



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGRÍCOLAS**

---

---

**“CARACTERIZACIÓN DEL PROCESO DE SENESCENCIA DE  
LA FLOR DE *Tigridia pavonia* (L.f.) DC.”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE INGENIERO  
AGRÓNOMO EN FLORICULTURA**

**PRESENTA:**

**EMELI VANESSA PEREA LÓPEZ**

**(N° DE CUENTA: 15713, 15 GENERACIÓN)**

**ASESOR DE TESIS:**

**Dr. JOSÉ LUIS PIÑA ESCUTIA**

**CAMPUS UNIVERSITARIO “EL CERRILLO”, EL CERRILLO  
PIEDRAS BLANCAS, ESTADO DE MÉXICO. DICIEMBRE, 2020.**



# ÍNDICE

	Página
AGRADECIMIENTOS .....	i
DEDICATORIAS .....	ii
LISTA DE FIGURAS .....	vi
ABSTRACT .....	vii
RESUMEN.....	ix
I.INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA .....	3
2.1 Origen y distribución .....	3
2.2 Morfología.....	3
2.3 Importancia.....	3
2.3.1 Importancia ornamental.....	3
2.3.2 Importancia cultural.....	4
2.3.3 Importancia genética .....	4
2.3.4 Importancia económica .....	4
2.3.5 Importancia Ecológica.....	5
2.4 Senescencia .....	5
2.4.1 Definición .....	5
2.4.2 Clasificación.....	6
2.4.2.1 Senescencia foliar.....	6
2.4.2.2 Senescencia frutal .....	6
2.4.2.3 Senescencia floral.....	7
2.5 Proteasas.....	7
2.5.1 Definición .....	7
2.5.2 Clasificación.....	8
2.5.3 Sitio de acción.....	9
2.5.3.1 Exopeptidasas.....	9
2.5.3.2 Endopeptidasas .....	10
2.5.3.2.1 Serín proteasas .....	10

2.5.3.2.2 Cisteín proteasas .....	11
2.5.3.2.3 Metaloproteasas.....	11
2.5.3.2.4 Aspartil proteasas o proteasas ácidas. ....	11
2.6 Electroforesis .....	13
2.6.1 Definición .....	13
2.6.2 Electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)...	13
2.6.3 Factores que afectan la electroforesis .....	15
2.6.3.1 Campo eléctrico .....	15
2.6.3.2 Muestra.....	16
2.6.3.3 Tampón Durante una electroforesis. ....	16
III. HIPÓTESIS.....	17
IV. JUSTIFICACIÓN .....	18
V. OBJETIVOS.....	20
VI. MATERIALES Y MÉTODOS .....	21
6.1 Ubicación de la investigación.....	21
6.2 Material vegetal .....	21
6.3 Extracción y cuantificación de proteínas .....	22
6.4 Ensayo proteasa e identificación de proteínas. ....	22
6.5 Identificación de proteasas por LC-MS / MS .....	23
VII. RESULTADOS.....	24
VIII. DISCUSIÓN .....	28
IX. CONCLUSIÓN .....	31
X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	32

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b> Etapas de desarrollo de la flor y senescencia en <i>Tigridia pavonia</i> var. Dulce .....	21
<b>Figura 2.</b> Contenido total de proteínas y actividad total de la proteasa .....	25
<b>Figura 3.</b> Actividad en gel de proteasa en varias etapas .....	26
<b>Figura 4.</b> Efecto de inhibidores específicos de la proteasa en la actividad en gel de proteasas asociadas a la senescencia en varias etapas.....	28

## LISTA DE CUADROS

	<b>Página</b>
<b>Cuadro 1.</b> Sub-subclases de peptidasas según el sistema EC.....	9
<b>Cuadro 2.</b> Principales características de las endoproteasas. ....	12

## ABSTRACT

Petal senescence is considered a natural process of programmed cell death (PCD) of developmental (van Doorn and Woltering, 2008; Rogers, 2013; Mochizuki-Kawai *et al.*, 2015). Depending on the species, petal senescence is visibly shown by wilting or withering. Petal wilting is due to loss of turgor whereas withering is a color change and slow dehydration (van Doorn and Woltering, 2008).

Patterns of flower senescence can be classified based on differences in how ethylene is involved: ethylene dependent, ethylene independent and intermediate or mixed patterns of senescence (Shibuya *et al.*, 2016; Shibuya, 2018).

Although sufficient carbohydrate reserves may prevent sugar starvation and delay petal senescence (Woltering, 2019), this process is characterized by transient upregulation of numerous genes related to the remobilization of macromolecules in the senescent cell which is mainly due to autophagic processes in the vacuole, protein degradation in mitochondria, nuclei, cytoplasm; fatty acid breakdown in peroxisomes and nucleic acid degradation in nuclei (Shahri *et al.*, 2011).

The action of proteases during senescence has been suggested to be involved in senescence-related protein degradation which is one of the first cellular responses to senescence induction (Griffiths *et al.*, 2015; Gul *et al.*, 2015; Rabiza-Świder *et al.*, 2019). In plant genomes, serine-proteases and cysteine-proteases have been described as the most abundant enzymes associated with senescence in different plant species, whereas aspartic-, threonine- and metallo-proteases also participate in this physiological process, but their role has been less documented (Diaz-Mendoza *et al.*, 2016).

Among all, cysteine proteases are the most frequent (Batelli *et al.*, 2014). Many of them are involved with proteolytic physiological functions in plants, such as plant defense senescence, seed reserves mobilization besides senescence and flowering time (Martínez *et al.*, 2012). In ephemeral flowers as *Ipomoea nil* (L.) or *Hibiscus rosa-sinensis* (L.) flower senescence is regulated by proteases expression and ethylene plays no significant role (Shibuya *et al.*, 2009; Trivellini *et al.*, 2016).

*Tigridia pavonia* (L.f) DC also known as “Oceloxochitl” or “Tiger flower” is a Mexican native ornamental plant that display great variability in color and beauty of its ephemeral flowers (Piña-Escutia *et al.*, 2013; Arzate-Fernández *et al.*, 2015; Arroyo-Martínez *et al.*, 2017). Although their flower longevity consists of one day, flower production continues for up eight weeks, being excellent outdoor plant.

The study of flower senescence in this species is priority to Mexico (SNITT, 2016). So, breeding efforts focused to delay flower senescence could increase its exploitation as landscape plant or cut flower even. In a preliminary study it was observed that *Tigridia pavonia* (L.f) DC flower senescence was not affected by exposure to ethylene. In this investigation, we show that flower senescence in *T. pavonia* (L.f) DC is associated with proteolytic activity of several proteases in different floral tissues, and the expression of one of them (65 kDa) coincided with the beginning of the visible symptoms of senescence suggesting that it is involved in triggering flower senescence of this species.

## RESUMEN

La senescencia de pétalos se considera un proceso natural de muerte celular programada (PCD) de desarrollo (van Doorn y Woltering, 2008; Rogers, 2013; Mochizuki-Kawai *et al.*, 2015). Según la especie, la senescencia del pétalo se muestra visiblemente por medio de la marchitez o el marchitamiento. El marchitamiento del pétalo se debe a la pérdida de turgencia, mientras que la marchitez es un cambio de color y una lenta deshidratación (van Doorn y Woltering, 2008).

Los patrones de senescencia de flores se pueden clasificar en función de las diferencias en la forma en que participa el etileno: patrones de senescencia dependientes de etileno, independientes de etileno e intermediarios o mixtos (Shibuya *et al.*, 2016; Shibuya, 2018).

Aunque suficientes reservas de carbohidratos pueden prevenir la escasez de azúcares y retrasar la senescencia de los (Woltering, 2019), este proceso se caracteriza por la regulación ascendente transitoria de numerosos genes relacionados con la movilización de macromoléculas en la célula senescente, que se debe principalmente a procesos autofágicos en la vacuola, degradación de proteínas en las mitocondrias, en los núcleos y el citoplasma; descomposición de ácidos grasos en los peroxisomas y degradación de ácidos nucleicos en los núcleos (Shahri *et al.*, 2011).

Se ha sugerido que la acción de las proteasas durante la senescencia está implicada en la degradación de las proteínas relacionadas con ésta y es una de las primeras respuestas celulares a la inducción de la senescencia (Griffiths *et al.*, 2015; Gul *et al.*, 2015; Rabiza-Świder *et al.*, 2019). En genomas vegetales, las serin-proteasas y cisteín-proteasas han sido descritas como las enzimas más abundantes asociadas con la senescencia en diferentes especies de plantas, mientras que las aspártil-proteasas y metaloproteasas también participan en este proceso fisiológico, pero su papel ha sido menos documentado (Díaz-Mendoza *et al.*, 2016).

Entre todas, las cisteína proteasas son las más frecuentes (Batelli *et al.*, 2014). Muchos de ellos están involucrados con funciones fisiológicas proteolíticas en las plantas, como la senescencia de defensa de las plantas, la movilización de reservas de semillas además de la senescencia y el tiempo de floración (Martínez *et al.*, 2012). En flores efímeras como *Ipomoea nil* (L.) o *Hibiscus rosa-sinensis* (L.), la senescencia de las flores está regulada por la expresión de proteasas y el etileno no juega un papel significativo (Shibuya *et al.*, 2009; Trivellini *et al.*, 2016).

*Tigridia pavonia* (L.f) DC también conocida como "Oceloxochitl" o "Flor de tigre" es una planta ornamental nativa mexicana de gran variabilidad en el color y belleza de su flor (Piña-Escutia *et al.*, 2013; Arzate-Fernández *et al.*, 2015; Arroyo-Martínez *et al.*, 2017). Aunque la longevidad de su flor se limita a un día, la producción de flores continúa durante ocho semanas, siendo una excelente planta para exterior.

