skoog (1962),  $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de mio-inositol,  $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de tiamina-HCl y  $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de sacarosa como se describió en el acápite 3.2.1. Los frascos se colocaron en la cámara de cultivo como se refirió en el acápite 3.2.1. Se utilizó un diseño experimental completamente aleatorizado y se realizó un análisis de varianza (ANOVA) monofactorial para cada indicador evaluado. Se usaron 50 explantes por tratamiento (5 explantes/frasco). A los 30 días, se cuantificó el número de brotes con raíces en cada tratamiento. Este resultado se expresó en porcentaje. Además, se evaluó el número promedio de raíces/brote y se midió la longitud de la raíz más larga. El mejor tratamiento sirvió de premisa para el siguiente experimento.

#### ***3.2.4 Efecto del sustrato en la aclimatización ex vitro de los brotes.***

Este experimento se realizó con el objetivo de evaluar el efecto del sustrato en la aclimatización de los brotes. Se utilizaron brotes individuales con más de 3,0 cm de longitud y de 5-6 g de masa fresca (Guerra y Dal Vesco, 2010) provenientes del enraizamiento con la mejor concentración de ANA que se obtuvo como resultado del experimento del acápite 3.2.3. Estos se lavaron con abundante agua corriente para eliminar los restos de agar. Los brotes se transfirieron a bandejas plásticas de 40 cavidades con ( $83 \text{ cm}^3$ ) de sustrato. Se usaron tres sustratos: cachaza, zeolita y cachaza+zeolita (v:v) (Anexo 1). Las condiciones de cultivo fueron: 80% de humedad relativa,  $25^\circ\text{C}$  de temperatura, flujo de fotones fotosintéticos entre  $400\text{-}500 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  y un régimen de fotoperíodo luz y oscuridad correspondiente a los ciclos naturales del día y la noche. El riego se realizó por microaspersión automatizada durante 15 segundos cada 45 minutos. Se utilizaron 100 brotes por tratamiento distribuidos en cinco bandejas con 20 explantes para cada una. Las bandejas se colocaron aleatoriamente en la casa de cultivo. Se cuantificó el número de brotes que sobrevivieron/bandeja para cada sustrato cada siete días durante 28 días. Este resultado se expresó en porcentaje. Para este indicador se determinó el intervalo de confianza ( $1-\alpha=95\%$ ) en cada tiempo de evaluación para cada sustrato. A los 28 días también se evaluaron el número promedio de hojas emitidas/planta, se midió la masa fresca final de las plantas y se calculó el incremento de este indicador como la diferencia resultante entre la masa fresca final de las plántulas y la masa fresca inicial. Para estos indicadores se realizó un análisis de varianza (ANOVA) monofactorial. Después de la

evaluación, las plantas se transfirieron a bolsas de polietileno de 6,3 dm<sup>3</sup> de capacidad que contenían el mismo sustrato donde se mantuvieron durante cinco meses más.

### **3.3 Efecto del ethrel en la inducción de proteasas en tallos de plantas aclimatizadas. Determinación de indicadores bioquímicos y fisiológicos asociados a este proceso.**

#### ***3.3.1 Determinación de la concentración de proteínas y la actividad proteolítica de extractos obtenidos a partir de tallos de plantas provenientes del hábitat natural y aclimatizadas.***

Este experimento se realizó con el objetivo de caracterizar, en términos de concentración de proteínas y actividad proteolítica, los extractos crudos obtenidos a partir de tallos de plantas aclimatizadas y compararlos con los obtenidos de tallos de plantas provenientes de su hábitat natural. Las plantas aclimatizadas fueron cultivadas durante seis meses a partir de las mejores condiciones que se obtuvieron en el experimento que se refirió en el acápite 3.2.4. Estas plantas se caracterizaron por tener entre 10-12 hojas, 100-200 g de masa del tallo y 1,0-1,5 kg de masa total. Mientras que las plantas provenientes del hábitat natural tenían entre 18-20 hojas, 400-500 g de masa del tallo y 2,5-3,0 kg de masa total.

Los extractos proteolíticos se prepararon por triplicado como se refirió en el acápite 3.1.1. Se cuantificó la actividad proteolítica frente a hemoglobina como sustrato y la concentración de proteínas como se describió en el acápite 3.1.1. Se realizaron tres determinaciones por extracto. La actividad proteolítica específica se calculó como se informó en el acápite 3.1.1. Se utilizó la prueba t-Student para la comparación de las medias de cada indicador evaluado.

#### ***3.3.2 Efecto de la concentración de ethrel en la inducción de proteasas en tallos de plantas aclimatizadas.***

Este experimento se realizó con el objetivo de evaluar el efecto de la concentración de ethrel en la inducción de proteasas en los tallos de plantas aclimatizadas. Las plantas fueron aclimatizadas durante seis meses con las mejores condiciones de cultivo que se obtuvieron en el acápite 3.2.4 y poseían las características descritas en el acápite 3.3.1. Las soluciones de ethrel (0; 1,5; 3,0; 4,5 y 6,0 mg·L<sup>-1</sup>) se prepararon a partir de una formulación comercial que contenía 480 g·L<sup>-1</sup> del compuesto activo (ácido 2-cloroetilfosfónico). Se aplicaron 40 mL de las soluciones de ethrel en la zona central de la roseta de acuerdo con lo descrito por Turnbull *et al.* (1999). Se mantuvieron las condiciones de cultivo que se describieron en acápite 3.2.4. El riego

se suspendió por seis horas después de aplicado el producto. Se utilizaron 30 plantas por tratamiento distribuidas en tres grupos de 10 plantas. Después de tres días de aplicado el producto, se colectaron los tallos de cada grupo de plantas.

Para preparar los extractos proteolíticos se procedió de acuerdo a lo descrito en el acápite 3.1.1. La cuantificación de los indicadores: actividad proteolítica, concentración de proteínas y actividad proteolítica específica se desarrolló como se refirió en el acápite 3.1.1. Se realizaron tres extracciones y tres determinaciones por extracto. Se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) monofactorial para cada indicador evaluado. El mejor resultado sirvió de premisa para el siguiente experimento.

### ***3.3.3 Efecto del tiempo de aplicación del ethrel en la inducción de proteasas en tallos de plantas aclimatizadas.***

Con el objetivo de estudiar el efecto del tiempo en la inducción de proteasas en tallos de plantas aclimatizadas se realizó este experimento. Las plantas fueron aclimatizadas durante seis meses con las mejores condiciones de cultivo que se refirieron en el acápite 3.2.4 y poseían las características descritas en el acápite 3.3.1. Se utilizó la concentración de ethrel que mostró el mejor resultado en el experimento del acápite 3.3.2. La solución se aplicó como se refirió en el acápite 3.3.2. Se mantuvieron las condiciones de cultivo que se describieron en acápite 3.2.4. El riego se suspendió por seis horas después de aplicado el producto. Se utilizaron 30 plantas por tratamiento distribuidas en tres grupos de 10 plantas. La evaluación se realizó a los 0; 1; 2; 3 y 4 días posteriores a la aplicación de la solución de ethrel. En cada momento de evaluación se colectaron los tallos de cada grupo de plantas.

La preparación de los extractos proteolíticos se realizó de acuerdo con lo descrito en el acápite 3.1.1. Para la determinar la actividad proteolítica, la concentración de proteínas y la actividad proteolítica específica se procedió de acuerdo con lo descrito en el acápite 3.1.1. Se realizaron extracciones y tres determinaciones por extracto. Se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) bifactorial para cada indicador evaluado. El mejor resultado sirvió de premisa para el siguiente experimento.

### ***3.3.4 Determinación de indicadores bioquímicos y fisiológicos asociados a la aplicación del ethrel.***

Este experimento se realizó para determinar el comportamiento de indicadores bioquímicos y fisiológicos asociados a rutas metabólicas relacionadas con la respuesta a la aplicación del ethrel

en plantas aclimatizadas. Se utilizaron dos tratamientos: uno en el que a las plantas no se les aplicó producto activo (Control) y otro en el que se aplicó a las plantas la concentración de ethrel que mostró el mejor resultado en el experimento descrito en el acápite 3.3.2. Las plantas fueron aclimatizadas durante seis meses con las mejores condiciones de cultivo que se obtuvieron en el acápite 3.2.4 y poseían las características descritas en el acápite 3.3.1. La preparación y aplicación de la solución de ethrel se realizó según lo descrito en el acápite 3.3.2. Se utilizaron 30 plantas por tratamiento distribuidas en tres grupos de 10 plantas. El tiempo para realizar las evaluaciones se seleccionó de acuerdo con el mejor resultado del experimento del acápite 3.3.3. Se utilizó la prueba t-Student para la comparación de las medias de cada indicador evaluado. Para la elección de la hoja donde se realizaron las evaluaciones se tuvo en cuenta lo establecido para *Ananas comosus* (L.) Merrill (Aragón *et al.*, 2011). En todos los casos se seleccionó la hoja que forma un ángulo de 45° con el eje vertical de la planta.

La medición de la actividad fotosintética se realizó a la hoja descrita anteriormente de cinco plantas por grupo con diez mediciones a cada una para un total de 150 mediciones. La capacidad fotosintética máxima se midió con el CIRAS-2 acoplado a una cubeta universal (PLC6). El área de la cubeta se cubrió completamente con la hoja (2,5 cm<sup>2</sup>). La concentración de dióxido de carbono fue de 375 μmol·mol<sup>-1</sup>. La humedad relativa se mantuvo entre 80-90%. La intensidad de la luz fue de 400 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>. Los resultados de fotosíntesis se expresaron en μmol CO<sub>2</sub>·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>.

Para determinar la masa fresca y seca se colectaron las hojas, con las características descrita anteriormente, de cinco plantas por grupo. Se determinó la masa fresca en una balanza analítica (Sartorius). Para obtener la masa seca, las hojas se colocaron durante 72 horas a 70°C en estufa convencional (HS62A) hasta que la masa fue constante.

Para cuantificar la concentración de proteínas y la actividad proteolítica se colectaron las hojas (con las características descrita anteriormente) de cinco plantas por grupo. Se prepararon extractos crudos por triplicado como se refirió en el acápite 3.1.1. La cuantificación de la concentración de proteínas y la actividad proteolítica así como el cálculo de la actividad proteolítica específica se realizó como se describió en el acápite 3.1.1. Se realizaron tres determinaciones por extracto.

Para determinar la actividad de las enzimas guayacol peroxidasa y superóxido dismutasa (SOD), los extractos proteicos se prepararon como establece el procedimiento de Jacobs *et al.* (1999). Las hojas (con las características descrita anteriormente) y los tallos (1 g) de cinco plantas por grupo se maceraron en nitrógeno líquido. La extracción se realizó por triplicado con solución amortiguadora Tris-HCl ( $0,35 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , pH 8,0), 50% de polivilpolipirrolidona,  $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  de ácido etilendiaminotetracético (EDTA),  $15 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  de cisteína, y  $0,2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  de PMSF a una proporción 1:4,0 (m/v). La homogeneización se realizó en homogeneizador Ultra-turrax T25. El homogenato se filtró por gasa y se centrifugó (Centrifuga Beckman, Modelo J2-21) a  $10\ 290 \times g$  durante 20 minutos a  $4^\circ\text{C}$ . Se colectó el sobrenadante.

La actividad guayacol peroxidasa se determinó según el método de Pascual *et al.* (1983). La mezcla de reacción contenía:  $50 \mu\text{L}$  de extracto de hojas y tallos;  $700 \mu\text{L}$  de solución amortiguadora Tris-HCl ( $0,01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , pH 7);  $150 \mu\text{L}$  de guayacol ( $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) y  $100 \mu\text{L}$  de peróxido de hidrógeno. Se evaluó la absorbancia a  $470 \text{ nm}$  cada 15 segundos durante tres minutos. El promedio de la variación de la absorbancia en la sección lineal de la curva se tomó en consideración para estimar la actividad peroxidasa. En cada determinación se tuvo en cuenta la reacción espontánea en el tiempo para los sustratos guayacol y peróxido de hidrógeno. La actividad enzimática se calculó como el cociente de la variación de la absorbancia medida en el tiempo de ensayo con respecto a la variación del tiempo, referidos al coeficiente de extinción molar del guayacol ( $5570\cdot 10^{-6} \mu\text{mol}^{-1}\cdot\text{L}\cdot\text{cm}^{-1}$ ). La actividad enzimática guayacol peroxidasa se expresó como  $\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$  de masa fresca, donde una unidad de actividad enzimática corresponde a  $1 \mu\text{mol}$  de sustrato transformado en 1 minuto. La actividad peroxidasa específica se calculó como la relación entre la actividad enzimática guayacol peroxidasa y la concentración de proteínas obtenida para cada tratamiento. Se expresó en  $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$  de proteínas. Se realizaron tres determinaciones por extracto.

Para determinar la actividad SOD (EC 1.15.1.1) se utilizó el procedimiento descrito por McCord y Fridovich (1969). La mezcla de reacción contenía:  $80 \mu\text{L}$  de extracto de hojas y tallos,  $900 \mu\text{L}$  de solución amortiguadora de fosfato de potasio-KOH ( $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , pH 7,6),  $0,1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  de EDTA;  $0,01 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  de Citocromo C (SIGMA) y  $0,05 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  de xantina y  $20 \mu\text{L}$  xantina oxidasa (EC 1.2.3.22; 0,03 unidades; SIGMA). La mezcla xantina-xantina oxidasa se utilizó como fuente de radicales superóxido y se cuantificó por el método del citocromo C

( $\epsilon_{340}=21,1 \text{ mmol}^{-1}\cdot\text{L}\cdot\text{cm}^{-1}$ ). Se evaluó la absorbancia a 550 nm cada 15 segundos durante tres minutos. La actividad enzimática SOD se expresó en  $\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$  de masa fresca, donde una unidad de actividad enzimática corresponde a 1  $\mu\text{mol}$  de superóxido transformado en 1 hora. La actividad SOD específica se calculó como la relación entre la actividad enzimática SOD y la concentración de proteínas obtenida para cada tratamiento. Se expresó en  $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$  de proteína. Se realizaron tres determinaciones por extracto.

La concentración de malondialdehído (MDA) y otros aldehídos se determinó por el procedimiento descrito por Heath y Packer (1968). Las hojas (con las características descrita anteriormente) y los tallos (100 mg) se maceraron en nitrógeno líquido, se mezclaron con 1,4 mL de agua destilada, y se agitaron brevemente. Se adicionaron 1,5 mL de ácido tiobarbitúrico 0,5% (m/v; en ácido tricloroacético 20% (v:v)), y las muestras se incubaron en un baño termostático a 100°C durante 25 minutos. Luego se colocaron en baño de hielo por cinco minutos y se centrifugaron a  $756\times\text{g}$ , durante 15 minutos. Se midió la absorbancia del sobrenadante a 455, 532 y 600 nm en un espectrofotómetro UV visible Pharmacia LKB-Ultrospec III. La absorbancia no específica del producto de la reacción (600 nm) se sustrajo de la absorbancia máxima a 532 nm para las mediciones del MDA, y de 455 nm para otros aldehídos. Para el cálculo de la concentración de MDA se utilizó un coeficiente de extinción molar de  $155 \text{ mmol}^{-1}\cdot\text{L}\cdot\text{cm}^{-1}$  y para los otros aldehídos de  $45,7 \text{ mmol}^{-1}\cdot\text{L}\cdot\text{cm}^{-1}$  (promedio de los coeficientes de extinción del propanal, butanal, hexanal, y propanal-dimetilacetal) a 532 nm. Los resultados se expresaron en  $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$  de masa fresca.

La concentración de clorofila a, b y total se determinó según el método de Porras (1991). Se maceraron 100 mg de hojas en nitrógeno líquido y posteriormente se le adicionaron 0,5 mL de acetona al 80% (v:v). Las muestras se centrifugaron a  $12\ 100 \times\text{g}$  y 4°C durante 15 minutos. Se colectó el sobrenadante y se evaluó la absorbancia a 647 nm y 664 nm. La concentración de clorofilas se calculó como:

$$\text{Clorofila a} = 12,25 \text{ Absorbancia } 664 \text{ nm} - 2,55 \text{ Absorbancia } 647 \text{ nm}$$

$$\text{Clorofila b} = 20,31 \text{ Absorbancia } 647 \text{ nm} - 4,91 \text{ Absorbancia } 664 \text{ nm}$$

$$\text{Clorofila total} = 17,76 \text{ Absorbancia } 647 \text{ nm} + 7,34 \text{ Absorbancia } 664 \text{ nm}$$

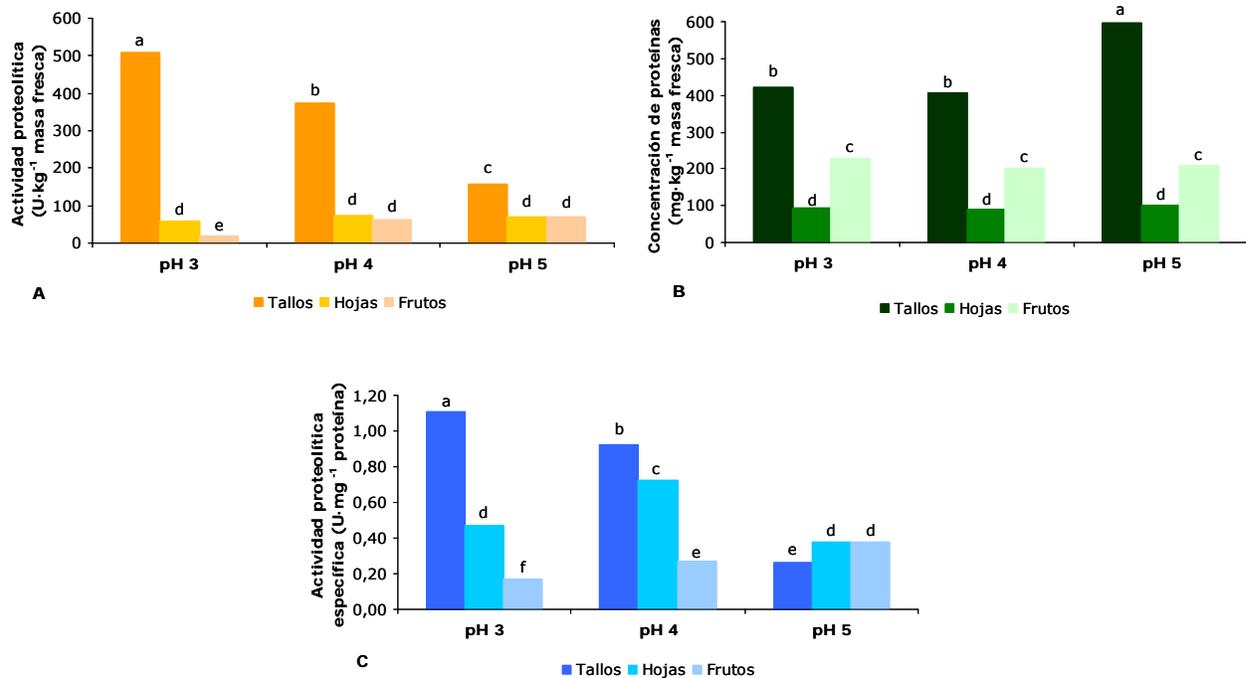
En cada caso los resultados se expresaron en  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  de masa fresca.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Obtención de proteasas a partir de plantas de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez.

#### 4.1.1 Efecto del pH de extracción en la actividad proteolítica de extractos crudos de diferentes órganos de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez.

En la figura 2 se muestra la actividad proteolítica; la concentración de proteínas y la actividad específica de los extractos de diferentes órganos de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez que se obtuvieron al realizar el procedimiento de extracción a diferentes pH. Como se puede apreciar la actividad proteolítica (figura 2A) fue significativamente mayor para los tallos cuando la extracción se realizó a pH 3 (508,91 U·kg<sup>-1</sup> de masa fresca). En el caso de las hojas, este indicador no tuvo diferencias significativas a los pH que se evaluaron. Por otra parte, la actividad proteolítica en los frutos no mostró diferencias significativas entre los valores que se obtuvieron para pH 4 y 5 (61,44 y 70,72 U·kg<sup>-1</sup> de masa fresca, respectivamente).



	Act. proteolítica (U·kg <sup>-1</sup> masa fresca)	Conc. proteínas (mg·kg <sup>-1</sup> masa fresca)	Act. proteolítica específica (U·mg <sup>-1</sup> proteína)
Media general	156,19	260,44	0,53
Error típico de la media	18,81	30,52	0,06

**Figura 2.** Actividad proteolítica (A), concentración de proteínas (B) y actividad específica (C) de extractos proteolíticos crudos obtenidos a varios pH, a partir de diferentes órganos de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez. Medias con letras desiguales difieren estadísticamente (ANOVA bifactorial; Tukey; p ≤ 0,05; n=9).

La mayor concentración de proteínas ( $597,27 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  de masa fresca) se logró en preparados de tallos de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez con solución de extracción a pH 5, con diferencias significativas del resto de los tratamientos. Este indicador no mostró diferencias significativas para los diferentes pH evaluados en los extractos de hojas y frutos. No obstante, los valores que se cuantificaron en los preparados de frutos fueron superiores a los de las hojas (figura 2B).

Para la actividad proteolítica específica (figura 2C) el mejor resultado le correspondió a los tallos cuando la extracción se hizo a pH 3 ( $1,10 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$  de proteína), con diferencias significativas con el resto de los tratamientos. En los preparados proteolíticos que se obtuvieron a partir de hojas, la actividad proteolítica específica fue mayor cuando la extracción se realizó a pH 4, con diferencias significativas con el resto de los pH evaluados. Por su parte, para los frutos se observó que este indicador fue mayor para los pH 4 y 5, sin diferencias significativas entre sí ( $0,37$  y  $0,43 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$  de proteína, respectivamente).

Este procedimiento de extracción de cisteino proteasas a partir de órganos de plantas de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez, en el que se emplean protectores de los grupos -SH- del centro activo y pH ligeramente ácido, permitió obtener extractos crudos con altos valores de actividad proteolítica. Hernández *et al.* (1999) usaron la metodología patentada por Hernández *et al.* (1997) y determinaron la actividad proteolítica de extractos de tallos de *Ananas comosus* (L.) Merrill frente a hemoglobina (2,0%, m/v) como sustrato, al igual que se realizó en esta investigación. Los mejores resultados en cuanto a actividad proteolítica ( $5\,357,90 \text{ U}\cdot\text{kg}^{-1}$  de masa fresca), concentración de proteínas ( $3\,939,00 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  de masa fresca) y actividad proteolítica específica ( $1,36 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$  de proteína) también los obtuvieron en los tallos cuando la extracción se realizó a pH 3. En términos de actividad proteolítica específica los resultados de esta investigación ( $1,10 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$  de proteína) son comparables con los informados por dichos autores, lo que demuestra que los rendimientos dependen del pH y se favorecen cuando la extracción se realiza a partir de tallos de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez a pH 3.

En investigaciones encaminadas a explicar los mecanismos de activación de las cisteino proteasas *in vivo* se informó que este proceso depende del pH (Wiederanders, 2003). También, se demostró que existe un predominio de moléculas de enzima activa a pH ácido. Esto puede

explicarse ya que las variaciones de pH neutro a pH ácido en las vacuolas provocan cambios en la conformación nativa de la enzima inactiva, lo que permite el procesamiento y plegamiento de la enzima activa (Kihara *et al.*, 2002).

Los mejores resultados obtenidos en el caso de tallos a pH 3 demostraron que la(s) enzima(s) es (son) estable(s) a ese pH. Como se señaló anteriormente, uno de los mecanismos de activación de estas enzimas *in vivo* es por el pH (Turk *et al.*, 1999; Müntz, 2007). Los resultados sugieren que la(s) proteasa(s) presentes en este órgano se activan a valores ácidos de pH. En el caso de los extractos de frutos se observó una tendencia a lograr mejores resultados en la medida que se incrementa el pH, es posible que la proporción de enzimas presentes en ese órgano tengan características ácido-base diferentes a las del tallo; de ahí que para los frutos, realizar la extracción a pH más cercano al neutro podría mostrar resultados interesantes.

La comparación de los rendimientos con otras tecnologías descritas no siempre es posible debido a que no se tienen las mismas condiciones de trabajo. No obstante, existen informes sobre la obtención de bromelina a partir de *Ananas comosus* (L.) Merrill donde se exponen los valores de actividad proteolítica obtenidos frente a hemoglobina como sustrato. Murachi (1970) obtuvo 5 700,00 U·kg<sup>-1</sup> de masa fresca. Daley y Vines (1978) informaron 2 100,00 U·kg<sup>-1</sup> de masa fresca y Tisseau (1986) 2 200,00 U·kg<sup>-1</sup> de masa fresca. Por su parte, Hernández *et al.* (1999) tuvieron en su extracto una actividad proteolítica de 5 357,90 U·kg<sup>-1</sup> de masa fresca. Estos valores de actividad proteolítica son superiores a los que se lograron en esta investigación. Sin embargo, en términos de actividad proteolítica específica (1,10 U·mg<sup>-1</sup> de proteína) los resultados que se obtuvieron para los tallos de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez son comparables o superiores a los informados en la literatura: 1,0-1,2 U·mg<sup>-1</sup> de proteína con el proceso patentado por la *Russian Academic Science*, (1993); 1,15 U·mg<sup>-1</sup> de proteínas al precipitar el jugo de tallos *Ananas comosus* (L.) Merrill con sulfato de amonio (Murachi, 1970) y 1,36 U·mg<sup>-1</sup> de proteínas al realizar la extracción con una solución de sulfuro de sodio a pH 3 (Hernández *et al.*, 1999).

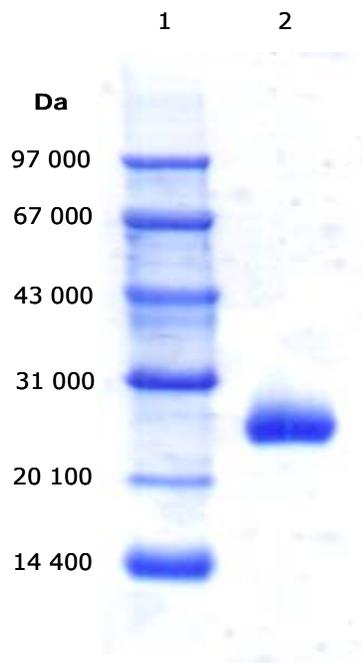
En lo adelante, se realizó la extracción de proteasas a partir de tallos de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez a pH 3.

#### **4.1.2 Caracterización molecular del preparado proteolítico parcialmente purificado.**

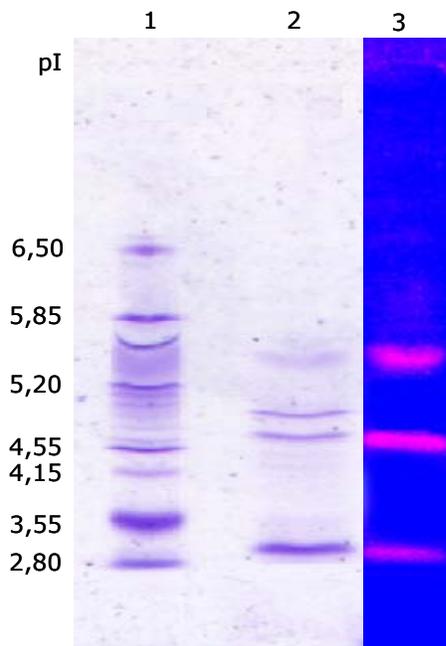
Los resultados de la electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) se muestran en la figura 3. En el gel, las fracciones proteicas se agruparon en una banda ancha de masa molar entre los 20 100 y los 31 000 Da. Este comportamiento electroforético es característico de las cisteino proteasas de plantas de la familia Bromeliaceae, para las que se ha descrito que su masa molar oscila entre 21 000 y 30 000 Da (Grzonka *et al.*, 2001). Harrach *et al.* (1995) analizaron extracto crudo de bromelina en una electroforesis SDS-PAGE y obtuvieron seis bandas de proteínas, de las cuales cinco se encontraban entre 20 100 y 30 000 Da. Además, Pardo *et al.* (2000); López *et al.* (2000) y Bruno *et al.* (2003) informaron la presencia de fracciones proteicas entre 21 000 y 30 000 Da en extractos de *Bromelia balansae* Mez, *Pseudoananas macrodontes* (Morr.) Harms y *Bromelia hieronymii* Mez. Aunque el comportamiento observado coincide con lo descrito para las proteasas de plantas de la familia Bromeliaceae, eso no garantiza la presencia de una única proteína pues pueden coexistir proteínas o isoformas que posean similar masa molar y diferentes puntos isoeléctricos que no pueden ser visualizados con esta técnica.

En la figura 4 se muestra el gel proveniente del isoelectroenfoque del preparado proteolítico parcialmente purificado. Se puede apreciar la presencia de cuatro fracciones ácidas con puntos isoeléctricos inferiores a 5,85; notándose además, una banda gruesa que se agrupa en la región catódica con pI cercano a 2,8. En el zimograma, se observaron tres bandas claras que demuestran que algunas fracciones del preparado proteolítico parcialmente purificado hidrolizaron la caseína, lo que se corresponde con lo informado en la literatura sobre la utilidad de esta técnica para detectar actividad proteolítica (Westergaard *et al.*, 1980).

Los perfiles de isoelectroenfoque y zimograma son variables y dependen de la naturaleza del extracto. Pardo *et al.* (2000) informaron que al realizar isoelectroenfoque de una preparación parcialmente purificada de frutos inmaduros de *Bromelia balansae* Mez. obtuvieron seis fracciones proteicas con puntos isoeléctricos inferiores a nueve, de las cuales sólo dos bandas mostraron actividad proteolítica en el zimograma.



**Figura 3.** Electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) del preparado proteolítico parcialmente purificado obtenido a partir de tallos de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez. (1) Patrones de masa molar conocida, (2) Preparado proteolítico parcialmente purificado. El gel contenía 12,5% de acrilamida. Se colocaron 30  $\mu$ g de proteínas en el gel.



**Figura 4.** Isoelectroenfoque y zimograma del preparado proteolítico parcialmente purificado obtenido a partir de tallos de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez. (1) Patrones de pI conocido, (2) Preparado proteolítico parcialmente purificado, (3) Zimograma. El gel para el isoelectroenfoque contenía 5,0% de acrilamida; anfolitos de rango de pI 2,8–6,5. Se colocaron 10  $\mu$ g de proteínas en el gel.

Los resultados de los estudios electroforéticos permitieron definir una estrategia para la purificación de las proteasas presentes en la preparación proteolítica parcialmente purificada obtenida a partir de tallos de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez. La utilización de la cromatografía de exclusión molecular no es factible en este caso porque no permitiría la separación resolutive de las proteasas presentes en el preparado proteolítico parcialmente purificado debido a que todas poseen similar masa molar comprobada por electroforesis SDS-PAGE. En el isoelectroenfoco se demostró la presencia de varias fracciones ácidas con actividad proteolítica. Estos resultados conllevaron a elegir, para la purificación de las proteínas, un método basado en la separación por su carga neta.

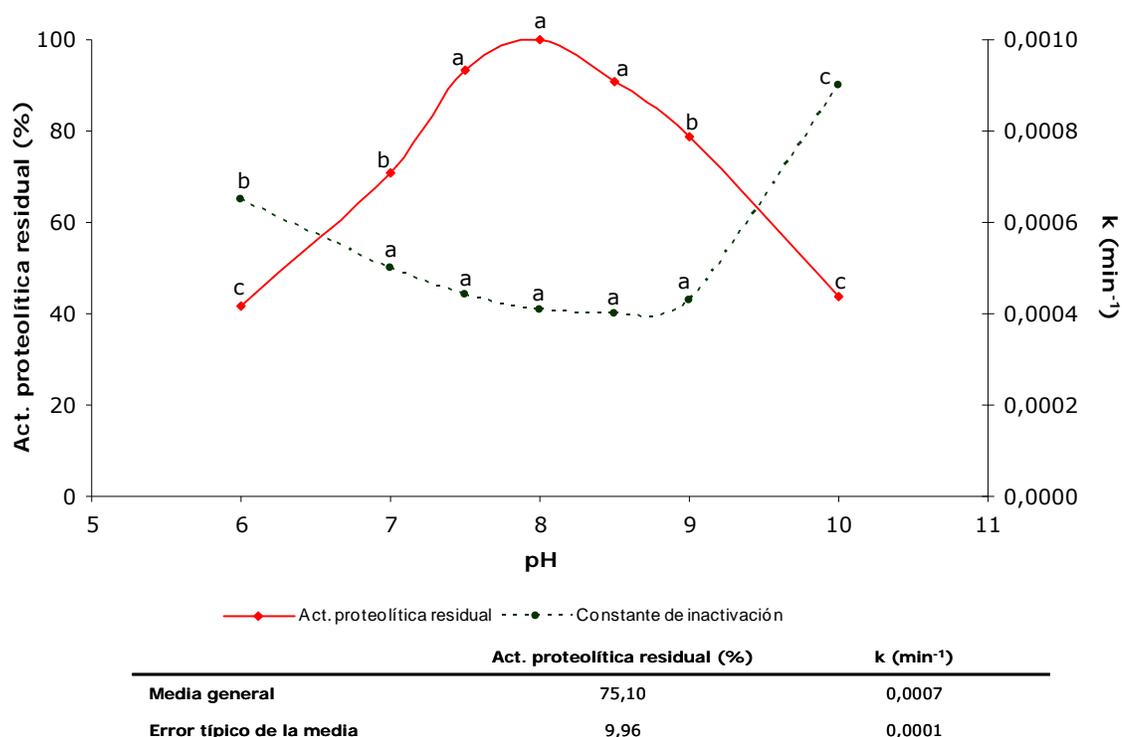
#### **4.1.3 Caracterización cinética del preparado proteolítico parcialmente purificado.**

##### *4.1.3.1 Determinación del pH óptimo y la estabilidad en función del pH.*

Los resultados de la actividad proteolítica residual y la constante de inactivación en función del pH del preparado proteolítico parcialmente purificado obtenido a partir de tallos de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez se muestran en la figura 5. La actividad proteolítica residual fue superior al 90% para el rango de pH 7,5-8,5; sin diferencias significativas para estos valores de pH, por encima o por debajo de este rango la actividad proteolítica residual disminuyó cuando la reacción ocurrió a 37°C por 4 minutos. Al analizar el comportamiento de la constante de inactivación en función del pH se observó que el preparado es más estable en el rango de pH entre 7,0 y 9,0; sin diferencias significativas entre sí.

El perfil acampanado que se obtuvo concuerda con el comportamiento de muchas preparaciones enzimáticas (Lehninger *et al.*, 2005), incluyendo algunas de plantas de la familia Bromeliaceae (Hernández *et al.*, 2003; Abreu *et al.*, 2005; Bruno *et al.*, 2006). El intervalo de pH óptimo es variable en dependencia de la especie vegetal, el sustrato con el que se trabaja y las condiciones a las que se realiza el ensayo enzimático (López *et al.*, 2000; Hernández *et al.*, 2003; Bruno *et al.*, 2008). El rango de pH (7,5-8,5) donde la preparación proteolítica parcialmente purificada mostró la mayor actividad proteolítica es ligeramente básico muy cercano al neutro. Este comportamiento es característico de las endoproteasas cisteínicas de la familia C1, que exhiben perfiles amplios de actividad proteolítica en función del pH, sin embargo

el valor óptimo se encuentra, generalmente, a pH cercano a 7,0 frente a sustratos sintéticos y proteicos (Barrett *et al.*, 2004; Dubey *et al.*, 2007).



