



ESTABLECIMIENTO DE UN CULTIVO *IN VITRO* DE *Bromelia hemisphaerica*

^bErika Y. Cruz Laguna, ^bVíctor H. Tierrafría Pulido y ^aMa. Carmen Oliver Salvador. Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología del Instituto Politécnico Nacional. Av. Acueducto s/n, Col. Barrio la Laguna Ticomán, México, D. F., C. P. 07340. Fax 57296000 Ext. 56305, e-mail: coliver@acei.upibi.ipn.mx

Palabras clave: Cultivo de células, *Bromelia hemisphaerica*, proteasas

Introducción. El cultivo de células vegetales es una herramienta biotecnológica para la producción de una gran variedad de metabolitos de interés industrial, entre los que se encuentran las enzimas. Los frutos de *B. hemisphaerica* contienen enzimas proteolíticas que han demostrado tener aplicaciones en la industria alimentaria (1).

El objetivo de este trabajo fue establecer las condiciones de un cultivo de células en suspensión de *B. hemisphaerica*, como una fuente alterna para la producción de enzimas proteolíticas.

Metodología. Se observó la respuesta de *B. hemisphaerica* usando 12 formulaciones del medio Murashige y Skoog (MS) resultado de la combinación de 4 auxinas y 2 citocininas (cuadro1) (2). Se iniciaron los cultivos de callos a partir de cortes de hojas de plántulas germinadas en condiciones de asepsia de semillas de *B. hemisphaerica*. Los explantes se sembraron en los medios con agar al 0.6%, sometidos a fotoperiodo de 16 h y a 27°C. Los callos establecidos fueron transferidos a medios semisólidos frescos cada 15 días y después de 4 resiembras se pasaron al medio en suspensión, los cuales se iniciaron con un inóculo de aprox. 5% (PF/V) y cada semana se pasaron a medio fresco; se determinó la actividad proteolítica en los medios donde crecieron las células y la tasa de crecimiento. Estos cultivos se mantuvieron en agitación a 120 rpm.

Resultados y discusión. Se observó que la inducción de callos de *B. hemisphaerica*, fue favorecida por la combinación de auxinas y citocininas y el incremento en la relación auxinas/citocininas, aumentó la friabilidad de los mismos. Con 0.5 mg/L de auxinas y 0.25 mg/L de citocininas, se obtuvo respuesta en nueve de los doce medios probados (cuadro1), incluyendo inducción de callos, organogénesis y formación de raíces, mientras que la relación de auxinas/citocininas con la que se obtuvieron callos más friables fue de 7:1 (0.5 mg/L de auxinas y 0.07 mg/L citocininas) (Cuadro 1). El cuadro 2 muestra los resultados preliminares del efecto de la concentración de sacarosa en los cultivos en suspensión de *B. hemisphaerica*, indicando que no hubo un efecto marcado en el desarrollo de las células ni en la síntesis de las proteasas.

Cuadro 2. Efecto de la concentración de sacarosa en cultivos de células en suspensión de *B. hemisphaerica* en MS4 (Picloram 0.5 mg/L)

Sacarosa	tiempo	Sacarosa 3%	Sacarosa 4%
Células en suspensión (g PF)	Semana 1	4	3.5
	Semana 8	10	12
Actividad proteolítica total (UT)	Semana 1	3328	2695

	Semana 8	4560	5172

Con el incremento de la biomasa del cultivo de células en suspensión aumentó la actividad proteolítica (datos no mostrados), lo que sugiere que la producción de dichas enzimas está asociada al crecimiento. El tiempo de duplicación de *B. hemisphaerica* depende de la concentración y del tipo de auxina usada. Los mejores tiempos de duplicación fueron 0.26 y 0.21 (g PF/día) en los medios MS4 (picloram 0.5 mg/L) y MS12 (picloram 0.5 mg/L + BAP 0.07 mg/L).

Cuadro 1. Efecto de la concentración de los reguladores de crecimiento vegetal en la inducción de callos u órganos de *B. hemisphaerica*.

Medio MS	Reguladores de Crecimiento		Resultados		
	Auxinas	Citocininas	1mg/L de auxinas 0.25 mg/L de cinetina 0.25 mg/L de BAP	0.5 mg/L de auxinas 0.25 mg/L de cinetina 0.25 mg/L de BAP	0.5 mg/L de auxinas 0.07 mg/L de cinetina 0.07 mg/L de BAP
MS1	2, 4 -D	-	Callo	Callo	Callo
MS2	ANA	-	Oscurecimiento	Rafz	-
MS3	AIA	-	Oscurecimiento	Oscurecimiento	-
MS4	Picloram	-	Callo	Callo	Callo
MS5	2, 4 -D	Cinetina	Oscurecimiento	Callo	Callo
MS6	ANA	Cinetina	Oscurecimiento	Rafz	-
MS7	AIA	Cinetina	Oscurecimiento	Oscurecimiento	-
MS8	Picloram	Cinetina	Oscurecimiento	Callo	Callo
MS9	2, 4 -D	BAP	Oscurecimiento	Callo	Callo
MS10	ANA	BAP	Organogénesis	Organogénesis	Organogénesis
MS11	AIA	BAP	Oscurecimiento	Oscurecimiento	Oscurecimiento
MS12	Picloram	BAP	Callo	Callo	Callo

Conclusiones. 1) Las mejores condiciones para el cultivo de células de *B. hemisphaerica* y síntesis de proteasas fue con el medio MS completo en sales, con picloram o 2,4-D (0.5 mg/L), cinetina o BAP (0.07 mg/L) y fotoperiodo de 16 h. 2) Se demostró la producción de proteasas en los cultivos de células en suspensión y que estas son liberadas al medio de cultivo. 3) La concentración y el tipo de fitohormona influye