El estudio de la senescencia de las flores en esta especie es prioritario para México (SNITT, 2016). Por lo tanto, los esfuerzos de mejoramiento enfocados para retrasar la senescencia de la flor podrían aumentar su explotación como planta de paisaje o incluso flor cortada. Por lo tanto, los esfuerzos de mejoramiento enfocados para retrasar la senescencia de la flor podrían aumentar su explotación como planta de paisaje o incluso flor cortada. En un estudio preliminar se observó que la senescencia de la flor de *Tigridia pavonia* (L.f) DC no se vio afectada por la exposición al etileno. En esta investigación, mostramos que la senescencia de la flor en *T. pavonia* (L.f) DC se asocia con la actividad proteolítica de varias proteasas en diferentes tejidos florales, y la expresión de uno de ellos (65 kDa) coincidió con el comienzo de los síntomas visibles de la senescencia sugiriendo que está involucrado en desencadenar la senescencia de flores de esta especie.



## I.INTRODUCCIÓN

México es considerado como uno de los países con mayor biodiversidad, pero con limitado aprovechamiento de esta. En el caso de ornamentales, casi el 90% de las especies comercializadas en nuestro país son introducidas y sólo el 10% restante son especies nativas. *Tigridia pavonia* (L.f) DC, es un atractivo recurso florícola con una importante demanda en el mercado como planta ornamental para jardines y macetería. (Leszczyńska-Borys *et al.*, 1995). Sin embargo, su explotación como flor de corte se ve limitada por la rápida senescencia de la flor, pues las flores abren en la mañana y cierran en la tarde del mismo día.

La senescencia en plantas se ha definido como una forma de muerte celular programada (PCD) (Rubinstein, 2000). Durante la senescencia de flores, señales del desarrollo, hormonales, y estímulos medioambientales, originan la sobrerregulación de genes que codifican enzimas hidrolíticas envueltas en el rompimiento y relocalización de componentes celulares (Jones, 2004). Una vez iniciado el proceso, éste continúa irreversiblemente dando lugar a la abscisión floral, marchitamiento, o ambos (Rogers, 2006).

En genomas vegetales, las serin-proteasas y cisteín-proteasas han sido descritas como las enzimas más abundantes asociadas con la senescencia en diferentes especies de plantas, mientras que las aspártico-proteasas y metaloproteasas también participan en este proceso fisiológico, pero su papel ha sido menos documentado (Díaz-Mendoza *et al.*, 2016). Así mismo, se ha reportado que en flores efímeras como *Ipomoea nil* (L.) o *Hibiscus rosa-sinensis* (L.), la senescencia floral está regulada por la expresión de proteasas y que el etileno no juega un papel significativo (Shibuya *et al.*, 2009; Trivellini *et al.*, 2016). Dentro de este marco cabe conocer si la senescencia de la flor de *T. pavonia* (L.f.) DC está relacionada con la actividad proteolítica de distintas proteasas.

El objetivo de esta investigación es caracterizar de forma molecular el proceso de senescencia de la flor de *T.pavonia* (L.f) DC.

Lo anterior permite inferir la importancia de comprender los mecanismos bioquímicos y moleculares de la senescencia floral de *Tigridia pavonia* (L.f) DC como una estrategia inicial en el desarrollo de programas de mejoramiento genético que permitan una mayor longevidad y puedan ofrecer una alternativa al productor del Estado de México y del país.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 Origen y distribución

*Tigridia pavonia* (L.f) DC, es una especie nativa de México que se puede encontrar en forma silvestre, en bosque de encino, jardines de traspatio y al lado de terrenos de cultivo, y aún en proceso de domesticación, en toda la República Mexicana (Molseed, 1970). México es considerado como el centro de mayor diversidad genética de esta especie, a nivel nacional se ubica en 18 estados, y en nuestra Entidad Federativa se localiza en 22 municipios (Vázquez-García *et al.*, 2010).

### 2.2 Morfología

Es una planta herbácea perenne, de 30 a 150 cm de alto, bulbo ovoide con escamas de color café oscuro; tallos robustos con numerosas hojas basales y de una a numerosas hojas caulinares más cortas que las de la base; brácteas florales de 6 a 12 cm; las flores pueden ser de color rosa, rojo, anaranjado, amarillo o blanco con manchas en el centro; tres tépalos externos más grandes que los tres internos; anteras lineares, erectas o curvadas; cápsulas maduras, cilíndricas y semillas piriformes (Vázquez *et al.*, 2011b).

### 2.3 Importancia

#### 2.3.1 Importancia ornamental

La importancia del género *Tigridia* en México radica en que debido a su colorido y morfología las convierte en plantas susceptibles de aprovechamiento ornamental,

como es el caso de *T. pavonia* (L.f) DC, que es una especie de amplia distribución y que se ha utilizado en algunos jardines de traspatio como planta ornamental, evidentemente extraída de su hábitat natural (Vázquez, 2011).

### **2.3.2 Importancia cultural**

Esta planta se encuentra mencionada en los comentarios botánicos del Códice Cruz-Badiano, y en el Códice Florentino aparece un dibujo hecho por tlacuilos, pero no es sino en la Historia Natural de la Nueva España de Francisco Hernández, donde se hace por primera vez la descripción de la planta y sus usos alimenticios y medicinales (Vázquez *et al.*, 2001a).

En México, el oceloxóchitl o flor de tigre *T. pavonia* (L.f) DC fue de gran importancia entre los guerreros aztecas debido a la belleza de sus flores, las cuales eran utilizadas en la elaboración de coronas y guirnaldas honoríficas (Hernández, 1995).

### **2.3.3 Importancia genética**

Las *Tigridias*, al igual que otras plantas silvestres de México, son una fuente de riqueza genética de valor incalculable, además de su valor histórico como parte de las culturas del centro del país. Por esta razón hoy en día forma parte del programa de conservación y aprovechamiento de especies ornamentales nativas de México (Gámez-Montiel *et al.*, 2017).

### **2.3.4 Importancia económica**

En la actualidad, el colorido de su flor, su morfología, así como la abundante variabilidad de colores, hacen de esta especie un atractivo recurso florícola, como planta ornamental para jardines y macetería (Leszczyńska-Borys *et al.*, 1995).

*T. pavonia* (L.f) DC es la única especie de las 40 existentes en México que ha entrado a la horticultura ornamental y forma parte de las plantas que se venden en algunos países, como es el caso de Japón. En México no existen datos de producción para esta especie (Vázquez, 2011).

### **2.3.5 Importancia Ecológica**

Es difícil encontrar en México un tipo de vegetación que el hombre no haya alterado, en ese sentido, las 40 especies de *Tigridia* que se ubican en nuestro país se localizan en diferentes tipos de hábitats donde la alteración del ambiente natural ha modificado sus poblaciones; sólo en pocos casos [*T. pavonia* (L.f) DC, *T. meleagris* (G.) y *T. ehrenbergii* (Schltdl.)] ello ha favorecido su desarrollo, por lo que se les conoce como especies colonizadoras. En la mayoría de las *Tigridias* las poblaciones tienden a disminuir de acuerdo en la medida que se alteran sus condiciones naturales. Así, son importantes los estudios ecológicos tendientes a conocer la situación actual de las poblaciones de cada una de las especies de *Tigridia* y el impacto que ha causado el hombre en su hábitat, para sí realizar acciones que lleven a su conservación y uso racional (Vázquez, 2011).

## **2.4 Senescencia**

### **2.4.1 Definición**

Definimos la senescencia como un proceso de desmantelamiento celular, que finaliza con la muerte de células, tejidos u órganos. Así mismo, se acepta como definición de senescencia los procesos progresivos y de deterioro que preceden a la muerte de una célula madura, órgano u planta entera (Wareing y Phillips, 1971; Beevers 1976; Thimann *et al.*, 1982).

## **2.4.2 Clasificación**

La senescencia se puede diferenciar según el tejido en el que tenga lugar, a saber;

- Foliar: Cuando una hoja deja de ser fotosintéticamente rentable, suele iniciarse su proceso de senescencia
- Frutal: El proceso de maduración del fruto requiere la senescencia de parte de sus tejidos, especialmente en frutos carnosos.
- Floral: Una vez ha tenido lugar la antesis y la polinización, los estambres, la corola, los pétalos, tépalos y los sépalos inician su proceso de senescencia. (Muerte celular programada, 2020).

### **2.4.2.1 Senescencia foliar**

La senescencia de las hojas se caracteriza por la caída de la tasa de fotosíntesis, desintegración de la estructura de los organelos, pérdida de clorofila y proteínas, daño oxidativo acumulativo, incremento de la actividad proteolítica y de poligalacturonasas, aparición de estructuras de autofagia, permeabilización de las membranas y pérdida de estructura tisular normal (Buchanan-Wollaston & Ainsworth, 1997; Yamada *et al*/2003; Hoeberichts *et al.*, 2005; Shibuya *et al.*, 2009).

### **2.4.2.2 Senescencia frutal**

El proceso de maduración del fruto requiere la senescencia de parte de sus tejidos, especialmente en frutos carnosos (Muerte celular programada, 2020).

### **2.4.2.3 Senescencia floral**

La senescencia de pétalos [tépalos, sépalos, estambres y gineceo], se considera un proceso natural de muerte celular programada (PCD) de desarrollo (Van Doorn y Woltering, 2008; Rogers, 2013; Mochizuki-Kawai *et al.*, 2015). Dependiendo de la especie, la senescencia se muestra visiblemente como un marchitamiento.

Los patrones de senescencia de flores se pueden clasificar en función de las diferencias en la forma en que participa el etileno: patrones de senescencia dependientes de etileno, independientes de etileno e intermediarios o mixtos (Shibuya *et al.*, 2016; Shibuya, 2018).

Aunque suficientes reservas de carbohidratos pueden prevenir la escasez de azúcares y retrasar la senescencia de los pétalos [tépalos, sépalos, estambres y gineceo] (Woltering, 2019), este proceso se caracteriza por la regulación ascendente transitoria de numerosos genes relacionados con la movilización de macromoléculas en la célula senescente, que se debe principalmente a procesos autofágicos en la vacuola, degradación de proteínas en las mitocondrias, en los núcleos y el citoplasma; descomposición de ácidos grasos en los peroxisomas y degradación de ácidos nucleicos en los núcleos (Shahri *et al.*, 2011).