**Figura 5.** Comportamiento de la actividad proteolítica residual y la constante de inactivación en función del pH del preparado proteolítico parcialmente purificado obtenido a partir de tallos de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez. [Sustrato]=1% (m/v), [Enzima]=0,1 mg·mL<sup>-1</sup>, 4 minutos. Medias con letras desiguales difieren estadísticamente para cada indicador (ANOVA de un factor; Tukey;  $p \leq 0,05$ ;  $n=9$ ).

El pH óptimo de una enzima no es necesariamente idéntico al pH de su entorno celular (Lehninger *et al.*, 2005). En las plantas, las cisteino proteasas se almacenan en las vacuolas o en la pared celular donde el pH es ligeramente ácido (Grudkowska y Zagdanska, 2004), generalmente estas enzimas son muy estables a esos valores de pH (Haq *et al.*, 2002); sin embargo están alejados del pH óptimo para la hidrólisis de proteínas, lo que es conveniente para evitar la autoproteólisis (Obregón *et al.*, 2009b).

Hernández *et al.* (2003) estudiaron la estabilidad en función del pH de extractos crudos obtenidos a partir de tallos de *Ananas comosus* (L.) Merrill y observaron que la preparación proteolítica es estable en un rango amplio de pH, desde 3,0 hasta 9,0 por 120 minutos. Por su parte, Abreu *et al.* (2005) caracterizaron bioquímica y funcionalmente un preparado enzimático parcialmente purificado por precipitación etanólica de frutos de *Bromelia pinguin* L. y

demonstraron que el mismo conserva más del 70% de su actividad original al cabo de las dos horas de incubado a pH 7,2; 8,08 y 9,25. Al comparar los resultados que se obtuvieron en esta investigación con los que informaron estos autores se puede apreciar que la estabilidad en función del pH del preparado proteolítico parcialmente purificado de tallos de *Hohehenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez fue superior pues a pH 7,0; 8,0 y 9,0 el preparado conservó entre el 85 y 90% de la actividad proteolítica residual a los 120 minutos de incubación.

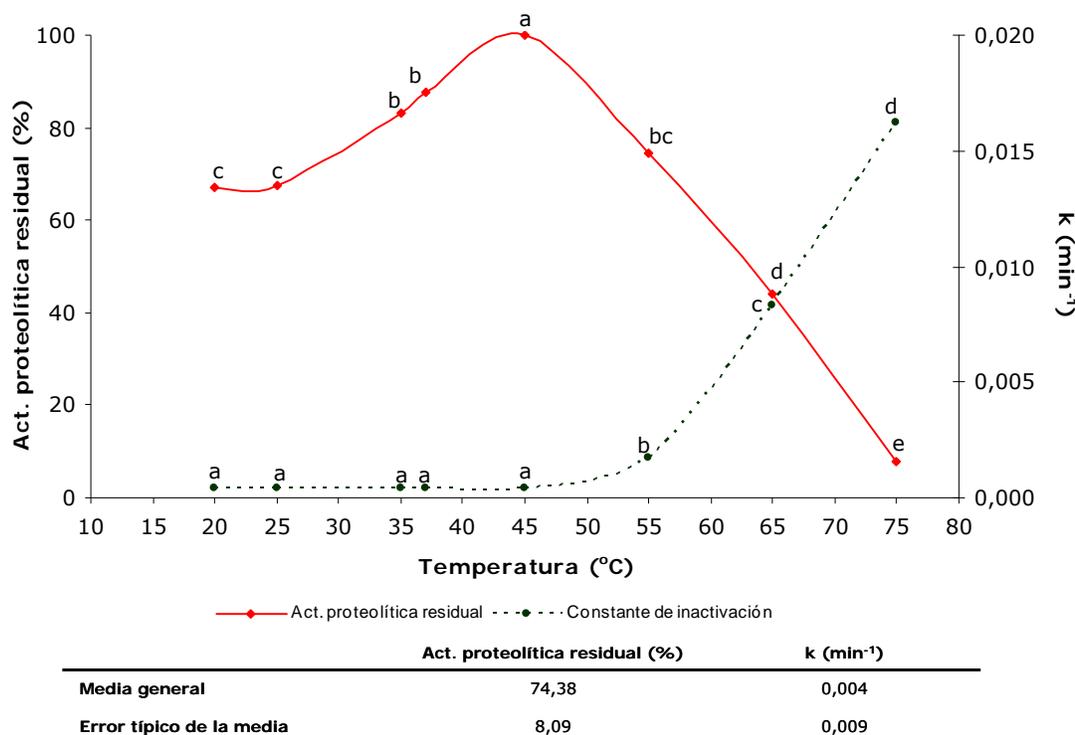
Estos factores son de gran importancia en los estudios *in vitro* para establecer las mejores condiciones de reacción. El rango de pH 7,5-8,5, donde el preparado proteolítico parcialmente purificado mostró los mayores valores de actividad proteolítica se encuentra dentro del rango de pH (7,0-9,0) donde el preparado resultó ser más estable. De acuerdo con los resultados se continuó la caracterización del preparado proteolítico parcialmente purificado a pH 8,0.

#### *4.1.3.2 Determinación de la temperatura "óptima" y la estabilidad en función de la temperatura.*

La figura 6 muestra el perfil de actividad proteolítica residual y la constante de inactivación del preparado proteolítico parcialmente purificado en función de la temperatura. El preparado conserva más del 60% de la actividad proteolítica para el rango de temperaturas entre 25 y 55°C, sin embargo el mejor resultado se obtuvo cuando la reacción enzimática se desarrolló a 45°C, con diferencias significativas con el resto de los tratamientos. El comportamiento de la constante de inactivación reflejó que el preparado proteolítico parcialmente purificado es muy estable hasta 45°C. A temperaturas superiores a 45°C, la estabilidad térmica comienza a disminuir progresivamente. El valor de  $k=0,015 \text{ min}^{-1}$  para la temperatura de 75°C demostró que a esa temperatura el preparado proteolítico parcialmente purificado no es estable.

La elevación de la temperatura generalmente conlleva al aumento de la velocidad de las reacciones químicas, ya que provoca un incremento del movimiento térmico y de la energía. Esto hace que aumente el número de moléculas capaces de alcanzar el estado de transición, es decir mayor cantidad de reaccionantes se transforman en producto (Lehninger *et al.*, 2005). La temperatura "óptima" de una reacción enzimática varía en dependencia de las condiciones experimentales, ya que factores como la concentración de enzima, la concentración de sustrato, el pH, la fuerza iónica y en especial el tiempo del ensayo afectan la estabilidad

conformacional de la molécula. Por lo general, la inactivación de las enzimas comienza a ser apreciable a temperaturas comprendidas entre 55 y 60°C (Chávez *et al.*, 2002).



**Figura 6.** Comportamiento de la actividad proteolítica residual y la constante de inactivación en función de la temperatura del preparado proteolítico parcialmente purificado obtenido a partir de tallos de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez. [Sustrato]=1% (m/v), [Enzima]=0,1 mg·mL<sup>-1</sup>, 4 minutos. Medias con letras desiguales difieren estadísticamente para cada indicador (ANOVA de un factor; Tukey; p≤ 0,05; n=9).

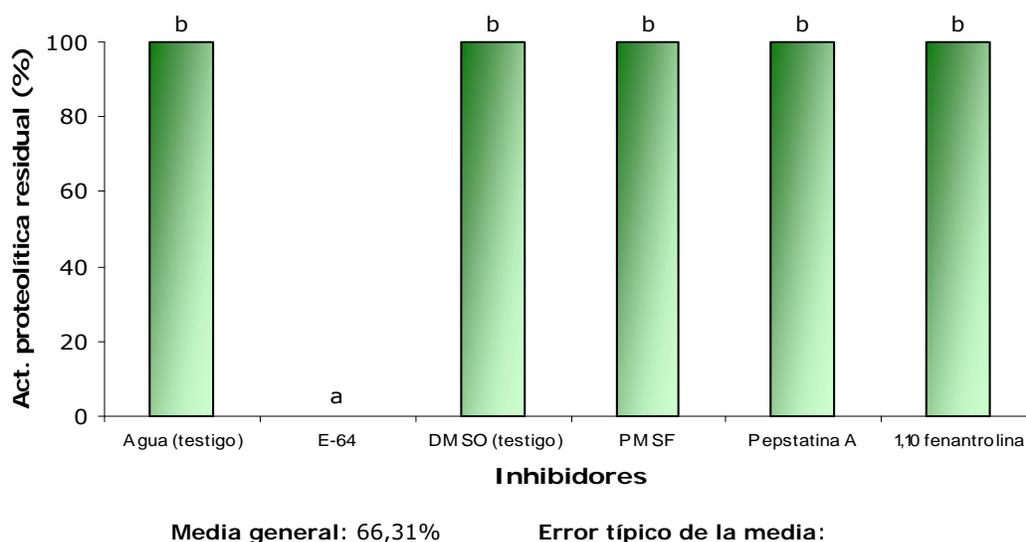
Abreu *et al.* (2005) estudiaron la estabilidad térmica de un preparado parcialmente purificado de *Bromelia pinguin* L. e informaron que la preparación proteolítica conservó entre el 70 y 80% de su actividad al incubarla a temperaturas de 22, 37 y 45°C por 120 minutos. Los resultados que se obtuvieron en esta investigación son superiores a los descritos por estos autores. La preparación parcialmente purificada de tallos de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez conservó entre el 88 y 90% de la actividad proteolítica residual al ser incubada a 20, 25, 37 y 45°C por 120 minutos. Esta propiedad constituye una herramienta importante para la utilización del preparado proteolítico parcialmente purificado obtenido de tallos en procesos industriales donde se use para catalizar la hidrólisis de proteínas.

La estabilidad térmica puede afectarse, además, por otros factores relacionados tanto con la enzima como con el sustrato (Chávez *et al.*, 1990). No obstante, la preparación proteolítica

parcialmente purificada mostró alta estabilidad térmica en función del tiempo, esto concuerda con lo informado en la literatura para endoproteasas cisteínicas (Rowan y Buttle, 1994; Barrett *et al.*, 2004).

#### 4.1.4 Efecto de inhibidores sobre la actividad proteolítica del preparado proteolítico parcialmente purificado.

El comportamiento de la actividad proteolítica residual del preparado proteolítico parcialmente purificado obtenido a partir de tallos de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez frente a varios tipos de inhibidores de proteasas se muestra en la figura 7. El PMSF, la pepstatina A y la 1,10-fenantrolina no inhibieron al preparado proteolítico parcialmente purificado, sin embargo el E-64 lo inhibió totalmente.



**Figura 7.** Comportamiento de la actividad proteolítica residual del preparado proteolítico parcialmente purificado obtenido a partir de tallos de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez frente a inhibidores de proteasas. [Enzima]=20  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Medias con letras desiguales difieren estadísticamente (ANOVA de un factor; Tukey;  $p \leq 0,05$ ;  $n=9$ ).

Los inhibidores irreversibles actúan de diversas formas: pueden enlazarse covalentemente al sitio activo de la enzima, bloquear un grupo funcional que es esencial para la catálisis enzimática o formar una asociación no covalente sustrato-enzima muy estable. Estas moléculas son una herramienta útil para estudiar los mecanismos de reacción de las enzimas debido a que cada inhibidor sólo reacciona con el sitio activo de enzimas específicas (Lehninger *et al.*, 2005). El PMSF es inhibidor de serino proteasas, la pepstatina A de proteasas aspárticas, la 1,10-fenantrolina de metalo proteasas y el E-64 de proteasas cisteínicas (Dunn, 1989). Los

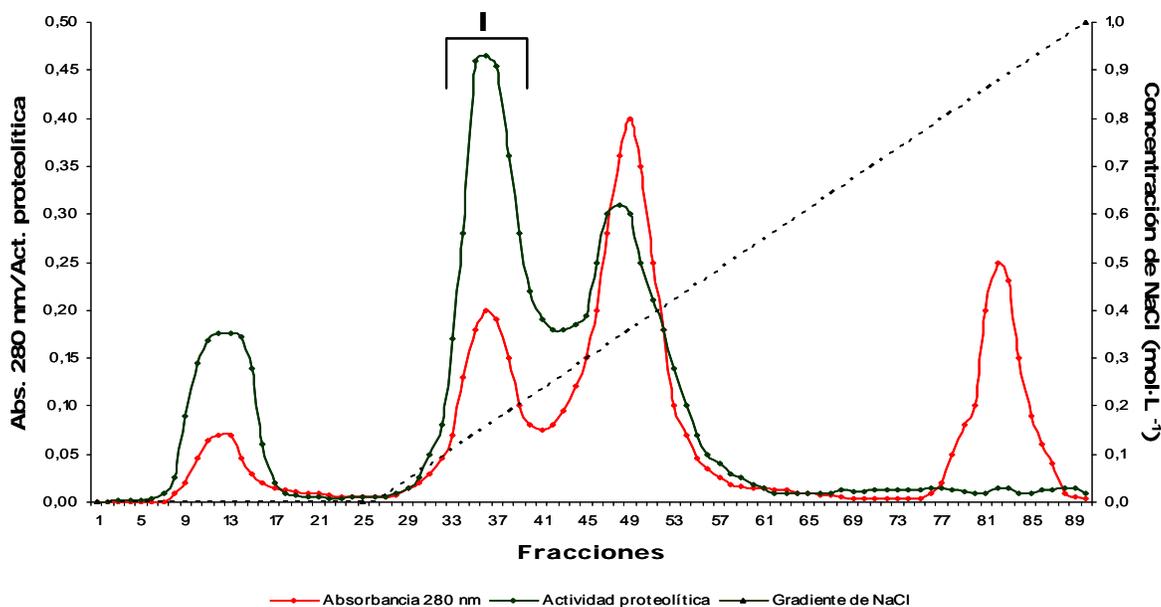
resultados confirmaron la naturaleza cisteínica de las proteasas presentes en el preparado proteolítico parcialmente purificado de tallos de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez.

El mecanismo inhibitorio del E-64 es resultado del enlace por puente de hidrógeno y las interacciones hidrofóbicas que se establecen entre la molécula de inhibidor y la proteasa (Matsumoto *et al.*, 1999). La irreversibilidad de esta inhibición está dada por la reacción del grupo epoxi en la posición C2 del inhibidor con el residuo de cisteína en posición 25 que forma parte del sitio catalítico de la proteasa (Govrin y Levine, 1999).

Las plantas de la familia Bromeliaceae son una fuente natural rica en cisteino proteasas (Rowan y Buttle, 1994; Rowan, 1998). La presencia de proteasas cisteinicas en el preparado proteolítico parcialmente purificado de tallos de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez concuerda con lo informado en la literatura para las plantas de esta familia (Rowan *et al.*, 1990; Pardo *et al.*, 2000; Bruno *et al.*, 2006, 2008). Esto unido a las condiciones que se establecieron para la extracción (uso de protectores de los grupos -SH- del centro activo y pH ligeramente ácido) favoreció la obtención de este tipo de proteasa e impidió la detección de otras proteasas con mecanismo catalítico diferente. Este resultado constituye un elemento valioso que permite confirmar que las proteasas presentes en el extracto de partida son de tipo cisteino.

#### **4.1.5 Purificación de cisteino proteasas a partir del preparado proteolítico parcialmente purificado.**

El cromatograma típico que se obtuvo al purificar el preparado proteolítico parcialmente purificado por cromatografía de intercambio aniónico con gradiente lineal de 0-1,0 mol·L<sup>-1</sup> de cloruro de sodio se muestra en la figura 8. En el cromatograma se observan cuatro fracciones proteicas mayoritarias, tres de ellas poseen actividad proteolítica. Se observó una fracción de proteínas no retenida que eluyó de la columna antes de la aplicación del gradiente. Con la aplicación del gradiente, comenzaron a eluir gradualmente las proteínas con punto isoeléctrico cercano al neutro o ligeramente ácidas hasta que finalmente salen de la columna las proteínas de menor punto isoeléctrico. Se seleccionaron las fracciones de la 33 a la 39 (I) y se decidió optimizar las condiciones de corrida para lograr mayor resolución de ese pico que mostró mayor actividad proteolítica específica.



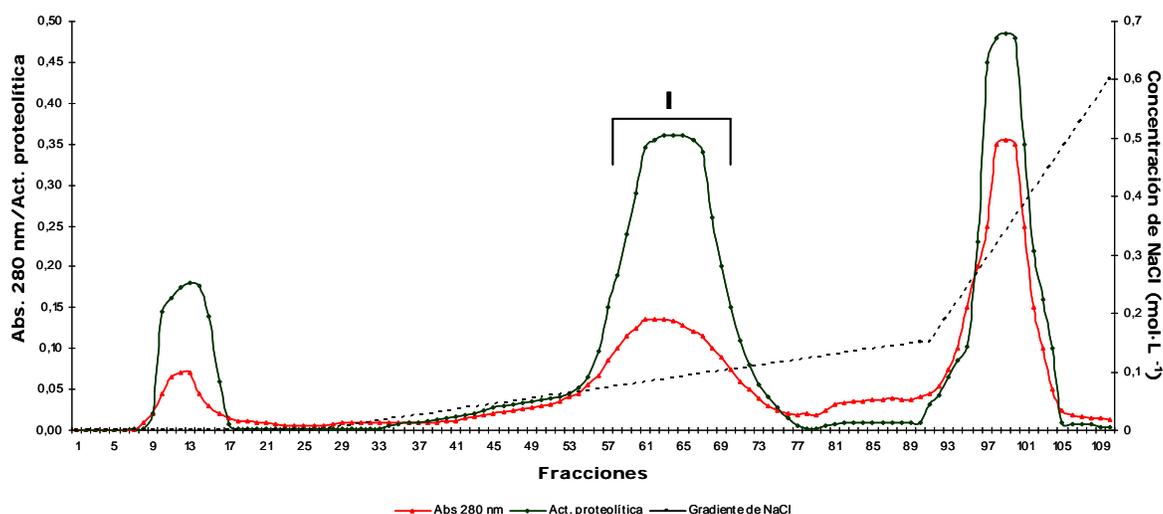
**Figura 8.** Cromatografía de intercambio aniónico en FPLC del preparado proteolítico parcialmente purificado obtenido a partir de tallos de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez. Matriz Q-Sefarosa, gradiente lineal de 0-1 mol·L<sup>-1</sup> de NaCl en el tampón de corrida (Tris-HCl 50 mmol·L<sup>-1</sup>; 5 mmol·L<sup>-1</sup> de Na<sub>2</sub>S<sub>4</sub>O<sub>6</sub>·2H<sub>2</sub>O; pH 7,6; 20°C; cuatro volúmenes de columna). Volumen de la columna 20 mL. Volumen de muestra aplicado 4 mL. [muestra] = 0,43 mg·mL<sup>-1</sup>.

En la figura 9 aparecen los resultados de la corrida cromatográfica resultante al purificar el preparado proteolítico parcialmente purificado por cromatografía de intercambio aniónico con gradiente lineal de 0-0,15 y 0,15-0,60 mol·L<sup>-1</sup> de cloruro de sodio. Con estas condiciones se logró la separación de la proteasa de interés del resto de las fracciones activas. Teniendo en cuenta que en la literatura no se encontraron estudios precedentes de aislamiento y purificación de cisteino proteasas de esta especie, en lo adelante se hará referencia a la fracción purificada (I) con el nombre de pendulifloraina I.

La tabla 1 muestra los rendimientos de las diferentes etapas de la purificación del extracto crudo de tallos de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez. Los rendimientos en términos de actividad fueron del 56,70% y se logró un grado de pureza de 5,80.

En la literatura se describen los rendimientos en la purificación de proteasas de la familia Bromeliaceae. Murachi (1970) obtuvo un grado de pureza de 1,5 y un rendimiento del 32% al purificar bromelina comercial (polvo de acetona) por intercambio iónico. Por su parte, Napper *et al.* (1994) purificaron cisteino proteasas de *Ananas comosus* (L.) Merrill por cromatografía de

intercambio iónico en un sistema FPLC y aunque no informaron cuantitativamente el rendimiento, se refirieron a la pérdida de material activo. López *et al.* (2000) purificaron macrodontaína I y II en FPLC con matriz de intercambio iónico e informaron rendimientos de 21 y 10%, respectivamente. Pardo *et al.* (2000) purificaron la balansaina I por intercambio aniónico en FPLC y obtuvieron un rendimiento final de 48,3% y 2,9 de grado de pureza. Por su parte, Bruno *et al.* (2008) lograron en la purificación de hieronymaina III un rendimiento final de 20,0% y 3,5 de grado de pureza.



**Figura 9.** Cromatografía de intercambio aniónico en FPLC del preparado proteolítico parcialmente purificado obtenido a partir de tallos de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez. Matriz Q-Sefarosa, gradiente lineal de 0-0,15 mol·L<sup>-1</sup> de NaCl en cuatro volúmenes de columna y 0,15-0,60 mol·L<sup>-1</sup> de NaCl en dos volúmenes de columna, en el tampón de corrida (Tris-HCl 50 mmol·L<sup>-1</sup>; 5 mmol·L<sup>-1</sup> de Na<sub>2</sub>S<sub>4</sub>O<sub>6</sub>·2H<sub>2</sub>O; pH 7,6; 20°C). Volumen de la columna 20 mL. Volumen de muestra aplicado 4 mL. [muestra]=0,43 mg·mL<sup>-1</sup>.

**Tabla 1.** Rendimientos de la purificación del extracto crudo de tallos de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez mediante cromatografía de intercambio aniónico en matriz de Q-Sefarosa (FPLC).

Etapas	Vol (mL)	Conc. Prot (mg·mL <sup>-1</sup> )	Prot. Total (mg)	Act. Enz. (U·mL <sup>-1</sup> )	Act. Enz Total (U)	Act. Esp. (U·mg <sup>-1</sup> )	Rend (%)	G.P
Extracto crudo	4,0	0,89	3,56	0,98	3,92	1,10	100,00	1,00
PPPP*	4,0	0,74	2,95	0,89	3,56	1,21	90,80	1,10
Pendulifloraina I	18,0	0,02	0,29	0,11	2,02	7,00	56,70	5,80

\*PPPP: preparado proteolítico parcialmente purificado.

Al comparar los rendimientos que se informan en la literatura para las cisteino proteasas de la familia Bromeliaceae, en los cuales se utilizan métodos similares de purificación, con los

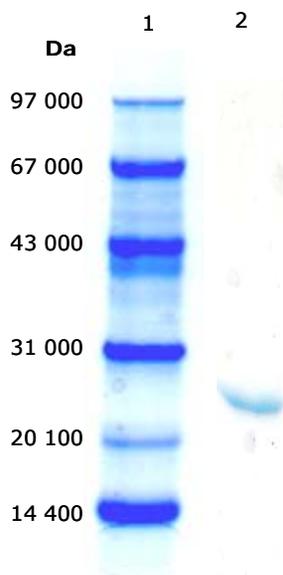
obtenidos en esta investigación se puede apreciar que los aquí expuestos son superiores. La estrategia trazada para la purificación de la fracción proteolítica mayoritaria presente en el preparado proteolítico parcialmente purificado es eficiente en términos de rendimientos. Sin embargo, en este preparado existen otras proteasas o isoformas de esta proteasa que pudieran ser purificadas y caracterizadas en investigaciones futuras. Finalmente se decidió realizar la caracterización molecular y cinética de la pendulifloraina I.

#### **4.1.6 Caracterización molecular de la proteasa purificada.**

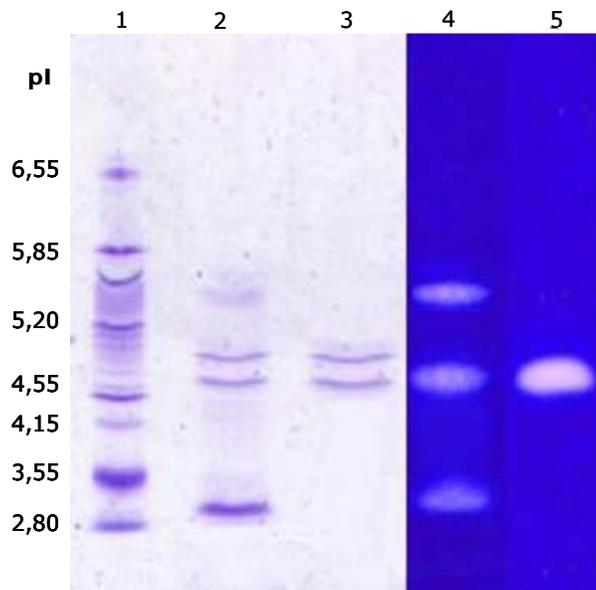
##### *4.1.6.1 Estudios electroforéticos.*

La figura 10 muestra la electroforesis SDS-PAGE de la pendulifloraina I. Se puede observar la presencia de una banda cuya masa molar se encuentra entre 20 100 y 31 000 Da. El gel proveniente del isoelectroenfoque y el zimograma de la pendulifloraina I comparada con el preparado proteolítico parcialmente purificado aparece en la figura 11. Como se puede apreciar se logró la purificación de una enzima proteolítica con pI entre 4,55 y 5,20. En el isoelectroenfoque de la pendulifloraina I (figura 11, columna 3) se observaron dos bandas proteicas que coinciden con las del preparado proteolítico parcialmente purificado (figura 11, columna 2). En el zimograma, se observó una banda clara que evidenció la actividad proteolítica de la pendulifloraina I al hidrolizar la caseína (figura 11, columna 5).

Los valores de masas molares informados para las cisteino proteasas del clan CA familia C1 (familia de la papaina) oscilan entre 21 000-30 000 Da (Grzonka *et al.*, 2001). Específicamente para cisteino proteasas aisladas de plantas de la familia Bromeliaceae la masa molar es aproximadamente 25 000 Da (Rowan *et al.*, 1990). Varios autores informaron la presencia de bandas proteicas de masa molar entre 20 100 y 31 000 Da al realizar electroforesis SDS-PAGE de las enzimas proteolíticas aisladas de plantas de la familia Bromeliaceae. Para cisteino proteasas obtenidas a partir de diferentes órganos de *Ananas comosus* (L.) Merrill, Rowan y Buttle (1994); Harrach *et al.* (1995) y Rupachandra *et al.* (2004) notaron este comportamiento, mientras que Pardo *et al.* (2000); López *et al.* (2000) y Bruno *et al.* (2003, 2008) informaron similares resultados para proteasas purificadas a partir de extractos de frutos de *Bromelia balansae* Mez, *Pseudoananas macrodentes* (Morr.) Harms y *Bromelia hieronymii* Mez, respectivamente.



**Figura 10.** Electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) de la pendulifloraina I purificada por intercambio aniónico en FPLC. (1) Patrones de masa molar conocida, (2) Pendulifloraina I. El gel contenía 12,5% de acrilamida. Se colocaron 20 µg de proteínas en el gel.



**Figura 11.** Isoelectroenfoco y zimograma de la pendulifloraina I purificada por intercambio aniónico en FPLC. (1) Patrones de pI conocido, (2) Preparado proteolítico parcialmente purificado, (3) pendulifloraina I, (4) gel de agarosa 1% (m/v) del preparado proteolítico parcialmente purificado, (5) Zimograma de la pendulifloraina I. El gel para IEF contenía acrilamida 5,0%; anfolitos de rango de pI 2,8–6,5. Se colocaron 10 µg de proteínas en el gel.

Las enzimas de este clan y de la familia de la papaina tienen una arquitectura general muy similar con un arreglo catalítico (residuos de Cys<sup>25</sup>, His<sup>159</sup> y Asn<sup>175</sup>) muy conservado (Theodorou *et al.*, 2007). La similitud estructural de estas enzimas sugieren la existencia de un precursor común, que con la evolución de las especies hace que hoy se conozcan más de 500 cisteino proteasas de esta familia, en los reinos de plantas y animales (Wiederanders, 2003). La conservación estructural de las moléculas permiten asegurar que son el resultado de la evolución de millones de años (Feijoo-Siota y Villa, 2011).

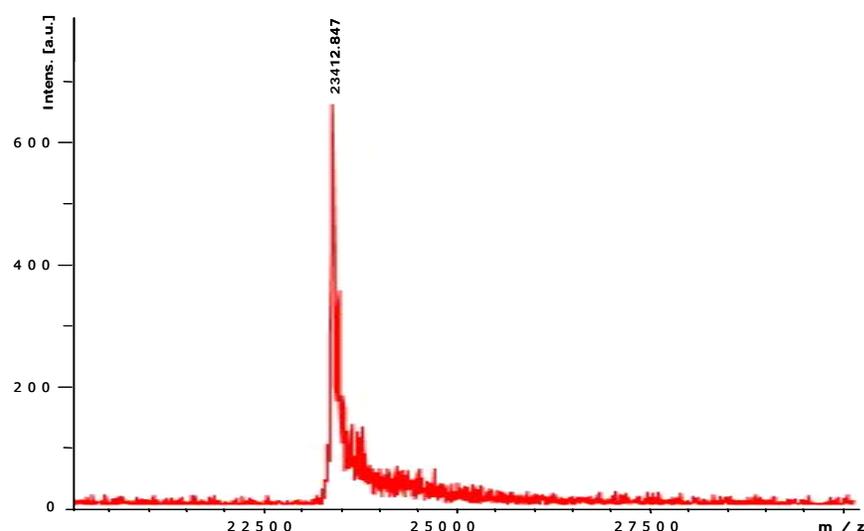
La existencia de dos bandas proteicas en el isoelectroenfoque de la pendulifloraina I pudiera estar relacionada con la presencia de isoformas en el extracto de partida, o con diferencias en el procesamiento celular de la enzima. La heterogeneidad de cargas de las cisteino proteasas aisladas de diferentes órganos de plantas es un tema ampliamente discutido. Rowan *et al.* (1990) informaron la existencia de bandas múltiples en el isoelectroenfoque de algunas proteasas purificadas de plantas de la familia Bromeliaceae. Por su parte, Harrach *et al.* (1995, 1998) describieron que al purificar cisteino proteasas de plantas de *Ananas comosus* (L.) Merrill simples cambios de temperatura, o la congelación-descongelación de los extractos provocaron variaciones en los perfiles de purificación por intercambio iónico atribuido a variaciones de carga neta de las proteínas. Para el caso de la bromelina de tallo estos autores observaron que se presentan dos formas de la enzima, que se visualizaron como dos bandas separadas en el isoelectroenfoque, que mantuvieron constante su masa molecular y secuencia amino terminal. Además, relacionaron este comportamiento con una modificación química dada por la desaminación de ciertos residuos y la sustitución por grupos hidroxilos.

Bruno *et al.* (2008) informaron que el isoelectroenfoque de la hieronymaina III evidenció la presencia de dos bandas con valores de pI 5,9 y 6,4. Mientras que la electroforesis SDS-PAGE de la enzima purificada mostró una banda única de proteínas con masa molar cercana a 25 000 Da. Estos autores atribuyen este comportamiento a procesos de desaminación en uno o más residuos de asparagina y/o glutamina, que traen como resultado final cambios en la carga neta pero no en la masa molar de la hieronymaina III.

La determinación de la masa molar y la secuencia aminoterminal de la pendulifloraina I aportarán nuevos elementos para la caracterización de esta nueva molécula, así como permitirán explicar el comportamiento electroforético observado para esta enzima.

#### 4.1.6.2 Determinación de la masa molar por espectrometría de masa.

Los resultados de la espectrometría de masa MALDI-TOF de la pendulifloraina I se muestran en la figura 12. Se obtuvo un valor de masa molar de 23 412 Da, el cual se encuentra dentro del rango establecido para las cisteino proteasas (21 000 y 30 000 Da) y es similar al de otras proteasas de plantas de la familia Bromeliaceae (Grzonka *et al.*, 2001).



**Figura 12.** Espectro de masa (MALDI-TOF) de la pendulifloraina I.

Desde que se realizaron los primeros aislamientos de bromelina, la masa molar se ha estudiado y se han informado resultados contradictorios en dependencia del grado de pureza del extracto. Ritonja *et al.*, (1989) calcularon la masa molar de bromelina de tallos a partir de los residuos de aminoácidos y la masa relativa del oligosacárido e informaron que era 23 800 Da. En investigaciones que realizaron Rowan *et al.*, (1990) la masa molar de esta proteasa por análisis de los perfiles electroforéticos resultó ser de 26 000 Da. Los resultados de la espectrometría de masa informaron un valor de 24 500 Da (Harrach *et al.*, 1995).

Varios autores utilizaron la espectrometría de masas para determinar la masa molar de cisteino proteasas aisladas de plantas de la familia Bromeliaceae. López *et al.* (2000, 2001) informaron que la masa molar de la macodontaina I y II es de 23 459 y 23 703 Da,

respectivamente. En el caso de la balansaina I, Pardo *et al.* (2000) determinaron que su masa molar era de 24 400 Da. Bruno *et al.* (2003, 2006, 2008) obtuvieron masas molares de 24 066, 23 411, 23 713 Da para la hieronymaina I, II y III respectivamente. Cabral *et al.* (2006) informaron que la fastuosaina posee una masa molar de 25 000 Da.

#### 4.1.6.3 Determinación de la secuencia amino terminal.

La secuenciación del extremo amino terminal de la pendulifloraina I mostró la existencia de dos poblaciones moleculares: **AVPQSIDWRDYGAVTTDKNQ** y **VPQSIDWRDYGAVTTDKNQ**. El procesamiento *in vivo* de cisteino proteasas de esta familia rinde en muchos casos moléculas idénticas que sólo se diferencian en algunos residuos de la región amino terminal (Ritonja *et al.*, 1989; Carter *et al.*, 2000). Este hecho también se atribuye al procesamiento del polipéptido que en algunos casos da como resultado una enzima activa cuyo sitio de corte no es el esperado (Avilés *et al.*, 1994; Wiederanders, 2003). En esta investigación se obtuvieron resultados similares a los de Ritonja *et al.* (1989). Estos autores informaron la presencia de dos secuencias amino terminal para bromelina de tallo que se diferenciaron solamente en el aminoácido inicial. El 25% de las secuencias comenzaban por alanina y el 75% por valina.

En la tabla 2 aparece la comparación de la secuencia amino terminal de la pendulifloraina I con otras cisteino proteasas aisladas de plantas de la familia Bromeliaceae y la papaina. La pendulifloraina I mostró elevada homología con las proteasas obtenidas de plantas de esta familia. Las poblaciones de pendulifloraina I tienen 90 y 85% de homología con la bromelina de tallo, mientras que con la bromelina de fruto, la macrodontaina I y II y la balansaina I los porcentajes de homología fueron de 85 y 80%, respectivamente.

