

ASPECTOS METABÓLICOS DEL CRECIMIENTO Y DESARROLLO DE LAS PLÁNTULAS DE PLÁTANO (CEMSA ^{3/4}) MICROPROPAGADAS EN BIORREACTORES DE INMERSIÓN TEMPORAL (BIT)

C. E. Aragón[✉], Maritza Escalona, Iris Capote, Inaudis Cejas, R. Rodríguez, J. Sandoval, Sophie Roels, P. Debergh y J. L. González-Olmedo

ABSTRACT. The crop techniques in Temporary Immersion Bioreactors constitutes an effective tool for plant propagation; it increases its multiplication coefficient and quality. Little is known so far about the ecophysiology of this new cultivation technique, where plants are subjected to a liquid immersion and the physiologic changes that take place during this stage will be the responsible for plant quality. To evaluate the effects of these conditions on the physiologic change of plantain plants, a descriptive experiment was conducted during the elongation phase. Enzymes related with carbon metabolism measured plant heterotrophic behaviour during the studied phase. High levels of acid invertase (AI) activities and pyruvate kinase (PK) accompanied by low levels of sucrose phosphate synthase (SPS) and phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) evidence these behaviours. The changes induced by the atmosphere on net photosynthesis and transpiration rates demonstrate the tendency of plants to use a less autotrophy metabolism. The plants under *in vitro* conditions do not totally depend on photosynthesis but rather they present a photomixotrophic behaviour.

Key words: bioreactors, photosynthesis, metabolism, carbon, plant physiology, *Musa*

RESUMEN. Las técnicas de cultivo en Biorreactores de Inmersión Temporal (BIT) constituyen una herramienta eficaz para la propagación de plántulas, pues aumenta el coeficiente de multiplicación y la calidad de estas. Poco se conoce hasta el momento sobre la ecofisiología de esta novedosa técnica de cultivo, donde las plántulas son sometidas a una inmersión en medio líquido y los cambios fisiológicos que se producen durante esta etapa serán los responsables de la calidad de las plántulas. Para evaluar los efectos de estas condiciones en el cambio fisiológico de plántulas de plátano, se realizó un experimento descriptivo durante la fase de elongación. Enzimas relacionadas con el metabolismo del carbono fueron la medida del comportamiento heterotrófico de las plántulas durante la fase de estudio. Altos niveles de actividades enzimáticas de las invertasas ácidas (IA) y piruvato quinasa (PQ) acompañados de bajos niveles de actividad sacarosa fosfato sintasa (SFS) y fosfoenolpiruvato carboxilasa (FEPC) evidencian estos comportamientos. Los cambios inducidos por el ambiente sobre los indicadores de fotosíntesis neta y transpiración demuestran la tendencia a la utilización en menor medida de un metabolismo autotrófico. Las plántulas durante las condiciones *in vitro* no dependen totalmente de la fotosíntesis sino que presentan un comportamiento fotomixotrófico.

Palabras clave: biorreactores, fotosíntesis, metabolismo, carbono, fisiología vegetal, *Musa*

INTRODUCCIÓN

El plátano constituye una de las frutas tropicales más comercializables del mundo, con una producción de aproximadamente 70 millones toneladas por año. Con

ello se ha emprendido la micropropagación en masa de genotipos seleccionados; la aplicación de la Inmersión Temporal constituye una de las técnicas más novedosas al respecto (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8). La estrategia de adaptación de las plántulas a las condiciones de los Biorreactores de Inmersión Temporal (BIT) es una combinación de características morfológicas, bioquímicas y fisiológicas, que permiten un uso más eficaz de los recursos del medio interno en el frasco. Los BIT provocan en las plántulas una inmersión completa, seguido de un período de ausencia de medio y estas condiciones pueden provocar cambios metabólicos en las hojas de las plántulas, que posteriormente afectan el proceso de aclimatización. Hojas formadas durante la fase de elongación son anatómicamente y fisiológicamente afectadas

Ms.C. C. E. Aragón, Investigador; Dra.C. Maritza Escalona, Investigadora Titular; Iris Capote, Especialista; Ms.C. Inaudis Cejas, Profesor Auxiliar y Dr.C. J. L. González-Olmedo, Investigador Titular del Laboratorio de Cultivo y Tejidos de Células, Centro de Bioplantitas, Universidad de Ciego de Ávila, CP 69450, Cuba; Dr. R. Rodríguez, Investigador del Departamento de Biología y Organismos de Sistemas, Universidad de Oviedo, España; Dr. J. Sandoval, Director de Investigaciones de la Empresa CORBANA, Costa Rica; Dra. Sophie Roels y Dr. P. Debergh del Departamento de Producción de Plantas, Iniversidad de Gent, Bélgica.