## **2.5 Proteasas**

### **2.5.1 Definición**

Las proteasas (enzimas proteolíticas) son un grupo amplio e importante de enzimas que hidrolizan enlaces peptídicos de proteínas. Estas enzimas ocupan una posición central en el metabolismo de todos los organismos, intervienen en diferentes procesos fisiológicos y su actividad se encuentra estrictamente regulada por la célula (Alonso y Granell, 1995; Otegui *et al.*, 2006). En esencia, las proteasas

catalizan la hidrólisis del enlace amida que uno a dos residuos de las proteínas, siendo este rompimiento selectivo y específico dependiendo de la enzima y proteína utilizada como sustrato (Barrett *et al.*, 1998).

### **2.5.2 Clasificación**

Según el Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular, las proteasas se ubican en el grupo 3, subgrupo 4 en donde se encuentran las hidrolasas (International Union of Biochemistry, 1992). Actualmente, se utilizan tres criterios principales, que son: sitio de acción, naturaleza química del sitio catalítico y el pH (Barrett, 1994).

De acuerdo con el tipo de corte que realizan, las proteasas se han clasificado en exopeptidasas y endopeptidasas (Cuadro 1) (Barrett *et al.*, 2001). Las primeras requieren de extremos aminos y carboxilos libres para iniciar la hidrólisis del sustrato, mientras que las endopeptidasas catalizan el rompimiento de los enlaces internos de la proteína.



**Cuadro 1.** Sub-subclases de peptidasas según el sistema EC (Enzyme Commission). (12/10/2020)

	Descripción	Cantidad	%
<b>Exopeptidasas</b>	Aminopeptidasas	26	7.6
	Dipeptidasas	11	3.2
	Di y Tri peptidil-peptidasas	8	2.3
	Peptidil-dipeptidasas	4	1.2
	Carboxipeptidasas-Serina	4	1.2
	Metalocarboxipeptidasas	20	5.8
	Carboxipeptidasas-Cisteína	1	0.3
	Omega peptidasas	11	3.2
<b>Endopeptidasas</b>	Endopeptidasas Serínicas	98	28.5
	Endopeptidasas Cisteínicas	98	28.5
	Endopeptidasas Aspárticas	41	11.9
	Metaloendopeptidasas	20	5.8
	Endopeptidasas Treonínicas	2	0.6
	Endopeptidasas de mecanismo desconocido	0	0
	<b>Total</b>	<b>344</b>	<b>100</b>

### 2.5.3 Sitio de acción

#### 2.5.3.1 Exopeptidasas

Las exopeptidasas actúan en el extremo carboxilo se denominan carboxipeptidasas, las cuales liberan un único aminoácido o un dipéptido (peptidil dipeptidasas) en los extremos C-terminales de la cadena polipeptídica. Estas enzimas también se

clasifican en tres grupos, serin-carboxipeptidasas, metalo-carboxipeptidasas y cisteín-carboxipeptidasas, basándose en la naturaleza de los residuos de aminoácidos en su sitio activo (Rao *et al.*, 1998; Mótyán *et al.*, 2013; Theron y Divon, 2014).

### **2.5.3.2 Endopeptidasas**

Las endopeptidasas se caracterizan por llevar a cabo la hidrólisis en los enlaces peptídicos de las regiones internas de la cadena polipeptídica. A diferencia de las exopeptidasas, realizan la hidrólisis del enlace peptídico en el interior de la proteína. Su clasificación se basa de acuerdo con el tipo de aminoácidos que constituyen su sitio activo, así como a la presencia de metales en el mismo, por lo que se han descrito cuatro grupos: serín-proteasas, aspartil-proteasas, cisteín-proteasas y metalo-proteasas. Cada una de ellas con cierta especificidad para romper enlaces peptídicos. (Rawlings y Barrett, 1993; Tyndall *et al.*, 2005).

Estas son producidas por una amplia variedad de especies microbianas, incluyendo bacterias y hongos (Rao *et al.*, 1998; Mótyán *et al.*, 2013; Theron y Divon, 2014).

#### **2.5.3.2.1 Serín proteasas**

Las serín proteasas se caracterizan por la presencia de un grupo serina en su sitio activo. Se pueden encontrar en virus, bacterias y eucariotas, lo que sugiere que son vitales para los organismos. Generalmente son activas a pH neutro y alcalino, con un óptimo entre pH 7 y 11. Tienen amplias especificidades de sustrato incluyendo actividad esterolítica y amidasa. Sus masas moleculares oscilan entre 18 y 35 kDa. Los puntos isoeléctricos se encuentran entre pH 4 y 6. Las proteasas alcalinas representan el mayor subgrupo de serín proteasas (Govind *et al.*, 1981; Barrett, 1994; Cera, 2009).

### **2.5.3.2.2 Cisteín proteasas**

Las cisteín proteasas están presentes tanto en procariotas como en eucariotas. Su actividad depende de un par cisteína e histidina. Estas enzimas contienen una tríada de Cys-His-Asn en el sitio activo, se sintetizan como zimógenos y contienen un prodominio (regulador) y un dominio maduro (catalítico). El primero actúa como un inhibidor endógeno que debe ser eliminado para que la enzima madura pueda ser activada. En la mayoría de los casos, son activas sólo en presencia de agentes reductores tales como el cianuro de hidrógeno o la cisteína. Estas enzimas tienen pH óptimo neutro, aunque algunas de ellas, son más activas a pH ácido. La papaína es la proteasa de cisteína más conocida (Barrett, 1994; Verma *et al.*, 2016).

### **2.5.3.2.3 Metaloproteasas**

Las metaloproteasas son la clase de hidrolasas que escinden enlaces peptídicos por acción de una molécula de agua que se activa por iones metálicos bivalentes como el zinc, el cobalto, el manganeso o el níquel, la cual sirve como nucleófilo en la catálisis y también se coordina con el ion metálico como cuarto ligando (Wu y Chen, 2011). El ion metálico catalítico generalmente está coordinado por tres ligandos de cadena lateral de aminoácidos conservados, tales como: His, Asp, Glu o Lys y al menos otro residuo, que puede desempeñar un papel electrofílico (Fukasawa *et al.*, 2011).

### **2.5.3.2.4 Aspartil proteasas o proteasas ácidas.**

Son las endopeptidasas que dependen de dos residuos de ácido aspártico para su actividad catalítica, localizados en dos tramos cortos de aminoácidos que tienen alta homología de secuencia y similitud de estructura tridimensional. Actúan a valores de pH bajos, poseen una preferencia de escisión entre aminoácidos hidrófobos, son

inhibidas por la pepstatina, presentan puntos isoeléctricos en el intervalo de pH 3 a 4.5 y sus masas moleculares son de 30 a 50 kDa (Fitzgerald *et al.*, 1990; Blundell y Johnson, 1993; Barrett, 1995; Shah *et al.*, 2014).

La mayoría de aspartil proteasas se ajustan a estas características, existen diferencias sustanciales en términos de propiedades catalíticas, la localización celular y las funciones biológicas (Davies, 1990; Coates *et al.*, 2001). Las APs se pueden encontrar en vertebrados, hongos, plantas, protozoos y virus, en donde desempeñan diferentes e importantes funciones (Horimoto *et al.*, 2009).

**Cuadro 2.** Principales características de las endoproteasas.

(Theron y Divol, 2014).

<b>Familia</b>	<b>Cofactores</b>	<b>Sitio activo característico</b>	<b>Intervalo de pH óptimo</b>	<b>Inhibidores</b>
Serin-proteasas	Ca <sup>2+</sup>	Asp, Ser, His	7-11	PMSD EDTA Fenol Ácido triaminoacético
Metalo-proteasas	Zn <sup>2+</sup> Ca <sup>2+</sup>	Glu, Try	7-9	EDTA EGTA
Cistein-porteasas	ND	Cys, His, Asp	2-3	Indoacetamida p-CMB
Proteasas aspárticas	Ca <sup>2+</sup>	Asp, Asp	2.5-7	Pepstatin EPNP DAN

## **2.6 Electroforesis**

### **2.6.1 Definición**

La electroforesis es una técnica para la separación de moléculas según la movilidad de estas en un campo eléctrico. Dependiendo de la técnica que se use, la separación obedece en distinta medida a la carga eléctrica de las moléculas y a su masa (Morales y Gallos, 2006).

Según Morales y Gallos (2006), existen numerosas variaciones de esta técnica en función del equipo utilizado, soporte y condiciones fisicoquímicas en las cuales se va a llevar a cabo la separación:

- i) Electroforesis capilar.
- ii) Electroforesis en papel.
- iii) Electroforesis en gel de agarosa.
- iv) Electroforesis desnaturante en gel de poliacrilamida (SDD-PAGE)
- v) Isoelectroenfoque.
- vi) Electroforesis bidimensional.

### **2.6.2 Electroforesis desnaturante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)**

Uno de los métodos de electroforesis más comúnmente aplicado para proteínas es el que emplea geles de poliacrilamida (PAGE = polyacrylamide gel electrophoresis) en presencia del detergente aniónico dodecilsulfato sódico (SDS). Esta técnica es conocida como SDS-PAGE. Para ello se prepara un gel en placa vertical (Cultek, 2006).

La electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida puede llevarse a cabo en condiciones nativas (ND-PAGE) o desnaturizantes (SDS-PAGE). Las diferencias

entre uno y otro tipo radican en los componentes de los geles y del tampón de electroforesis, así como en el tratamiento de las muestras. Como su propio nombre indica, en el segundo tipo, y no en el primero, se incluyen agentes desnaturizantes: reductores, detergentes y caótopos. En el primer caso, las proteínas mantienen su estructura tridimensional y las diferentes cadenas polipeptídicas pueden permanecer unidas, separándose no sólo en función de su carga eléctrica, sino también según su tamaño y forma (Lomonte B., 2007).