Es importante señalar que en las cisteino proteasas comparadas, se encuentra conservado el residuo glutamina en la posición P19 (sistema de numeración de la papaina). Este aminoácido juega un papel fundamental en la formación de la cavidad oxoaniónica durante la catálisis enzimática (Rawlings y Barrett, 1993) y contribuye a la estabilización de este estado de transición (Ménard *et al.*, 1995). La prolina en la posición P2 (sistema de numeración de la papaina) también se encuentra conservada, lo que se atribuye al papel protector de este aminoácido frente al ataque de aminoproteasas (Barrett *et al.*, 2004).

**Tabla 2.** Comparación de la secuencia amino terminal de la pendulifloraina I con algunas proteasas aisladas a partir de plantas de la familia Bromeliaceae y la papaina. La búsqueda de homología de las secuencias se realizó con el servicio BLAST (Altschul *et al.*, 1997), disponible en URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>. En azul aminoácidos no conservados y en anaranjado regiones conservadas en todas las secuencias.

Cisteino proteasa	Fuente vegetal	Secuencia amino terminal	Homología(%)	Referencia
Pendulifloraina I	<i>Hohenbergia penduliflora</i>	A V P Q S I D W R D Y G A V T T D K N Q V P Q S I D W R D Y G A V T T D K N Q		
Bromelina de tallo	<i>Ananas comosus</i>	A V P Q S I D W R D Y G A V T S V K N Q	90,0*; 85,0**	Ritonja <i>et al.</i> , 1989
Bromelina de fruto	<i>Ananas comosus</i>	A V P Q S I D W R D Y G A V N E V K N Q	85,0; 80,0	Yamada <i>et al.</i> , 1976
Macrodontaina I	<i>Pseudoananas sagenarius</i>	A V P Q S I D W R D Y G A V N E V K N Q G	85,0; 80,0	López <i>et al.</i> , 2000
Macrodontaina II	<i>Pseudoananas sagenarius</i>	A V P Q S I D W R D Y G A V N E V K N Q N	85,0; 80,0	López <i>et al.</i> , 2001
Balansaina I	<i>Bromelia balansae</i>	A V P E S I D W R D Y G A V T S V K N Q	85,0; 80,0	Pardo <i>et al.</i> , 2000
Ananaina	<i>Ananas comosus</i>	V P Q S I D W R D S G A V T S V K N Q	80,0; 85,0	Lee <i>et al.</i> , 1997
Comasaina	<i>Ananas comosus</i>	V P Q S I D W R N Y G A V T S V K N Q	80,0; 85,0	Napper <i>et al.</i> , 1994
Hironymaina I	<i>Bromelia hieronymi</i>	A L P E S I D W R A K G A V T E V K R Q D	65,0; 60,0	Bruno <i>et al.</i> , 2003
Papaina	<i>Carica papaya</i>	I P E Y V D W R Q K G A V T P V K N Q G	55,0; 60,0	Cohen <i>et al.</i> , 1986

\*Homología para la primera secuencia de pendulifloraina I.

\*\*Homología para la segunda secuencia de pendulifloraina I.

Las regiones **DWR** y **GAV** están presentes en todas las proteasas que se compararon. Nótese que para el caso de las cisteino proteasas de plantas de la familia Bromeliaceae también se conservan los aminoácidos serina (S, en la posición 4) e isoleucina (I, en la posición 5) lo que hace que la región conservada sea mayor (**SIDWR**), esto explica que el porcentaje de identidad entre las proteasas de la misma familia sea tan elevado.

El aislamiento, purificación y caracterización de una nueva cisteino proteasa (pendulifloraina I) a partir de tallos de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez contribuye a ampliar el conocimiento sobre este importante grupo enzimático. La pendulifloraina I es un nuevo miembro de la familia de la papaina (clan CA), con alta homología, preferentemente, con cisteino proteasas aisladas de plantas de la familia Bromeliaceae.

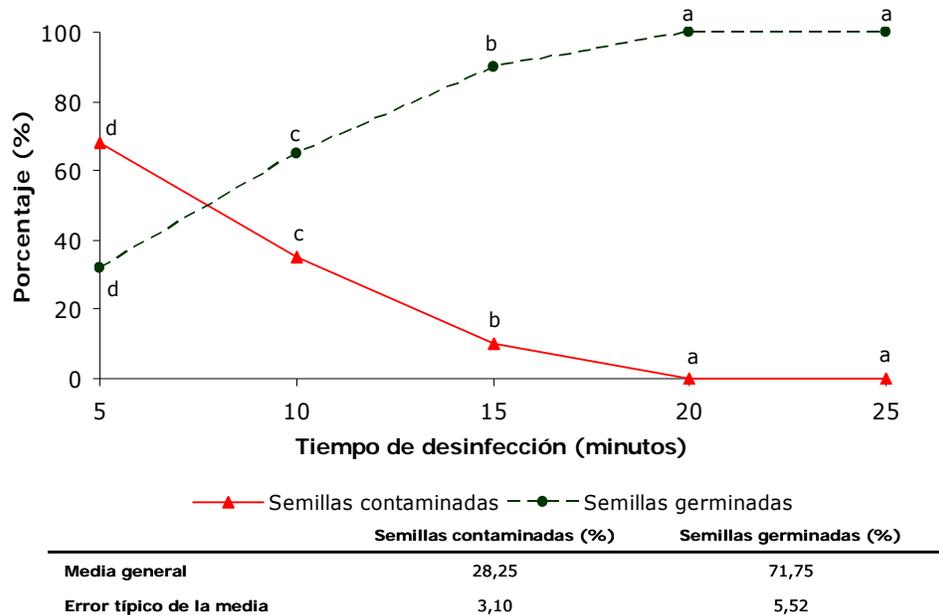
Las amplias potencialidades de uso que pudieran tener los extractos proteolíticos que se obtuvieron a partir de los tallos de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez y la enzima purificada (pendulifloraina I) resulta un tema muy atractivo para desarrollar investigaciones futuras. Sin embargo, para lograr este empeño se necesitaría contar con mayores volúmenes de material vegetal. La masa promedio del tallo de una planta adulta de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez oscila entre 400-500 g. Esto implica que para procesar un kilogramo de tallo se necesitan extraer dos o tres plantas de su hábitat natural, lo que provocaría serias afectaciones en estos ecosistemas pues la propagación natural de esta planta es muy lenta y depende en gran medida de las condiciones ambientales. El establecimiento de una

metodología de cultivo *in vitro* para la obtención de plantas de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez a partir de las cuales se pueda realizar la extracción de proteasas sin causar alteraciones a la biodiversidad resolvería este inconveniente.

#### 4.2 Propagación *in vitro* de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez.

##### 4.2.1 Establecimiento *in vitro*. Efecto del tiempo de desinfección de las semillas.

El efecto del tiempo de desinfección en el porcentaje de contaminación y germinación de las semillas de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez con hipoclorito de sodio (2%, v:v) se muestra en la figura 13. Como se puede apreciar a medida que se aumenta el tiempo de desinfección disminuyen los niveles de contaminación y aumenta el porcentaje de germinación. Cuando las semillas se desinfectaron durante 20 y 25 minutos no se presentaron explantes contaminados y se logró el 100% de germinación, lo que difiere significativamente del resto de los tratamientos (figura 13). En todos los tratamientos las semillas que estuvieron libres de contaminación germinaron sin dificultad, lo que indica que no se presentaron síntomas de toxicidad en las semillas por acción del agente desinfectante durante el desarrollo del experimento.



**Figura 13.** Efecto del tiempo de desinfección con hipoclorito de sodio (2%, v:v) en el establecimiento de las semillas de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez. Medias con letras desiguales difieren estadísticamente para cada indicador (ANOVA de un factor; Tukey;  $p \leq 0,05$ ;  $n=10$ ). Para el tratamiento estadístico los datos se transformaron de acuerdo con  $x' = 2 \arccos(x/100)^{0.5}$ . Los datos que se presentan en la figura son los datos no transformados.

El hipoclorito de sodio es uno de los desinfectantes químicos que más se utiliza en el establecimiento *in vitro* de plantas de la familia Bromeliaceae (Guerra y Dal Vesco, 2010). Pompelli y Guerra (2005) lograron la desinfección de semillas de *Dyckia distachya* Hassler con etanol (70%) por 3 minutos seguido de hipoclorito de sodio (5%) por 30 minutos y lograron el 100% de germinación de las semillas. Por su parte, Rech Filho *et al.* (2005) trataron las semillas de *Vriesea reitzii* Leme y Costa inicialmente con etanol (70%) por dos minutos y luego con hipoclorito de sodio (2%) por 30 minutos logrando un porcentaje de germinación del 100%. García *et al.* (2009) utilizaron etanol (70%) por 5 minutos seguido de hipoclorito de sodio (2%) por 20 minutos para la desinfección superficial de semillas de *Neoglaziovia variegata* (Arr. Cam.) Mez.

En los protocolos descritos anteriormente se utilizaron concentraciones de hipoclorito de sodio entre 2 y 5% y tiempo de desinfección entre 20 y 30 minutos. Los mejores resultados de este experimento se encuentran dentro de ese rango pues se lograron con hipoclorito de sodio (2%) durante 20 y 25 minutos (figura 13). Sin embargo, el uso previo de etanol al 70% es una práctica muy generalizada. En la desinfección de las semillas de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez se omitió ese paso para evitar el contacto con otro agente químico previo a la acción del hipoclorito de sodio (2%) lo cual pudiera aumentar la muerte de las semillas por toxicidad.

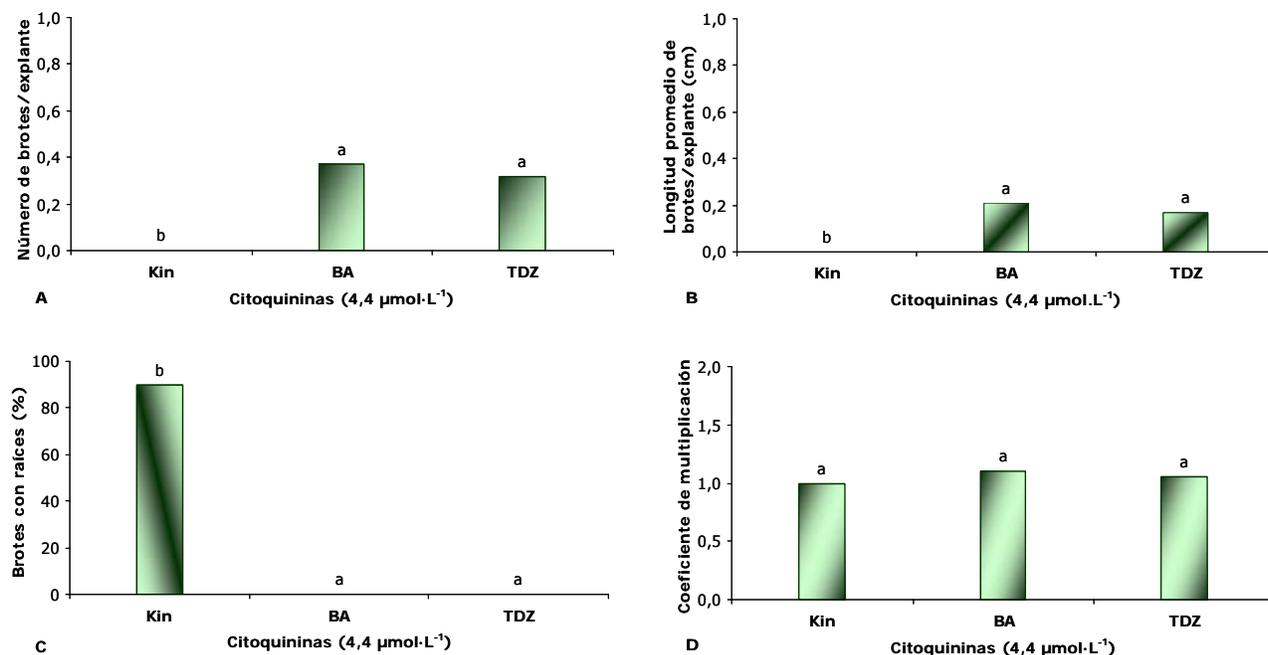
Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en lo adelante se utilizó para la desinfección superficial de las semillas de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez el hipoclorito de sodio (2%) por 20 minutos debido a que este fue el menor tiempo con el que se logró controlar la contaminación sin afectar la germinación de las semillas.

#### **4.2.2 Multiplicación in vitro de los brotes.**

##### *4.2.2.1 Efecto del tipo de citoquinina.*

En la figura 14 se muestra el efecto del tipo de citoquinina en la multiplicación de brotes de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez. Como se puede apreciar el mayor número de brotes/explante y la longitud promedio de los brotes/explante (0,37 brotes/explante y 0,21 cm, respectivamente) se obtuvo cuando se utilizó medio de cultivo suplementado con BA, sin diferencias significativas con el TDZ (0,32 brotes/explante y 0,19 cm, respectivamente) (figura 14A y B). La concentración que se utilizó de kinetina ( $4,4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) no provocó formación de

nuevos brotes (figura 14A), sin embargo se observó la formación de raíces en el 90% de los brotes (figura 14C). En los brotes cultivados con BA y TDZ no se notó la presencia de raíces (figura 14C).



	Número de brotes/explante	Longitud promedio de brotes/explante (cm)	Brotos con raíces (%)	Coefficiente de multiplicación
Media general	0,25	0,13	30,00	1,07
Error típico de la media	0,06	0,02	2,352	0,22

**Figura 14.** Efecto del tipo de citoquinina en la multiplicación *in vitro* de los brotes de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez luego de 30 días de cultivo. A) Número de brotes/explante (n=50), B) Longitud promedio de los brotes/explante (n=50), C) Porcentaje de brotes con raíces (n=10) y D) Coeficiente de multiplicación (n=50). Medias con letras desiguales difieren estadísticamente para cada indicador (ANOVA de un factor; Tukey;  $p \leq 0,05$ ). Para el tratamiento estadístico, los datos de número de brotes/explante y brotes con raíces se transformaron de acuerdo con  $x' = (x+0,5)^{0,5}$  y  $x' = 2\text{arcoseno}(x/100)^{0,5}$ , respectivamente. Los datos que se presentan en la figura son no transformados.

El comportamiento que se observó en los explantes cultivados con kinetina no es típico de las citoquininas (figura 14A y C). En general, estas fitohormonas se caracterizan por favorecer la brotación e inhibir la formación de raíces (George *et al.*, 2008). Sin embargo, Kukulczanka y Czastka (1989) y García *et al.* (2009) informaron la estimulación de la rizogénesis en lugar de la brotación cuando utilizaron kinetina en la multiplicación *in vitro* de los brotes varias especies de la familia Bromeliaceae provenientes de semillas germinadas *in vitro*. Esto pudiera estar relacionado con que la germinación de semillas se desarrolló en un medio de cultivo libre de

reguladores de crecimiento, lo que estimuló la formación de la plúmula y la radícula a partir del embrión. Al realizar la transferencia al medio de cultivo para la multiplicación se cortaron las raíces que poseían los brotes, sin embargo el proceso de rizogénesis estaba inducido solo que la BA y el TDZ inhibieron el desarrollo de nuevas raíces y favorecieron únicamente la brotación.

Por su parte, el coeficiente de multiplicación no mostró diferencias significativas entre los tratamientos (figura 14D). A pesar de que la BA y el TDZ incrementaron el número de brotes/explante, el tamaño que alcanzaron los mismos (figura 14C) no fue suficiente para realizar su individualización. Esto hizo que el coeficiente de multiplicación no se incrementara significativamente en estos tratamientos aunque se formaron nuevos brotes (figura 14D).

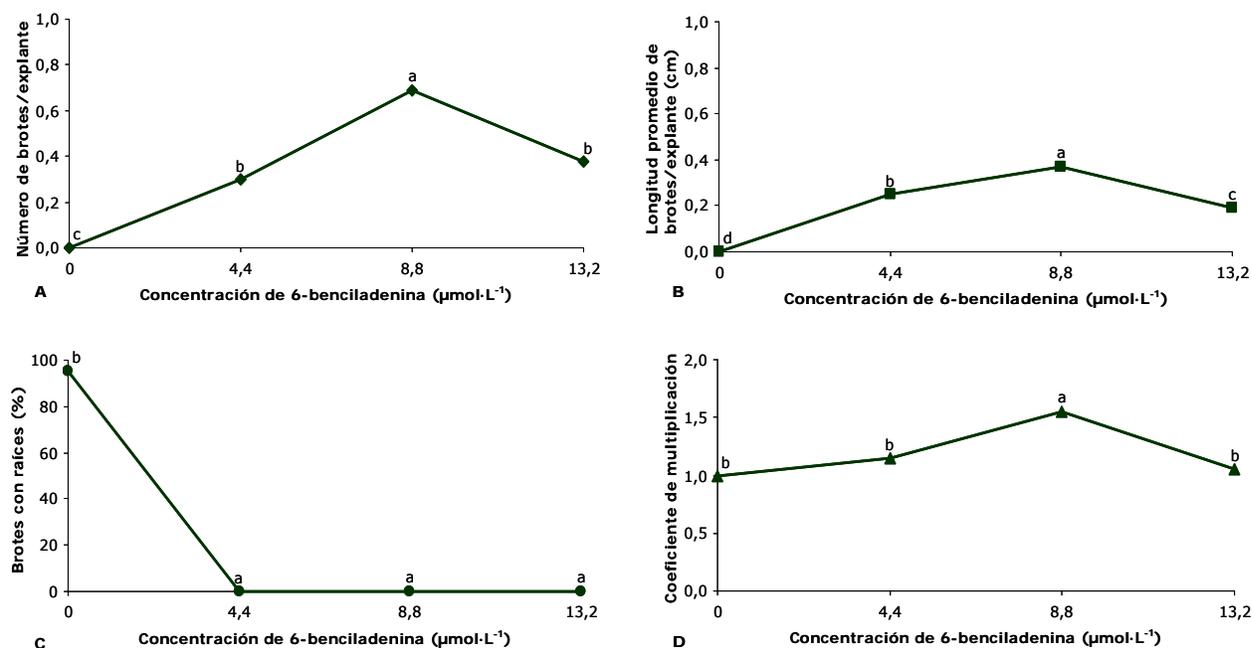
En las plantas de la familia Bromeliaceae la selección del tipo de citoquinina que se utiliza en la multiplicación está determinada por el evento morfogénico que se desea favorecer. La BA es la citoquinina con la que se han logrado los mejores resultados en la multiplicación axilar (Duarte *et al.*, 2009). Por su parte, el TDZ se ha usado con éxito en la inducción y multiplicación de brotes a partir de agregados nodulares. Estas estructuras se forman a partir de células de los elementos vasculares presentes en la región basal de las hojas, las cuales son competentes para la rediferenciación y se activan por la acción de los reguladores del crecimiento (Guerra y Dal Vesco, 2010; Dal Vesco *et al.*, 2011). En esta investigación la concentración de TDZ que se utilizó ( $4,4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) no provocó la formación de callos en la base del explante ni brotación adventicia.

Entre la BA y el TDZ no se encontraron diferencias en el coeficiente de multiplicación ni en el tipo de respuesta morfogénica para la concentración que se utilizó en este experimento. Sin embargo los niveles de brotación que se lograron fueron bajos. Esto motivó la selección de la BA para mejorar la multiplicación de brotes en el siguiente experimento.

#### *4.2.2.2 Efecto de la concentración de 6-benciladenina.*

Al evaluar el efecto de la concentración de BA en la multiplicación de los brotes (figura 15) se observó un aumento en el número de brotes/explante y la longitud promedio de los brotes/explante con el incremento de la concentración del regulador del crecimiento hasta  $8,8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  (figura 15A y B). El mayor valor para ambos indicadores se alcanzó con la concentración de  $8,8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  (0,70 brotes/explante y 0,37 cm, respectivamente). La

concentración de  $13,2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de BA provocó una disminución significativa de ambos indicadores (figura 15A y B). En los explantes que se colocaron en el medio de cultivo libre de citoquinina no ocurrió brotación y se notó la formación de raíces en el 95% de estos, con diferencias significativas con el resto de los tratamientos (figura 15C). Por su parte, el coeficiente de multiplicación fue mayor (1,55) cuando se usaron  $8,8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de BA, con diferencias significativas del resto de los tratamientos (figura 15D).



	Número de brotes/explante	Longitud promedio de brotes/explante (cm)	Brotos con raíces (%)	Coefficiente de multiplicación
Media general	0,34	0,20	23,75	1,19
Error típico de la media	0,05	0,03	3,52	0,15

**Figura 15.** Efecto de la concentración de BA en la multiplicación *in vitro* de los brotes de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez luego de 30 días de cultivo. A) Número de brotes/explante (n=50), B) Longitud promedio de los brotes/explante (n=50), C) Porcentaje de brotes con raíces (n=10) y D) Coeficiente de multiplicación (n=50). Medias con letras desiguales difieren estadísticamente para cada indicador (ANOVA de un factor; Tukey;  $p \leq 0,05$ ). Para el tratamiento estadístico, los datos de número de brotes/explante y brotes con raíces se transformaron de acuerdo con  $x' = (x+0,5)^{0,5}$  y  $x' = 2\text{arcoseno}(x/100)^{0,5}$ , respectivamente. Los datos que se presentan en la figura son no transformados.

Generalmente, en plantas de la familia Bromeliaceae, el suplemento de BA al medio de cultivo incrementa la formación de brotes axilares a partir del explante inicial (Be y Deberg, 2006). En este experimento no se observó la formación de brotes en los explantes que se colocaron en el

medio de cultivo sin regulador del crecimiento (figura 15A). Sin embargo, el incremento de la concentración de BA hasta  $8,8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  resultó beneficioso para lograr este propósito pues promovió la ruptura de la dominancia apical, favoreció la división celular y el crecimiento y desarrollo de nuevos brotes axilares. La concentración de  $13,2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de BA afectó notablemente la formación de nuevos brotes. Es posible que esa concentración esté por encima del umbral biológico de esta especie y en lugar de favorecer el proceso de formación de brotes lo inhibió. En los brotes que se cultivaron con BA no se formaron raíces (figura 15C). Esto pudiera deberse a que la adición de citoquininas exógenas, generalmente inhibe el enraizamiento (Assis y Teixeira, 1998).

La disminución de la longitud de los brotes con la máxima concentración de BA (figura 15B) pudiera estar relacionada con el propio efecto inhibitorio de la dominancia apical que poseen las citoquininas que produce frecuentemente la disminución de la longitud de los brotes (Naves *et al.*, 2003) e impide la individualización de los mismos. No obstante, a pesar de que con  $8,8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de BA se logró mayor número de brotes/explante y mayor longitud promedio de los brotes/explante se considera que el coeficiente de multiplicación que se logró es aún bajo.

Almeida *et al.* (1996) evaluaron el efecto de la BA en la multiplicación *in vitro* de dos cultivares de *Ananas comosus* (L.) Merrill. Para el cultivar Primavera, el mayor número de brotes/explante (38,50) lo obtuvieron cuando utilizaron  $4,4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de BA. Mientras que para el cultivar Perola el mayor valor (5,3) se alcanzó con  $8,8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de la citoquinina. La concentración de BA con la que se lograron los mejores resultados en esta investigación ( $8,8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , figura 15) es superior a la que informaron estos autores para *Ananas comosus* (L.) Merrill cv. Primavera y coincide con la que usaron en el cultivar Perola. Sin embargo, el número de brotes/explante que se lograron en ambos cultivares (38,5 y 5,3) fue superior a los obtenidos en este experimento (0,7), esto evidencia la influencia que tiene el genotipo en la respuesta morfogénica.

También en *Ananas comosus* (L.) Merrill, el incremento de la concentración de BA hasta  $4,4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  provocó un aumento en el número de brotes/explante. Con  $3,6$  y  $4,4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  BA se formaron 8,0 y 9,0 brotes/explante, respectivamente (Be y Debergh, 2006). Por su parte, Zuraida *et al.* (2011) en el cultivar Maspine lograron niveles similares de brotación (10 brotes/explante) pero con concentraciones muy elevadas de BA ( $22,2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ). El número

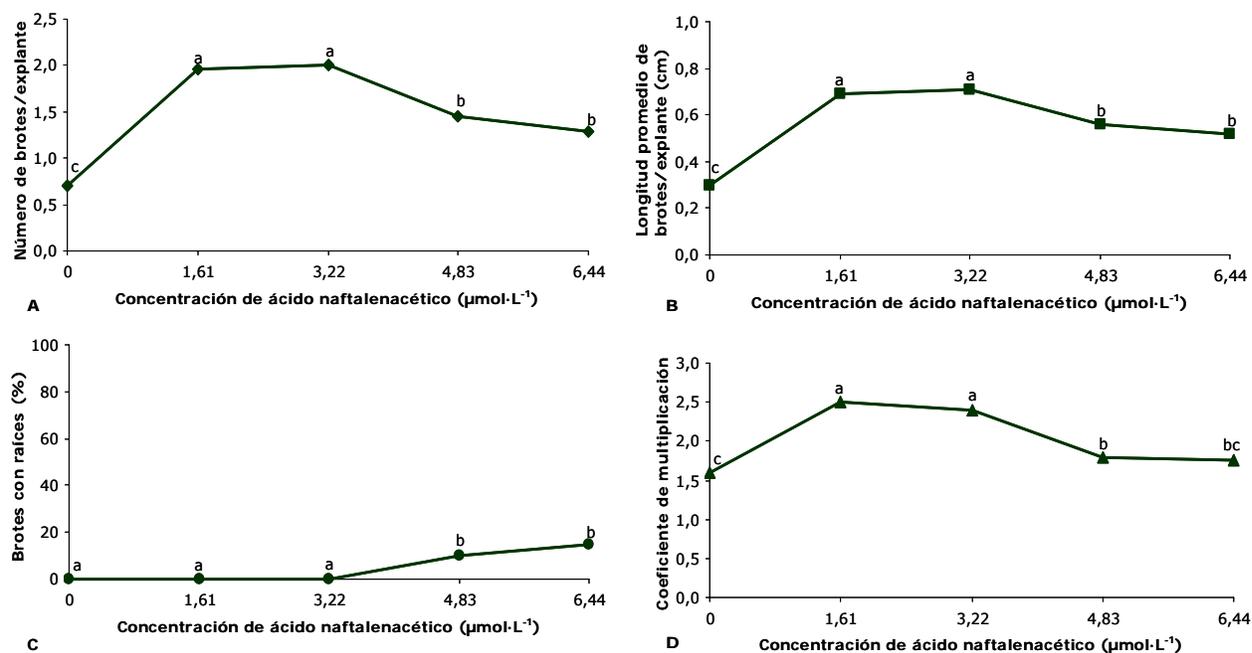
de brotes/explante que se logró en este experimento fue muy bajo en comparación con lo que se informa para *Ananas comosus* (L.) Merrill. Sin embargo, con la concentración de  $8,8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  se mejoró la respuesta morfogénica de esta especie y se encuentra en el rango de concentraciones de BA que se informa para esta familia.

En plantas de la familia Bromeliaceae el uso de la BA en combinación con auxinas, fundamentalmente el ANA, en bajas concentraciones es una estrategia muy utilizada para la multiplicación *in vitro* (Mercier y Kerbauy, 1992, 1994; Daquinta y Benegas, 1997; Carneiro *et al.*, 1999; Rech Filho *et al.*, 2005; Pickens *et al.*, 2006; García *et al.*, 2009). Es por ello que evaluar el efecto del balance citoquinina/auxina en la multiplicación de los brotes será objeto del próximo experimento para lo cual se escogió la concentración de  $8,8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de BA.

#### 4.2.2.3 Efecto de la concentración de ácido naftalenacético.

El efecto de la concentración de ANA en la multiplicación de brotes se muestra en la figura 16. El mayor número de brotes/explante se alcanzó cuando se suplementó el medio de cultivo con  $1,61$  y  $3,22 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de ANA ( $1,96$  y  $2,01$  brotes/explante, respectivamente) sin diferencias significativas entre sí (figura 16A). La longitud promedio de los brotes/explante mostró los mejores resultados ( $0,69$  y  $0,71$  cm) para esas mismas concentraciones, sin diferencias significativas entre sí (figura 16B). Las concentraciones mayores de ANA ( $4,83$  y  $6,44 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) provocaron la formación de raíces, sin diferencias significativas entre ambas (figura 16C). Por su parte, los mayores valores de coeficiente de multiplicación se obtuvieron cuando se utilizaron  $1,61$  y  $3,22 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de ANA ( $2,5$  y  $2,4$ , respectivamente) sin diferencias significativas entre sí (figura 16D).

El crecimiento y la morfogénesis *in vitro* son regulados por la interacción que se establece entre las fitohormonas producidas de forma endógena y los reguladores del crecimiento que se suplementan al medio de cultivo (Pierik, 1990; George *et al.*, 2008). Las combinaciones de  $8,8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de BA con  $1,61$  y  $3,22 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de ANA favorecieron la brotación, la longitud promedio de los brotes y por consiguiente el coeficiente de multiplicación. La ausencia de ANA provocó una disminución significativa de la brotación (figura 16A), lo que corrobora que en plantas de la familia Bromeliaceae la interacción citoquinina/auxina es necesaria para lograr con éxito la multiplicación *in vitro* (Carneiro *et al.*, 1998; García *et al.*, 2009).



	Número de brotes/explante	Longitud promedio de brotes/explante (cm)	Brotos con raíces (%)	Coefficiente de multiplicación
Media general	1,48	0,56	3,00	1,91
Error típico de la media	0,22	0,04	5,52	0,24

**Figura 16.** Efecto de la concentración de ácido naftalenacético en la multiplicación *in vitro* de los brotes de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez luego de 30 días de cultivo. A) Número de brotes/explante (n=50), B) Longitud promedio de los brotes/explante (n=50), C) Porcentaje de brotes con raíces (n=10) y D) Coeficiente de multiplicación (n=50). Medias con letras desiguales difieren estadísticamente para cada indicador (ANOVA de un factor; Tukey;  $p \leq 0,05$ ). Para el tratamiento estadístico, los datos de número de brotes/explante y brotes con raíces se transformaron de acuerdo con  $x' = (x+0,5)^{0,5}$  y  $x' = 2\text{arcoseno}(x/100)^{0,5}$ , respectivamente. Los datos que se presentan en la figura son no transformados.

Las combinaciones de  $8,8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de BA con  $1,61$  y  $3,22 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de ANA fueron las mejores para el crecimiento de los brotes (figura 16B). Esto incrementó la cantidad de brotes que pudieron ser individualizados, de allí el aumento que se observó en el coeficiente de multiplicación (figura 16D). La ausencia de ANA afectó todos los indicadores de la multiplicación. Esto pudiera estar dado por el efecto que poseen las citoquininas en la ruptura de dominancia apical con la consecuente disminución de la longitud de los brotes (Naves *et al.*, 2003). El balance citoquina/auxina que se estableció con las concentraciones más elevadas de ANA ( $4,83$  y  $6,44 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) favorecieron la formación de raíces (figura 16C) en lugar de la brotación (figura 16A) y la disminución de longitud de los brotes (figura 16B). Mientras que

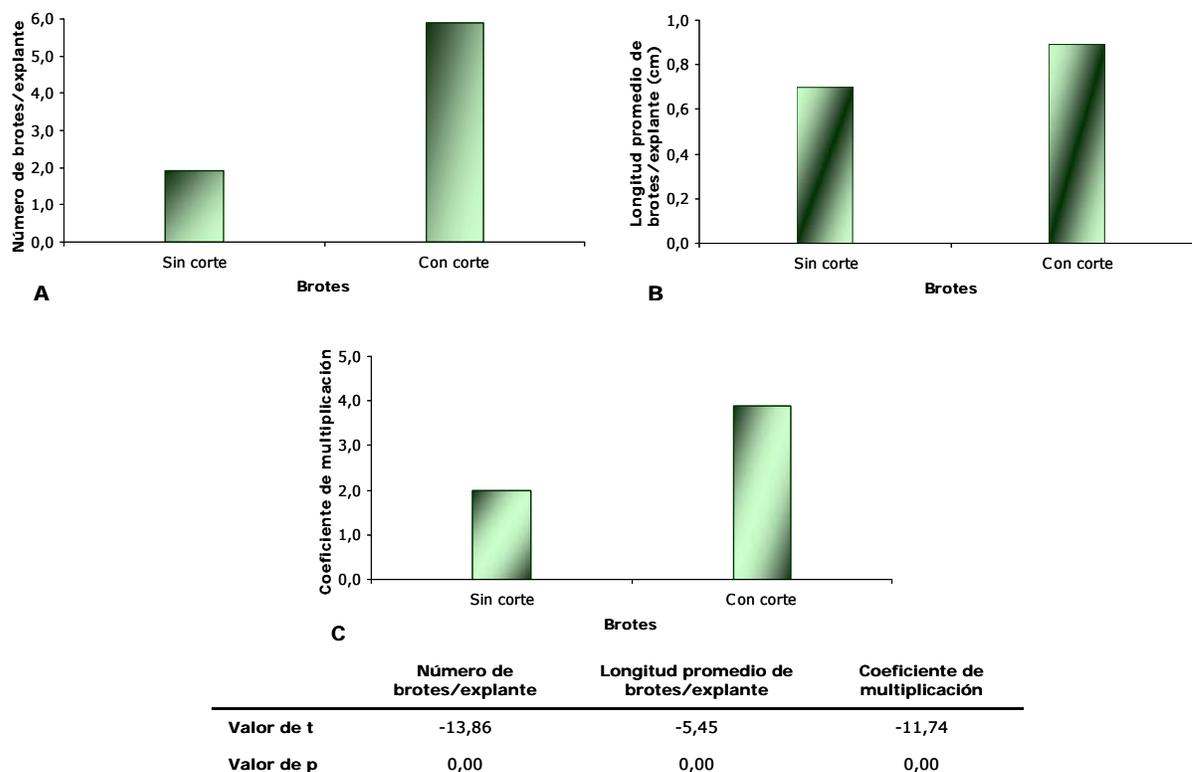
para las concentraciones de ANA inferiores a  $4,83 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  no se observó rizogénesis, esto resulta muy favorable para el desarrollo de la fase de multiplicación pues las raíces dificultan el manejo de los explantes. En plantas de la familia Bromeliaceae, el rango de concentraciones que se utiliza para lograr con éxito la multiplicación es amplio:  $0,80-33,0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de BA y  $0,02-15,0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de ANA y muy variable el número de brotes/explante que se forman ( $4,0-15,0$ ) (Pierik y Sprenkles, 1991; Hamad y Taha 2008a, b; Danso *et al.*, 2008; Duarte *et al.*, 2009; García *et al.*, 2009, Guerra y Dal Vesco, 2010). Esto evidencia que además del balance hormonal, el genotipo juega un papel muy importante en este proceso morfogénético, lo que hace que cada especie necesite un protocolo que se ajuste a sus características. En *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez, el número de brotes/explante y el coeficiente de multiplicación que se alcanzaron con el balance BA/ANA son aún muy bajos, de ahí la necesidad de utilizar otras alternativas que permitan incrementar estos indicadores.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en este experimento en lo adelante se decidió suplementar el medio de cultivo con  $1,61 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de ANA debido a que esta fue la menor concentración de auxina con la que se logró el mayor coeficiente de multiplicación.