✉ eduardo@bioplantitas.eu

por este ambiente; frecuentemente se observan cambios de pigmentación que repercuten en las características fotosintéticas de las plántulas. Actualmente, varias son las investigaciones que se han desarrollado para explicar estos comportamientos en la micropropagación convencional (9, 10, 11, 12), pero en los BIT muy poco se ha realizado al respecto (13). Una caracterización bioquímica y metabólica de los fundamentales procesos vinculados con el metabolismo del carbono, permite explicar el desarrollo que alcanzan las hojas y cómo pudiera esto permitir una mejor adaptación de las plántulas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Biorreactores de Inmersión Temporal. El sistema está constituido por dos vasos transparentes de Nalgene plástico con un volumen de 250 mL; los dos recipientes se conectaron por una manguera de silicona con 100 mL de medio de cultivo añadidos (10 mL/explante). Los brotes se sumergieron durante cuatro minutos cada tres horas y la corriente de aire se esterilizó por el paso a través de filtros hidrófobos de 0.2 μm . La presión positiva de un compresor de aire empujó el medio de un recipiente al otro para sumergir las plántulas completamente. La corriente de aire fue invertida para retirar el medio del recipiente. Los cronómetros electrónicos controlaron la frecuencia y longitud del período de la inmersión. Las válvulas solenoides trifásicas proporcionaron el funcionamiento del encendido/apagado (5).

Material vegetal. Las plántulas de plátano (clon CEMSA ¾) (AAB) se proliferaron utilizando las condiciones de cultivo de inmersión temporal previamente establecidas (5) en MS (14) sales y vitaminas, complementado con 3 % sacarosa y Metatopolin 4.44 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, donde el pH se ajustó a 5.8 antes del autoclaveado a 121°C y 118 kPa durante 30 minutos. Se incubaron las plántulas a 25°C bajo tubos fluorescentes blancos que proporcionan 30-40 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ con un fotoperíodo de 16 horas luz 8 oscuridad. Inicialmente diez explantes de plátano provenientes de la micropropagación convencional (3-4 subcultivo) fueron colocados en cada biorreactor. Los brotes colocados en los biorreactores fueron divididos longitudinalmente y previamente decapitados. El experimento se dirigió durante la fase de elongación en BIT (21 días) con medio MS sin regulador del crecimiento.

Determinación de variables fotosintéticas. Para la medición de la capacidad fotosintética neta máxima, se utilizaron hojas totalmente extendidas de los retoños entre cuatro y cinco horas después del principio del fotoperíodo. Las capacidad fotosintética máxima y transpiración fueron medidas con un CIRAS-2 (Sistema Portátil de Fotosíntesis, Europa, PP Systems, UK). El área de la cubeta (PLC6) se cubrió completamente con la hoja más joven completamente expandida (2.5 cm^2). La concentración de dióxido de carbono y humedad relativa fueron valores ambientales de aproximadamente 375 $\mu\text{mol.mol}^{-1}$ y 80 %, bajo luz controlada. Las medidas se hicieron a cinco

plántulas con diez repeticiones para un total de 50 valores. La fotosíntesis se expresó en $\mu\text{mol de CO}_2.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ y la transpiración en $\text{mmol de H}_2\text{O}.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Para la determinación de la luz óptima donde la fotosíntesis fuera máxima y estable, se realizaron curvas de saturación de luz donde este valor resultó ser 600 $\mu\text{mol de fotones}.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

Las masas fresca y seca se determinaron después de las medidas de intercambio de gas; para el peso seco se secaron las plántulas durante 72 horas a 70°C.

Todas las mediciones fueron realizadas cada siete días durante la fase de elongación, con 30 medidas para los indicadores morfológicos.

Extracción y actividad enzimáticas para las invertasas ácidas (IA) y sacarosa fosfato sintasa (SFS). Diez hojas correspondientes a diez plántulas (250 mg) se colocaron inmediatamente en nitrógeno líquido y fueron maceradas en mortero. Se extrajeron las enzimas por el método descrito según Geigenberg y Stitt (15). Las actividades SPS y IA se realizaron utilizando el procedimiento informado por Van Quy (12). La síntesis de sacarosa se determinó por el método de la antrona (16) y la formación de hexosas como describieron Miron y Schaffer (17).