Por el contrario, cuando las proteínas se solubilizan en presencia del detergente aniónico SDS, éste se une a las proteínas, rompiendo interacciones hidrofóbicas y desnaturizándolas. Las proteínas desnaturizadas de la muestra adoptarán una estructura en forma de bastoncillo con una serie de moléculas de SDS cargadas negativamente a lo largo de la cadena polipeptídica. Como media, se une una molécula de SDS por cada dos residuos de aminoácidos. La carga nativa original de la molécula está completamente enmascarada por la carga negativa del SDS. Debido a que la cantidad de SDS que se une a las proteínas es prácticamente proporcional a su tamaño, los complejos SDS-proteínas presentan un valor carga/masa constante y por lo tanto se separan de acuerdo con su tamaño cuando migran desde el cátodo al ánodo a una velocidad relacionada con su peso molecular (Schägger, 2006).

Además del SDS, se emplean otros agentes desnaturizantes como son un agente reductor, generalmente el 2-mercaptoetanol que reduce los puentes disulfuro (Cys-S-S-Cys) a grupos tioles (Cys-SH), y agentes caótopos, que, como la urea, rompen puentes de hidrógeno. Para asegurar la disociación de las proteínas en sus subunidades y la pérdida de la estructura secundaria de las proteínas se suele calentar la muestra antes de ser cargada en el gel (Maldonado, s/f).

A diferencia de la electroforesis en condiciones nativas, en la SDS-PAGE las proteínas se separan únicamente en función de su tamaño (masa molecular), lo que permite determinar el peso molecular de las proteínas. Para ello se compara la movilidad electroforética ( $R_f$ ) de la proteína de peso molecular desconocido con el de proteínas de referencia de peso molecular conocido (Maldonado, s/f).

### 2.6.3 Factores que afectan la electroforesis

El resultado de una electroforesis depende de numerosos factores y es necesario conocerlos para lograr la máxima resolución.

#### 2.6.3.1 Campo eléctrico.

Es un gradiente de potencial que posibilita que haya electroforesis. A su vez, depende de diferentes parámetros:

- Diferencia de potencial (V). Se mide en voltios y es lo que define el campo eléctrico. Cuanto mayor sea, mayor será la velocidad de migración. Las electroforesis se consideran de bajo voltaje si se realizan entre 10-500 voltios (la mayoría) y de alto voltaje si se realizan entre 500-10,000 voltios (Morales y Gallos, 2006).
- Intensidad (I). Se mide en amperios y cuantifica el flujo de carga eléctrica. Está relacionada con la diferencia de potencial por la Ley de Ohm:  $V=IR$  y para una diferencia de potencial dada, su valor (normalmente entre 5-50mA) viene determinado por la resistencia del soporte, por lo que, en última instancia, da cuenta de la distancia recorrida por las moléculas (Morales y Gallos, 2006).
- Resistencia (R). Se mide en ohmios y cuanto mayor sea la resistencia del soporte, menor será la movilidad electroforética (ya que la intensidad ha de ser menor para que se cumpla la Ley de Ohm). Depende de la naturaleza del soporte, sus dimensiones (anchura, longitud y sección) y de la concentración del tampón de electroforesis (Morales y Gallos, 2006).
- Temperatura. Por el efecto Joule, el paso de una corriente eléctrica produce calor, y este efecto será tanto mayor cuanto mayor sea la diferencia de potencial y la resistencia del sistema. Debe controlarse de forma estricta, puesto que puede afectar a la muestra (desnaturalizándola), al soporte e incluso al equipo electroforético (Morales y Gallos, 2006).

### **2.6.3.2 Muestra**

La movilidad electroforética de una molécula es tanto mayor cuanto mayor sea su carga y disminuye según aumenta su tamaño, ya que mayor es la fricción de la molécula con el medio y menor es su carga por unidad de superficie. Por esta razón, las moléculas globulares se mueven con mayor facilidad que las elongadas, ya que la esfera presenta la mínima superficie a igualdad de volumen. Así, moléculas del mismo tamaño y carga, pero de diferente forma, pueden tener una movilidad electroforética diferente y ser, por tanto, separables mediante una electroforesis (Zarza, 2014).

### **2.6.3.3 Tampón Durante una electroforesis.**

Se produce una electrolisis del agua por acción del campo eléctrico, lo cual genera protones en la proximidad del ánodo e iones hidroxilo en el cátodo. El tampón es, por esta razón, esencial durante la electroforesis para evitar que el ánodo se acidifique y el cátodo se haga más básico, pero no debe afectar a las moléculas a separar (Yábar, 2003).

Según Yabar (2003), la fuerza iónica condiciona la movilidad electroforética de las sustancias a separar, ya que influye en su esfera de solvatación y en la conductividad de todo el sistema, por lo tanto, es necesaria una fuerza iónica suficiente para mantener el pH y la conductividad durante todo el proceso, pero no muy elevada, ya que llegaría a interferir en el sistema.

Normalmente, se emplean tampones con fuerzas iónicas moderadas (0.05-0.10M), siendo el pH la característica que debe ser más controlada, puesto que determina la carga de la muestra. Conviene señalar también que, atendiendo a la distribución del tampón, los sistemas se clasifican en continuos cuando se emplea un único tampón en el proceso, y discontinuos cuando se emplean, al menos, dos tampones de pH y composición diferentes (García, 2000).



### III. HIPÓTESIS

La senescencia en la flor de *Tigridia pavonia* (L.f) DC está relacionada con la actividad proteolítica de distintas proteasas.

#### IV. JUSTIFICACIÓN

*Tigridia pavonia* (L.f) DC también conocida como "Oceloxochitl" o "Flor de tigre" es una planta ornamental nativa mexicana de gran variabilidad en el color y belleza de su flor (Piña-Escutia *et al.*, 2013; Arzate-Fernández *et al.*, 2015; Arroyo-Martínez *et al.*, 2017). Aunque la longevidad de su flor se limita a un día, la producción de flores continúa durante ocho semanas, siendo una excelente planta para exterior.

Estudios preliminares indican que la senescencia de la flor de *Tigridia pavonia* (L.f) DC es independiente de la polinización, y que el etileno podría no tener efecto sobre la longevidad de esta, en cambio, parece existir un incremento en la actividad de proteasas que pudiera estar determinando la senescencia de la flor de esta especie.

Además del etileno, se considera que el ácido abscísico (ABA) es un regulador natural de la senescencia de la flor. Cuando se aplica de manera exógena, acelera la senescencia (Panavas *et al.*, 1998), causando una pérdida de diferencial en la permeabilidad de la membrana, incremento en la peroxidación de lípidos e inducción de proteasas. La regulación de la acumulación de ABA en la flor sugiere que, en algunas especies, la hormona coordina los primeros eventos en la señal de la traducción de la senescencia, mientras que, en otras, afecta sólo los últimos estadios de la senescencia. Se ha encontrado que, dependiendo de la especie, el etileno, o el ácido abscísico, pueden disparar la señal para la actividad de enzimas proteolíticas en el proceso de senescencia floral.

Aunque el análisis de la expresión de RNA mensajero ha sido utilizado para analizar el proceso de senescencia, algunos estudios han demostrado que no existe una correlación directa entre la cantidad de RNA mensajero y la cantidad de proteína sintetizada, ya que el RNA mensajero está sujeto a varios mecanismos de control transcripcional, por lo cual, las proteínas sintetizadas a partir de estos mensajeros pueden experimentar diversas modificaciones post-traduccionales como: fosforilaciones, glicosilaciones, etc. (Graves y Haystead, 2002), los cuales definirán el papel que juegue la proteína bajo un estadio determinado en la senescencia floral.

El estudio de los mecanismos sobre la senescencia floral de *Tigridia pavonia* (L.f) DC puede favorecer el desarrollo de estrategias que permitan una mayor longevidad y promuevan la utilización de esta especie en el mercado florícola.

## V. OBJETIVOS

### a. Objetivo General

- Caracterizar de forma molecular el proceso de senescencia de la flor de *Tigridia pavonia* (L.f) DC.

### b. Objetivos Especificos

- Identificar las proteínas que incrementan y disminuyen su expresión durante la senescencia de los tépalos, ovarios y las anteras de la flor de *Tigridia pavonia* (L.f) DC.
- Clasificar de manera funcional, las proteínas que se expresan diferencialmente en tépalos, ovarios y anteras senescentes y no senescentes.

## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Ubicación de la investigación

El desarrollo del presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Biología Molecular Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma del Estado de México, localizada en el Campus Universitario el Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, México.

### 6.2 Material vegetal

Se utilizaron 50 plantas de *Tigridia pavonia* var. Dulce, las cuales fueron cultivadas en un invernadero tipo rústico de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma del Estado de México.

De las plantas en floración se utilizaron ovarios, anteras y tépalos (internos y externos), colectados a las 0, 5, 8 y 12 h durante el período de apertura de la flor. El diseño experimental fue de bloques completos al azar, con tres repeticiones para cada etapa de colecta. Cada repetición consistió en 10 tépalos.



**Figura 1.** Etapas de desarrollo de la flor y senescencia en *Tigridia pavonia* var. Dulce. A. Inicio de apertura (etapa I). B. Apertura completa (etapa II). C. Senescencia parcial (etapa III); la cabeza de la flecha indica el pliegue del tépalo externo como primera señal visible de senescencia. D. Flores completamente marchitas (etapa IV).

### **6.3 Extracción y cuantificación de proteínas**

La extracción de proteínas totales se realizó por triplicado siguiendo el método reportado por Saravanan y Rose (2004), basado en precipitación con ácido tricloroacético y acetona (TCA-A). Los tépalos fueron macerados con nitrógeno líquido y suspendidos en acetona con 10% de TCA, 1% de PVP y 2% de 2-mercaptoetanol. La mezcla fue homogeneizada durante 15 min en hielo con ayuda de un sonicador, una vez homogeneizada, la mezcla se centrifugo a 2000 g durante 2 min a 4°C.