#### 4.2.2.4 Efecto del corte del brote.

El corte vertical desde la región apical hasta la base del brote provocó un aumento significativo del número de brotes/explante, la longitud promedio de los brotes/explante y el coeficiente de multiplicación ( $5,88$  brotes/explante;  $0,89$  cm y  $3,90$ ; respectivamente) (figura 17). Este comportamiento puede estar asociado con que la aplicación de heridas a los explantes es una de las técnicas de cultivo de tejidos de plantas que se utiliza para cambiar el balance citoquinina/auxina y favorecer la multiplicación (George *et al.*, 2008).

El número de brotes/explante fue tres veces mayor en los brotes cortados que en los intactos (figura 17A). Debido a la disposición en roseta que poseen los brotes de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez, el corte que se realizó desde la región apical hasta la base de los brotes provocó una ruptura mecánica de la dominancia apical, lo que favoreció la formación de nuevos brotes en esta zona.



**Figura 17.** Efecto del corte vertical desde la región apical hasta la base del explante en la multiplicación *in vitro* de los brotes de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez luego de 30 días de cultivo. A) Número de brotes/explante, B) Longitud promedio de los brotes/explante y C) Coeficiente de multiplicación. No se detectó la formación de raíces. Comparación de medias para cada indicador (t-Student;  $p \leq 0,05$ ;  $n=50$ ). Para el tratamiento estadístico, los datos de número de brotes/explante y brotes con raíces se transformaron de acuerdo con  $x' = (x+0,5)^{0,5}$ . Los datos que se presentan en la figura son no transformados.

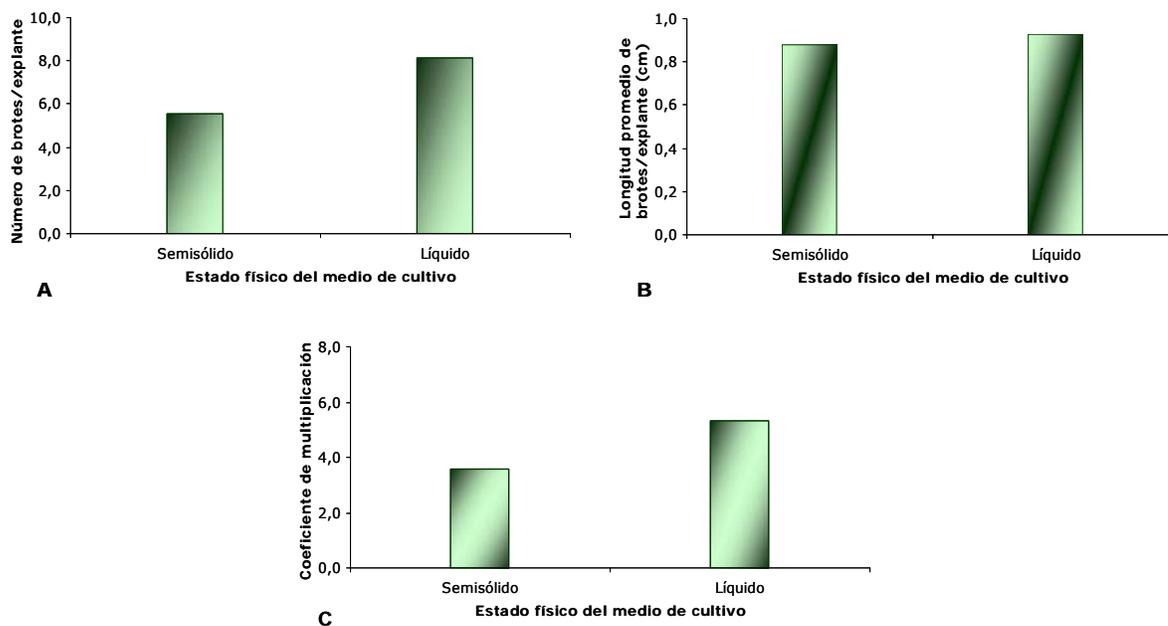
Los brotes que se formaron en los explantes cortados alcanzaron una mayor longitud (figura 17B), lográndose una mayor individualización de los mismos. El efecto beneficioso que causó el corte vertical desde la región apical hasta la base de los brotes sobre el número de brotes/explante y la longitud promedio de los brotes/explante favoreció significativamente el coeficiente de multiplicación (figura 17D). Es evidente que esta práctica unida al balance hormonal BA/ANA resultó muy efectiva para incrementar los indicadores de la proliferación pues provocó la reducción o eliminación de la dominancia apical y estimuló la brotación axilar. Un manejo similar al descrito en esta investigación realizaron Daquinta y Benegas (1997) a brotes de *Ananas comusus* (L.) Merrill. Por su parte, Capote *et al.* (2009) seccionaron longitudinalmente brotes de *Vriesea* sp. y lograron incrementar el coeficiente de multiplicación hasta 9,5 en los

explante cortados. En *Zantedeschia* sp. el coeficiente de multiplicación aumentó de 10 a 16 cuando se cortaron de forma longitudinal los explantes (Sánchez *et al.*, 2011).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en este experimento en lo adelante se decidió utilizar brotes con un corte vertical desde la región apical hasta base para la multiplicación.

#### 4.2.2.5 Efecto del estado físico del medio de cultivo.

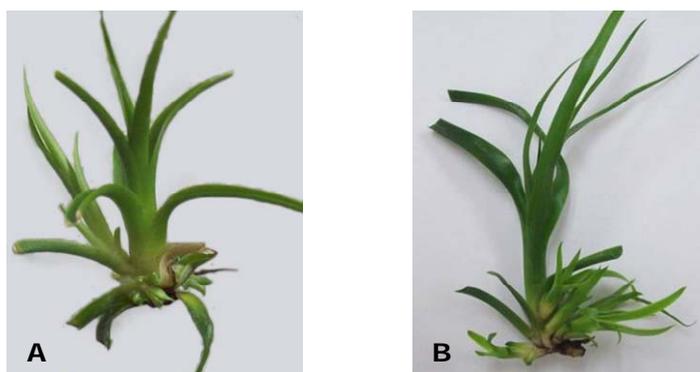
En la figura 18 se observan los resultados relacionados con el efecto del estado físico del medio de cultivo en la multiplicación de los brotes. El mayor número de brotes (8,12 brotes/explante) se obtuvo cuando los explantes se cultivaron en medio de cultivo líquido (figura 18A). La longitud promedio de los brotes/explante no mostró diferencias significativas entre los tratamientos (figura 18B). Por su parte, el coeficiente de multiplicación fue mayor (5,3) para los brotes cultivados en medio de cultivo líquido (figura 18C).



	Número de brotes/explante	Longitud promedio de brotes/explante	Coeficiente de multiplicación
Valor de t	-8,46	-1,35	-5,1
Valor de p	0,00	0,18	0,00

**Figura 18.** Efecto del estado físico del medio de cultivo en la multiplicación *in vitro* de los brotes de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez luego de 30 días de cultivo. A) Número de brotes/explante, B) Longitud promedio de los brotes/explante y C) Coeficiente de multiplicación. No se detectó la formación de raíces. Comparación de medias para cada indicador (t-Student;  $p \leq 0,05$ ;  $n=50$ ). Para el tratamiento estadístico, los datos de número de brotes/explante y brotes con raíces se transformaron de acuerdo con  $x' = (x+0,5)^{0,5}$ . Los datos que se presentan en la figura son no transformados.

El hecho de que la longitud promedio de los brotes/explante no mostró diferencias significativas (figura 18B) pudo estar asociado con las características que tenían los brotes que se formaron en cada tratamiento (figura 19). Los brotes que se obtuvieron en el medio de cultivo líquido poseían una longitud más homogénea, lo que favoreció la individualización de los mismos y repercutió de manera positiva en el coeficiente de multiplicación. Por su parte, los brotes que se formaron en el medio de cultivo semisólido presentaron mayor diferencia en cuanto a su longitud, lo que dificultó la separación de los mismos.



**Figura 19.** Brotes cultivados en medio de cultivo con diferentes estado físico.  
A) Semisólido y B) Líquido

Los brotes que se cultivaron en medio de cultivo líquido no presentaron síntomas de hiperhidricidad (figura 19B), lo que resulta de gran importancia pues la acumulación de agua en los espacios apoplásticos de los tejidos es la principal desventaja que tiene la utilización de esta forma de cultivo (Debergh *et al.*, 1981). Además, la ausencia de hiperhidricidad garantiza, en gran medida, la competencia de los brotes para enfrentar las condiciones *ex vitro* (Kozai *et al.*, 1995).

La utilización del medio de cultivo líquido resultó favorable pues se logró un incremento significativo en el número de brotes/explante (figura 18A) y en el coeficiente de multiplicación (figura 18C), indicadores de suma importancia en esta etapa. En este caso, el medio de cultivo líquido penetró mejor en el corte que se le realizó al explante en la base y favoreció la formación de brotes en esta zona.

En plantas de la familia Bromeliaceae el uso del medio de cultivo líquido es una práctica que muestra buenos resultados (Guerra y Dal Vesco, 2010). En la multiplicación *in vitro* de *Ananas*

*comosus* (L.) Merrill se obtuvieron 19,7 brotes/explantes con el uso del medio de cultivo líquido suplementado con  $2,7 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de ANA y  $4,4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de BA (Guerra *et al.*, 1999). En el cultivar MD2, el mayor número de brotes/explante (28,5) se logró cuando utilizaron el medio de cultivo líquido suplementado con  $33,3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de BA y  $10,7 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de ANA luego de 45 días (Danso *et al.*, 2008). En la multiplicación del cultivar Maspine el mayor número de brotes/explante (31) se alcanzó en el medio de cultivo líquido suplementado con  $4,4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de BA, luego de 30 días (Zuraida *et al.*, 2011).

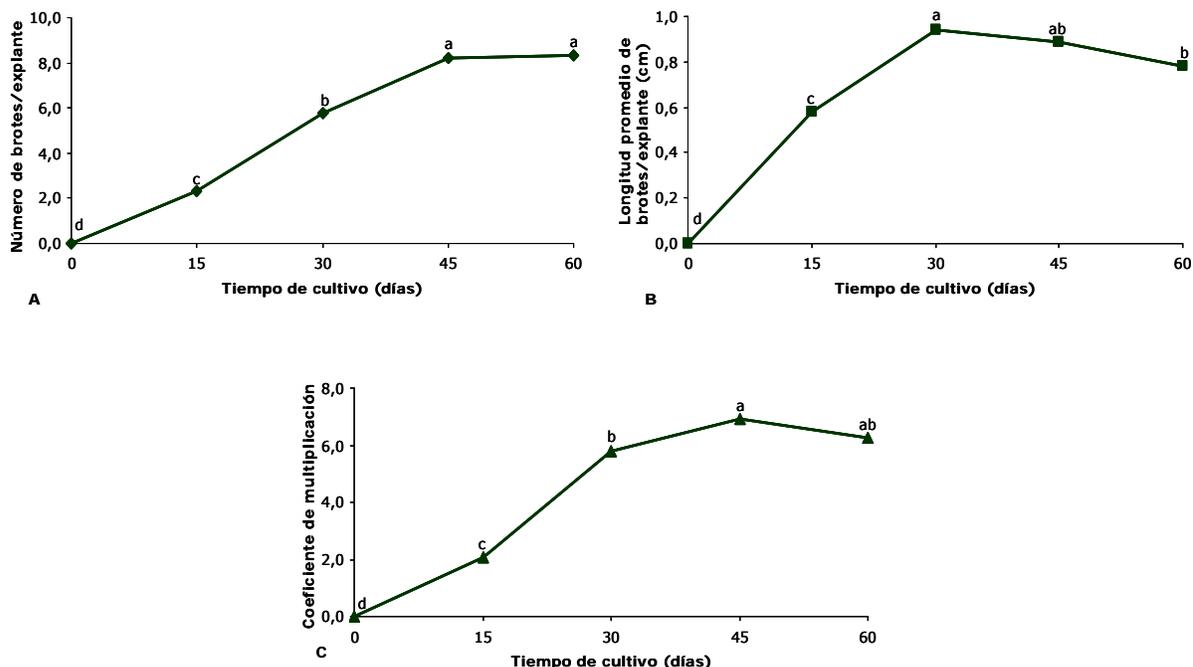
Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en este experimento en lo adelante se decidió utilizar el medio de cultivo líquido para la multiplicación de brotes de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez.

#### 4.2.2.6 Efecto del tiempo de cultivo.

Los resultados relacionados con el efecto del tiempo de cultivo en la multiplicación de los brotes se muestran en la figura 20. Como se puede apreciar el número de brotes/explante se incrementó progresivamente con el tiempo hasta los 45 días de cultivo, momento en el que se estabilizó este indicador hasta el final de la evaluación (60 días) (figura 20A). En cuanto a la longitud de los brotes, los mayores valores se registraron a los 30 y 45 días (0,94 y 0,89 cm, respectivamente), sin diferencias significativas entre sí (figura 20B). Por su parte, el coeficiente de multiplicación tuvo un comportamiento similar al número de brotes/explante (figura 20C). Los mayores valores para este indicador se lograron a los 45 y 60 días (6,90 y 6,25, respectivamente), sin diferencias significativas entre sí.

En las plantas de la familia Bromeliaceae el tiempo de cultivo adecuado para lograr la mayor tasa de multiplicación y realizar el cambio a medio de cultivo fresco es variable y depende en gran medida del nivel de respuesta al cultivo *in vitro* que poseen los diferentes genotipos. Para el caso de *Ananas comosus* (L.) Merrill, el tiempo de cultivo oscila entre 30 y 75 días. Por ejemplo en los cultivares Primavera y Perola fue de 60 días (Almeida *et al.*, 1996). Igual tiempo de cultivo necesitaron Be y Debergh (2006) para lograr la mayor cantidad de brotes/explante durante la multiplicación de esta especie. En el cultivar Cayena Lisa, Hamad y Taha (2008b) obtuvieron el mayor número de brotes/explante luego de 75 días de cultivo. Por su parte, Danso *et al.* (2008) usaron el cultivar MD2 y tuvieron el mayor número brotes/explante a los 45

días de cultivo. En el cultivar Maspine, Zuraida *et al.* (2011) informaron los mayores valores para este indicador luego de 30 días de cultivo.



	Número de brotes/explante	Longitud promedio de brotes/explante (cm)	Coefficiente de multiplicación
Media general	4,94	0,64	4,04
Error típico de la media	0,59	0,12	0,85

**Figura 20.** Efecto del tiempo de cultivo en la multiplicación *in vitro* de los brotes de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez. A) Número de brotes/explante, B) Longitud promedio de los brotes/explante y C) Coeficiente de multiplicación. No se detectó la formación de raíces. Medias con letras desiguales difieren estadísticamente para cada indicador (ANOVA de un factor; Tukey;  $p \leq 0,05$ ;  $n=50$ ). Para el tratamiento estadístico, los datos de número de brotes/explante y brotes con raíces se transformaron de acuerdo con  $x' = (x+0,5)^{0,5}$ . Los datos que se presentan en la figura son no transformados.

En otros géneros de esta familia, los tiempos de cultivo para lograr una mayor brotación son más prolongados oscilando entre 35 y 180 días. La mayor tasa de multiplicación *in vitro* de *Vriesea hieroglyphica* (Carriere) E. Morren se logró después de 180 días de cultivo (Mercier y Kerbauy 1992, 1994). En *Dyckia distachya* Hassler después de 142 días de cultivo (Pompelli y Guerra, 2005), en *Vriesea reitzii* Leme y Costa luego de 90 días de cultivo (Rech Filho *et al.*, 2005) y en *Nidularium fulgens* Lemaire luego de 120 días de cultivo (Duarte *et al.*, 2009). Por su parte, García *et al.* (2009) informaron el mejor resultado en la multiplicación de los brotes de *Neoglaziovia variegata* (Arr. Cam.) Mez a los 35 días de cultivo.

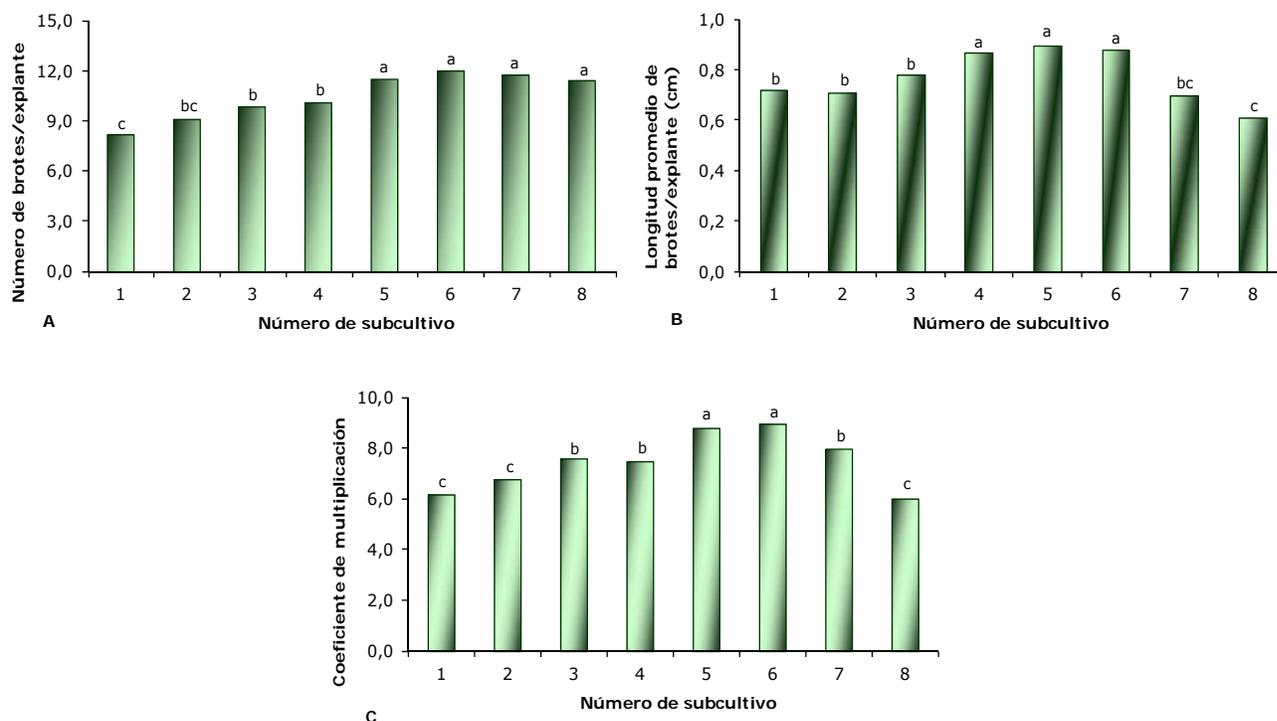
En el mecanismo de acción de las fitohormonas se reconoce el papel de receptores, generalmente de naturaleza proteica, que se unen al regulador del crecimiento y desencadenan la cascada de señales y finalmente la respuesta fisiológica (Chow y McCourt, 2006). La formación de nuevos brotes fue máxima y estable a partir de los 45 días (figura 20A). Esta respuesta pudiera estar asociada a la saturación de los sitios receptores de los reguladores del crecimiento, lo que impide la unión con nuevas moléculas del regulador, reprimiendo así su efecto sobre la formación de nuevos brotes.

Hasta los 45 días de cultivo se observó un aumento en la longitud promedio de los brotes (figura 20B). Sin embargo, a los 60 días se notó una disminución en este indicador, lo que pudiera estar asociado con el agotamiento de los iones minerales, carbohidratos y vitaminas del medio de cultivo necesarias para el crecimiento de los mismos. El comportamiento del coeficiente de multiplicación es el resultado de la interacción de los indicadores que se abordaron anteriormente, de ahí el incremento que se observó hasta los 45 días de cultivo. Luego este indicador no mostró variación (figura 20C).

Teniendo en cuenta los resultados se decidió seleccionar 45 días como el tiempo de cultivo adecuado para realizar los subcultivos por ser este el menor tiempo de cultivo con el que se logró el mayor coeficiente de multiplicación.

#### *4.2.2.7 Efecto del número de subcultivo.*

La figura 21 muestra los resultados relacionados con el efecto del número de subcultivo en la multiplicación de los brotes. De manera general, se observó un incremento en el número de brotes/explantes con el número de subcultivo, alcanzándose el valor máximo en el quinto subcultivo, momento a partir del cual se estabilizó este indicador hasta el octavo subcultivo (figura 21A). La longitud promedio de los brotes/explante fue mayor para los subcultivos cuatro, cinco y seis (0,74; 0,75 y 0,70 cm, respectivamente), sin diferencias significativas entre sí, decreciendo en el séptimo y octavo subcultivo (figura 21B). Por su parte, el coeficiente de multiplicación se incrementó hasta el quinto subcultivo, a partir de este último se mantuvo estable hasta el sexto subcultivo, mostrando los mejores valores (8,8 y 9,0; respectivamente) sin diferencias significativas entre sí (figura 21C). A partir del séptimo subcultivo se observó una disminución significativa de este indicador.



	Número de brotes/explante	Longitud promedio de brotes/explante (cm)	Coefficiente de multiplicación
Media general	10,47	0,78	7,66
Error típico de la media	1,18	0,09	0,66

**Figura 21.** Efecto del número de subcultivo cada 45 días de cultivo en la multiplicación *in vitro* de los brotes de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez. A) Número de brotes/explante, B) Longitud promedio de los brotes/explante y C) Coeficiente de multiplicación. No se detectó la formación de raíces. Medias con letras desiguales difieren estadísticamente para cada indicador (ANOVA de un factor; Tukey;  $p \leq 0,05$ ;  $n=50$ ). Para el tratamiento estadístico, los datos de número de brotes/explante y brotes con raíces se transformaron de acuerdo con  $x' = (x+0,5)^{0,5}$ . Los datos que se presentan en la figura son no transformados.

En la micropropagación el número de subcultivos permite incrementar la disponibilidad de material vegetal durante la fase de mutiplicación. El comportamiento observado para el coeficiente de multiplicación es el resultado de la interacción entre el número de brotes y la longitud de los mismos (figura 21C). El incremento inicial de este indicador y luego su estabilización hasta el sexto subcultivo pudiera estar relacionado con el efecto beneficioso del aumento del número de subcultivo en la acumulación endógena de citoquininas en el tejido vegetal cultivado *in vitro* (Blakesley, 1991). Esta acumulación puede deberse a la pobre metabolización que tienen los reguladores del crecimiento citoquinínicos en las células vegetales

(Perrin *et al.*, 1997) o por la inducción que estos pueden provocar para la síntesis y/o acumulación de zeatina u otra citoquinina endógena (Caboni *et al.*, 2002).

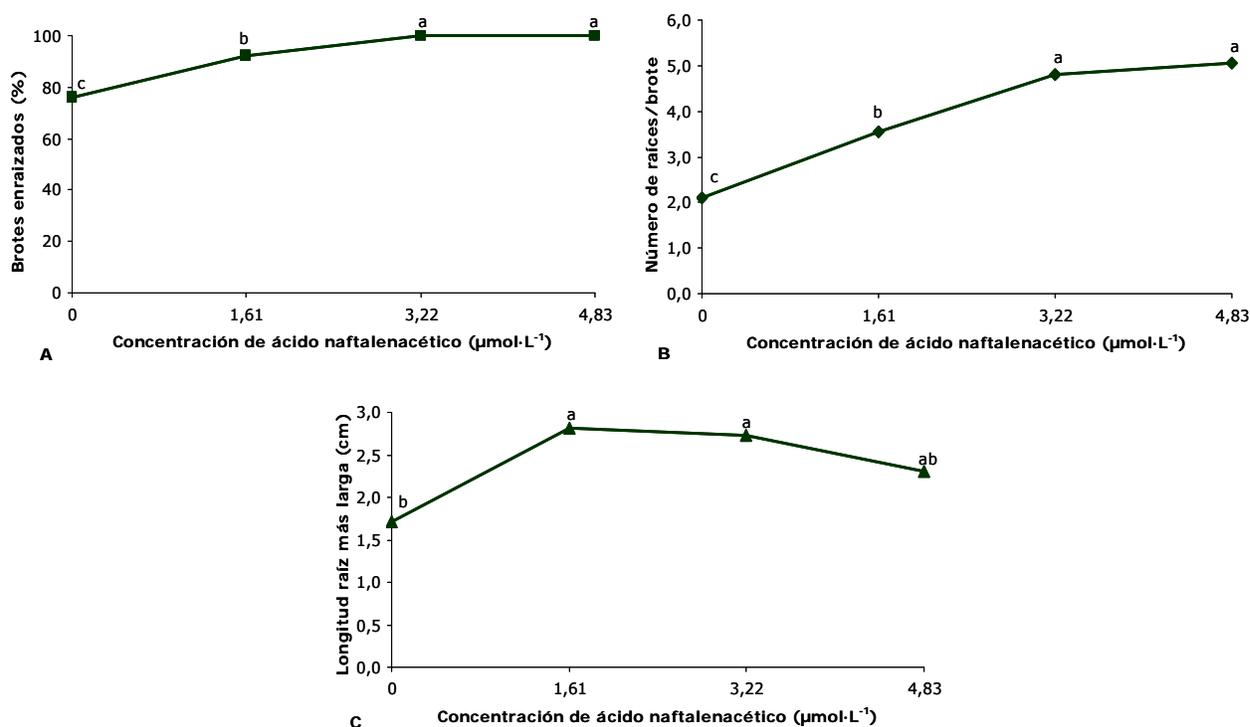
El decrecimiento significativo del coeficiente de multiplicación en el octavo subcultivo está estrechamente relacionado con la longitud de los brotes, la disminución de este indicador no permitió que estos, una vez individualizados, formaran parte del siguiente subcultivo. El aumento del número de subcultivo permite la acumulación endógena de reguladores del crecimiento, fundamentalmente la citoquinina, la cual tiene un efecto beneficioso en la ruptura de la dominancia apical, incrementando la brotación axilar. Sin embargo, también en exceso puede provocar la disminución de la longitud de los brotes por su propio efecto inhibitor de la dominancia apical (Naves *et al.*, 2003). La exposición durante largos períodos de tiempo a los reguladores del crecimiento puede llegar a ser tóxico para el tejido vegetal (Blakesley, 1991). A pesar de que el número de brotes/explante se mantuvo estable hasta el octavo subcultivo, la disminución de la longitud promedio de los brotes/explante y por consiguiente el coeficiente de multiplicación pudieran ser los primeros síntomas de toxicidad que se aprecian en los explantes. Hamad y Taha (2008b) evaluaron el efecto del número de subcultivo (1-4) a diferentes tiempos de cultivo (30, 45, 60 y 75 días) en la multiplicación *in vitro* de *Ananas comosus* (L.) Merrill cv. Cayena Lisa. El mayor número de brotes/explante (25) lo obtuvieron en el tercer subcultivo cada 75 días. Por otra parte, Zuraida *et al.* (2011) en esta misma especie cv. Maspine realizaron tres subcultivos cada 30 días e informaron que el número de brotes/explante se incrementó de 31 a 204 con el subcultivo.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos se decidió realizar hasta seis subcultivos durante la fase de multiplicación de brotes de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez.

#### **4.2.3 Efecto de la concentración de ácido naftalenacético en el enraizamiento *in vitro* de los brotes.**

Los resultados relacionados con el efecto de la concentración de ANA en el enraizamiento *in vitro* de brotes de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez se muestra en la figura 22. Los mayores valores de brotes enraizados (100%) y número de raíces/brote (4,8 y 5,05; respectivamente) se lograron en los tratamientos con 3,22 y 4,83  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de ANA sin diferencias significativas entre sí (figura 22A y B). Los tratamientos con ANA favorecieron la

longitud de la raíz más larga (2,81; 2,72 y 2,31 cm, respectivamente) sin diferencias significativas entre sí (figura 22C).



	Brotos enraizados (%)	Número raíces/explante	Longitud raíz más larga (cm)
Media general	92,00	3,88	2,39
Error típico de la media	4,31	0,47	0,51

**Figura 22.** Efecto del ácido naftalenacético en el enraizamiento *in vitro* de los brotes de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez luego de 30 días de cultivo. A) Brotos enraizados (n=10), B) Número de raíces/brote (n=50) y C) Longitud de la raíz más larga (n=50). Medias con letras desiguales difieren estadísticamente para cada indicador (ANOVA de un factor; Tukey;  $p \leq 0,05$ ). Para el tratamiento estadístico, los datos de brotes enraizados y número de raíces/brote se transformaron de acuerdo con  $x' = 2 \arccos(x/100)^{0,5}$  y  $x' = (x+0,5)^{0,5}$ , respectivamente. Los datos que se presentan en la figura son no transformados.

La formación de raíces *in vitro* continúa siendo una práctica común en la micropropagación y en ocasiones es el único método para enraizar una planta. Ciertas plantas, especialmente las herbáceas enraizan más fácil, sobreviven mejor y presentan una mayor tasa de crecimiento si se han enraizado *in vitro* previamente (George *et al.*, 2008). El efecto favorable de las auxinas en la inducción de la rizogénesis *in vitro* está bien documentado y a la vez se relaciona con la necesaria determinación celular durante este proceso. La presencia de este tipo de regulador

parece ser necesaria en la inducción, la cual aparece pocas horas después del tratamiento auxínico. La herida causada durante la individualización de los brotes provoca un aumento en la concentración de fenoles, los cuales actúan como protectores de las auxinas incrementando los niveles de estas en la base del brote (Pierik, 1990).

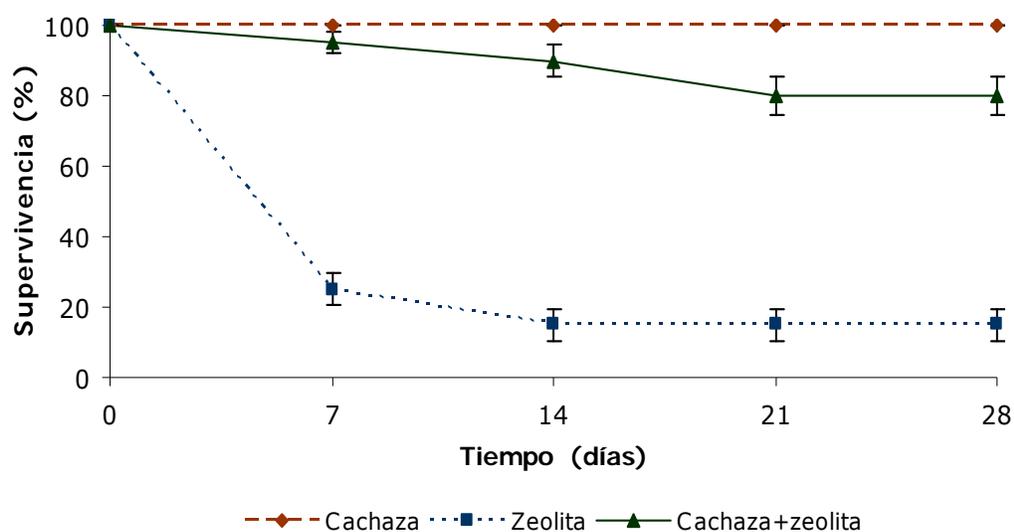
El ANA y el AIB son los reguladores del crecimiento auxínicos que más se utilizan en el enraizamiento *in vitro* de plantas de la familia Bromeliaceae. Lin y Ren (2005) lograron 3,5 raíces/brote de *Vriesea poelmanii* L.B. Smith cuando usaron la mitad de las sales de Murashige y Skoog (1962), 4,92  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de AIB y 1  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de carbón activado. Por otra parte, un 33% de brotes enraizados de *Dyckia maritima* Baker se lograron en el mismo medio de cultivo suplementado con 0,5  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de AIB (Lopes *et al.* 2008). Sin embargo, García *et al.* (2009) obtuvieron el mayor número de raíces (37,03) en los brotes de *Neoglaziovia variegata* (Arr. Cam.) Mez cuando utilizaron 0,5  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de ANA y 2,2  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de kinetina. Danso *et al.* (2008) estudiaron el efecto del AIB y el ANA en el enraizamiento *in vitro* de *Ananas comosus* (L.) Merrill cv. MD2. El mayor número de raíces (15,6) lo obtuvieron cuando suplementaron el medio de cultivo con la combinación 5,37  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de ANA y 4,92  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de AIB.

En el enraizamiento *in vitro* de plantas de esta familia existen dos vertientes, una donde los mejores resultados en el enraizamiento se logran sin la adición de reguladores del crecimiento y otra donde la presencia de un regulador de tipo auxínico incrementa la rizogénesis. En los brotes de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez se favoreció la inducción del enraizamiento con la adición de ANA, lo cual presupone que la interacción de las fitohormonas endógenas y la auxina exógena provocó una mayor diferenciación radicular en los brotes.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el enraizamiento *in vitro* de brotes de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez se decidió suplementar el medio de cultivo con 3,22  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de ácido naftalenacético por ser esta la menor concentración donde se obtuvo el mayor porcentaje de brotes enraizadas.

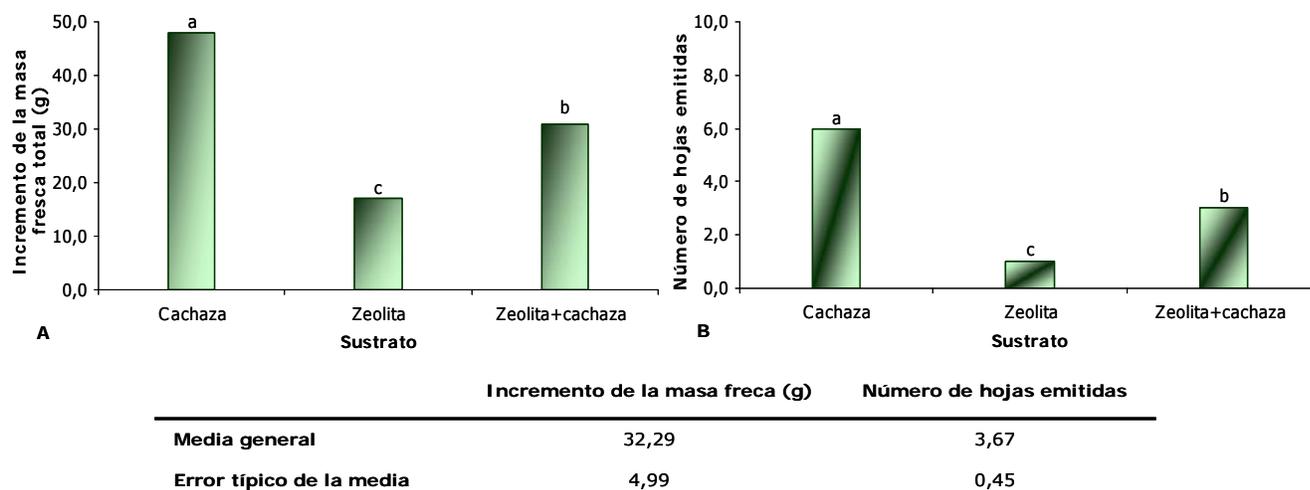
#### 4.2.4 Efecto del sustrato en la aclimatización *ex vitro* de los brotes.