El sobrenadante se precipito durante toda la noche a -20°C, posteriormente se centrifugó a 13000 g durante 30 min a 4°C para obtener la pastilla de proteínas, la cual, fue lavada en acetona fría, se secó a temperatura ambiente hasta eliminar el exceso de acetona y se almacenará a -80°C.

La concentración de proteínas totales solubles se determinó mediante el método Bradford utilizando el kit comercial Protein Assay (Bio-Rad), y albúmina sérica como estándar. La lectura se fue a 595 nm de absorbancia.

### **6.4 Ensayo proteasa e identificación de proteínas**

Se siguió la metodología propuesta por Azeez *et al.* (2007), del sobrenadante de proteína se tomaron 20 µl y se mezclaron con 300 µl de 100 mM de buffer fosfato de sodio, usando azocaseina como substrato. La mezcla se incubó a 37°C por 3 horas, enseguida se detuvo la reacción agregando 200 µl de ácido tricloroacético, se incubo a 4°C por 30 min, se centrifugo a 2000 rpm por 10 minutos, y se determinó la absorbancia a 366 nm.

Para la identificación de las proteasas se utilizaron inhibidores específicos; EDTA (50 mM) (específico para metalo-proteasas), AEBSF (1 mM) (específico para serin-proteasas), APMSF (100 µM) (específico para serin-proteasas) y E-64 (2 µM) (específico para cystein-proteasas). Para evaluar el efecto de los inhibidores, se tomó una alícuota de la proteína (20 µg, aproximadamente), y se incubó con cada

uno de los inhibidores (sin el sustrato) por 30 minutos, el procedimiento fue el antes descrito.

Las proteasas fueron observadas mediante electroforesis en gel desnaturizante de poliacrilamida, siguiendo la técnica descrita por Azeez *et al.* (2007), para lo cual, se tomaron 20 µg de proteína, y se mezclaron con igual volumen de buffer de muestra (0.1 M de Tris-HCl pH 6.8; 2% SDS; 10% de glicerol; 0.01% de azul de bromofenol), se incubaron a 37°C por 30 minutos, y se corrieron en electroforesis vertical, a temperatura ambiente.

Después de la electroforesis, el gel se lavó en buffer de renaturalización (2.5% de tritón, 10 mM de EDTA, 50 mM de Tris-HCl pH 7.5) por 30 minutos con agitación. La actividad proteasa fue monitoreada incubando el gel en 10 mM de calcio, 10 mM de magnesio, 50 mM de Tris-HCl pH 7.5 a 37 °C por 12-16 horas en incubación. El gel se tiñó con azul de comassie, y se destiñó con una solución de metanol/ácido acético (5:1). La presencia de bandas claras en el gel indicó los sitios de actividad proteasa.

## **6.5 Identificación de proteasas por LC-MS / MS**

Después de la SDS-PAGE, se seleccionaron bandas de acuerdo con cada estadio de senescencia. Estas fueron sometidas a identificación por espectrometría de masas en tándem de cromatografía líquida (LC) (MS / MS) utilizando un espectrómetro de masas LTQ-Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific™).

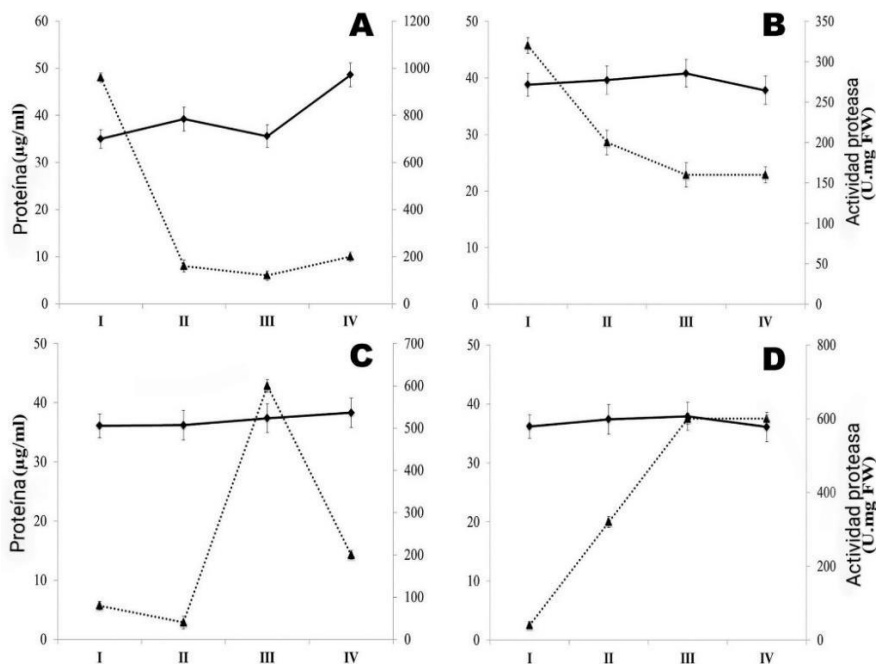
Para la fragmentación de péptidos, se utilizaron métodos de disociación inducida por colisión y de disociación por colisión de alta energía. Los datos obtenidos fueron comparados con la base de datos NCBI utilizando el programa Protein Prospector. El análisis antes mencionado se realizó en la unidad de proteómica del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

## VII. RESULTADOS

### Niveles totales de proteínas y actividad proteasa

El nivel de proteína soluble en agua en el tejido ovárico aumentó entre las dos primeras etapas, cayó en tercera etapa y luego aumentó en la etapa IV, cuando la flor estuvo completamente marchita (**Fig. 2A**). Mientras tanto, la antera y el tépalo externo mostraron un aumento constante del nivel de proteína hasta la etapa III, y disminuyó en la etapa final (**Fig. 2BD**). Sólo el tépalo interno mostró un aumento continuo en las cuatro etapas (**Fig. 2C**).

Cuando se midió la actividad de la proteasa, se observó una fuerte disminución en el ovario y la antera (**Fig. 2AB**). Por el contrario, el tépalo interno mostró una cantidad dramática en la actividad total de la proteasa con el inicio de la senescencia (**Fig. 2C**) y disminuyó en la etapa final. Del mismo modo, el tépalo externo mantuvo un aumento continuo y dramático en las tres primeras etapas, y más tarde se observó un ligero aumento en las etapas de senescencia restantes (**Fig. 2D**).



**Figura 2.** Contenido total de proteínas y actividad total de la proteasa en ovario (A), anteras (B), tépalo interno (C) y tépalo externo (D) de *Tigridia pavonia* var. Dulce en

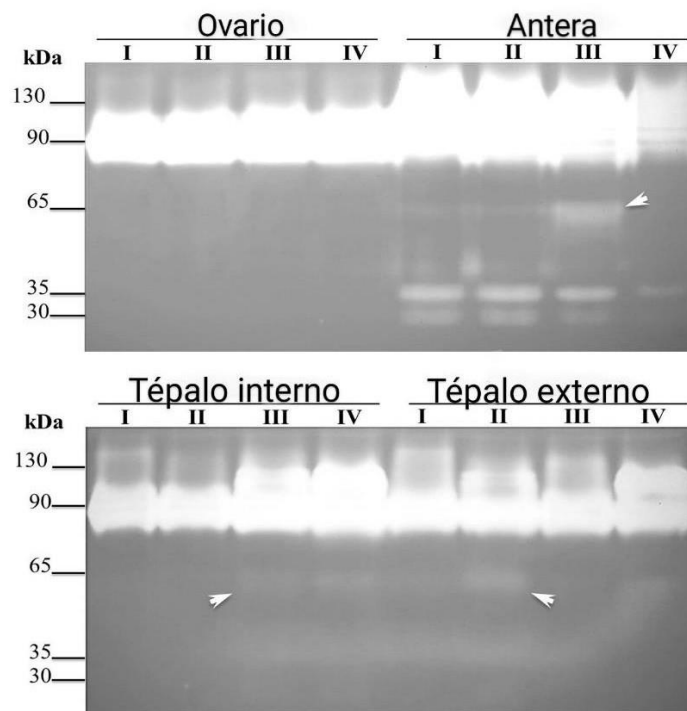


cuatro etapas diferentes de la senescencia floral; (I) inicio de apertura, (II) flor completamente abierta, (III) senescencia parcial, (IV) flores completamente marchitas. Línea con cuadros: contenido de proteínas; línea punteada con diamantes: actividad proteasa.

### Caracterización de la actividad proteasa por zimografía

La zimografía reveló actividad proteasa de cinco bandas distintas cuyas masas moleculares fueron de 130, 90, 65, 35 y 30 kDa, respectivamente (**Fig. 3**). La proteasa de 90 kDa fue la principal en todo momento y en todos los órganos (tépalos, ovarios y anteras) durante la senescencia, mientras que la expresión de las proteasas de 35 y 30 kDa fueron específicas de la antera.

Por otro lado, la expresión de la proteasa de 130 kDa se observó en las tres primeras etapas de la senescencia en antera, sin embargo, en el tépalo interno la misma proteasa estuvo presente en las dos últimas etapas, mientras que en el tépalo externo se observó en las etapas II y IV cuando la senescencia de la flor ya está muy avanzada.

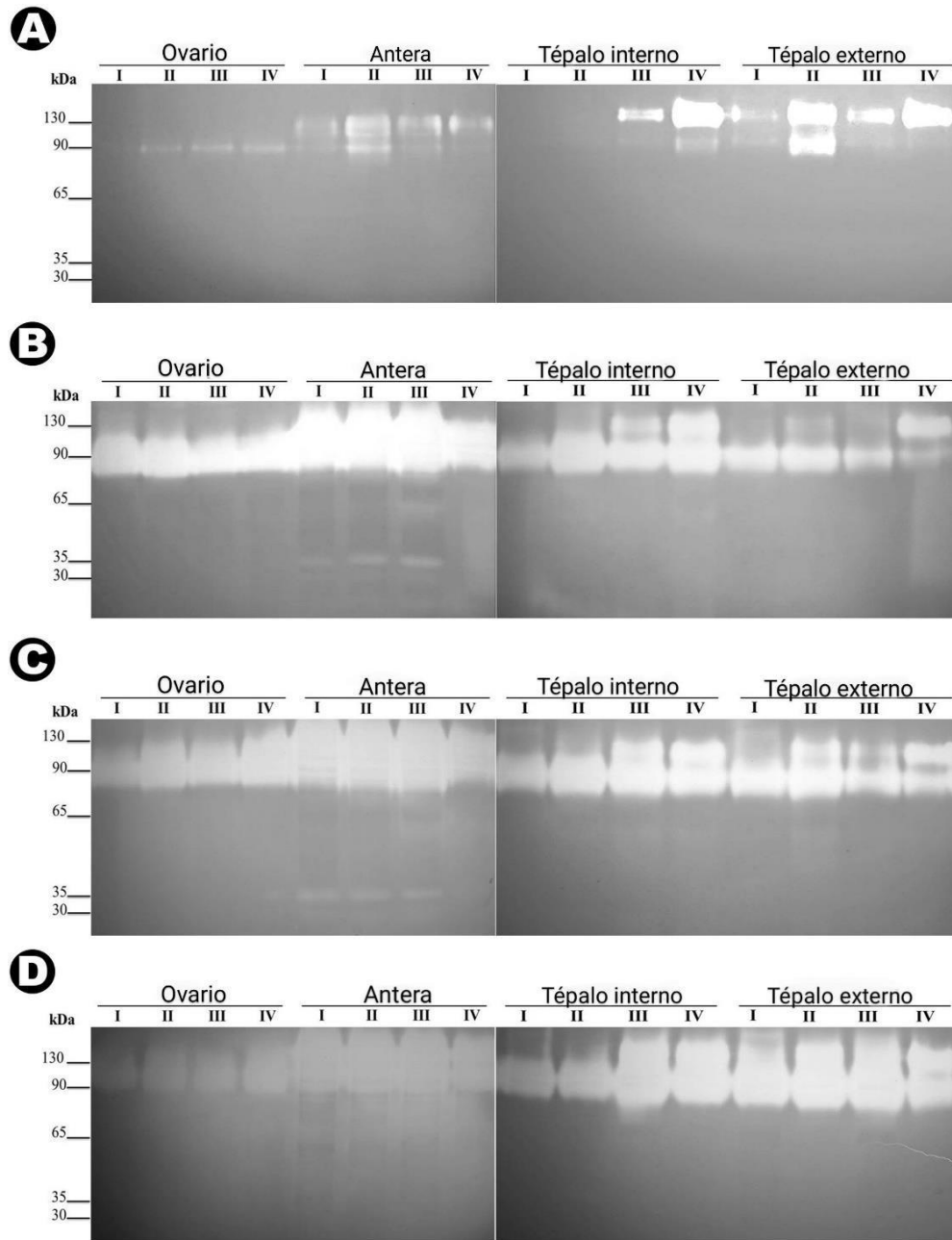


**Figura 3.** Actividad en gel de proteasa en varias etapas (I a IV) de ovario, anteras, tépalo interno y tépalo externo de la flor de *Tigridia pavonia* var. Dulce. Las flechas muestran la expresión marcada de una proteasa durante la senescencia.

Curiosamente, la expresión proteasa de 65 kDa observada en la tercera etapa de la senescencia en la antera, también estuvo presente en la tercera etapa del tépalo interno y en la segunda etapa del tépalo externo (**Fig. 3**). Además, la expresión de esta proteasa coincidió con síntomas visibles de senescencia floral (**Fig. 1C**). Estos resultados sugirieron que esta proteasa desencadena señales de senescencia no sólo en la antera, sino también en los tépalos internos y externos. Finalmente, las proteasas de 35 y 30 kDa se expresaron sólo en antera en todas las etapas de senescencia estudiadas.

Con el fin de estudiar los cambios de las proteasas en cuatro etapas diferentes de la senescencia, se utilizaron varios inhibidores específicos para la determinación de la actividad proteasa utilizando azocaseína como sustrato. De acuerdo con la **Fig. 4A.C.**, no se observó ninguna inhibición con AEBSF y APMSF, lo cual sugiere que estas proteasas no pertenecen al grupo de las serin-proteasas. Sin embargo, después del tratamiento con EDTA (**Fig. 4A**), la actividad de las bandas de 130 y 90 kDa disminuyó en comparación con los otros inhibidores, lo que indica que las metaloproteasas podrían participar en todas las etapas de la senescencia de *T. pavonia* (L.f) DC.

Del mismo modo, las bandas de 65, 35 y 30 kDa fueron inhibidas por EDTA, pero curiosamente, el tratamiento con E-64 también inhibió su expresión (**Fig. 4AD**). Por lo que se asume que estas podrían ser cisteín-proteasas reguladas por metales. El análisis de Protein Prospector para las bandas de 65, 35 y 30 kDa arrojó identidad con varias proteasas. Entre ellas la secuencia parcial de la proteasa de 65 kDa tuvo una buena homología con la proteína de respuesta temprana a la deshidratación (ERD-2), la cual se ha reportado por ser inducida rápidamente en respuesta a la deshidratación, principal síntoma visible en tépalos de senescencia de la flor de *T. pavonia* (L.f) DC.



**Figura 4.** Efecto de inhibidores específicos de la proteasa en la actividad en gel de proteasas asociadas a la senescencia en varias etapas (I a IV) de ovario, antera, tépalo interno y tépalos externo de la flor de *Tigridia pavonia* var. Dulce. EDTA (A), AEBSF (B), APMSF (C) y E64 (D).

## VIII. DISCUSIÓN

La degradación de las proteínas y el reciclaje de nitrógeno y nutrientes es probablemente el proceso de degradación más importante que se produce durante la senescencia, que se caracteriza por la expresión regulada de proteasas, la actividad enzimática elevada y la disminución de los niveles de proteínas solubles tanto en flores sensibles como insensibles al etileno (Shahri *et al.*, 2011; Roberts *et al.*, 2012). Esto permite la removilización o translocación de nutrientes de los pétalos al desarrollo de ovarios en una flor polinizada, o a otros tejidos de demandantes (Jones, 2013). En especies como *Gladiolus grandiflorus* (Andrew) (Azeez *et al.*, 2007), *Consolida ajacis* (L.) (Waseem *et al.*, 2011) y *Helleborus orientalis* (Lam.) (Shahri *et al.*, 2011) la senescencia está precedida por una disminución en el nivel de proteína. En el presente estudio, los síntomas visibles de la senescencia estuvieron acompañados por un aumento muy ligero en el nivel de proteínas en tépalos, ovarios y anteras (**Fig. 2**). Esto se puede explicar porque aunque las proteínas solubles en agua podrían degradarse, la nueva síntesis y posiblemente, la transferencia de proteínas insolubles a la fracción soluble pueden compensarlo, como fue reportado por Lerslerwong *et al.* (2009) en *Dendrobium*.

En especies como *Tulipa gesneriana* (L.) la actividad proteasa aumentó visiblemente con el marchitamiento de pétalos (Azad *et al.*, 2008) pero en otras como *Lily*, la actividad proteasa de pétalos ha mostrado un aumento antes de la senescencia visible (Mochizuki-Kawai *et al.*, 2015). En la presente investigación se observó un drástico aumento de la actividad proteasa en los tépalos a medida que las flores avanzaban hacia la senescencia (**Fig. 2** y **Fig. 3**). Más del 60 % de la actividad total de la proteasa se debió a la actividad de metaloproteasas, de acuerdo a los inhibidores utilizados *in vitro*. Curiosamente el tratamiento con E-64 también inhibió la expresión de 65, 35 y 30 kDa bandas (**Fig.4AD**) lo que sugiere que éstas podrían ser cisteín-proteasas reguladas por metales.

Las cisteín-proteasas se han relacionado con la senescencia y la muerte celular en varias especies (Tripathi *et al.*, 2009; Martínez *et al.*, 2012) siendo consideradas

importantes para determinar el tiempo de senescencia visible (Lerslerwong *et al.*, 2009; Mochizuki-Kawai *et al.*, 2015).

Arora y Singh (2004) revelaron una dramática regulación en el aumento de la expresión de la cisteín-proteasa *GgCyP* en la etapa inicial de la senescencia floral, lo que indica que este gen puede codificar una enzima importante para el proceso proteolítico en *Gladiolus*. En el presente estudio, la proteasa de 65 kDa mostró una regulación incipiente sobre las primeras etapas senescentes en el tépalo externo, pero en el tépalo interno y la antera, su expresión se observó en las últimas etapas de la senescencia. Nuestros resultados son similares a los reportados en otras flores efímeras como *Ipomoea nil* (L.) o *Hibiscus sinensis* (L.), donde también se ha reportado una fluctuación en la expresión de cisteín-proteasas (Shibuya *et al.*, 2009; Trivellini *et al.*, 2016).

El marchitamiento de pétalos se encuentra bajo estricto control de las cascadas de señalización que desencadenan la sobreexpresión de genes que codifican clases específicas de factores de transcripción (FT) como NAC, MYB, MYC, MADS-box, WRKY y proteínas de zinc (Aleksandrushkina y Vanyushin, 2009; Wagstaff *et al.*, 2010). Los factores de transcripción NAC están ampliamente distribuidos en las plantas y modulan la tasa de transcripción de genes blanco. Así, la expresión de muchos genes NAC es inducida por stress abiótico y biótico como frío, alta salinidad y deshidratación (Alves *et al.*, 2011; et al García-Morales *et al.*, 2013; et al Matallana-Ramirez *et al.*, 2013; Shibuya *et al.*, 2014; Shao *et al.*, 2015). Por ejemplo, un FT inducido transcripcionalmente por ácido abscísico (ABA), sequía, y alta salinidad, se une al promotor del gen de respuesta inicial a la deshidratación (*ERD*) (Thirumalaikumar *et al.*, 2018). En la presente investigación *T. pavonia* (L.f) DC exhibió una rápida deshidratación, y el marchitamiento de tépalos, se observó aproximadamente seis horas después de la apertura de la flor, con tépalos completamente enrollados (**Fig.1BD**). Aún más, la secuencia parcial de la proteasa de 65 kDa tuvo un buen porcentaje de homología con la proteína de respuesta inicial a la deshidratación (*ERD*), uno de los genes que se ha identificado por su capacidad de inducción por deshidratación (Alves *et al.*, 2011).