Los resultados relacionados con el efecto del sustrato en la aclimatización de los brotes de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez se muestran en la figura 23. Como se puede apreciar, cuando se utilizó la cachaza como sustrato el porcentaje de supervivencia de los brotes fue 100% en todos los momentos de evaluación. En los brotes que se colocaron en la mezcla de los sustratos zeolita y cachaza (1:1, v:v) este indicador disminuyó significativamente en todos los momentos de evaluación con respecto a los brotes que se cultivaron en cachaza. Sin embargo, a partir de los 14 días de cultivo no se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de supervivencia para este sustrato. Por su parte, en los brotes que se cultivaron en zeolita se notó una disminución drástica del porcentaje de supervivencia mostrando los menores valores en todos los momentos evaluados. A los siete días de cultivo, sólo el 20% de los brotes lograron sobrevivir. A los 14 días de cultivo el porcentaje de supervivencia fue de 15%, sin diferencias significativas con el valor alcanzado a los siete días de cultivo. A partir de ese momento este indicador se mantuvo constante hasta el final de la aclimatización.



**Figura 23.** Dinámica del efecto del sustrato sobre la supervivencia de los brotes de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez durante la aclimatización *ex vitro*. Intervalos de confianza en cada tiempo de evaluación para cada sustrato ( $1-\alpha=95\%$ ;  $n=5$ ).

Al evaluar los indicadores de calidad de las plantas luego de 28 días de cultivo en los diferentes sustratos, se observó que el incremento de masa fresca de los brotes y el número de hojas emitidas (48 g y 6 hojas, respectivamente) fueron mayores en las plantas que se aclimatizaron con cachaza, con diferencias significativas del resto de los tratamientos (figura 24A y B). Esto pudiera estar relacionado con una mayor asimilación de los nutrientes en estas plantas.



**Figura 24.** Efecto del sustrato en la aclimatización *ex vitro* de los brotes de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez luego de 28 días de cultivo. A) Incremento de la masa fresca, B) Número promedio de hojas emitidas/brote. Medias con letras desiguales difieren estadísticamente para cada indicador (ANOVA de un factor; Tukey;  $p \leq 0,05$ ;  $n=100$ ). Para el tratamiento estadístico, los datos de brotes enraizados y número de hojas emitidas se transformaron de acuerdo con  $x' = (x+0,5)^{0,5}$ . Los datos que se presentan en la figura son no transformados.

La transición desde el cultivo *in vitro* a las condiciones *ex vitro* es la fase final de cada esquema de micropropagación. En el cultivo *in vitro*, el ambiente se caracteriza por una alta humedad relativa, baja intensidad lumínica, limitado intercambio de gases, exposición a una fuente externa de carbono y por lo general altos niveles hormonales. Todos estos factores conducen a cambios estructurales y funcionales en la fisiología de las plantas (Pospisilova *et al.*, 1997; Arigita *et al.*, 2002). En las primeras semanas después de la transferencia al ambiente *ex vitro*, las plantas deben adaptarse a nuevas condiciones de crecimiento y tienen que desarrollar una fisiología normal y funcional del sistema radical (Debergh *et al.*, 2000).

Las plantas cuando van a la aclimatización *ex vitro*, presentan problemas de deshidratación debido a la pérdida de agua foliar y a la toma restringida de la misma por la incapacidad de las raíces en los primeros momentos. Esta es una de las principales causas de muerte de las plantas (Preece y Sutter, 1991). El tipo de sustrato es uno de los factores que incide en la aclimatización de los brotes provenientes del cultivo *in vitro* (Yanes *et al.*, 2000). Es por ello, que la selección de la cachaza y la zeolita para la aclimatización de plantas de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez se basó en la capacidad diferencial para la retención de agua, aireación y aporte de materia orgánicas que poseen estos sustratos (Anexo 1).

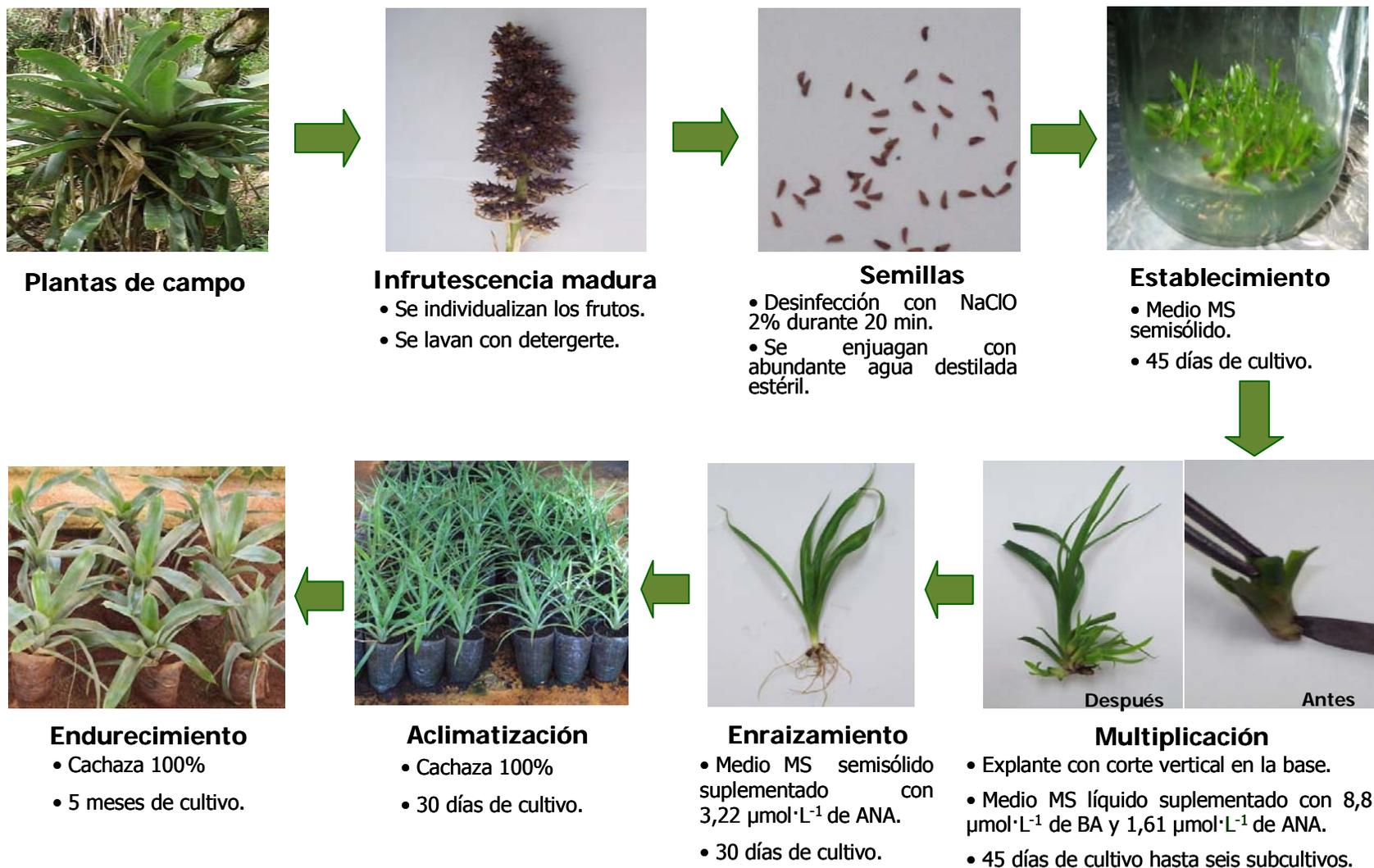
La utilización de zeolita como sustrato afectó considerablemente la supervivencia de los brotes (15%) durante la aclimatización (figura 23). El efecto adverso que provocó este sustrato se notó desde el comienzo de esta fase pues a los siete días el 75% de los brotes estaban muertos. Este comportamiento puede estar relacionado en gran medida con la incapacidad que posee este sustrato para retener el agua, además de la ausencia de fuente nitrogenada en su composición (Anexo 1). Couvillon (1998) sugirió la utilización de sustratos capaces de mantener la humedad para la aclimatización exitosa de brotes de plantas de la familia Bromeliaceae, lo que evita la deshidratación. Con la mezcla de la zeolita y la cachaza se redujo el efecto negativo que causó la zeolita sobre el porcentaje de supervivencia. La mezcla de los sustratos favoreció la supervivencia los brotes, obteniéndose un 80% de supervivencia a los 28 días de cultivo.

El hecho de que la calidad de los brotes cultivados en cachaza fue superior (figura 24) pudiera estar relacionado con la presencia de materia orgánica en este sustrato (Anexo 1) lo que constituye una fuente importante de nitrógeno para las plantas. Carrijo *et al.* (2004) sugirieron la utilización de sustratos enriquecidos en nitrógeno fundamentalmente en la etapa inicial de la aclimatización de la plantas, pues los procesos de síntesis de las proteínas estructurales que darán lugar a los nuevos órganos así lo exigen.

En la aclimatización de plantas de la familia Bromeliaceae el tipo de sustratos incide en los porcentajes de supervivencias. Las plantas de *Dyckia distachya* Hassler alcanzaron un 92% de supervivencia a los 120 días de cultivo cuando se utilizó una mezcla de turba, vermiculita y

arena (2:2:1, v:v:v) (Pompelli y Guerra 2005). Por otra parte, Alves *et al.* (2006) obtuvieron el 90,6% de supervivencia en las plantas de *Vriesea reitzii* Leme y Costa, luego de 60 días de cultivo, con una mezcla de paja de arroz y Turfa Fertil<sup>®</sup> (N:4%, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>:14% K<sub>2</sub>O:8%) (1:1, v:v) como sustrato. Lopes *et al.* (2008) lograron el 90% de supervivencia en los brotes de *Dyckia maritima* Baer aclimatizados en suelo, arena y vermiculita (1:1:1, v:v:v). Por su parte, Duarte *et al.* (2009) informaron la supervivencia del 100% de las plantas de *Nidularium fulgens* Lemaire cuando utilizaron el sustrato comercial Plantmax<sup>®</sup> HA (Ferreira *et al.*, 2007). En la aclimatización de plantas de *Vriesea splendens* (Brongniart) Lemaire y *Vriesea fosteriana* L.B. Smith, Guerra y Dal Vesco (2010) obtuvieron un 95% de supervivencia cuando se utilizaron el sustrato formado por una mezcla Plantmax<sup>®</sup> HA, corteza de pino y paja de arroz (2:1:1, v:v:v) luego de 60 días de cultivo. Bajo estas mismas condiciones los porcentajes de supervivencia de *Vriesea hieroglyphica* (Carriere) E. Morren y *Alcantarea imperiales* (Carriere) Harms fueron del 98%. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos se decidió utilizar la cachaza como sustrato para la aclimatización *ex vitro* de brotes de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez.

En la figura 25 se presenta un esquema que resume la metodología para la propagación *in vitro* de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez. Como explante inicial se usan semillas obtenidas de frutos maduros las cuales se desinfectan con hipoclorito de sodio (2%, v:v). En la etapa de multiplicación se utilizan brotes provenientes de semillas germinadas *in vitro* (aproximadamente 1 cm de longitud) a los que se les aplica un corte vertical desde la región apical hasta la base y se transfieren al medio de cultivo líquido de Murashige y Skoog (1962) suplementado con 8,8  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de BA y 1,61  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de ANA. El subcultivo se realiza cada 45 días y se pueden hacer hasta seis subcultivos. Para el enraizamiento *in vitro*, los brotes individuales de 2,0 cm de longitud se colocan en medio de cultivo semisólido de Murashige y Skoog (1962) suplementado con 3,22  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de ANA durante 30 días de cultivo. Los brotes mayores de 3,0 cm provenientes del enraizamiento *in vitro* se transfieren a la aclimatización *ex vitro* utilizando cachaza como sustrato.



**Figura 25.** Esquema de la metodología de propagación *in vitro* de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez.

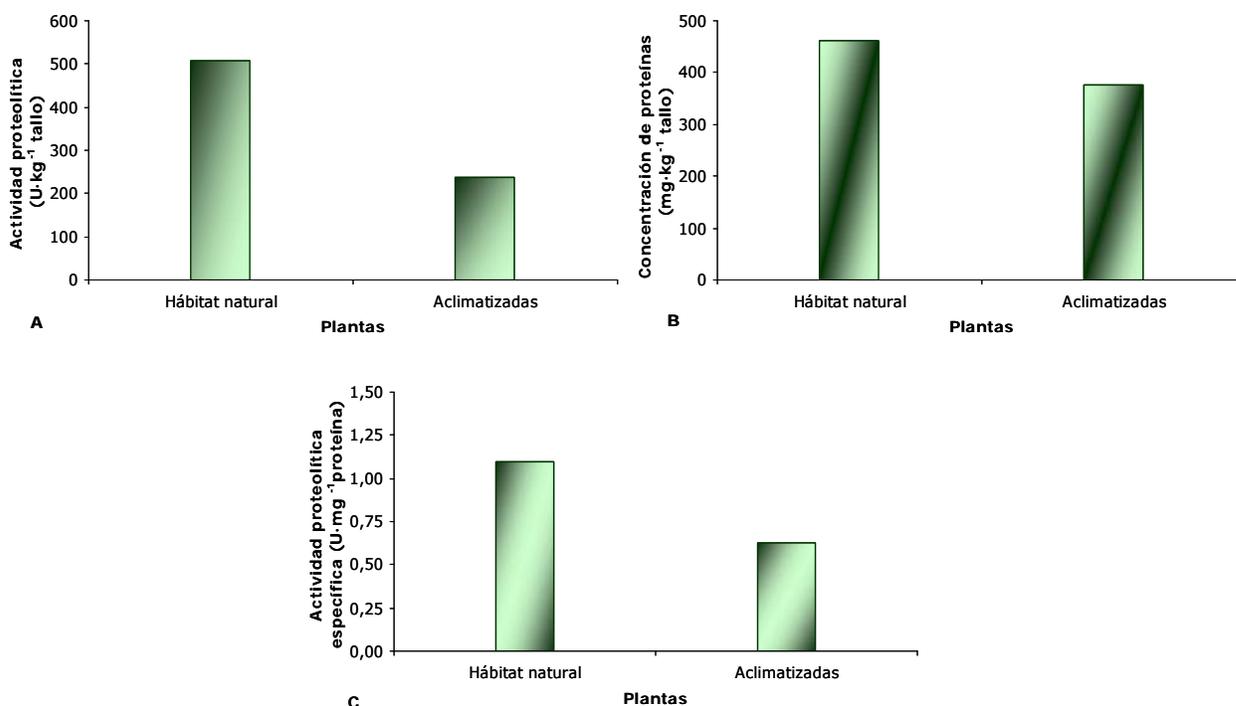
La propagación natural de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez a partir de semillas se ve limitada porque su floración ocurre una vez por año. Además, este proceso suele ser lento y depende de las condiciones ambientales (Landgraf y Paiva, 2009). Con la aplicación de este protocolo de micropropagación se pueden obtener hasta 470 596 plantas/año/semilla, con lo que se incrementa considerablemente la disponibilidad de plantas. Además, permite contar con material vegetal durante todo el año, independientemente de las condiciones ambientales. No obstante, esta metodología pudiera ser mejorada con vista a reducir los costos asociados a la utilización del sistema de cultivo convencional y mejorar la calidad morfológica y fisiológica de las plantas. El uso de sistemas semiautomatizados con el empleo de la técnica de inmersión temporal resultaría atractivo para futuras investigaciones. En ellos se podrían utilizar diseños experimentales que consideren la interacción de factores para incrementar el nivel de respuesta morfogenética de los brotes.

Con este método alternativo de propagación de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez, además de incrementar la disponibilidad de plantas para las extracciones de proteasas, se reducen las afectaciones al ecosistema. Sin embargo, se hace necesario caracterizar en término de actividad proteolítica y concentración de proteínas el material vegetal que se obtiene con el uso de esta metodología.

#### **4.3 Efecto del ethrel en la inducción de proteasas en tallos de plantas aclimatizadas. Determinación de indicadores bioquímicos y fisiológicos asociados a este proceso.**

##### ***4.3.1 Determinación de la concentración de proteínas y la actividad proteolítica de extractos obtenidos a partir de tallos de plantas provenientes del hábitat natural y aclimatizadas.***

En la figura 26 aparecen los resultados relacionados con la concentración de proteínas, la actividad proteolítica y la actividad proteolítica específica de extractos crudos de tallos de plantas de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez provenientes del hábitat natural y aclimatizadas. En ambos casos se detectó la presencia de proteasas en los extractos crudos de tallos pero los valores de concentración de proteínas, actividad proteolítica y actividad específica fueron mayores en los extractos de tallos de plantas provenientes del hábitat natural (508,91 U·kg<sup>-1</sup> de tallo; 462,64 mg·kg<sup>-1</sup> de tallo y 1,10 U·mg<sup>-1</sup> de proteína, respectivamente).



	Act. proteolítica	Conc. proteínas	Act. proteolítica específica
Valor de t	6,81	37,02	12,34
Valor de p	0,02	0,00	0,00

**Figura 26.** Actividad proteolítica (A), concentración de proteínas (B) y actividad proteolítica específica (C) de extractos crudos obtenidos a partir de tallos de plantas de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez provenientes del hábitat natural y aclimatizadas. Comparación de medias para cada indicador (t-Student;  $p \leq 0,05$ ;  $n=9$ ).

Este comportamiento puede estar asociado a las diferencias ontogenéticas que existen entre los dos grupos de plantas. El uso de semillas como explante inicial y el propio cultivo *in vitro* inducen rejuvenecimiento, lo que hace que la diferenciación de los tejidos y órganos de las plantas provenientes del cultivo *in vitro* sea menor. Además, las diferencias ontogenéticas que existen entre las plantas no solo están asociadas a la morfología y estructura de sus órganos, sino también a los procesos metabólicos de síntesis y degradación (George *et al.*, 2008). En las plantas, los cambios en el desarrollo y la diferenciación de los órganos están asociados con la inducción de proteasas (Palma *et al.*, 2002; Grudkowska y Zagdanska, 2004).

La detección de actividad proteolítica en los tallos de las plantas aclimatizadas constituye un hecho valioso. A pesar de que su valor fue menor, que el cuantificado en los tallos de las plantas provenientes del hábitat natural, se demuestra que este material vegetal se puede

utilizar como alternativa para la obtención de proteasas. De esta forma se evita la extracción continua de la plantas de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez de su hábitat natural y se reducen los daños que se ocasionan al ecosistema.

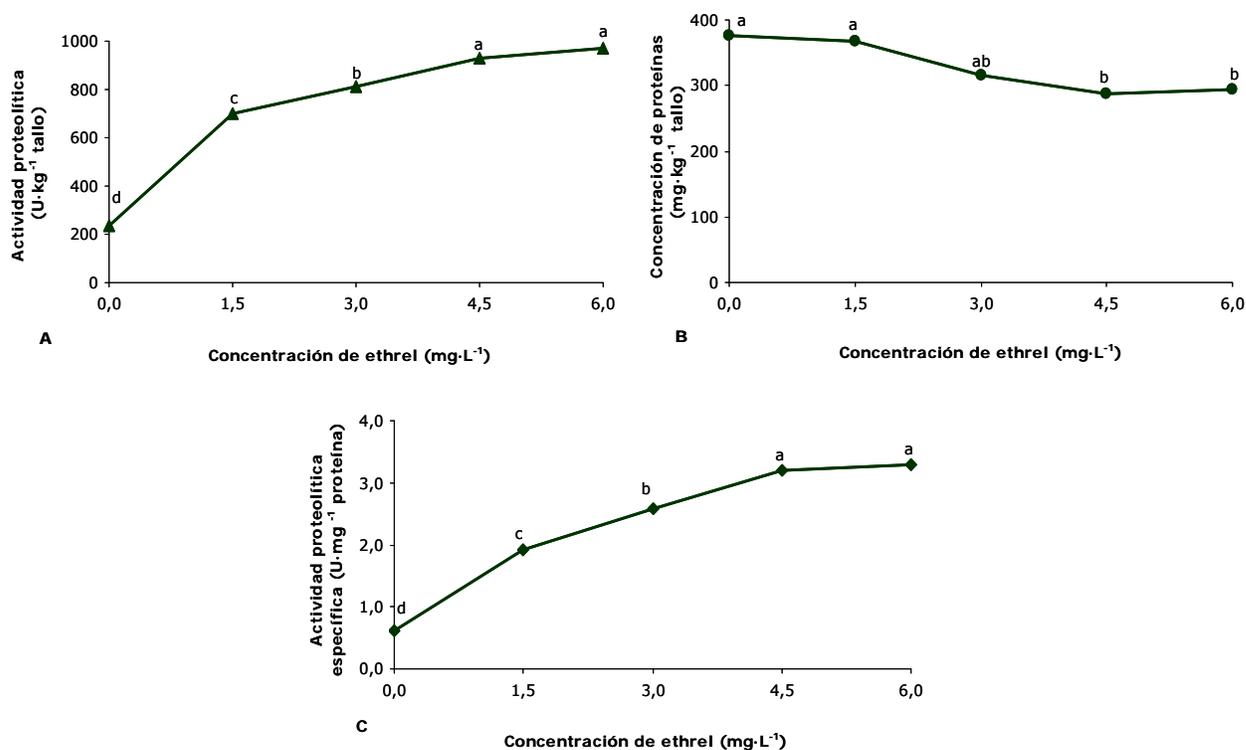
La participación de las proteasas en diferentes etapas del desarrollo está bien documentada en la literatura. Como se ha planteado con anterioridad, estas enzimas están involucradas en la germinación de las semillas, en la diferenciación y morfogénesis, en la senescencia y en la muerte celular programada (Ueda *et al.*, 2000; Azarkan *et al.*, 2004; Woltering, 2004; Gradzka, 2006; Parrot *et al.*, 2010; Guan-Hong *et al.*, 2012). El incremento de actividad proteolítica en las plantas aclimatizadas de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez con el uso de productos liberadores de etileno, así como la caracterización de indicadores bioquímicos y fisiológicos relacionados con este proceso serán abordados en los próximos experimentos de esta investigación.

#### **4.3.2 Efecto de la concentración de ethrel en la inducción de proteasas en tallos de plantas aclimatizadas.**

Los resultados relacionados con el efecto de la concentración de ethrel en la acumulación de proteasas en tallos de plantas aclimatizadas de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez se muestran en la figura 27. La actividad proteolítica se incrementó con el aumento de la concentración de ethrel, mostrando los mayores valores (926,83 y 969,99 U·kg<sup>-1</sup> de tallo) para las concentraciones de 4,5 y 6,0 mg·L<sup>-1</sup> de ethrel, respectivamente, sin diferencias significativas entre sí (figura 27A). La concentración de proteínas (figura 27B), decreció con el aumento de la concentración de ethrel. Los mayores valores se lograron para los tratamientos con 0; 1,5 y 3,0 mg·L<sup>-1</sup> de ethrel (376,70; 367,57 y 315,21 mg·kg<sup>-1</sup>de tallo, respectivamente) sin diferencias significativas entre sí. Por su parte, los valores de actividad proteolítica específica crecieron con el aumento de la concentración de ethrel, detectándose los mayores (3,21 y 3,29 U·mg<sup>-1</sup>de proteína) para las concentraciones de 4,5 y 6,0 mg·L<sup>-1</sup> de ethrel, respectivamente, sin diferencias significativas entre sí (figura 27C).

El incremento de la actividad proteolítica (figura 27A) pudiera estar relacionado con la habilidad que tienen las células vegetales de cambiar de un estado del desarrollo a otro o a la adaptación

a nuevas condiciones ambientales. Ambos procesos requieren de cambios rápidos en los mecanismos regulatorios de las células que sólo se logran con la activación de la proteólisis (Viestra, 1996).



	Act. proteolítica (U·kg <sup>-1</sup> tallo)	Conc. proteínas (mg·kg <sup>-1</sup> tallo)	Act. proteolítica específica (U·mg <sup>-1</sup> proteína)
Media general	728,90	328,50	2,30
Error típico de la media	96,29	53,00	0,49

**Figura 27.** Efecto de la concentración de ethrel sobre la actividad proteolítica (A), la concentración de proteínas (B) y la actividad proteolítica específica (C) de extractos crudos obtenidos a partir de tallos de plantas aclimatizadas de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez luego de tres días de aplicado el producto. Medias con letras desiguales difieren estadísticamente para cada indicador (ANOVA de un factor; Tukey;  $p \leq 0,05$ ;  $n=27$ ).

Con la aplicación de 4,5 y 6,0 mg·L<sup>-1</sup> de ethrel se obtuvieron los mayores valores de actividad proteolítica, los menores valores de concentración de proteínas y por ende los mayores valores de actividad proteolítica específica (figura 27). Estos resultados pudieran estar asociados al papel regulador del etileno durante la senescencia de las plantas y a la participación de las proteasas en los eventos degradativos de los tejidos que ocurren en este proceso fisiológico (Warner y Leopold, 1969). La senescencia en las plantas es un proceso de desarrollo activo que está controlado genéticamente y se inicia por cambios en el ambiente o el desarrollo. Es una

serie ordenada de acontecimientos citológicos y bioquímicos que implica la reducción de la expresión de la mayoría de los genes e inicia la expresión de genes que codifican varias enzimas hidrolíticas, entre ellas las proteasas que intervienen en los procesos degradativos de los tejidos (Taiz y Zeiger, 2006).

La cuantificación de la actividad proteolítica por degradación de proteínas internas o con la utilización de sustratos exógenos (Martin y Thimann, 1972; Ficher y Feller, 1994; Ishida *et al.*, 1998; Gregersen *et al.*, 2008; Martínez *et al.*, 2008; Kaushal *et al.*, 2009), así como la disminución de la concentración de proteínas (Distefano *et al.*, 1999; Palma *et al.*, 2002) son indicadores que caracterizan la respuesta a la adición de ethrel. En discos de hojas de *Solanum lycopersicum* L. la aplicación de  $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  de ethrel duplicó la actividad proteolítica y disminuyó la concentración de proteínas luego de cuatro días de aplicado el producto (Vera y Conejero 1988, 1990). Por otra parte, Lerslerwong *et al.* (2009) evaluaron el efecto de la inducción de la síntesis del etileno con  $0,4 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de ethrel sobre la actividad proteolítica y la degradación de proteínas en pétalos de *Dendrobium* sp. Estos autores informaron una disminución de la concentración de proteínas totales de 600 a  $400 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  de masa fresca y un aumento de actividad proteolítica de 4,0 a  $6,5 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$  de masa fresca en los pétalos de las flores tratadas con ethrel después de cuatro días de aplicado el producto. Kaushal *et al.* (2009) detectaron que la concentración de proteínas decreció un 65% y la actividad proteolítica se incrementó 4,3 veces con respecto al control en pétalos de *Rosa bourboniana* L. tratadas con gas etileno por 8 horas.

En plantas de la familia Bromeliaceae, generalmente, el uso de productos liberadores de etileno se ha asociado a la estimulación de la floración y no se tiene referencia previa de la acción de esta hormona en la inducción de proteasas. La acción del ethrel en la estimulación de la actividad proteolítica en plantas de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez pudiera estar asociada a los procesos de senescencia, estas plantas en pleno crecimiento vegetativo no estaban aptas para la floración. La capacidad para florecer (la transición desde la juventud a la madurez) se alcanza cuando la planta posee cierta edad o tamaño (Taiz y Zeiger, 2006). Es por

ello que el efecto inductor de este producto en la acumulación de proteasas en función de la edad y el tamaño de la planta requiere de futuras investigaciones.

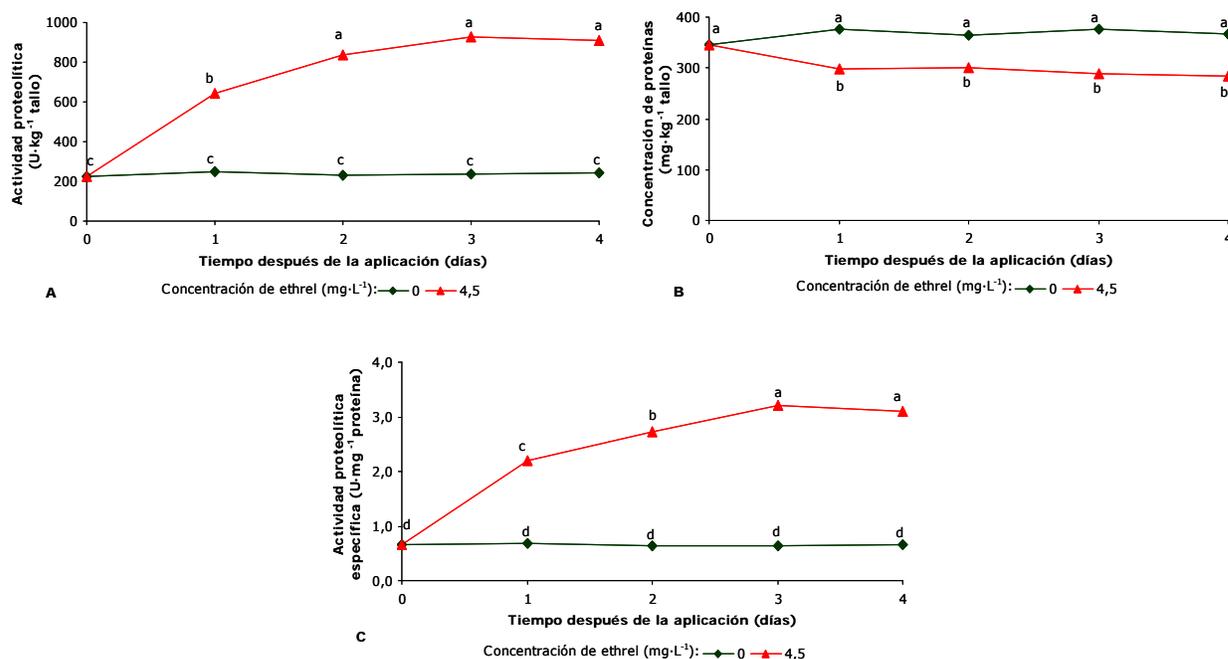
Teniendo en cuenta los resultados obtenidos se decidió utilizar  $4,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de ethrel para incrementar la actividad proteolítica en tallos de plantas aclimatizadas de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez.

#### **4.3.3 Efecto del tiempo de aplicación del ethrel en la inducción de proteasas en tallos de plantas aclimatizadas.**

La figura 28 muestra los resultados relacionados con el efecto del tiempo de aplicación del ethrel en la acumulación de proteasas en tallos de plantas aclimatizadas de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez. En las plantas tratadas con ethrel la actividad proteolítica se incrementó con el transcurso del tiempo, alcanzando los máximos valores ( $825,59$ ;  $927,00$  y  $909,24 \text{ U}\cdot\text{kg}^{-1}$  de tallo) a partir de los dos días después de la aplicación del producto, sin diferencias significativas entre sí (figura 28A). Este indicador no tuvo variación en el transcurso del tiempo en las plantas no tratadas. La concentración de proteínas (figura 28B) no varió con el transcurso de tiempo en las plantas que no fueron tratadas con ethrel. Sin embargo, en las plantas tratadas con ethrel ocurrió una disminución significativa de este indicador luego de un día de aplicado el producto, después de este momento no se notó variación. La actividad proteolítica específica en las plantas tratadas con ethrel creció con el paso del tiempo y fue mayor a los tres y cuatro días después de la aplicación del producto ( $3,22$  y  $3,11 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$  de proteína, respectivamente), sin diferencias significativas entre sí. En las plantas que no se trataron con ethrel este indicador no tuvo variación con el transcurso del tiempo (figura 28C).

El tiempo de aplicación del ethrel tiene marcada influencia en la actividad proteolítica y en la concentración de proteínas. En discos de hojas de *Solanum lycopersicum* L. la actividad proteolítica fue mayor a los cuatro días después de aplicado el producto (Vera y Conejero 1988, 1990). También, Lerslerwong *et al.* (2009) encontraron la mayor actividad proteolítica en pétalos de *Dendrobium* sp. cuatro días después de añadido el ethrel. En esta investigación se encontraron resultados que se encuentran en el rango de tiempo informados por estos autores en cuanto a la actividad proteolítica pues este indicador fue máximo y estable entre el segundo y cuarto día después de aplicado el ethrel (figura 28A). Sin embargo, la concentración de

proteínas disminuyó en las plantas tratadas luego de un día de aplicado el producto, a partir de este momento se mantuvo estable (figura 28B).



	Act. proteolítica (U·kg <sup>-1</sup> tallo)	Conc. proteínas (mg·kg <sup>-1</sup> tallo)	Act. proteolítica específica (U·mg <sup>-1</sup> proteína)
Media general	470,91	334,42	1,51
Error típico de la media	98,10	39,69	0,32

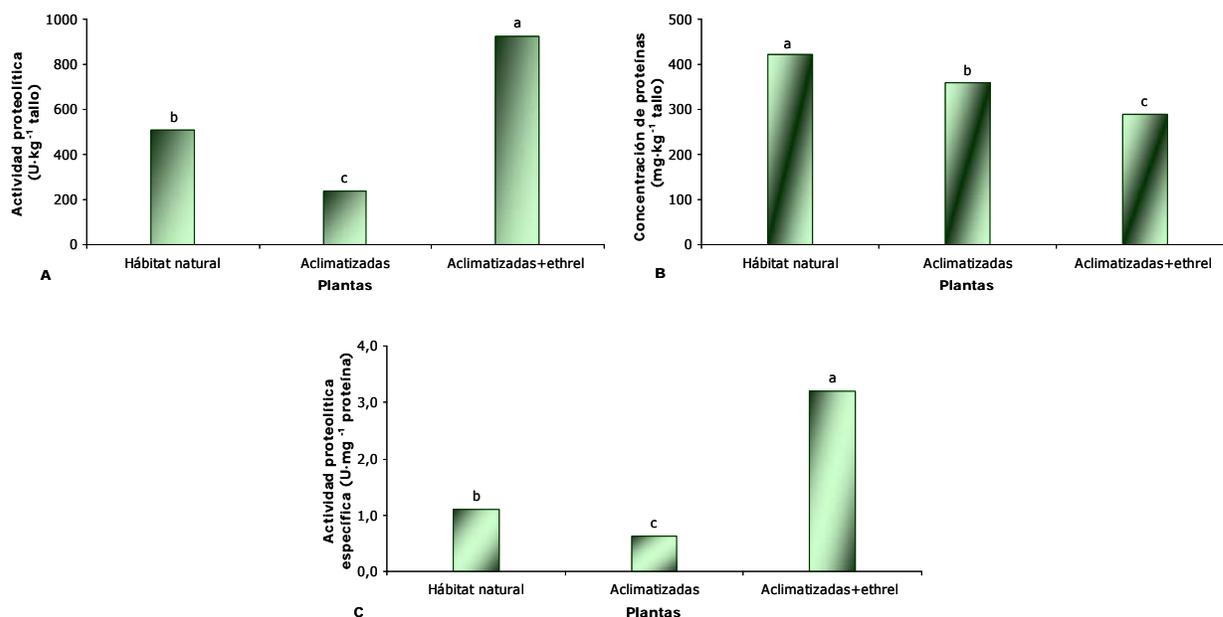
**Figura 28.** Efecto del tiempo de aplicación sobre la actividad proteolítica (A), la concentración de proteínas (B) y la actividad proteolítica específica (C) de extractos crudos obtenidos a partir de tallos de plantas aclimatizadas de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Medias con letras desiguales difieren estadísticamente para cada indicador (ANOVA bifactorial; Tukey;  $p \leq 0,05$ ;  $n=27$ ).