Similar a *T. pavonia* (L.f) DC, *Ipomoea nil* (L.) tiene flores efímeras que abren por la mañana y generalmente muestran síntomas visibles de senescencia en la flor dentro del mismo día. En esta última especie, Shibuya *et al.* (2014) identificaron al gen *EPHEMERAL 1* (*EPH1*) como el principal regulador de la PCD en la senescencia de pétalos, y el análisis filogenético de las proteínas NAC en *Arabidopsis* reveló que *EPH1* se agrupa con *ORESARA1* (*ORE1*), otro gen que no sólo desempeña un papel clave en la regulación de la senescencia de la hoja, sino que también tiene una función en la muerte celular programada (PCD) (Matallana-Ramírez *et al.*, 2013). Curiosamente, Lindemose *et al.* (2014) reportaron que *ORE1* y *ERD1* contienen al menos una copia del motivo CGT del núcleo NAC-BS que se ha identificado como el sitio de unión central de los FT NAC inducibles por estrés. Por lo tanto, diferentes variaciones como versiones palindrómicas del NAC-BS se pueden utilizar para identificar genes blanco NAC a partir de genes asociados a la senescencia co-expresados (Podzimska-Sroka *et al.*, 2015). Considerando lo anterior y nuestros resultados, se requieren nuevos estudios para confirmar si la secuencia parcial encontrada realmente pertenece al gen *ERD*, como principal FT que integra las vías de señalización que desencadenan la senescencia de la flor en *T. pavonia* (L.f) DC, o si el proceso de senescencia implica la acción de un gran número de FT.

## **IX. CONCLUSIÓN**

Se demostró que la senescencia de *T. pavonia* (L.f) DC se asocia principalmente con la expresión de cisteína-proteasas. La aparición de síntomas visibles de senescencia implica la sobre expresión de una proteasa de 65 kDa que posiblemente está asociada con la muerte celular programada de los tépalos.

## X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aleksandrushkina NI and Vanyushin BF (2009) Endonucleases and their involvement in plant apoptosis. *Russian Journal of Plant Physiology* 56: 291-305.

Alonso JM y 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.

Alves MS, Fontes EP and Fietto LG (2011) Early responsive to dehydration 15, a new transcription factor that integrates stress signaling pathways. *Plant Signaling & Behavior* 6 (12): 1993-1996.

Arora A and Singh VPJ (2004) Cysteine protease gene expression and proteolytic activity during floral development and senescence in ethylene-insensitive *Gladiolus grandiflora* *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology* 13: 123-126.

Arroyo-Martínez HA, Arzate-Fernández AM, Barba-González R and Piña-Escutia JL (2017) Karyotype analysis and physical mapping of the 5S and 45S rDNA genes in *Tigridia pavonia* var. Dulce (Iridaceae). *Caryologia* 71 (1): 1-6.

Arzate-Fernández AM, González-González H, Vázquez-García LM, Norman-Mondragón TH, González-Villarreal C, Brumbley SM and Piña-Escutia JL (2015) Somatic embryogenesis and plant regeneration of *Tigridia pavonia* (L.f.) DC., a Mexican native ornamental plant. *Propagation of Ornamental Plants* 15 (3): 101-106.

Azad AK, Ishikawa T, Ishikawa T, Sawa Y and Shibata H (2008) Intracellular energy depletion triggers programmed cell death during petal senescence in tulip. *Journal of Experimental Botany* 59 (8): 2085-2095.



Azeez A, P.S Aniruddha, D. Bhatnagar, N. Pravendra (2007) Enhanced expression of serine proteases during floral senescence in *Gladiolus* *Phytochemistry* 68: 1352–1357.

Barrett, A. J. (1994). *Methods Enzymology*. Proteolytic enzymes: serine and cysteine peptidases Vol. 244. Academic Press Inc. San Diego California USA. pp. 1–15.

Barrett, A. J. (1995). *Methods Enzymology*. Proteolytic enzymes: aspartic and metallopeptidases. Vol. 248. Academic Press Inc. San Diego California USA. pp. 183.

Barrett AJ, Rawlings ND y Woessner JF, (1998). *Handbook of proteolytic enzymes*. Academic Press San Diego, CA:.

Barret, A.J., Rawlings, N.D., y O'Brien, E.A. (2001). The MEROPS database as a peptidase information system. *Journal of Structural Biology*. 134:95–102.

Battelli R, Lombardi L, Picciarelli P, Lorenzi R, Frigerio L and Rogers HJ (2014) Expression and localisation of a senescence-associated KDEL-cysteine protease from *Lilium longiflorum* tepals. *Plant Science* 214: 38-46.

Beevers, L., (1976). Senescence. *Plant Biochemistry*, Third Edition. Edited by J. Bonner, J.E. Varner Academic Press. 183.

Blundell, T.L., y Johnson, M.S. (1993). Catching a common fold. *Protein Science*. 2:877–883.

Buchanan-Wollaston V (1997) The molecular biology of leaf senescence. *Journal Experimental Botany*. 48: 181-199.

Coates, L., Erskine, P.T., Wood, S.P., Myles, D.A., y Cooper, J.B. (2001). A neutron Laue diffraction study of endothiapepsin: implications for the aspartic proteinase mechanism. *Biochemistry*. 40:13149–13157.

Cultek. (2006). Electroforesis de proteínas: Protocolos y técnicas. Obtenido de <http://www.cultek.com/inf/otros/soluciones/soluciones-electroforesisprotocolos.pdf>

Davies, D.R. (1990). The structure and function of the aspartic proteinase. *Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry*. 19:189–215.

Díaz-Mendoza M, Velasco-Arroyo B, Santamaria ME, González-Melendi P, Martínez M and Díaz I (2016) Plant senescence and proteolysis: two processes with one destiny. *Genetics and Molecular Biology* 39 (3): 329–338.

Fitzgerald, P.M.D., McKeever, B.M., Van Middlesworth., J.F., Springer, J.P., Heimbach, J.C., Chih-Tai, L., Herber, W.K., Dixon, R.A.F., y Darke, P.L. (1990). Crystallographic analysis of a complex between human immunodeficiency virus type 1 protease and acetyl-pepstatin at 2.0Å resolution. *The Journal of Biological Chemistry*. 265:14209–14191.

Fukasawa, K.M., Hata, T., Ono, Y., y Hirose J. (2011). Metal preferences of zinc-binding motif on metalloproteases. *Journal of Amino Acids*. 2011:1–7.

Gámez M. O., E. Villavicencio G., M. A. Serrato C., J. M. Mejía M., M. G. Treviño C., H. L. Martínez G., M. Rodríguez O., L. Granada C., M. Flores C., J. Reyes S., M. Á. Islas L., E. Salomé C., R. A. Menchaca G., C. M. Espadas M., L. Hernández S., L. M. Vázquez G., M. T. B. Colinas L., F. Martínez M., O. Vargas P. y E. Ríos S. 2017. Conservación y aprovechamiento sostenible de especies ornamentales nativas de México. Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas y Universidad Autónoma Chapingo. México. 152 p.

García, H. (2000). Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. *UNIV DIAG*, 31-41.

García-Morales S, Gómez-Merino FC, Trejo-Téllez LI and Herrera-Cabrera BE (2013) Transcription factors involved in molecular responses of plants to osmotic stress. *Revista Fitotecnia Mexicana* 36 (2): 105-115.

Govind, N.S., Mehta, B., Sharma, M., y Modi, V.V. (1981). Protease and carotenogenesis in *Blakeslea trispora*. *Phytochemistry*. 20:2483–2485.

Graves P.R, T.A.J Haystead (2002) Molecular Biologist's Guide to Proteomics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66: 39-63.

Griffiths CA, Gaff DF and Neale AD (2015) Drying without senescence in resurrection plants. *Frontiers in Plant Science* 5 (36): 1-18.

Gul F, Tahir I and Shahri W (2015) Flower development and senescence in *Narcissus tazetta* 'kashmir Local'. *Folia Horticulturae* 27 (2): 115-121.

Hernández, F. (1995) Historia Natural de la Nueva España. Universidad Nacional Autónoma de México. Tomo II, Vol. I. 476pp.

Horimoto Y., Dee D., Yada R. (2009). Multifunctional aspartic peptidase prosegments. *New Biotechnology*. 25:318-324.

Jones M. (2004) Changes in Gene Expression during Senescence. In: Nooden L, ed. *Plant Cell Death Processes*. San Diego, CA: Elsevier Science, 51-71.

Jones M. (2013) Mineral nutrient remobilization during corolla senescence in ethylene-sensitive and -insensitive flowers. *AoB Plants* 5: plt023.

Lerslerwong L, Ketsa S and van Doorn WG (2009) Protein degradation and peptidase activity during petal senescence in *Dendrobium* cv. Khao Sanan. *Postharvest Biology and Technology* 52 (1): 84-90.

Leszczyńska-Borys H, M.T Borys (1995) Algunas características de la tigridia *Tigridia pavonia* Ker. Gawl. Revista Chapingo, Serie Horticultura. 4: 117-130.

Lindemose S, Jensen MK, Van de Velde J, O'Shea C, Heyndrickx KS, Workman CT, Vandepoele K, Skriver K and De Masi F (2014) A DNA-binding-site landscape and regulatory network analysis for NAC transcription factors in *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Research* 42 (12): 7681-7693.