El incremento de la actividad proteolítica específica hasta los tres días después de aplicado el producto en las plantas aclimatizadas (figura 28C) pudiera estar asociado con que el aumento de la proteólisis es uno de los eventos que se desencadena como parte de la respuesta temprana a cambios en el estado de desarrollo o de las condiciones ambientales (Palma *et al.*, 2002). La estabilización de este indicador luego de tres días de aplicada la solución de ethrel pudiera relacionarse con la acomodación al estrés que se presenta en las plantas como respuesta a un estímulo ambiental (Azcon-Bieto y Talon, 1993).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos se decidió que tres días después de la aplicación del ethrel es el tiempo adecuado para incrementar la actividad proteolítica en tallos de plantas

aclimatizadas de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez. Este es el menor tiempo con el que se obtuvo la mayor actividad proteolítica específica.

En la figura 29 se compara la actividad proteolítica, la concentración de proteínas y la actividad proteolítica específica de extractos proteolíticos crudos obtenidos a partir de tallos de plantas de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez provenientes del hábitat natural y aclimatizadas, tratadas y no tratadas con ethrel ( $4,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ). La actividad proteolítica mostró su mayor valor en las plantas aclimatizadas tratadas con ethrel ( $926,86 \text{ U}\cdot\text{kg}^{-1}$  de tallo) con diferencias significativas del resto de los tratamientos (figura 29A). Por su parte, la mayor concentración de proteínas se detectó en tallos de plantas provenientes del hábitat natural ( $420,64 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  de tallo), con diferencias significativas del resto de los tratamientos (figura 29B). Las plantas aclimatizadas tratadas con ethrel ( $4,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) mostraron los menores valores para este indicador ( $288,55 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  de tallo). La actividad proteolítica específica fue mayor en las plantas aclimatizadas tratadas con ethrel ( $3,21 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$  de proteína) (figura 29C).



	Act. proteolítica (U·kg <sup>-1</sup> tallo)	Conc. proteínas (mg·kg <sup>-1</sup> tallo)	Act. proteolítica específica (U·mg <sup>-1</sup> proteína)
Media general	557,56	361,96	1,65
Error típico de la media	93,25	28,25	0,31

**Figura 29.** Actividad proteolítica (A), concentración de proteínas (B) y actividad proteolítica específica (C) de extractos crudos obtenidos a partir de tallos de plantas de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez provenientes del hábitat natural y aclimatizadas, tratadas y no tratadas con ethrel. Medias con letras desiguales difieren estadísticamente para cada indicador (ANOVA de un factor; Tukey;  $p \leq 0,05$ ;  $n=9$ ).

El incremento de la proteólisis se asocia a dos eventos fundamentalmente: la activación de zimógenos y/o la síntesis de *novo* de nuevas proteasas (Müntz, 2007). En las vacuolas, lugar de almacenamiento de las cisteino proteasas que se estudiaron en este trabajo, es el compartimento celular donde ocurre la mayor degradación de proteínas y el reciclaje de los aminoácidos. Este proceso está estrechamente relacionado con el desarrollo de la planta y su respuesta a los estímulos ambientales (Robinson *et al.*, 2005). Esto pudiera explicar el comportamiento observado.

En esta investigación se demostró que en las plantas aclimatizadas tratadas con ethrel se expresan niveles de proteasas en los tallos superiores a las plantas provenientes del hábitat natural y esta activación pudiera estar asociada a procesos de aceleración de la senescencia durante la etapa de crecimiento vegetativo. Durante la senescencia, además del incremento de la actividad de las proteasas pueden ocurrir otros procesos como son: la disminución de las clorofilas, el incremento de la peroxidación lipídica y el aumento de la permeabilidad de las membranas debido a alteraciones en el metabolismo de las especies reactivas del oxígeno (Leshem *et al.*, 1988; Del Río *et al.*, 1998; Palma *et al.*, 2002, 2006). Por estas razones para tratar de explicar los principales cambios metabólicos que ocurren en las plantas aclimatizadas de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez con la aplicación del ethrel se determinaron indicadores bioquímicos y fisiológicos en hojas y tallos los que serán abordados en el siguiente acápite.

#### **4.3.4 Determinación de indicadores bioquímicos y fisiológicos asociados a la aplicación del ethrel.**

En la tabla 3 se muestran los valores de la actividad proteolítica, la concentración de proteínas y la actividad proteolítica específica en hojas de plantas aclimatizadas no tratadas y tratadas con ethrel ( $4,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) luego de tres días de aplicado el producto. Como se puede apreciar en las hojas de las plantas tratadas con ethrel, la actividad proteolítica y la actividad proteolítica específica fue significativamente mayor, mientras que la concentración de proteínas fue menor en estas plantas. Este comportamiento es similar al que se obtuvo para estos indicadores en los tallos de las plantas tratadas con ethrel ( $4,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) luego de tres días de aplicado el producto (figura 28).

Las proteasas tienen un papel regulador en el desarrollo de las plantas debido a que poseen selectividad para la escisión de las proteínas y activan enzimas, incluyendo otras proteasas (Beers *et al.*, 2004). Jones *et al.* (2005) informaron que el etileno participa en la regulación temporal de la proteólisis durante la senescencia. Por otra parte, varios investigadores sugieren que las proteasas participan activamente en la hidrólisis de las proteínas durante la senescencia y permiten la movilización de los nutrientes hacia los tejidos afectados (Rubinstein, 2000; Jones, 2004). Además, se informa que el etileno induce la activación de cisteino proteasas durante la senescencia de diferentes órganos en *Cicer arietinum* L. (Cervantes *et al.*, 1994), *Dianthus caryophyllus* L. (Jones *et al.*, 1995), *Pisum sativum* L. (Cercos *et al.*, 1999), *Solanum lycopersicum* L. (Chen *et al.*, 2002), *Alstroemeria peruviana* Van Houtte (Wagstaff *et al.*, 2002), *Sandersonia aurantiaca* Hook (Eason *et al.*, 2002), *Narcissus pseudonarcissus* L. (Hunter *et al.*, 2002), *Petunia* sp. (Jones *et al.*, 2005) y *Rosa bourboniana* L. (Kaushal *et al.*, 2009). En esta investigación se comprobó el incremento de la actividad proteolítica específica en los tallos y las hojas de las plantas tratadas con ethrel (figura 28 y tabla 3).

**Tabla 3.** Actividad proteolítica, concentración de proteínas y actividad proteolítica específica en hojas de plantas aclimatizadas de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez luego de tres días de aplicado el ethrel ( $4,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ).

Indicadores evaluados	Control	Ethrel ( $4,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )	Valor de t	Valor de p
<b>Actividad proteolítica</b> ( $\text{U}\cdot\text{kg}^{-1}$ de masa fresca)	32,08	93,02	-54,22	0,00
<b>Concentración de proteínas</b> ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de masa fresca)	139,83	108,33	-12,74	0,00
<b>Actividad proteolítica específica</b> ( $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína)	0,30	0,67	-23,46	0,00

Comparación de medias para cada indicador (t-Student;  $p \leq 0,05$ ;  $n=27$ ).

En la tabla 4 se muestran los resultados relacionados con el efecto del ethrel sobre indicadores del estrés oxidativo en hojas y tallos de plantas aclimatizadas de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez luego de tres días de aplicado el producto. Como se puede apreciar la concentración de MDA y otros aldehídos en tallos y hojas no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos. En el caso de la actividad SOD específica en tallos no se observó diferencias significativas entre los tratamientos que se evaluaron. Sin embargo, en las hojas se encontró el mayor valor de este indicador en las plantas tratadas con ethrel ( $12,87 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$  de proteína). Por

su parte, para la actividad guayacol peroxidasa específica en los tallos no se presentó diferencias significativas entre los tratamientos que se evaluaron, mientras que en las hojas el mayor valor de este indicador ( $384,61 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$  de proteína) se detectó para las plantas tratadas con ethrel.

**Tabla 4.** Indicadores del estrés oxidativo en hojas y tallos de plantas aclimatizadas de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez luego de tres días de aplicado el ethrel ( $4,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ).

Indicadores evaluados	Tallos		Valor de t	Valor de p	Hojas		Valor de t	Valor de p
	Control	Ethrel ( $4,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )			Control	Ethrel ( $4,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )		
<b>Concentración de MDA</b> ( $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ de masa fresca)	6,55	6,42	0,18	0,87	10,98	9,73	1,25	0,28
<b>Concentración de otros aldehídos</b> ( $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ de masa fresca)	85,24	90,11	-0,64	0,56	139,61	148,91	0,66	0,55
<b>Actividad SOD específica</b> ( $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína)	13,49	11,69	0,83	0,42	5,74	12,87	7,63	0,00
<b>Actividad guayacol peroxidasa específica</b> ( $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína)	597,72	561,71	1,99	0,06	133,83	384,61	-2,89	0,01

Comparación de medias para cada indicador (t-Student;  $p \leq 0,05$ ;  $n=27$ ).

En las hojas de plantas aclimatizadas tratadas con ethrel ( $4,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) se observó el incremento de las actividades específicas de SOD y guayacol peroxidasa, mientras que los contenidos de MDA y otros aldehídos no sufrieron variación (tabla 4). Esto sugiere que el sistema enzimático SOD-peroxidasas asociado al estrés oxidativo en las hojas resultó suficiente en la eliminación de las ERO que se generaron luego de la aplicación del ethrel. El hecho de que la concentración de MDA no mostró variación entre los tratamientos que se evaluaron pudiera asociarse a la ausencia de daños a nivel de la membrana celular.

El hecho que en los tallos no se detectaron incrementos en la concentración de MDA y otros aldehídos ni en las actividades específicas de las enzimas relacionadas con el estrés oxidativo (tabla 4) en las plantas aclimatizadas tratadas con ethrel ( $4,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) hace pensar que en este órgano no está ocurriendo la formación y acumulación de radicales libres como consecuencia de la aplicación del ethrel. Sin embargo, la actividad proteolítica específica en los tallos tratados con ethrel ( $4,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) aumentó significativamente (figura 28), lo que pudiera estar relacionado con un incremento en la degradación de las proteínas de reserva que se encuentran en las vacuolas producto de la proteólisis (Müntz, 2007). Con este proceso se forman aminoácidos libres que son transportados al citosol y por acción de las enzimas glutamina sintasa citosólica,

aspartato aminotransferasa y glutamato deshidrogenasa se convierten en compuestos que pueden ser transportados a las hojas como la glutamina, principal aminoácido transportable (Fischer y Feller, 1994; Buchanan–Wollaston *et al.*, 2005). De esta forma ocurre una rápida relocalización de los recursos del vegetal y se garantiza la movilización del nitrógeno hacia los tejidos afectados (Yang *et al.*, 2004).

En la tabla 5 se aprecian los resultados del efecto del ethrel sobre indicadores del crecimiento y el contenido de clorofilas y la actividad fotosintética en hojas de plantas aclimatizadas de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez luego de tres días de aplicado el producto. Para los indicadores masa fresca y seca de las hojas no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos que se evaluaron. En las plantas aclimatizadas tratadas con ethrel ( $4,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) no se notó flacidez en las hojas luego de transcurridos los tres días de aplicado el producto. Para la concentración de clorofila a, b y total los mayores valores ( $121,99$ ;  $90,88$  y  $212,87 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$  de masa fresca, respectivamente) se observaron en las hojas de las plantas aclimatizadas que no fueron tratadas con ethrel. En la actividad fotosintética no se encontraron diferencias significativas entre las plantas aclimatizadas tratadas y no tratadas con ethrel.

**Tabla 5.** Indicadores del crecimiento, concentración de clorofilas y actividad fotosintética en hojas de plantas aclimatizadas de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez luego de tres días de aplicado el ethrel ( $4,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ).

Indicadores evaluados	Control	Ethrel ( $4,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )	Valor de t	Valor de p
<b>Masa fresca</b> (g)	19,63	21,22	-0,85	0,44
<b>Masa seca</b> (g)	3,12	3,20	-0,29	0,79
<b>Concentración de clorofila a</b> ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ masa fresca)	121,99	78,09	14,13	0,00
<b>Concentración de clorofila b</b> ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ masa fresca)	90,88	69,25	5,86	0,00
<b>Concentración de clorofila total</b> ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ masa fresca)	212,87	147,35	12,06	0,00
<b>Actividad fotosintética</b> ( $\mu\text{mol CO}_2\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ )	9,63	11,20	-1,49	0,14

Comparación de medias para cada indicador (t-Student;  $p \leq 0,05$ ;  $n=27$ ).

El hecho de que la masa fresca de las hojas no mostró variación indica que la concentración del producto y el tiempo de aplicación que se utilizaron en esta investigación no provocaron la pérdida de agua. Este comportamiento pudiera estar relacionado con las adaptaciones

anatómicas, morfológicas y fisiológicas que se presentan en las plantas con metabolismo CAM que reducen al mínimo la pérdida de agua. El ciclo estomático de las plantas CAM está invertido. La apertura de los estomas se realiza en la noche cuando las condiciones son menos favorables para la salida del agua. Además, en estas plantas las hojas presentan una cutícula gruesa que es muy eficaz para limitar la pérdida de agua (Azcon-Bieto y Talon, 1993).

Los cloroplastos son los primeros organelos que se deterioran al inicio de la senescencia en las hojas (Michele *et al.*, 2009). En las plantas tratadas con ethrel ocurrió una disminución en el contenido de clorofilas a, b y totales mientras que la actividad fotosintética no mostró variación con respecto a las plantas que no fueron tratadas con ethrel (tabla 5). Este comportamiento pudiera estar relacionado con la influencia de la intensidad de la luz en la acumulación de clorofilas a, b y total. Se ha comprobado que, generalmente, a bajas intensidades de luz el contenido de clorofilas se incrementa para garantizar que la función de los pigmentos no afecte el metabolismo celular (Donnelly y Vidaver, 1984; Lee *et al.*, 1985). Las plantas de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez se aclimatizaron en una casa de cultivo con intensidad luminosa entre 400-500  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Esto pudiera haber provocado un incremento en los niveles de clorofilas de estas plantas, lo que explica que a pesar de que el ethrel afectó la concentración de estos pigmentos los niveles que se alcanzaron son suficientes para garantizar el funcionamiento de la antena fotoquímica.

La mayoría de los pigmentos fotosintéticos no participan en las reacciones de la antena fotoquímica, sino que su función es realizar el proceso físico de absorción y transferencia de energía. Generalmente, solo una molécula del pigmento participa en las reacciones fotoquímicas mientras que los restantes actúan como pigmentos auxiliares en la absorción y transmisión de la energía luminosa (Azcon-Bieto y Talon, 1992), lo que explica que las variaciones en las concentraciones de clorofilas no afectan la actividad fotosintética. De manera general, se reconoce que la disminución de la capacidad fotosintética se debe a alteraciones en las actividades fotoquímicas en los fotosistemas II, I y en la cadena de transporte de electrones (Zhang *et al.*, 2006). El comportamiento observado en las plantas de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez hace pensar que las principales alteraciones que provocó el ethrel en los

cloroplastos estuvieron asociadas a la antena colectora de luz donde se localizan la mayoría de los pigmentos fotosintéticos.

Las moléculas de clorofila y todo el sistema enzimático que cataliza la transformación de la energía luminosa en química se localizan en los tilacoides que forman las granas de los cloroplastos. La membrana del tilacoide tiene estructura de mosaico fluido, similar a la membrana citoplasmática. Las moléculas de clorofila se unen a las proteínas globulares que forman esta membrana (Salisbury y Ross, 1992). Durante la senescencia de las hojas, en los cloroplastos se produce desorientación en las granas, dilatación de los tilacoides y un considerable decrecimiento del contenido de pigmentos fotosintéticos (Smart, 1994; Del Río *et al.*, 1998; Hörtensteiner y Kräutler, 2011). Recientemente, Eckardt (2009) y Büchert *et al.* (2011) informaron que el primer paso en la degradación de las clorofilas es la eliminación del átomo de magnesio para formar feofitina, luego ocurre la eliminación de la cola de fitol catalizada por la enzima feofitinasasa. La degradación completa de las clorofilas es de vital importancia en esta etapa, ya que permite el reciclaje del nitrógeno y otros compuestos en el interior del cloroplasto. Además, es un mecanismo de protección para evitar la acumulación de productos intermediarios fototóxicos (Hörtensteiner, 2006).

La degradación de las clorofilas en hojas de varias especies de plantas en fase de senescencia se ha informado. Gepstein y Thimann (1981) evaluaron el efecto del etileno en la degradación de las clorofilas en hojas de *Avena sativa* L. durante 10 días. La descomposición de las clorofilas progresó con el transcurso del tiempo. Por su parte, Meir *et al.* (1992) estudiaron el efecto del etileno en la degradación de las clorofilas en hojas de *Petroselinum crispum* (Mill.) durante siete días. Luego de transcurridos cuatro días, estos autores notaron una disminución notable del contenido de clorofilas en las hojas tratadas con etileno con respecto al tratamiento control. Zhang *et al.* (2011) demostraron que el etileno acelera la senescencia en hojas de *Brassica rapa* L. La expresión de los genes relacionados con las enzimas que catalizan la degradación de las clorofilas se incrementó en las plantas tratadas con etileno, lo que evidencia el incremento de este proceso catabólico en las hojas senescentes.

Con los resultados obtenidos en esta fase de la investigación se demostró que el ethrel ( $4,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) luego de tres días de aplicación provocó la inducción de las proteasas presentes en los tallos de plantas aclimatizadas, alcanzándose valores de actividad proteolítica específica 2,5 veces superiores a los obtenidos en los tallos de las plantas provenientes del hábitat natural. Además, se comprobó que con la aplicación de este compuesto aparecen cambios bioquímicos y fisiológicos en las plantas aclimatizadas de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez que se asocian con el proceso de senescencia que ocurre en estas plantas.

Con el conjunto de experimentos desarrollados se demostró que los tallos de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez son un reservorio natural de cisteino proteasas y en particular una fuente para la obtención de pendulifloraina I. En esta tesis doctoral se brindan alternativas para el aislamiento de estas enzimas sin afectar los ecosistemas, lo que constituye un aspecto importante para diseñar investigaciones futuras.

## 5. CONCLUSIONES

1. La obtención de extractos proteolíticos activos y estables a partir de tallos de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez permitió aislar una nueva cisteino proteasa: la pendulifloraina I, la cual posee elevada homología con los miembros la familia C1.
2. Con la metodología de propagación *in vitro* de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez propuesta se incrementó la disponibilidad de material vegetal a usar como fuente de extracciones de proteasas, sin afectar los ecosistemas.
3. El uso del ethrel incrementó la actividad proteolítica específica en los tallos de plantas aclimatizadas hasta valores superiores a los obtenidos en las plantas provenientes del hábitat natural e influyó en otros indicadores relacionados con la senescencia, sin ocasionar daños severos a nivel celular.

## 6. RECOMENDACIONES

1. Iniciar los estudios sobre posibles aplicaciones de los preparados proteolíticos obtenidos en esta investigación, en particular la pendulifloraina I.
2. Evaluar los sistemas semiautomatizados con el uso de la técnica de inmersión temporal como otro método de propagación de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez donde se utilicen diseños experimentales que incluyan la interacción de factores.
3. Aplicar la metodología de propagación *in vitro* de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez, que incluye el uso del ethrel, en el Centro de Bioplantitas u otra entidad especializada como alternativa para la obtención de proteasas, sin afectar la biodiversidad y los ecosistemas.

## 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abeles, F.B. 1992. Roles and physiological effects of ethylene in plant physiology: Dormancy, growth, and development. En: Abeles, F.B.; Morgan, P.W.; Saltveit, M.E. (eds.) Ethylene in Plant Biology. Academia Press, San Diego. pp. 120-181.
2. Abreu, J.; Obregón, W.D.; Natalucci, C.L.; Caffini, N.O. 2005. Reinvestigation of the proteolytically active components of *Bromelia pinguin* fruit. *Fitoterapia*. 76: 540-548.
3. Abreu, J.; Obregón, W.D.; Trejo, S.A.; Caffini, N.O. 2008. Purification and characterization of four new cysteine endopeptidases from fruits of *Bromelia pinguin* L. grown in Cuba. *Protein Journal*. 27: 88-96.
4. Acharya, B.R.; Assmann S.M. 2009. Hormone interactions in stomatal function. *Plant Molecular Biology*. 69: 451-462.
5. Aehle, W. 2004. Industrial enzymes: Enzymes in food applications. En: Aehle, W. (ed). Enzymes in industry: Production and applications. Wiley-VCH, Weinheim. pp. 114-142.
6. Agundis, C.; Reyes, M.; Córdoba, F. 1977. Hemisphaericin-D, a dialysable and polymerizable protease found in *Bromelia hemisphaerica*. *Experientia*. 33(7): 867-869.
7. Aiyegbusi, A.; Duru, F.; Anunobi, C.; Noronha, C.; Okanlawon, A. 2011. Bromelain in the early phase of healing in acute crush achilles tendon injury. *Phytotherapy Research*. 25: 49-52.
8. Almeida, W.; de Matos, A.P.; da Souza, A.S. 1996. Effects of benylaminopurine (BAP) on *in vitro* proliferation of pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr.). *Acta Horticulturae*. 425: 235-239.
9. Alonso, J.M.; Granell, A. 1995. A putative vacuolar processing protease is regulated by ethylene and also during fruit ripening in *Citrus* fruit. *Plant Physiology*. 109: 541-547.
10. Altschul, S.F.; Madden, T.L.; Schäffer, A.A.; Zhang, J.; Zhang, Z.; Miller, W.; Lipman, D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*. 25(17): 3389-3402.
11. Alves, G.M.; Guerra, M.P. 2001. Micropropagation for mass propagation and conservation of *Vriesea firburgensis* var. *paludosa* from microbuds. *Journal of the Bromeliad Society*. 51: 5.
12. Alves, G.M.; Dal Vesco, L.L.; Guerra, M.P. 2006. Micropropagation of the Brazilian endemic bromeliad *Vriesea reitzii* through nodule clusters culture. *Scientia Horticulturae*. 110(2): 2004-2007.

13. Anson, M. 1938. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with haemoglobin. *Journal of Genetic Physiology*. 22: 79.
14. Apte, P.; Kaklij, G.; Heble, M. 1979. Proteolytic enzymes bromelains in tissue cultures of *Ananas sativus* pineapple. *Plant Science Letter*. 14: 52-62.
15. Aragón, C.; Carvalho, L.; González, J.; Escalona, M.; Amancio, S. 2011. The physiology of *ex vitro* pineapple (*Ananas comosus* L. Merr. var MD-2) as CAM or C3 is regulated by the environmental conditions. *Plant Cell Reports*. 31: 757-769.
16. Aranda-Peres, A.N.; Pinheiro, A. 2009. Adjustment of mineral elements in the culture medium for the micropropagation of three *Vriesea* Bromeliads from the Brazilian Atlantic Forest: The importance of calcium. *HortScience*. 44(1): 106-112.
17. Arigita, L.; González, A.; Sánchez, R. 2002. Influence of CO<sub>2</sub> and sucrose on photosynthesis and transpiration of *Actinidia deliciosa* explants cultured *in vitro*. *Physiologia Plantarum*. 115: 166-173.
18. Arrabal, R.; Amancio, F.; Carneiro, L.A.; Neves, L.J.; Mansur, E. 2002. Micropropagation of endangered endemic Brazilian bromeliad *Cryptanthus sinuosus* (L.B. Smith) for *in vitro* preservation. *Biodiversity and Conservation*. 11(6): 1081-1089.
19. Arribére, M.C.; Cortadi, A.A.; Gattuso, M.A.; Bettiol, M.P.; Priolo, N.S.; Caffini, N.O. 1998. Comparison of Asclepiadaceae latex proteases and characterization of *Morrenia brachystephana* Griseb. Cysteine peptidases. *Phytochemical Analysis*. 9: 267-273.
20. Arroyo-Reyna, A.; Hernández-Arena, A. 1995. The thermal denaturation of stem bromelain is consistent with an irreversible two-state model. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1248: 123-128.
21. Asada, K. 1999. The water-water cycle in chloroplasts: Scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. *Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 50: 601-639.
22. Ashraf, M.; Akram, N.A.; Arteca, R.N.; Foolad, M.R. 2010. The physiological, biochemical and molecular roles of brassinosteroids and salicylic acid in plant processes and salt tolerance. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 29(3): 162-190.
23. Aspino, S.; Horn, S.; Eijsink, V. 2005. Enzymatic hydrolysis of atlantic cod (*Gadus morhua* L.) viscera. *Process Biochemistry*. 40(5): 1957-1966.

24. Assis, T.F.; Teixeira, S.L. 1998. Enraizamento de plantas leñosas. En: Torres, A.C; Caldas, L.S.; Buso, J.A. (eds.) Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas. Embrapa-SPI/CNPQ. Brasilia, Brazil. pp. 261-296.
25. Avilés, X.; Guasch, A.; Vendrell, J. 1994. Activación de precursores de proteínas. Research Bulletin. 100(210): 74-81.
26. Awang, M.; Razak, O. 1978. Proteolytic activity of locally prepared pineapple bromelain. Research Bulletin. 6(2): 165-171.
27. Azarkan, M.; Wintjens, R.; Looze, Y.; Baeyens-Volant, D. 2004. Detection of three wound-induced proteins in papaya latex. Phytochemistry. 65: 525-534.
28. Azcon-Bieto, J.; Talon, M. 1993. Fisiología y bioquímica vegetal. McGraw-Hill Interamericana, España. pp 537-553.
29. Bailey, A.; Light, N. 1989. Connective tissue. En: Bayley, A. (ed.) Meat and meat products. Elsevier Science Publishers Ltd, London. pp. 213-214.
30. Ban, T.; Kugishima, M.; Ogata, T.; Shiozaki, S.; Horiuchi, S.; Ueda, H. 2007. Effect of ethephon (2-chloroethylphosphonic acid) on the fruitripening characters of rabbiteye blueberry. Scientia Horticulturae. 112(3): 278-281.
31. Barboza, S.B.; Caldas, L.S.; Souza, L.A. 2004. Micropropagation of pineapple hybrid PExSC-52 and cultivar Smooth Cayenne. Pesquisa Agropecuária Brasileira. 39 (8): 725-733.
32. Barrett, A. 1989. Proteolytic enzymes: Nomenclature and classification. En: Beynot, R.; Bond, J. (eds.) Proteolytic Enzymes. A Practical Approach. Oxford University Press, Oxford. pp. 13-39.
33. Barrett, A.; Rawlings, N.D.; Woessner, J.F. 1998. Handbook of Proteolytic Enzymes. Academic Press, London. pp. 546-555.
34. Barrett, A.; Rawlings, N.D.; O'Brien, E.A. 2001. The MEROPS database as a protease information system. Journal of Structural Biology. 134: 95-102.
35. Barrett, A.; Rawlings, N.D.; Woessner, J.F. 2004. Handbook of Proteolytic Enzymes. Academic Press, Amsterdam. pp 1368-1379.
36. Batkin, S.; Taussig, S.; Szekerezes, R. 1998. Modulation of pulmonary metastases (Lewis Lung carcinoma) by bromelain an extract of the pineapple stems (*Ananas comosus*). Cancer Investigation. 241-242.
37. Be, L.; Debergh, P. 2006. Potential low-cost micropropagation of pineapple (*Ananas comosus*). South African Journal of Botany. 72: 191-194.

38. Beers, E.P.; Woffenden, B.J.; Zhao, C. 2000. Plant proteolytic enzymes: Possible roles during programmed cell death. *Plant Molecular Biology*. 44: 399-415.
39. Beers, E.P.; Jones, A.M.; Dickermann, A.W. 2004. The S8 serine, C1A cysteine and A1 aspartic protease families in *Arabidopsis*. *Phytochemistry*. 65: 43-58.
40. Bennett, B. 2000. Ethnobotany of Bromeliaceae. En: Benzing, D.H. (ed.) *Bromeliaceae: Profile of an adaptation*. Cambridge University Press, Cambridge. pp. 587-608.
41. Benucci, I.; Garzillo, A.; Esti, M. 2011. Bromelain from pineapple stem in alcoholic-acidic buffers for wine application. *Food Chemistry*. 124: 1349-1353.
42. Benzing, D. 1970. Germination and early establishment of *Tillandsia circinnata* Schelecht, (Bromeliaceae) on some of its hosts and other supports in Southern Florida. *Selbyana*. 5(1): 95-106.
43. Berazaín, R.; Areces, F.; Lazcano, J.; González, L. 2005. Lista roja de la flora vascular cubana. Jardín Botánico Atlántico, Gijón, España. pp. 1-86.
44. Beuth, J. 2008. Proteolytic enzyme therapy in evidence-based complementary oncology: fact or fiction? *Integrative Cancer Therapy*. 7(4): 311-316.
45. Bhui, K.; Tyagi, S.; Prakash, B.; Shukla, Y. 2010. Pineapple bromelain induces autophagy, facilitating apoptotic response in mammary carcinoma cells. *Biofactors*. 36: 474-482.
46. Blakesley, D. 1991. Uptake and metabolism of 6-benzyladenine in shoot cultures of *Musa* and *Rhododendron*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 25: 69-74.
47. Boller, T. 1986. Roles of proteolytic enzymes in interactions of plants with other organisms in plant proteolytic enzymes. En: Dalling, M. J. (ed.) *Plant proteolytic enzymes*. CRC Press, Boca Raton, Florida. pp. 67-96.
48. Borroto, J.; Coll, J.; Rivas, M.; Blanco, M.; Concepción, O.; Tandrón, Y.; Hernández, M.; Trujillo, R. 2008. Anthraquinones from *in vitro* root culture of *Morinda royoc* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 94: 181-187.
49. Borroto, J.; Salazar, R.; Pérez, A.; Quiros, Y.; Hernández, M.; Waksman, N.; Trujillo, R. 2010. Antimicrobial activity of the dichloromethane extract from *in vitro* cultured roots of *Morinda royoc* L. and its main constituents. *Natural Products Communications*. 5(5): 809-810.
50. Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of submicrogram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72: 248-254.

51. Brien, S.; Lewith, G.; Walker, A.; Hicks, S.M.; Middleton, D. 2004. Bromelain as a treatment for osteoarthritis: A review of clinical studies. *Evidence-Based Complementary Alternative Medicine*. 1(3): 251–257.
52. Bruno, M.A.; Pardo, M.F.; Caffini, N.O.; López, L.M. 2003. Hieronymain I, a new cysteine peptidase isolated from unripe fruits of *Bromelia hieronymii* Mez (Bromeliaceae). *Journal of Protein Chemistry*. 22(2): 127-138.
53. Bruno, M.A.; Trejo, S.A.; Avilés, X.F.; Caffini, N.O.; López, L.M. 2006. Isolation and characterization of hieronymain II, another peptidase isolated from fruits of *Bromelia hieronymii* Mez (Bromeliaceae). *Protein Journal*. 25(3): 224-231.
54. Bruno, M.A.; Trejo, S.A.; Caffini, N.O.; López, L.M. 2008. Purification and characterization of hieronymain III. Comparison with other proteases previously isolated from *Bromelia hieronymii* Mez. *Protein Journal*. 27: 426-433.
55. Buchanan, B.B.; Gruissen, W.; Jones, R.L. 2000. *Biochemistry and molecular biology of plants*. American Society of Plant Physiologists Rockville, MD. pp. 75-82.
56. Buchanan–Wollaston, V.; Page, T.; Harrison, E.; Breeze, E.; Lim, P.O.; Nam, H.G.; Lin, J.F.; Wu, S.H.; Swidsinski, J.; Ishizaki, K.; Leaver, C.J. 2005. Comparative transcriptome analysis reveals significant differences in gene expression and signaling pathways between developmental and dark/starvation–induced senescence in *Arabidopsis*. *Plant Journal*. 42: 567–585.
57. Büchert, A.M.; Civello, P.M.; Martínez, G.A. 2011. Chlorophyllase versus pheophytinase as candidates for chlorophyll dephytilation during senescence of broccoli. *Plant Physiology*. 168(4): 337-343.
58. Buttazzoni, M.S.; Caffini, N.O.; Natalucci, C.L.; Priolo, N.S. 1984. Proteasas de Bromeliaceae I. Estudio preliminar de la fracción proteolíticamente activa presente en frutos de *Bromelia laciniosa* Mart. *Acta Farmacéutica Bonaerense*. 3(1): 33–38.
59. Caboni, E.; D’Angeli, D.; Chiappetta, A.; Innocenti, A.M.; Van Onckelen, H.; Damiano, C. 2002. Adventitious shoot regeneration from vegetative shoot apices in pear and putative role of cytokinin accumulation in the morphogenetic process. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 70: 199-206.
60. Cabral, H.; Leopoldino, A.; Tajara, E.; Greene, L.; Faca, V.; Mateus, R.; Ceron, C.; de Souza, W.; Julianod, L.; Bonilla-Rodriguez, G.O. 2006. Preliminary functional

- characterization, cloning and primary sequence of fastuosain, a cysteine peptidase isolated from fruits of *Bromelia fastuosa*. Protein Peptide Letter. 13(1): 83-89.
61. Caffini, N.O.; Natalucci, C.L.; Priolo, N.S.; Buttazzoni, M.S. 1988. Proteasas de Bromeliaceae. Aislamiento de una fitoproteasa sulfhídrica presente en frutos de *Bromelia serra* Griseb. Acta Farmacéutica Bonaerense. 7(1): 9-14.
  62. Campos, R. 2010. Caracterización morfo-anatómica foliar de cuatro representantes de la subfamilia Bromelioideae (Bromeliaceae) en Cuba. Tesis de diploma. 50 p.
  63. Cândido, M.S.D. 1995. Chave artificial para o gênero *Cryptanthus*. Revista da Sociedade Brasileira de Bromélias. 2: 15-21.
  64. Cândido, M.S.D. 1996. Cultivando *Cryptanthus*. Revista da Sociedade Brasileira de Bromélias. 3: 33-37.
  65. Capote, I.; Escalona, M.; Daquinta, M.; Pina, D.; González, J.; Aragón, C. 2009. Propagación *in vitro* de *Vriesea* en sistemas de inmersión temporal. Biotecnología Vegetal. 9(3): 161-167.
  66. Carneiro, L.A.; Cândido, M.S.; Araújo, R.F.; Fonseca, M.H.; Crocomo, O.J.; Mansur, E. 1998. Clonal propagation of *Cryptanthus sinuosus* L.B. Smith, an endemic stoloniferous Bromeliaceae species from Rio de Janeiro, Brazil. Plant Tissue Culture and Biotechnology. 4: 152-158.
  67. Carneiro, L.; Araújo, R.; Brito, G.; Fonseca, M.; Costa, A.; Crocomo, O.J.; Mansur, E. 1999. *In vitro* regeneration from leaf explants of *Neoregelia cruenta* (R. Graham) L.B. Smith, an endemic bromeliad from eastern Brazil. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 55: 79-83.
  68. Carrijo, O.A.; Vidal, M.; Reis, N.; Souza, R.B.; Makishima, N. 2004. Produtividade do tomateiro em diferentes substratos e modelos de casas de vegetação. Horticultura Brasileira. 22(1): 5-9.
  69. Carter, C.; Marriage, H.; Goodenough, P. 2000. Mutagenesis and kinetic studies of a plant cysteine proteinase with an unusual arrangement of acidic amino acids in and around the active site. Biochemistry. 39: 11005-11013.
  70. Cercos, M.; Santamaria, S.; Carbonell, J. 1999. Cloning and characterization of TPE4A, a thiol-protease gene induced during ovary senescence and seed germination in pea. Plant Physiology. 119: 1341-1348.