Lomonte, B. (2007). Electroforesis en gel de poliacrilamida. En B. Lomonte, Manual de métodos inmunológicos (págs. 92-101). San José de Costa Rica: Universidad de Costa Rica.

Maldonado, & Jorrín. (s.f.). Departamento de Bioquímica en Ingeniería Molecular: Campus Universitario de Rabanales, Obtenido de <https://www.uco.es/dptos/bioquimicabiolmol/pdfs/16%20ELECTROFORESIS%20ELES%20PAA.pdf>.

Martinez M, Cambra I, González-Melendi P, Santamaría ME and Díaz I (2012) C1A cysteine-proteases and their inhibitors in plants. *Physiologia Plantarum* 145: 329–338.

Matallana-Ramirez LP, Rauf M, Farage-Barhom S, Dortaya H, Xuec GP, Dröge-Laserd W, Lersb A, Balazadeha S and Mueller-Roeber B (2013) NAC transcription factor ORE1 and senescence-induced BIFUNCTIONAL NUCLEASE1 (BFN1) constitute a regulatory cascade in *Arabidopsis*. *Molecular Plant* 6 (5): 1438-1452.

Mochizuki-Kawai H, Niki T, Shibuya K, and Ichimura K (2015) Programmed cell death progresses differentially in epidermal and mesophyll cells of lily petals. *PLoS ONE* 10 (11): e0143502.

Molseed E 1970. The genus *Tigridia* (Iridaceae) of Mexico and Central America. University of California. Publications in Botany. Berkeley. 54: 1-126.

Morales S. E., Gallos R. A., (2006). Plataformas de proteómicas. Instituto de Biotecnología. UNAM. Obtenido de [http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/plataformas\\_de\\_proteomica.pdf](http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/plataformas_de_proteomica.pdf)

Mótyán, J.A., Tóth, F., y Tözsér, J. (2013). Research applications of proteolytic enzymes in molecular biology. *Biomolecules*. 3:923–942.

Otegui MS, Herder R, Schulze J, Jung R y Staehelin LA. (2006). The proteolytic processing of seed storage proteins in *Arabidopsis* embryo cells starts in the multivesicular bodies. *The Plant Cell Online*. 18: 2567-2581.

Panavas T, E.L Walker, B. Rubinstein (1998) Possible involvement of abscisic acid in senescence of daylily petals. *Journal of Experimental Botany* 49: 1987–1997.

Piña-Escutia JL, Vázquez-García LM and Arzate-Fernández AM (2013) Interspecific hybridization between *Tigridia pavonia* and *T. augusta* through ovary slice culture. *Genetics and Molecular Research* 12 (1): 15-22.

Podzimska-Sroka D, O'Shea C, Gregersen PL, and Skriver K (2015) NAC Transcription Factors in Senescence: From Molecular Structure to Function in Crops. *Plants* 4 (3): 412-448.

Rabiza-Świder J, Skutnik E and Jędrzejuk A (2019) The effect of a sugar-containing preservative on senescence-related processes in cut clematis flowers. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* 47 (2): 432-440.

Rao, M.B., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S., y Deshpande, V. (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 62:597–635.

Rawlings, N.D., y Barrett, J. (1993). Evolutionary families of peptidases. *Biochemical Journal*. 290:205–218.

Roberts IN, Caputo C, Criado MV and Funk C (2012) Senescence-associated proteases in plants. *Physiologia Plantarum* 145 (1): 130-139.

Rogers H.J (2006) Programmed cell death in floral organs: How and why do flowers die? *Annual Botany* 97: 309–315.

Rogers H (2013) From models to ornamentals: how is flower senescence regulated?. *Plant Molecular Biology* 82: 563-574.

Rubinstein B. (2000) Regulation of cell death in flower petals. *Plant Molecular Biology* 44: 303-318.

Saravanan R.S, J.K Rose (2004) A critical evaluation of simple extraction techniques for enhanced proteomic analysis of recalcitrant plant tissues. *Proteomics* 4: 2522-2532.

Schägger, H. (2006). Tricine-SDS-PAGE. *Nature protocols*, 16-22.

Shahri W, Tahir I, Islam ST and Bhat (2011) MA Physiological and biochemical changes associated with flower development and senescence in so far unexplored *Helleborus orientalis* Lam. cv. Olympicus. *Physiology and Molecular Biology of Plants* 17: 33-39.

Shah, M.A., Mir, S.A., y Paray, M.A. (2014). Plant proteases as milk-clotting enzymes in cheesemaking: A review. *Dairy Science & Technology*. 94:5–16.

Shao H, Wang H and Tang X (2015) NAC transcription factors in plant multiple abiotic stress responses: progress and prospects. *Frontiers in Plant Science* 29 (6): 902.

Shibuya K, Yamada T and Ichimura K (2009) Autophagy regulates progression of programmed cell death during petal senescence in Japanese morning glory. *Autophagy* 5 (4): 546-547.

Shibuya K, Shimizu K, Niki T and Ichimura K (2014) Identification of a NAC transcription factor, EPHEMERAL1, that controls petal senescence in Japanese morning glory. *The Plant Journal* 79 (6): 1044-1051.

Shibuya K, Yamada T and Ichimura K (2016) Morphological changes in senescing petal cells and the regulatory mechanism of petal senescence. *Journal of Experimental Botany* 67 (20): 5909-5918.

Shibuya K (2018) Molecular aspects of flower senescence and strategies to improve flower longevity. *Breeding Science* 68 (1): 99-108.

SNITT. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca, y Alimentación (SAGARPA). México. 2016.

Theron, L.W., y Divol, B. (2014). Microbial aspartic proteases: current and potential applications in industry. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 98:8853–8868.

Thimann K.V, Santler S.O, Trippi V. (1982). Further extension of the syndrome of leaf senescence. In: *Plant Growth substance*, ed P.F. Wareing 540548.

Thirumalaikumar VP, Devkar V, Mehterov N, Ali S, Ozgur R, Turkan I, Mueller-Roeber B and Balazadeh S (2018) NAC transcription factor JUNGBRUNNEN1 enhances drought tolerance in tomato. *Plant Biotechnology Journal* 16 (2): 354-366.

Tripathi SK, Singh AP, Sane AP and 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.

Trivellini A, Cocetta G, Hunter DA, Vernieri P and Ferrante A (2016) Spatial and temporal transcriptome changes occurring during flower opening and senescence of the ephemeral hibiscus flower, *Hibiscus rosa-sinensis* *Journal of Experimental Botany* 67 (20): 5919–5931.

Tyndall, J.D.A., Nall, T., y Fairlie, D.P. (2005). Proteases universally recognize  $\beta$ -strands in their active sites. *Chemical Reviews*. 105:973–1000.

Van Doorn W.G, E.J Woltering (2008) Physiology and molecular biology of petal senescence. *Journal of Experimental Botany* 356: 1- 28.

Vázquez, G. L; M. T. Norman y R. M. Corona. 2001a. Oceloxóchiltl, *Tigridia pavonia* (L. f.) DC. uaemex. 69 p.

Vázquez-García L M, Arzate-Fernandez A M, Mungia-Lino G, Piña-Escutia, J L, Leszczyńska-Borys H, M W Borys, Larrucea A, Meza-Aguilar C, 2010. Fenología de especies de *Tigridia*, SINAREFI. Universidad Autónoma del Estado de México. p. 21.

Vázquez G, L. 2011. *Tigridias ornamentales, uso y distribución*. Primera Edición. Ed. UACH, México, 13-106p.

Vázquez G., L. M. 2011b. Catálogo de tigrídias mexicanas. Universidad Autónoma del Estado de México. México. Pag.64.

Verma, S., Dixit, R., y Pandey, K. C. (2016). Cysteine Proteases: Modes of Activation and Future Prospects as Pharmacological Targets. *Frontiers in pharmacology*. 7:107.

Wagstaff C, Bramke I, Breeze E, Thornber S, Harrison E, Thomas B, Buchanan-Wollaston V, Stead T and Rogers H (2010) A specific group of genes respond to cold dehydration stress in cut *Alstroemeria* flowers whereas ambient dehydration stress accelerates developmental senescence expression patterns. *Journal of Experimental Botany* 61 (11): 2905-2921.

Wareing, P.F., Seth, A.K., (1971). Ageing and senescence in the whole plant. In *Aspects of Biology of ageing*. Cande University Press: 200-203.



Waseem S and Inayatullah T (2011) Physiological and biochemical changes associated with flower development and senescence in *Consolida ajacis* Nieuwl cv. Violet blue. *Frontiers of Agriculture in China* 5: 201-208.

Woltering EJ (2019) Why can't we store flowers for longer? Opinion paper on physiological, biophysical and biochemical determinants of premature flower failure after long-term cold storage. *Acta Horticulturae* 1263: 325-334.

Wu, W., y Chen, X.L. (2011). Extracellular metalloproteases from bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 92:253–262.

Yamada T, Takatsu Y, Manabe T, Kasumi M, Marubashi W (2003) Suppressive effect of trehalose on apoptotic cell death leading to petal senescence in ethylene-insensitive flowers of gladiolus. *Plant Science*. 164: 213-22

Yábar V. C. (2003). Manual de procedimientos de electroforesis para proteína y DNA. Instituto Nacional de Salud Lima. Obtenido de [https://bvs.ins.gob.pe/insprint/SALUD\\_PUBLICA/NOR\\_TEC/38.pdf](https://bvs.ins.gob.pe/insprint/SALUD_PUBLICA/NOR_TEC/38.pdf)

Zarza J. L., (2014). Monografía Electroforesis de proteínas. Obtenido de [http://www.ehowenespanol.com/factores-afectan-fenomenos-electroforeticos-info\\_469690/](http://www.ehowenespanol.com/factores-afectan-fenomenos-electroforeticos-info_469690/)