71. Cervantes, E.; Rodriguez, A.; Nicolas, G. 1994. Ethylene regulates the expression of a cysteine protease gene during germination of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Plant Molecular Biology*. 25: 207-215.
72. Chandler, D.S.; Mynott, T.L. 1998. Bromelain protects piglets from diarrhoea caused by oral challenge with K88 positive enterotoxigenic *Escherichia coli*. *GUT*. 43(2): 196-202.
73. Chávez, M.; Díaz, J.; Delfin, J.; Pérez, U. 1990. Temas de Enzimología. ENPES, La Habana. pp. 25-261.
74. Chávez, M., Díaz, J., Delfin, J. 2002. Enzimología. Principios básicos y aplicados. Editorial Goudelias, Buenos Aires. pp. 220-259.
75. Chen, G.H.; Huang, L.T.; Yap, M.N.; Lee, R.H.; Huang, Y.J.; Cheng, M.C.; Chen, S.C. 2002. Molecular characterization of a senescence associated gene encoding cysteine proteinase and its gene expression during leaf senescence in sweet potato. *Plant Cell Physiology*. 43: 984-991.
76. Chen, H.; Tsai, Y.; Chen, W.; Huang, G.; Huang, S.; Lin, Y. 2010. Ethephon-mediated effects on leaf senescence are affected by reduced glutathione and EGTA in sweet potato detached leaves. *Botanical Studies*. 51: 171-181.
77. Chobotova, K.; Vernallis, A.; Majid, F. 2009. Bromelain's activity and potential as an anti-cancer agent: Current evidence and perspectives. *Cancer Letters*. 290: 148-156.
78. Chow, B.; McCourt, P. 2006. Plant hormone receptors: Perception is everything. *Genes and Development*. 20: 1992-2008.
79. Coelho, R.; Kika, N.; Vieira, M.; Louzada, R.; Pavan, F.R.; Queico, C.; Lima, C.A. 2010. Chemical composition and antioxidant and antimycobacterial activities of *Bromelia balansae* (Bromeliaceae). *Journal of Medicinal Food*. 13(5): 1277-1280.
80. Coffani Nunes, J.V. 2002. Bromeias. En: Simones, L.L.; Lino, C.F. (eds.) *Sustentavel Mata Atlantica: A exploração de seus recursos florestais*. SENAC, Sao Paulo, Brazil. pp. 119-132.
81. Company listing. 2005. Flora culture international [on-line]. Bromeliaceae family [visitado Enero, 2006]. Disponible en URL: <http://www.floracultureintl.com/sourcebook.asp.html>.
82. Coppens d'Éeckenbrugge, G.; Leal, F. 2003. Morphology, anatomy and taxonomy. En: Bartholomew, D.P.; Paull, R.E. and Rohrbarch, K.G. (eds.) *The Pineapple: Botany, Production and Uses*. CAB International, New York, USA. pp. 13-32.

83. Corrons, M.; Bertucci, J.; Liggieri, C.; López, L.; Bruno, M. 2012. Milk clotting activity and production of bioactive peptides from when using *Maclura pomifera* proteases. LWT-Food Science and Technology. 47: 103-109.
84. Couvillon, G. 1998. Rooting responses to different treatments. Acta Horticulturae. 227: 187-196.
85. Dal Vesco, L.L.; Pinto, A.A.; Safari, G.R.; Nodari, R.O.; Reis, M.S.; Guerra, M.P. 2001. Improving pineapple micropropagation protocol through explant size and medium composition manipulation. Fruits. 3: 143-154.
86. Dal Vesco, L.; Guerra, M. 2010. *In vitro* morphogenesis and adventitious shoot mass regeneration of *Vriesea reitzii* from nodular cultures. Scientia Horticulturae. 125: 748-755.
87. Dal Vesco, L.; Stefenon, V.; Welter, L.; Scherer, R.; Guerra, M. 2011. Induction and scale-up of *Billbergia zebrina* nodule cluster cultures: Implications for mass propagation, improvement and conservation. Scientia Horticulturae. 128: 515-522.
88. Dal Vesco, L.; Stefenon, V.; Welter, L.; Steiner, N.; Guerra, M. 2012. Conservation of *Billbergia zebrina* genetic resources: AFLP polymorphism of *in vitro* regenerated genotypes. Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization. 10(1): 20-23.
89. Daley, L.; Vines, M. 1978. Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.) leaf proteinase. Plant Science Letters. 11: 56-67.
90. Danso, K.; Ayeh, K.; Oduro, V.; Amiteye, S.; Amoatey, H. 2008. Effect of 6-benzylaminopurine and naphthalene acetic acid on *in vitro* production of MD2 pineapple planting materials. World Applied Sciences Journal. 3(4): 614-619.
91. Daquinta, M.; Benegas, R. 1997. Brief review of tissue culture of pineapple. Pineapple News. 3: 7-9.
92. Daquinta, M.; Espinosa, P.; Escalona, M.; Rodríguez, R.; Guerra, M. 2001. Bromeliad micropropagation in Temporary Immersion System. Journal of the Bromeliad Society. 51(2): 80-85.
93. Davey, M.R.; Sripaoraya, S.; Anthony, P.; Lowe, K.C.; Power, J.B. 2007. Pineapple. En: Pua, E.C.; Davey, M.R. (eds.) Biotechnology in agriculture and forestry. Transgenic crops V. Springer-Verlag, Berlin, Germany. pp. 98-127.
94. De Proft, M.P.; Mekers, O.; Jacobs, L.; De Greef, J.A. 1986. Influence of light and flowering inducing chemicals on the quality of the Bromeliaceae inflorescence. Acta Horticulturae. 181: 141-146.

95. Debergh, P.; Harbaoui, Y.; Lemeur. 1981. Mass propagation of globe artichoke (*Cynara scolymus*) evaluation of different hypotheses to overcome vitrification with special reference to water potential. *Physiology Plant*. 53: 181-187.
96. Debergh, P.; Topoonyanont, G.; Van Huylenbroeck, J.; Moreira da Silva H.; Oyaert, E. 2000. Preparation of microplants for *ex vitro* establishment. *Acta Horticulturae*. 530: 181-185.
97. Del Río, L.A.; Pastori, G.M.; Palma, J.M.; Sandalio, L.M.; Sevilla, F.; Corpas, F.J.; Jiménez, A.; López-Huertas, E.; Hernández, J.A. 1998. The activated oxygen role of peroxisomes in senescence. *Plant Physiology*. 116: 1195-1200.
98. Demidyuk, I.; Shubin, A.; Gasanov, E.; Kostrov, S. 2010. Propeptides as modulators of functional activity of proteases. *Biomolecular Concepts*. 1: 305-322.
99. Devaraj, K.B.; Lalitha Gowda, R.; Prakash, V. 2008. An unusual thermostable aspartic protease from the latex of *Ficus racemosa* (L.). *Phytochemistry*. 69: 647-655.
100. Dhillon W.; Mahajan, B. 2011. Ethylene and ethephon induced fruit ripening in pear. *Journal of Stored Products and Postharvest Research*. 2(3): 45-51.
101. Distefano, S.; Palma, J.M.; Gómez, M.; del Río, L.A. 1997. Characterization of endoproteases from plant peroxisomes. *Biochemistry Journal*. 327: 399-405.
102. Domsalla, A.; Melzig, M. 2008. Occurrence and Properties of proteases in plant lattices. *Planta Medica*. 74: 699-711.
103. Donnelly, D.; Vidaver, W. 1984. Pigment content and gas exchange of red raspberry *in vitro* and *ex vitro*. *Journal of American Society Horticultural Science*. 109: 177-181.
104. Droste, A.; da Silva, A.M.; Matos, A.V.; Almeida, J.W. 2005. *In vitro* culture of *Vriesea gigantea* and *Vriesea philippocoburgii*: two vulnerable bromeliads native to Southern Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 48(5): 717-722.
105. Duarte, A.; Rosa, N.; Duarte, E.; Pires, E.; Barros, M. 2007. Cardosins: A new and efficient plant enzymatic tool to dissociate neuronal cells for the establishment of cell cultures. *Biotechnology and Bioengineering*. 97: 991-996.
106. Duarte, P.; Pissarra, J.; Moore, I. 2008. Processing and trafficking of a single isoform of the aspartic proteinase cardosin A on the vacuolar pathway. *Planta*. 227: 1255-1268.
107. Duarte, P.; Coelho, V.; Ferreira, L.; Paiva, R.; Pasqual, M. 2009. *In vitro* propagation of *Nidularium fulgens* Lemaire. *Interciencia*. 34(8): 593-596.
108. Dubey, V.K.; Pande, M.; Singh, B.K.; Jagannadham, M.V. 2007. Papain-like proteases: Applications of their inhibitors. *African Journal of Biotechnology*. 6(9): 1077-1086.

109. Dukovski, D.; Bernatzky, R.; Han, S. 2006. Flowering induction of *Guzmania* by ethylene. *Scientia Horticulturae*. 110: 104-108.
110. Dunn, B. 1989. Protease mechanism. En: Beynon, R.; Bond, J. (eds.) *Proteolytic Enzymes. A practical approach*. Oxford University Press, Oxford. pp. 57-79.
111. Eason, J.R.; Ryan, D.J.; Pinkney, T.T.; O'Donoghue, E.M. 2002. Programmed cell death during flower senescence: Isolation and characterization of cysteine proteases from *Sandersonia aurantiaca*. *Functional Plant Biology*. 29: 1055-1064.
112. Eckardt, N. 2009. A new chlorophyll degradation pathway. *The Plant Cell*. 21(3): 700.
113. Edman, P. 1949. A method for the determination of the amino acid sequence in peptides. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 22: 475-480.
114. Esteban-García, B.; Garrido-Cardenas, J.A.; Lopez-Alonso, D.; Garcia-Maroto, F. 2010. A distinct subfamily of papainlike cysteine proteinases regulated by senescence and stresses in *Glycine max*. *Journal of Plant Physiology*. 167: 1101-1108.
115. Feijoo-Siota, L.; Villa T. 2011. Native and biotechnologically engineered plant proteases with industrial applications. *Food Bioprocess Technology*. 4: 1066-1088.
116. Fernández, G.; Pomilio, A.B. 2003. Optimized growth conditions and determination of catalytic type of the peptidase complex from a novel callus culture of pineapple (*Ananas comosus*). *Molecular Medicinal Chemistry*. 1: 39-49.
117. Ferreira, C.; Paiva, P.; Rodrigues, T.; Ramos, D.; Carvalho, J.; Paiva, R. 2007. Desenvolvimento de mudas de bromélia (*Neoregelia cruenta* (R. Graham) L. B. Smith) cultivadas em diferentes substratos e adubação foliar. *Ciencia e Agrotecnologia*. 31: 666-671.
118. Finni, C.; Andersen, B.; Shaphiri, A.; Svensson, B. 2011. Proteome of the barley aleurone layer: a model system for plant signalling and protein secretion. *Proteomics*. 11: 1595-1605.
119. Fiorani, F.; Bogemann, G.; Visser, E.; Lambers, H.; Voesenek, L. 2002. Ethylene emission and responsiveness to applied ethylene vary among poa species that inherently differ in leaf elongation rates. *Plant Physiology*. 129: 1382-1390.
120. Fischer, A.; Feller, U. 1994. Senescence and protein degradation in leaf segment of young winter wheat: Influence of leaf age. *Journal of Experimental Botany*. 45: 103-109.
121. Fisher, J.; Becker, C.; Hillmer, S.; Horstmann, C.; Neubohn, B.; Schlereth, A.; Senyuk, V.; Shutov, A.; Muntz, K. 2000. The families of papain and legumain-like cysteine proteinases

- from embryonic axes and cotyledons of *Vicia* seeds: developmental patterns, intercellular localization and functions in globulin proteolysis. *Plant Molecular Biology*. 43: 83-101.
122. Fitzhugh, D.; Shan, S.; Dewhirst, M.; Hale, L. 2008. Bromelain treatment decreases neutrophil migration to sites of inflammation. *Clinical Immunology*. 128(1): 66-74.
123. Foda, Y.; Bassiouny, S.; Abdalla, M.; Shehata, M. 1980. Studies on the effect of meat tenderizers on some chemical constituents of canned and buffalo meats. *Mesopotamian Journal of Agriculture*. 15(1): 93-111.
124. Foyer, C.H.; Noctor, G. 2000. Oxygen processing in photosynthesis: Regulation and signalling. *New Phytology*. 146: 359-388.
125. Freitas, C.; Oliveira, J.; Miranda, M.; Macedo, N.; Sales, M.; Villas-Boas, L.; Ramos, M. 2007. Enzymatic activities and protein profile of latex from *Calotropis procera*. *Plant Physiology and Biochemistry*. 45: 781-789.
126. Fukuda, H. 1997. Programmed cell death during vascular system formation. *Cell Death and Differentiation*. 4: 684-688.
127. García, D.; Vidigal, F.; Pelacani, C.; da Silva, A.; da Silva, C.; Ferreira, J. 2009. Micropropagation and in vitro conservation of *Neoglaziovia variegata* (Arr. Cam.) Mez, a fiber producing bromeliad from Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 52(4): 923-932.
128. Gavira, J.A.; González-Ramírez, L.A.; Oliver-Salvador, M.C.; Soriano-García, M.; García-Ruiz, J. M. 2007. Structure of the mexicain-E-64 complex and comparison with other cysteine proteases of the papain family. *Acta of Crystallography*. 63: 555-563.
129. Ge, T.; Sui, F.; Bai, L.; Lu, Y.; Zhou, G. 2006. Effects of water stress on the protective enzyme activities and lipid peroxidation in roots and leaves of summer maize. *Agricultural Science China*. 5: 291-298.
130. George, E.F.; Hall, M.A.; De Klerk, G.J. 2008. *Plant propagation by tissue culture*. 3rd edition. Springer, Dordrecht, The Netherlands. pp. 29-227.
131. Gepstein, S.; Thimann, K.V. 1981. The role of ethylene in the senescence of oat leaves. *Plant Physiology*. 68: 349-354.
132. González, H.; Fontenla, J. 2007. Biodiversidad y conservación. En: González, H. (ed.) *Biodiversidad de Cuba*. Ediciones Polymita S.A., La Habana. pp. 290-309.
133. González-Rábade, N.; Badillo-Corona, J.; Aranda-Barradas, J.; Oliver-Salvador, M. 2011. Production of plant proteases *in vivo* and *in vitro*. *Biotechnology Advances*. 29:983-996.

134. Good, N.E.; Izawa, S. 1972. Hydrogen ion tampons. *Methods Enzymology*. 24: 53-68.
135. Govrin, E.; Levine, A. 1999. Purification of active cysteine proteases by affinity chromatography with attached E-64 inhibitor. *Protein Expression and Purification*. 15: 247-250.
136. Gradzka, I. 2006. Mechanisms and regulation of the programmed cell death. *Postepy Biochemii*. 52(2): 157-165.
137. Gray, W.M. 2004. Hormonal regulation of plant growth and development. *PLoS Biology*. 2: 311.
138. Gregersen, P.L.; Holm, P.B.; Krupinska, K. 2008. Leaf senescence and nutrient remobilisation in barley and wheat. *Plant Biology (Stuttg)*. 1: 37-49.
139. Grudkowska, M.; Zagdanska, B. 2004. Multifunctional role of plant cysteine proteinases. *Acta Biochimica Polonica*. 51(3): 609-624.
140. Grzonka, Z.; Jankowska, E.; Kasprzykowski F.; Kasprzykowska, R.; Lankiewicz, L.; Wiczak, W.; Wieczerek, E.; Ciarkowski, J.; Drabik, P.; Janowski, R.; Kozak, M.; Jaskólski, M.; Grubb, A. 2001. Structural studies of cysteine proteases and their inhibitors. *Acta Biochimica Polonica*. 48(1): 1-20.
141. Guan-Hong, C.; Chia-Ping, L.; Shu-Chen, G.C.; Long-Chi, W. 2012. Role of *Arabidopsis* a-fifteen in regulating leaf senescence involves response to reactive oxygen species and is dependent on ethylene insensitive. *Journal of Experimental Botany*. 63(1): 275-292.
142. Guerra, M.; Dal Vesco, L.; Pescador, R.; Schuelter, A.; Nodari, R. 1999. Establishment of a regenerative protocol for the pineapple micropropagation. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*. 34: 1557-1563.
143. Guerra, M.; Dal Vesco, L. 2010. Strategies for the Micropropagation of Bromeliads. En: Jain, S.M.; Ochatt, S.J. (eds.) *Protocols for in vitro propagation of ornamental plants: Methods in molecular biology*. Humana Press, New York. pp. 47-66.
144. Guimarães-Ferreira, C.A.; Rodrigues, E.G.; Mortara, R.A.; Cabral, H.; Serrano, F.A.; Ribeiro-dos-Santos, R.; Travassos, L.R. 2007. Antitumor effects *in vitro* and *in vivo* and mechanisms of protection against melanoma B16F10-Nex2 cells by fastuosain, a cysteine proteinase from *Bromelia fastuosa*. *Neoplasia*. 9: 723-733.
145. Hale, L.; Greer, P.; Trinh, C.; James, C. 2005. Proteinase activity and stability of natural bromelain preparations. *International Immunopharmacology*. 4: 255-264.

146. Hamad, A.M.; Taha, R.M. 2008a. The effect of different hormones and incubation on *in vitro* proliferation of pineapple (*Ananas comosus* L.) Merr. cv. Smooth Cayenne shoot-tip culture. Pakistan Journal of Biological Science. 11(3): 386-391.
147. Hamad, A.M.; Taha, R.M. 2008b. Effect of sequential subcultures on *in vitro* proliferation capacity and shoot formations pattern of pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.) over different incubation periods. Scientia Horticulturae. 117: 329-334.
148. Hammerton, R.; Ho, T. 1986. Hormonal regulation of the development of protease and carboxypeptidase activities in barley aleurone layers. Plant Physiology. 80: 692-697.
149. Haq, S.; Rasheedi, S.; Khan, R. 2002. Characterization of a partially folded intermediate of stem bromelain at low pH. European Journal of Biochemistry. 269(1): 47-52.
150. Harrach, T.; Eckert, K.; Schulze, F.; Nuck, R.; Grunow, D.; Maurer, H. 1995. Isolation and partial characterization of basic proteinases from stem bromelain. Journal of Protein Chemistry. 14: 41-52.
151. Harrach, T.; Eckert, K.; Maurer, H.; Macheleidt, I.; Nuck, R. 1998. Isolation and characterization of two forms of an acid bromelain stem proteinase. Journal of Protein Chemistry. 17: 51-61.
152. Heath, R.L.; Packer, J. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplast: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Archives of Biochemistry and Biophysics. 125: 189-198.
153. Hernández Arana, A.; Rodríguez Romero, A.; Cruz-Victoria, M.T.; Del Castillo, L.M. 1983. Proteinases of mexican plants. Structure relationships and taxonomy. Revista Latinoamericana de Química. 14: 95-98.
154. Hernández, M.; Chávez, M.; Márquez, M.; Rodríguez, G.; Santos, R.; González, J.; Carvajal, C. 1997. Proceso de obtención de bromelina a partir de tallos de piña. Patente Cubana C12 N9/50.
155. Hernández, M.; Carvajal, C.; Santos, R.; Márquez, M.; Blanco, M.; González, J.; Chávez, M. 1999. Purification alternatives of obtained bromelain from different sources. Pineapple News. 6: 5.
156. Hernández, M.; Chávez, M.; Báez, R.; Carvajal, C.; Márquez, M.; Morris, H.; Santos, R.; González, J.; Rodríguez, C. 2003. Nueva Tecnología para la obtención de bromelina de tallos de piña (*Ananas comosus* (L.) Merr). Biotecnología Aplicada. 20(3): 180-182.

157. Hernández, M.; Pérez, A.; Lorenzo, J.; Carvajal, C.; Mora, M.; Natalucci, C.; Jorrín, J. 2009. Proteases expressed in response to *in vitro* culture of pineapple. *Pineapple News*. 16: 15.
158. Heyll, U.; Munnich, U.; Senger, V. 2003. Proteolytic enzymes as an alternative in comparison with nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAID) in the treatment of degenerative and inflammatory rheumatic disease. *Systematic Review Med Klin*. 98(11): 609-615.
159. Holenarasipura, V.; Shivaprasad, H.; Rajaiah, R.; Frey, B.; Frey, F.; Vishwanath, B. 2010. Pergularain e I a plant cysteine protease with thrombin-like activity from *Pergularia extensa* latex. *Thrombosis Research*. 125: 100-105.
160. Hopkins, M.; Taylor, C.; Liu, Z.; Ma, F.; McNamara, L.; Wang, T.; Thompson, J. 2007. Regulation and execution of molecular disassembly and catabolism during senescence. *New Phytology*. 175: 201-214.
161. Hörtensteiner, S. 2006. Chlorophyll degradation during senescence. *Annual Review of Plant Biology*. 57: 55-77.
162. Hörtensteiner, S.; Kräutler, B. 2011. Chlorophyll breakdown in higher plants. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1807(8): 977-988.
163. Hosoki, T.; Asahira, T. 1980. *In vitro* propagation in liquid culture. *HortScience*. 5: 603-604.
164. Huffaker, R.C. 1990. Proteolytic activity during senescence of plants. *New Phytology*. 116: 199-231.
165. Hunter, D.A.; Steele, B.C.; Reid, M.S. 2002. Identification of genes associated with perianth senescence in daffodil (*Narcissus pseudonarcissus* L. 'Dutch Master'). *Plant Science*. 163: 13-21.
166. Ishida, H.; Shimizu, S.; Makino, A.; Mae, T. 1998. Light-dependent fragmentation of the large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in chloroplasts isolated from wheat leaves. *Planta*. 204: 305-309.
167. Izquierdo, Y.; Pérez-Alonso, N.; Jiménez, E. 2010. Metabolismo de cardenólidos y transformación genética de *Digitalis*. *Potencialidades y retos. Biotecnología Vegetal*. 10(3): 131-140.
168. Jacobs, A.; Dry, I.; Robinson, S. 1999. Induction of different pathogenesis-related cDNAs in grapevine infected with powdery mildew and treated with ethephon. *Plant Pathology*. 48: 325-336.

169. Jaenicke, R.; Bohm, G. 1998. The stability of proteins in extreme environments. *Current Opinion in Structural Biology*. 8: 738-748.
170. Jaleel, C.A.; Riadh, K.; Gopi, R.; Manivannan, P.; Inés, J.; AI-Juburi, H.J.; Zhao, C.X.; Shao, H.B.; Rajaram, P. 2009. Antioxidant defense responses: Physiological plasticity in higher plants under abiotic constraints. *Acta Physiologiae Plantarum*. 31: 427-436.
171. Jing, H.; Schippers, J.; Hille, J.; Dijkwel, P. 2005. Ethylene-induced leaf senescence depends on age-related changes and old genes in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*. 56(421): 2915-2923.
172. Jinka, R.; Ramakrishna, V.; Rao S.K.; Rao, R.P. 2009. Purification and characterization of cysteine protease from germinating cotyledons of horse gram. *BMC Biochemistry*. 10: 28-35.
173. Jones, J.B.; Murashige, T. 1974. Tissue culture propagation of *Aechmea fasciata* and other bromeliaes. *Proceeding of International Plant Propagators Society*. 24: 117-126.
174. Jones, M.L.; Larsen, P.B.; Woodson, W.R. 1995. Ethylene-regulated expression of a carnation cysteine protease during flower petal senescence. *Plant Molecular Biology*. 28: 505-512.
175. Jones, M.L. 2004. Changes in gene expression during senescence. En: Nooden, L. (ed.) *Plant cell death processes*. Elsevier Science, San Diego. pp. 51-72.
176. Jones, M.L.; Chaffin, G.S.; Eason, J.R.; Clark, D.G. 2005. Ethylene-sensitivity regulates proteolytic activity and cysteine protease gene expression in petunia corollas. *Journal of Experimental Botany*. 56(420): 2733-2744.
177. Jones, B.L. 2005. Endoproteases of barley and malt. *Journal of Cereal Science*. 42(2): 139-156.
178. Kane, S.; Goldberg, M.J. 2000. Use of bromelain for mild ulcerative colitis. *Annals of Internal Medicine*. 132(8): 680.
179. Karnchanatat, A.; Tiengburanatam, N.; Boonmee, A.; Puthong, S.; Sangvanich, P. 2011. Zingipain, A cysteine protease from *Zingiber ottensii* Valetton rhizomes with antiproliferative activities against fungi and human malignant cell lines. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*. 41(2): 138-53.
180. Kaschani, F.; Shabab, M.; Bozkurt, T.; Shindo, T.; Schornack, S.; Gu, C.; Ilyas, M.; Win, J.; Kamoun, S.; Van der Hoorn, R. 2010. An effector-targeted protease contributes to defense

- against *Phytophthora* infestans and is under diversifying selection in natural hosts. *Plant Physiology*. 154: 1794-1804.
181. Kasche, V. 2001. Proteases in peptide synthesis. En: Beynon, R.; Bond, J.S. (eds.) *Proteolytic enzymes, a practical approach*. 2<sup>nd</sup> Edition. Oxford University Press, Oxford. pp. 312-320.
182. Kaushal, S.; Pal, A.; Sane, A.; Nath, P. 2009. Transcriptional activation of a 37 kDa ethylene responsive cysteine protease gene, RbCP1, is associated with protein degradation during petal abscission in rose. *Journal of Experimental Botany*. 60(7): 2035-2044.
183. Kelly, G. 1996. Bromelain: A literature review and discussion of its therapeutic applications. *Alternative Medicine Review*. 1(4): 405-410.
184. Kihara, M.; Kakegawa, H.; Matano, Y.; Murata, E.; Tsuge, H.; Kido, H.; Katunuma, N. 2002. Chondroitin sulfate proteoglycan is a potent enhancer in the processing of procathepsin L. *The Journal of Biological Chemistry*. 383: 1925-1929.
185. Knudson, L. 1946. A new nutrient solution for the germination of orchid seed. *American Orchid Society Bulletin*. 15:214-217.
186. Konno, K. 2011. Plant latex and other exudates as plant defense systems: roles of various defense chemicals and proteins contained therein. *Phytochemistry*. 72: 1510-1530.
187. Kozai, T.; Jeon, B.R.; Kubota, C.H.; Murai, Y. 1995. Effects of volume and initial strength of medium on the growth. Photosynthesis and ion uptake of potato (*Solanum tuberosum* L.) plantlets *in vitro*. *Journal of Japanese Society Horticultural Science*. 64(1): 63-71.
188. Kukulczanka, K.; Czastka, B. 1989. Propagation of some species of the Bromeliaceae family cultured *in vitro*. *Acta Horticulturae*. 251: 167-172.
189. Kyndt, T.; Van Damme, E.J.M.; Van Beeumen, J.; Gheysen, G. 2007. Purification and characterization of the cysteine proteinases in the latex of *Vasconcellea* spp. *FEBS Journal*. 274: 451-462.
190. Laemmli, U. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature*. 237: 680-685.
191. Landgraf, P.; Paiva, P. 2009. Produção de mudas para jardim no estado de Minas Gerais. *Ciência e Agrotecnologia*. 33: 127-131.
192. Lawrie, R. 1985. *Meat Science*. Pergamon Press, London. pp. 195-197.
193. Leary, D.; Vierros, M.; Hamon, G.; Arico, S.; Monagle, C. 2009. Marine genetic resources: a review of scientific and commercial interest. *Marine Policy*. 33: 183-194.

194. Lee, N.; Wetzstein, Y.; Sommer, H. 1985. Effect of quantum flux density on photosynthesis and chloroplast ultrastructure in tissue-cultured plantlets and seedlings of *Liquidambar styraciflua* (L.) towards improved acclimatization and field survival. *Plant Physiology*. 78: 637-641.
195. Lehninger, A.L.; Nelson, D.L.; Cox, M. 2005. *Principios de Bioquímica*. 4<sup>ta</sup> Edición. Ediciones Omega, Barcelona. pp. 19-283.
196. Lerslerwong, L.; Ketsa, S.; Van Doorn, W.G. 2009. Protein degradation and peptidase activity during petal senescence in *Dendrobium* cv. Khao Sanan. *Postharvest Biology and Technology*. 52: 84-90.
197. Leshem, Y. 1988. Plant senescence processes and free radicals. *Free Radical Biology and Medicine*. 5: 39-49.
198. Liggieri, C.; Obregón, W.; Trejo, S.; Priolo, N. 2009. Biochemical analysis of a papain-like protease isolated from the latex of *Asclepias curassavica* L. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*. 41(2): 154-162.
199. Lim, P.O.; Kim, H.; Nam, H. 2007. Leaf senescence. *Annual Review of Plant Biology*. 58: 115-136.
200. Lin, S.; Ren, H. 2005. Tissue Culture and Rapid Propagation of *Vriesea poelanii*. *Forestry Science and Technology*. DOI: cnki:ISSN:1006-4427.0.2005-01-003.
201. Lin, C.Y.; Yeh, D.M. 2008. Potassium nutrition affects leaf growth, anatomy, and macroelements of *Guzmania*. *HortScience*. 43:146-148.
202. Lopes, A.L.; Henz, E.T.; Bortoluzzi, E.; Arzivenko, J.P. 2008. Micropropagation of *Dyckia maritima* Baker: Bromeliaceae. *Iheringia Serie Botánica*. 63(1): 135-138.
203. Lopes, A.L.; Henz, E.T.; Bortoluzzi, E.; Reichert, C.L.; Quoirin M. 2009. In vitro multiplication of *Vriesea scalaris* E. Morren (Bromeliaceae). *Iheringia Serie Botánica*. 64(2): 151-156.
204. López, L.M.I.; Sequeiros, C.; Natalucci, C.L.; Brullo, A.; Maras, B.; Barra, D.; Caffini, N.O. 2000. Purification and characterization of macrodontan I, a cysteine peptidase from unripe fruits of *Pseudananas macrodontes* (Morr.) Harms (Bromeliaceae). *Protein Expression and Purification*. 18(2): 133-140.
205. López, L.M.I.; Sequeiros, C.; Trejo, S.A.; Pardo, M.F.; Caffini, N.O.; Natalucci, C.L. 2001. Comparison of two cysteine endopeptidases from *Pseudananas macrodontes* (Morr.) Harms (Bromeliaceae). *The Journal of Biological Chemistry*. 382: 875-878.

206. Lotz, W. 1991. On the pharmacology of bromelain: an update with special regard to animal studies on dose dependent effects. *Planta Medica*. 56(3): 249-253.
207. Luther, H.E. 2008. An alphabetic list of Bromeliad binomials. The Marie Selby Botanical Gardens. 11<sup>rd</sup> Edition. Sarasota, Bromeliad Society International, Florida. 110 p.
208. Maehashi, K.; Matsuzaki, M.; Yamamoto, Y.; Udaka, S. 1999. Isolation of peptides from enzymatic hydrolysate of food proteins and characterization of their taste properties. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 63(3): 555-559.
209. Margesin, R.; Neuner, G.; Storey, K.B. 2007. Cold-loving microbes, plants, and animals fundamental and applied aspects. *Naturwissenschaften*. 94(2): 77-99.
210. Martin, C.; Thimann, K. 1972. Role of protein synthesis in the senescence of leaves II. The influence of amino acids on senescence. *Plant Physiology*. 50: 432-437.
211. Martin, C. 1994. Physiological ecology of the Bromeliaceae. *The Botanical Review*. 60(1): 1-148.
212. Martínez, D.E.; Bartoli, C.G.; Grbic, V.; Guiamet, J.J. 2007. Vacuolar cysteine proteases of wheat (*Triticum aestivum* L.) are common to leaf senescence induced by different factors. *Journal of Experimental Botany*. 58:1099-1107.
213. Martínez, D.E.; Costa, M.L.; Guiamet, J.J. 2008. Senescence-associated degradation of chloroplast proteins inside and outside the organelle. *Plant Biology (Stuttg)*. 1: 15-22.
214. Martínez, M.; Rubio-Somoza, I.; Carbonero, P.; Díaz, I. 2003. A cathepsin B-like cysteine protease gene from *Hordeum vulgare* (gene CatB) induced by GA in aleurone cells is under circadian control in leaves. *Journal of Experimental Botany*. 54(384): 951-959.
215. Martínez, M.; Cambra, I.; Carrillo, L.; Diaz-Mendoza, M.; Diaz, I. 2009. Characterization of the entire cystatin gene family in barley and their target cathepsin L-like cysteine proteases, partners in the hordein mobilization during seed germination. *Plant Physiology*. 151: 1531-1545.
216. Matsumoto, K.; Mizoue, K.; Kitamura, K.; Tse, W.C.; Huber, C.P.; Ishida, T. 1999. Structural basis of inhibition of cysteine proteases by E-64 and its derivatives. *Biopolymers Peptide Science*. 51: 99-107.
217. McCord, J.; Fridovich, I. 1969. Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 244: 6049-6055.

218. McLellan, H.; Gilroy, E.; Yun, B.; Birch, P.; Loake, G. 2009. Functional redundancy in the *Arabidopsis* cathepsin B gene family contributes to basal defence, the hypersensitive response and senescence. *New Phytology*. 183: 408-418.
219. Medina, E. 1990. Boletín de la Academia Nacional de Ciencias. Córdoba, Argentina. pp. 10-26.
220. Meir, S.; Philosoph-Hadas, S.; Aarón, N. 1992. Ethylene-increased accumulation of fluorescent lipid-peroxidation products detected during senescence of parsley by a newly developed method. *Journal of America Society Horticultural Science*. 117(1): 128-132.
221. Ménard, R.; Plouffe, C.; Laflamme, P.; Vemet, T.; Tessier, D.C.; Thomas, D.Y.; Store, A.C. 1995. Modification of the electrostatic environment is tolerated in the oxyanion hole of the cysteine protease papain. *Biochemistry*. 34: 464-471.
222. Mercier, H.; Kerbauy, G.B. 1992. *In vitro* multiplication of *Vriesea fosteriana*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 30: 247-249.
223. Mercier, H.; Kerbauy, G. 1994. *In vitro* culture of *Vriesea hieroglyphica*, an endangered Bromeliad from the Brazilian Atlantic forest. *Journal of the Bromeliad Society*. 44 (3): 120-124.
224. Mercier, H.; Kerbauy, G.B. 1995. Importance of tissue culture technique for conservation of endangered Brazilian bromeliads from Atlantic rain forest canopy. *Selbyana*. 16(2): 147-149.
225. Mercier, H.; Kerbauy, G.B. 1997. Micropropagation of ornamental Bromeliads (Bromeliaceae). En: Bajaj, Y.P.S. (ed.) *Biotechnology in agriculture and forestry. High-Techology and Micropropagation VI*. Springer Verlag. pp. 43-57.
226. Michele, R.; Formentin, E.; Lo Schiavo, F. 2009. Legume leaf senescence. *Plant Signaling and Behavior*. 4(4): 319-320.
227. Mittler, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Science*. 7: 405-410.
228. Montes, C.; Amador, M.; Cuevas, D.; Córdoba, F. 1990. Subunit structure of karatasin, the proteinase isolated from *Bromelia plumieri* (karatas). *Agricultural Biology and Chemistry*. 54: 17-24.
229. Moore, G.A.; de Wald, M.G.; Evans, M.H. 1992. Micropropagation of pineapple (*Ananas comosus* L.). En: Bajaj, Y.P.S. (ed.) *Biotechnology in agriculture and forestry. High-tech and micropropagation*. Springer, Berlin Heidelberg, Germany. pp. 460-469.

230. Morcelle, S.; Trejo, S.; Canals, F.; Avilés, F.; Priolo, N. 2004. Funastrain c II: A cysteine endopeptidase purified from the latex of *Funastrum clausum*. The Protein Journal. 23(3): 205-215.
231. Morris, H.; Borges, L.; Martínez, C.; Carrillo, O. 2002. Aspectos bioquímicos de la intervención con un hidrolizado enzimático de *Chlorella vulgaris* durante la recuperación de la malnutrición proteico-energética en ratones Balb/c. Revista Cubana de Alimentación y Nutrición. 16(1): 5-12.
232. Morris, H.; Borges, L.; Martínez, C.; Carrillo, O. 2003. Restauración de la inmunocompetencia en ratones malnutridos con la administración de un hidrolizado de microalgas. Revista Cubana de Farmacia. 37(3): 1-10.
233. Morsya, M.R.; Jouveb, L.; Hausmanb, J.F.; Hoffmannb, L.; Stewart, J.M. 2007. Alteration of oxidative and carbohydrate metabolism under abiotic stress in two rice (*Oryza sativa* L.) genotypes contrasting in chilling tolerance. Journal of Plant Physiology. 164: 157-167.
234. Mosolov, V.; Grigoreva, L.I.; Valueva, T.A. 2001. Involvement of proteolytic enzymes and their inhibitors in plant protection. Applied Biochemistry and Microbiology. 37(2):115-123.
235. Müntz, K. 2007. Protein dynamics and proteolysis in plant vacuoles. Journal of Experimental Botany. 58(10): 2391-2407.
236. Murachi, T.; Yasui, M.; Yasuda, Y. 1964. Purification and physical characterization of stem bromelain. Biochemistry. 3(1): 48-55.
237. Murachi, T. 1970. Bromelain Enzymes. En: Perlmann, G.E.; Lorand, L. (eds.) Methods in enzymology XIX. Academic Press, New York. pp. 273-283.
238. Murashige, T.; Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiology Plant. 15: 473-497.
239. Mynott, T.L.; Crossett, B.; Prathalingam, S.R. 2002. Proteolytic Inhibition of *Salmonella enterica* Serovar *typhimurium*-induced activation of the mitogen-activated protein kinases ERK and JNK in cultured human intestinal cells. Infection and Immunity. 70(1): 86-95.
240. Nagarathnam, R.; Rengasamy, A.; Balasubramanian, R. 2010. Purification and properties of cysteine protease from rhizomes of *Curcuma longa* (Linn.). Journal of Science Food and Agriculture. 90(1): 97-105.
241. Napper, A.; Bennett, S.; Borowsk, M.; Holdridge, M.; Leonard, M.; Rogers, E.; Duan, Y.; Laursen, R.; Reinhold, B., Shames, S. 1994. Purification and characterization of the

- pineapple stem-derived cysteine proteinases: ananain and comasain. *Biochemistry Journal*. 301: 727-735.
242. Natalucci, C.L.; Brullo, A.; López, L.M.I.; Hilal, R.M.; Caffini, N.O. 1996. Macrodontin, a new protease isolated from fruits of *Pseudananas macrodentes* (Morr.) Harms (Bromeliaceae). *Journal of Food Biochemistry*. 19: 443-454.
243. Naves, V.C.; Paiva, P.D.; Paiva, R.; Pasqual, M.; Paiva, L.V. 2003. Avaliação de diferentes concentrações dos meios de cultura MS e Knudson para a propagação *in vitro* da bromélia imperial. *Revista Brasileira de Horticultura Ornamental*. 9: 161-166.
244. Neurath, H. 1993. Proteolytic enzymes. En: Avilés, F.X. (ed.) *Innovations in proteases and their inhibitors*. Walter de Gruyter, Berlin. pp. 3-12.
245. O'Farrell, P. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *Journal of Biological Chemistry*. 250: 4007-4021.
246. Obregón, W.; Liggieri, C.; Morcelle, S.; Trejo, S.; Avilés, F.X.; Priolo N.S. 2009a. Biochemical and PMF MALDI-TOF analysis of two novel papain-like plant proteinases. *Protein and Peptide Letters*. 16: 1323-1333.
247. Obregón, W.; Hernández, M.; Priolo N.S. 2009b. Métodos de obtención de proteínas vegetales. En: Caffini, N.O. (ed.) *Enzimas proteolíticas de vegetales superiores. Aplicaciones industriales*. Mariscal y Asociados, Buenos Aires. pp. 137-149.
248. Ochoa, N.; Agundis, C.; Córdoba, F. 1987. Isolation and partial characterization of *Bromelia hemisphaerica* protease by affinity chromatography. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*. 17(4): 337-341.
249. Ojeda, M.; Mogollón, N.; Pérez, M.; Maciel, N. 2007. Efecto del etefón (etileno) sobre la promoción floral de *Billbergia pyramidalis* (Sims) Lindley. *Bioagro*. 19(1): 11-17.
250. Onken, J.E.; Greer, P.; Calingaert, B.; Hale, L. 2008. Bromelain treatment decreases secretion of pro-inflammatory cytokines and chemokines by colon biopsies *in vitro*. *Clinical Immunology*. 126: 345-352.
251. Otsuki, N.; Dang, N.; Kumagai, E.; Kondo, A.; Iwata, S.; Morimoto, C. 2010. Aqueous extract of *Carica papaya* leaves exhibits anti-tumor activity and immunomodulatory effects. *Journal of Ethnopharmacology*. 127: 760-767.
252. Ougham, H.; Hörtensteiner, S.; Armstead, I.; Donnison, I.; King, I.; Thomas, H.; Mur, L. 2008. The control of chlorophyll catabolism and the status of yellowing as a biomarker of leaf senescence. *Plant Biology (Stuttg)*. 10: 4-14.

253. Ouzounidou, G.; Giannakoula, A.; Asfi, M.; Ilias, I. 2011. Differential responses of onion and garlic against plant growth regulators. *Pakistan Journal of Botany*. 43(4): 2051-2057.
254. Palma, J.M.; Sandalio, L.M.; Corpas, J.; Romero-Puertas, M.C.; McCarthy, I.; del Río, L.A. 2002. Plant proteases, protein degradation, and oxidative stress: Role of peroxisomes. *Plant Physiology and Biochemistry*. 40: 521-530.
255. Palma, J.M.; Jiménez, A.; Sandalio, L.M.; Corpas, F.J.; Lundqvist, M.; Gómez, M.; Sevilla, F.; del Río, L.A. 2006. Antioxidative enzymes from chloroplasts, mitochondria and peroxisomes during leaf senescence of nodulated pea plants. *Journal of Experimental Botany*. 57(8): 1747-1758.
256. Pardo, M.F.; López L.M.I.; Natalucci, C.L.; Caffini, N.O. 2000. Purification of balansain I, an endopeptidase from unripe fruits of *Bromelia balansae* Mez (Bromeliaceae). *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 48(9): 3795-3800.
257. Pardo, M.F.; López, L.M.I.; Caffini, N.O.; Natalucci, C.L. 2001. Properties of a milk clotting protease isolated from fruits of *Bromelia balansae* Mez. *Biological Chemistry*. 382: 871-874.
258. Parrott, D.L.; Martin, J.M.; Fischer, A.M. 2010. Analysis of barley (*Hordeum vulgare*) leaf senescence and protease gene expression: A family C1A cysteine protease is specifically induced under levels. conditions characterized by high carbohydrate, but low to moderate nitrogen. *New Phytology*. 187(2): 313-331.
259. Pascual, M.; Pereda, C.; Pérez, R. 1983. Inverse correlation between estrogens receptor and peroxidase activity in human mammary tumor. *Neoplasma*. 30: 611.
260. Pereira, F.; Pinto, J.E.; Rosado, L.; Rodrigues, H.; Bertolucci, S.; Lameira, O. 2008. Micropropagation of the fiber-rich Amazonian species *Ananas erectifolius* (Bromeliaceae). *HortScience*. 43(7): 2134-2137.
261. Pérez, C. 2003. Técnicas estadísticas con SPSS. Editorial Pearson Educación, S.A. Madrid. España. pp. 274-308.
262. Pérez, A.; Nápoles, L.; Lorenzo, J.C.; Hernández, M. 2003. Protease excretion during pineapple micropropagation in temporary immersion bioreactors. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*. 39: 311-315.
263. Pérez, A.; Nápoles, L.; Carvajal, C.; Hernández, M.; Lorenzo, J. 2004. Effect of sucrose, inorganic salts, inositol and thiamine on protease excretion during pineapple culture in temporary immersion bioreactors. *In Vitro Cellular and Development Biology-Plant*. 40: 311-316.

264. Pérez-Alonso, N.; Wilken, D.; Perth, A.; Jahn, A.; Nitzsche, H.; Kerns, G.; Capote-Pérez, A.; Jiménez, E. 2009. Cardiotonic glycosides from biomass of *Digitalis purpurea* L. cultured in temporary immersion systems. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 99: 151-156.
265. Perrin, Y.; Doumas, P.; Lardet, L.; Carron, M.P. 1997. Endogenous cytokinins and biochemical markers of rubber-tree (*Hevea brasiliensis*) clone rejuvenation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 47: 239-245.
266. Pickens, K.A.; Affolter, J.M.; Wetzstein, H.Y.; Wolf, J.H. 2003. Enhanced seed germination and seedling growth of *Tillandsia eizii* *in vitro*. *HortScience*. 38: 101-104.
267. Pickens, K.A.; Wolf, J.; Affolter, J.M.; Wetzstein, H.Y. 2006. Adventitious bud development and regeneration in *Tillandsia eizii*. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*. 42(4): 348-353.
268. Pierik, R.; Steegmans, H.H.; Hendriks, J. 1984. Vegetative propagation of *Nidularium fulgens* Lem *in vitro*. *Netherlands Journal of Agriculture Science*. 32: 101-106.
269. Pierik, R. 1990. Cultivo *in vitro* de plantas superiores. Ediciones Mundi-Prensa. pp. 57-80.
270. Pierik, R.; Sprenkles, P.A. 1991. Micropropagation of *Tillandsia cyanea*. *Journal of Bromeliad Society*. 41: 9-12.
271. Pierik, R.; Tholen, D.; Poorter, H.; Visser, E.; Voeselek, L. 2006. The janus face of ethylene: growth inhibition and stimulation. *Trends in Plant Sciences*. 11: 176-183.
272. Pompelli, M.F.; Guerra, M.P. 2005. Micropropagation enables the mass propagation and conservation of *Dyckia distachya* Hassler. *Crop Breeding Applied Biotechnology*. 5: 117-126.
273. Porras, R.J. 1991. Recent advances and re-assessments in chlorophyll extraction and assay procedures for terrestrial, aquatic and marine organisms including recalcitrant algae. En: Scheer, H. (ed.) *Chemistry of chlorophyll*. CRC Press Boca Raton, Florida. pp. 305-320.
274. Pospisilova, J.; Catsky, J.; Sesták, Z. 1997. Photosynthesis in plant cultivated *in vitro*. En: Passaraki, M. (ed.) *Handbook of photosynthesis*. Kluwer Academic Publishers, Netherland. pp. 525-540.
275. Preece, J.E.; Sutter, E. 1991. Acclimatization in micropropagated plants to the greenhouse and field. En: Debergh, P.; Zimmerman, C. (eds.) *Micropropagation Technology and Applications*. Kluwer Academic Publisher, Netherland. pp. 71-93.
276. Priolo, N.S.; Buttazzoni, M.S.; Caffini, N.O.; Natalucci, C.L. 1986. Proteasas de Bromeliaceae. Condiciones óptimas de acción, estabilidad y purificación de la proteasa aislada de frutos de *Bromelia laciniosa* Mart. *Acta Farmacéutica Bonaerense*. 5(3): 159-164.

277. Priolo, N.S.; Morcelle, S.M.; López, L.M.I.; Arribére, M.C.; Natalucci, C.L.; Caffini, N.O. 2000. Isolation and characterization of a cysteine protease from latex of *Araujia hortorum* fruits. *Journal of Protein Chemistry*. 19 (1): 39-49.
278. Proença, S.; Sajo, M. 2004. Estructura foliar de espécies de *Aechmea* Ruiz & Pav. (Bromeliaceae) do Estado de São Paulo, Brasil. *Acta Botánica Brasileira*. 18(2): 319-331.
279. Rauh, W. 1990. *The Bromeliad*. Lexicon Blandford, London, UK. 215 p.
280. Rawlings, N.; Barrett, A. 1993. Evolutionary families of peptidases. *Biochemistry Journal*. 290: 205-218.
281. Rawlings, N.; Barrett, A.; Bateman, A. 2010. MEROPS: The peptidase database. *Nucleic Acids Research*. 38: D227-233.
282. Rech Filho, A.; Dal Vesco, L.; Nodari, R.O.; Lischka, R.W.; Muller, C.V.; Guerra, M. 2005. Tissue culture for the conservation and mass propagation of *Vriesea reitzii* Leme and Costa, a bromeliad threatened of extinction from the Brazilian Atlantic Forest. *Biodiversity and Conservation*. 14: 1799-1808.
283. Rech Filho, A.; Dal Vesco, L.; Guerra, M. 2009. Adventitious shoots from nodule cluster cultures of *Vriesea reitzii*: an endemic and endangered bromeliad from atlantic forest. *Ciencia Rural*. 39(3): 909-912.
284. Ritonja, A.; Rowan, A.; Buttle, D.; Rawlings, N.; Turk, V.; Barrett, A. 1989. Stem bromelain: aminoacid sequence and implications for weak binding of cystatin. *FEBS Letters*. 247(2): 419-424.
285. Robinson, D.G.; Oliviusson, P.; Hinz, G. 2005. Protein sorting to the vacuoles of plants: A critical appraisal. *Traffic*. 6: 615-625.
286. Rookard, L.; Edmondson, O.; Greenwell, P. 2009. ABO reverse grouping: Effect of varying concentrations of the enzyme bromelain. *British Journal of Biomedical Science*. 66(2): 93-97.
287. Rosenberg, L.; Lapid, O.; Bogdanov-Berezovsky, A.; Glesinger, R.; Krieger, Y.; Silberstein, E. 2004. Safety and efficacy of a proteolytic enzyme for enzymatic burn débridement: A preliminary report. *Burns*. 30(8): 843-850.
288. Ross, J.J.; Reid, J.B. 2010. Evolution of growth-promoting plant hormones. *Functional Plant Biology*. 37: 795-805.
289. Rowan, A.; Buttle, D.; Barrett, A. 1988. Ananain. A novel proteinase found in pineapple plant. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 267(1): 262-270.

290. Rowan, A.; Buttle, D.; Barrett, A. 1990. The cysteine proteinases of the pineapple plant. *Biochemistry Journal*. 266: 869-875.
291. Rowan, A.; Buttle, D. 1994. Pineapple cysteine endopeptidases. *Methods in Enzymology*. 244: 555-568.
292. Rowan, A. 1998. Stem bromelain. En: Barrett, A.; Rawlings, N.; Woessner, J. (eds.) *Handbook of Proteolytic Enzymes*. Academic Press, London. UK. pp. 566-572.
293. Rubinstein, B. 2000. Regulation of cell death in flower petals. *Plant Molecular Biology*. 44: 303-318.
294. Rupachandra, L.; Premila, T.; Kunjeshwori, S. 2004. Purification and characterization of pineapple crown leaf thiol protease. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*. 34(1): 25-43.
295. Russian Academic Science. 1993. Bromelain production. Institute Biochemistry, Experimental Biology. Vilnius, inventors. SU Patents. 1804855.
296. Safarik, I.; Safarikova, M. 2004. Magnetic techniques for the isolation and purification of proteins and peptides. *Biomagnetic Research and Technology*. 2(7): 1-17.
297. Sajc, L.; Grubisic, D.; Novakovic, G.V. 2000. Bioreactors for plant engineering: An out for further research. *Biochemical Engineering Journal*. 4: 89-99.
298. Salas, C.; Gomes, M.; Hernandez, M.; Lopes, M. 2008. Plant cysteine proteinases: Evaluation of the pharmacological activity. *Phytochemistry*. 69: 2263-2269.
299. Salisbury, F.B.; Ross, C.W. 1992. *Fisiología Vegetal*. Wadsworth Publishing, California. pp. 652-759.
300. Salvesen, G.; Nagase, H. 2001. Inhibition of proteolytic enzymes. En: Beynon, R.; Bond, J.S. (eds.) *Proteolytic Enzymes*. Second Edition, Oxford University Press, Oxford. pp. 116-119.
301. Sánchez, J.; Daquinta, M.; Capote, I.; Teixeira, J. 2011. Shoot propagation of *Zantedeschia* spp. in TIS-effect of culture parameters on plant proliferation and quality. *Floriculture and Ornamental Biotechnology*. 5: 78-80.
302. Santner, A.; Calderon-Villalobos, L.; Estelle, M. 2009. Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth. *Nature Chemical Biology*. 5: 301-307.
303. Santos, D.; Tamaki, V.; Nievola, C. 2010. In vitro propagation of the ornamental bromeliad *Acanthostachys strobilacea* (Schult. f.) Klotzsch via nodal segments. *In Vitro Cellular and Development Biology-Plant*. DOI 10.1007/s11627-010-9325-4.

304. Sauget, J.S. 1946. La Flora de Cuba. Cultural S.A., La Habana. pp. 284-297.
305. Schaller, A. 2004. A cut above the rest: The regulatory function of plant proteases. *Planta*. 220(2): 183-197.
306. Schaller, G. 2012. Ethylene and the regulation of plant development. *BMC Biology*. 10: 9.
307. Schulte, K.; Barfuss, M.; Zizka G. 2009. Phylogeny of Bromelioideae (Bromeliaceae) inferred from nuclear and plastid DNA loci reveals the evolution of the tank habit within the subfamily. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 51: 327-339.
308. Shägger, H.; Von Jagow, G. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry*. 166: 368-379.
309. Sharma, A.; Kumari, M.; Jagannadham, M.V. 2009. Benghalensin, a highly stable serine protease from the latex of medicinal plant *Ficus benghalensis*. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 57(23): 11120-11126.
310. Sheokand, S.; Dahiya, P.; Vincent, J.L.; Brewin, N.J. 2005. Modified expression of cysteine protease affects seed germination, vegetative growth and nodule development in transgenic lines of *Medicago truncatula*. *Plant Science*. 169: 966-975.
311. Shi, C.; Xu, L.L. 2009. Characters of cysteine endopeptidases in wheat endosperm during seed germination and subsequent seedling growth. *Journal of Integrative Plant Biology*. 51: 52-57.
312. Silva, E.N.; Ferreira-Silva, S.L.; Fontenelea, A.V.; Ribeiro, R.V.; Viégasc, R.A.; Silveira, J.A.G. 2010. Photosynthetic changes and protective mechanisms against oxidative damage subjected to isolated and combined drought and heat stresses in *Jatropha curcas* plants. *Journal of Plant Physiology*. 167: 1157-1164.
313. Singh, V.K.; Patel, A.K.; Moir Medicherla, A.J.; Jagannadham, V. 2008. Indicain, a dimeric serine protease from *Morus indica* cv. K2. *Phytochemistry*. 69: 2110-2119.
314. Smart, C. 1994. Gene expression during leaf senescence. *New Phytology*. 126: 419-448.
315. Smith, L.B. 1934. Geographical evidence on the lines of evolution in the Bromeliaceae. *Botanische Jahrbucher*. 66: 446-448.
316. Smith, L.B.; Till, W. 1998. Bromeliaceae. En: Kubitzki, K. (ed.) *The families and genera of vascular plants*. Springer, Berlin, Germany. pp. 74-99.
317. Sreenivasulu, N.; Usadel, B.; Winter, A.; Radchuk, V.; Scholz, U.; Stein, N.; Weschke, W.; Strickert, M.; Close, T.J.; Stitt, M.; Graner, A.; Wobus, U. 2008. Barley grain maturation and

- germination: metabolic pathway and regulatory network commonalities and differences highlighted by new mapMan/PageMan profiling tools. *Plant Physiology*. 146: 1738-1758.
318. Stepek, G.; Buttle, D.J.; Duce, I.R.; Lowe, A.; Behnke, J.M. 2005. Assessment of the anthelmintic effect of natural plant cysteine proteinases against the gastrointestinal nematode, *Heligmosomoides polygyrus*, *in vitro*. *Parasitology*. 130(2): 203-211.
319. Suárez, M.F. 2004. Metacaspase-dependent programmed cell death is essential for plant embryogenesis. *Current Biology-Cell*. 14: 339-340.
320. Sullivan, G.A.; Calkins, C.R. 2010. Application of exogenous enzymes to beef muscle of high and low-connective tissue. *Meat Science*. 85: 730-734.
321. Suni, M.L.; Cano, A.; Vadillo, G. 2001. Ensayos preliminares de germinación en *Puya raimondii* Harms (Bromeliaceae). *Revista Peruana de Biología*. 8(1): 53-59.
322. Sussner, U.; Abel, G.; Schulte, R.; Kreis, W. 2004. Isolation and characterization of a cysteine protease (phytolacain G), from *Phytolacca americana* roots. *Planta Medica*. 70(10): 942-947.
323. Taiz, L.; Zeiger, E. 2006. *Fisiología Vegetal*. Publications de la Universitat Jaume, España. pp. 636-757.
324. Tamer, M.I.; Mavituna, F. 1996. Protease from callus and cell suspension cultures of *Onopordum turcicum* (Compositae). *Biotechnology Letters*. 18: 361-366.
325. Tang, B.; Xu, S.; Zou, X.; Zheng, Y.; Qiu, F. 2010. Changes of antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of waterlogging-tolerant and waterlogging-sensitive maize genotypes at seedling stage. *Agricultural Science in China*. 9(5): 651-661.
326. Tarré, E.; Mendes, B.; Mançano, A.; Alves, L.; Campostrini, R.; Mansur, E. 2007. Germinability after desiccation, storage and cryopreservation of seeds from endemic *Encholirium* Mart. ex Schult. & Schult. f. and *Dyckia* Schult. & Schult. f. species (Bromeliaceae). *Acta Botánica Brasileira*. 21(4): 777-783.
327. Theodorou, L.G.; Bieth, J.G.; Papamichael, E.M. 2007. The catalytic mode of cysteine proteinases of papain (C1) family. *Bioresource Technology*. 98(10): 1931-1939.
328. Thiede, B. 1997. Mass spectrometry in peptide and protein sequence analysis. En: Kamp, R.M.; Choull-Papadopoulou, T.; Witmann-Liebold, B. (eds.) *Protein structure analysis. Preparation, characterization, and microsequencing*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, Germany. pp. 279-293.

329. Thomson, A.; Miles, B.; Caygill, J.; Moore, D. 1980. Separation of protein from fluid. US Pat 4 318 990.
330. Tisseau, R. 1986. Valorisation de déchets de conserverie d' *Ananas*. Possibilités d' extraction de broméline. *Fruits*. 41(12): 703-708.
331. Toledo-Aceves, T.; Wolf, J. 2008. Germination and establishment of *Tillandsia eizii* (Bromeliaceae) in the canopy of an oak forest in Chiapas, Mexico. *Biotropica*. 40: 246-250.
332. Tomar, R.; Kumar, R.; Jaganadham, M.V. 2008. A stable serine protease, wrightin, from the latex of the plant *Wrightia tinctoria* (Roxb.) R.Br.: Purification and biochemical properties. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 56: 1479-1487.
333. Tomlinson, P.B. 1969. Conmeliales-Zingiberales. En: Metcalfe, C.R. (ed.) *Anatomy of the monocotyledons*. Oxford University Press, Oxford. pp. 193-294.
334. Torres, M.; Trejo, S.; Martin, M.; Natalucci, C.; Avilés, F.; López, L. 2010. Purification and characterization of a cysteine endopeptidase from *Vasconcellea quercifolia* A. St.-Hil. latex displaying high substrate specificity. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 58: 11027-11035.
335. Trejo, S.A.; López, L.M.I.; Cimino, C.V.; Caffini, N.O.; Natalucci, C.L. 2001. Purification and characterization of a new plant endopeptidase isolated from latex of *Asclepias fruticosa* L. (Asclepiadaceae). *Protein Chemistry*. 20(6): 469-477.
336. Turk, B.; Turk, V.; Turk, D. 1997. Structural and functional aspects of papain-like cysteine proteinases and their protein inhibitors. *Biological Chemistry*. 378: 141-150.
337. Turk, V.; Guncar, G.; Turk, D. 1999. Lysosomal cysteine proteinases: Structure and regulation. En: Turk, V. (ed.) *Proteases: New perspectives*. Basel, Switzerland. pp. 1-16.
338. Turnbull, C.; Sinclair, E.; Anderson, K.; Nissen, R.; Shorter, A.; Lanham, T. 1999. Routes of ethephon uptake in pineapple (*Ananas comosus*) and reasons for failure of flower induction. *Journal of Plant Growth Regulation*. 18: 145-152.
339. Uchikoba, T.; Yonezawa, H.; Shimada, M.; Kaneda, M. 1999. Melain G, a cysteine protease from green fruits of the bead tree, *Melia azedarach*: A protease aicted by specific amino acids at P3 position. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1430: 84-94.
340. Uchikoba, T.; Okubo, M.; Arima, K.; Yonezawa, H. 2002. Isolation and characterization of a cysteine protease of freesia corms. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 66(2): 448-452.

341. Ueda, T.; Seo, S.; Ohashi, Y.; Hashimoto, J. 2000. Circadian and senescence enhanced expression of a tobacco cysteine protease gene. *Plant Molecular Biology*. 44: 649-657.
342. Vairo Cavalli, S.; Silva, S.V.; Cimino, C.V.; Malcata, F.X.; Priolo, N. 2008. Hydrolysis of caprine and ovine milk proteins brought about by aspartic peptidases from *Silybum marianum* flowers. *Food Chemistry*. 106 (3): 997-1003.
343. Vallés, D.; Furtado, S.; Cantera, A.M. 2007. Characterization of new proteolytic enzymes from ripe fruits of *Bromelia antiacantha* Bertol. (Bromeliaceae). *Enzyme and Microbial Technology*. 40: 409-413.
344. Vallés, D.; Bruno, M.; López, L.; Caffini, N.; Cantera, A.M. 2008. Granulosain I, a cysteine protease isolated from ripe fruit of *Solanum granuloso-leprosum* (Solanaceae). *Protein Journal*. 27: 267-75.
345. Van de Poel, B.; Clusters, J.; De Prof, M.P. 2009. Determination of pineapple (*Ananas comosus*, MD-2 hybrid cultivar) plant maturity, the efficiency of flowering induction agents and the use of activated carbon. *Scientia Horticulturae*. 120: 58-63.
346. Van der Hoorn, R.A.L.; Jones, J.D.C. 2004. The plant proteolytic machinery and its role in defence. *Current Opinion in Plant Biology*. 7: 400-407.
347. Van der Hoorn, R.A.L. 2008. Plant proteases: From phenotypes to molecular mechanisms. *Annual Review of Plant Biology*. 59: 191-233.
348. Vásquez, D. 2003. Plantas útiles. *Sociedad y Naturaleza en Cuba I*. IES, Ciudad de La Habana. pp. 21-24.
349. Vera, P.; Conejero, V. 1988. Pathogenesis-related proteins of tomato. P69 as an alkaline endoprotease. *Plant Physiology*. 87: 58-63.
350. Vera, P.; Conejero, V. 1990. Effect of ethephon on protein degradation and the accumulation of 'Pathogenesis-Related' (PR) proteins in tomato leaf discs. *Plant Physiology*. 92: 227-233.
351. Vervaeke, R.; Wouters J.; Deroose, R.; De Proft, M.P. 2004a. Division of the germinative nucleus in cultured pollen tubes of the Bromeliaceae. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 76: 17-28.
352. Vervaeke, R.; Wouters, J.; Deroose, R.; De Proft., M.P. 2004b. Semi *in vitro* pollen tube growth of *Aechmea fasciata*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 75: 67-73.
353. Viestra, R.D. 1996. Proteolysis in plants: Mechanisms and functions. *Plant Molecular Biology*. 32: 275-302.

354. Voet, D.Y.; Voet, J.G. 1992. Bioquímica. Ediciones Omega, Barcelona. pp. 97-110.
355. Wagstaff, C.; Leverentz, M.; Griffiths, G.; Thomas, B.; Chanasut, U.; Stead, A.; Rogers, H. 2002. Cysteine protease gene expression and proteolytic activity during senescence of *Alstroemeria* petals. *Journal of Experimental Botany*. 53: 233-240.
356. Wall, B. 1988. Bromeliads. Cassell for The Royal Horticultural Society, New York, USA. pp. 50-64.
357. Wang, W.; Vignani, R.; Scali, M.; Cresta, M. 2006. A universal and rapid protocol for protein extraction from recalcitrant plant tissues for proteomic analysis. *Electrophoresis*. 27: 2782-2786.
358. Wang, J.; Zhao, M.; Zhao, Q.; Bao, Y.; Jiang, Y. 2007. Characterization of hydrolysates derived from enzymatic hydrolysis of wheat gluten. *Journal of Food Science*. 72(2): 103-107.
359. Warner, H.; Leopold, A. 1969. Ethylene evolution from 2-chloroethyl phosphonic acid. *Plant Physiology*. 44: 156-158.
360. Watanabe, H.; Abe, K.; Emori, Y.; Hosoyama, H.; Arai, S. 1991. Molecular cloning and gibberellin-induced expression of multiple cysteine proteinases of rice seeds (*Oryzains*) *The Journal of Biological Chemistry*. 266(25): 16897-16902.
361. Weaver, L.M.; Gan, S.; Quirino, B.; Amasino, R.M. 1998. A comparison of the expression patterns of several senescence-associated genes in response to stress and hormone treatment. *Plant Molecular Biology*. 37: 455-469.
362. Westergaard, J.L.; Hackbarth, C.; Treuhaft, M.W.; Roberts, R.C. 1980. Detection of proteinases in electrophoretograms of complex mixtures. *Journal of Immunological Methods*. 34(2): 167-175.
363. Wiederanders, B. 2003. Structure-function relationships in class CA1 cysteine peptidase propeptides. *Acta Biochimica Polonica*. 50(3): 691-713.
364. Wisniewski, K.; Zagdanska, B. 2001. Genotype-dependent proteolytic response of spring wheat to water deficiency. *Journal of Experimental Botany*. 52: 1455-1463.
365. Woltering, E.J. 2004. Death proteases come alive. *Trends in Plant Science*. 9(10): 469-472.
366. Xu, H.; Lu, Y.; Tang, S.; Song, F. 2011. Lipid peroxidation, antioxidant enzyme activity and osmotic adjustment changes in husk leaves of maize in black soils region of Northeast China. *African Journal of Agricultural Research*. 6(13): 3098-3102.

367. Yamamoto, H.; Tabata, M. 1989. Correlation of papain-like enzyme production with laticifer formation in somatic embryos of papaya. *Plant Cell Report*. 8: 251-254.
368. Yanes, E.; González, J.; Rodríguez, R. 2000. A technology of acclimatization of pineapple vitroplants. *Pineapple News*. 7: 24.
369. Yang, L.; Mickelson, S.; See, D.; Blake, T.; Fischer, A. 2004. Genetic analysis of the function of major leaf proteases in barley (*Hordeum vulgare* L.) nitrogen remobilization. *Journal of Experimental Botany*. 55(408): 2607-2616.
370. Yang, R.; Song, J.; Gu, Z.; Li, C. 2011. Partial purification and characterization of cysteine protease in wheat germ. *Journal of Science Food and Agriculture*. 91(13): 2437-2442.
371. Ye, Z.H.; Varner, J. 1996. Induction of cysteine and serine proteases during xylogenesis in *Zinnia elegans*. *Plant Molecular Biology*. 30(6): 1233-1246.
372. Zhang, M.; Wei, Z.; Chang, S.; Teng, M.; Gong, W. 2006. Crystal structure of a papain-fold protein without the catalytic residue: A novel member in the cysteine proteinase family. *Journal of Molecular Biology*. 358(1): 97-105.
373. Zhang, X.; Zhang, Z.; Li, J.; Wu, L.; Guo, J.; Ouyang, L.; Xia, Y.; Huang, X.; Pang, X. 2011. Correlation of leaf senescence and gene expression/activities of chlorophyll degradation enzymes in harvested chinese flowering cabbage (*Brassica rapa* var. parachinensis). *Journal of Plant Physiology*. 168(17): 2081-2087.
374. Zuraida, A.R.; Nurul-Shahnadz, A.H.; Harteeni, A.; Roowi, S.; Che-Radziah, C.M.Z.; Sreeramanan S. 2011. A novel approach for rapid micropropagation of maspine pineapple (*Ananas comosus* L.) shoots using liquid shake culture system. *African Journal of Biotechnology*. 10(19): 3859-3866.

## 8. ANEXOS

### Anexo 1: Características físico-químicas de los sustratos utilizados.

A) Composición química de la cachaza (100%) (Complejo Agroindustrial Azucarero Ciro Redondo, Ciego de Ávila).

Composición química		Valor
Calcio	CaO	224,32 mg/L
Potasio	K <sub>2</sub> O	108,86 mg/L
Fósforo	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	1107,90 mg/L
Materia orgánica		32,1%
C.E		1,04 mol/cm <sup>3</sup>
pH		7,8

B) Composición química de la zeolita (100%) (Yacimiento de Tasajeras, Santi Spíritus)

Composición química		%
Silicio	SiO <sub>2</sub>	66,20
Aluminio	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	11,20
Hierro	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	2,20
	FeO	0,30
Magnesio	MgO	0,60
Calcio	CaO	4,50
Sodio	Na <sub>2</sub> O	1,50
Potasio	K <sub>2</sub> O	1,30
Fósforo	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	0,07
Agua	H <sub>2</sub> O	4,70
Composición mineral		%
Clinoptilolita		40,00
Modernita		40,00
Otros (Calcita, cuarzo, feldespato)		20,00
Propiedades físicas		Valor
Tamaño de la partícula		0,01-1,0 mm
Densidad (δ)		0,37 g/cm <sup>3</sup>
Densidad de la fase sólida (γ)		1,77 g/cm <sup>3</sup>
Porosidad total (PT)		80,59 % vol.