Extracción y actividad enzimáticas para la fosfoenolpiruvato carboxilasa (FEPC) y piruvato quinasa (PQ). Diez hojas correspondientes a diez plántulas se colocaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se maceraron. Las enzimas fueron extraídas resuspendiendo el material en 1 mL de HEPES-KOH (50 mmol.L^{-1}), MgCl_2 (12 mmol.L^{-1}), EGTA (1 mmol.L^{-1}), EDTA (1 mmol.L^{-1}), DTT (1 mmol.L^{-1}), 10 % glicerol, benzamidina (2 mmol.L^{-1}), ácido n-amino caprónico (2 mmol.L^{-1}) a pH 7.4, según Siegel y Stitt (18). La reacción catalizada por la FEPC se acopló con la reacción de la malato deshidrogenasa y se ensayó a 25°C, registrando la utilización de NADH a 340 nm en un espectrofotómetro (Pharmacia). La solución de ensayo contuvo 1 mL de solución (19), 718 μL de HEPES-KOH (50 mmol.L^{-1}), pH 7.6, 10 μL de NaHCO_3 (1 mol.L^{-1}), 10 μL de NADH (20 mmol.L^{-1}), 10 μL de MgCl_2 (1 mol.L^{-1}), 1 μL de DDT (1 mol.L^{-1}), 1 μL de EDTA (1 mol.L^{-1}), cinco unidades de malato deshidrogenasa, 20 μL de Glucosa-6P (1 mmol.L^{-1}) y 25 μL del extracto. Las reacciones fueron comenzadas agregando 5 μL de fosfoenolpiruvato (1 mol.L^{-1}). La reacción de PQ se acopló con la reacción de la lactato deshidrogenasa y se ensayó a 25°C seguida por la utilización de NADH a 340 nm. La actividad de PQ se ensayó en tampón imidazol-HCl (50 mmol.L^{-1}), fosfoenolpiruvato (2 mmol.L^{-1}), ADP (2 mmol.L^{-1}), MgCl_2 (10 mmol.L^{-1}), KCl (30 mmol.L^{-1}), NADH (0.15 mmol.L^{-1}) y 2.5 unidades. mL^{-1} desalinizados de lactato deshidrogenasa de músculo de conejo para un volumen final de 1 mL a pH 7.0. Las actividades enzimáticas se expresaron en U/g MF, donde 1 U corresponde a 1 μmol de sustrato transformado por hora.

Determinación de la concentración de sacarosa. En las hojas y el medio de cultivo se utilizó un KIT (SIGMA-ALDRICH Co). Se tomó 1 mL de medio de cultivo cada siete días y un gramo de material vegetal de 10 hojas correspondientes a 10 plántulas durante los 21 días de la

elongación. El contenido de sacarosa en el medio de cultivo se expresó en g/100 mL y en las hojas en mg/g MF. **Análisis estadístico.** Se realizaron los análisis estadísticos utilizando el SPSS versión 8.0. Los análisis para la fotosíntesis, transpiración e indicadores morfológicos se realizaron a través de una prueba de clasificación simple ANOVA, seguida de una prueba de *Tukey* para un 5 % como análisis paramétrico. Dentro de los análisis no paramétricos realizados a los resultados de actividades enzimáticas y cuantificación de sacarosa, se realizó una prueba de comparación *Kruskal Wallis* y una prueba de clasificación *Student-Newman-Keuls* para un 5 % de significación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los indicadores morfológicos de calidad de los brotes durante la fase de elongación sugieren un desarrollo de las plántulas durante esta etapa, donde se incrementan fundamentalmente a los 21 días (Tabla I). La altura de la planta demuestra que a los 21 días es el momento de mayor desarrollo del material vegetal. La variación de la masa seca fue significativa en el final de esta etapa como un verdadero indicador de crecimiento. La disminución de indicadores como el número de hojas y diámetro del tallo a los 21 días puede estar relacionado con el momento en el que el volumen del frasco es limitante y el crecimiento en longitud de las plántulas es máximo (7.02 cm). A los 21 días, la altura de las plantas (7.02 cm) fue muy similar a la altura de los frascos, por lo que se observó que prácticamente toparon con el borde superior de los frascos. Otro factor adverso pudo ser el agotamiento de la fuente de carbono producto de la hidrólisis en el medio de cultivo y su incapacidad de ser asimilado como azúcares no reductores; los valores quedaron aproximadamente a la mitad de la concentración inicial.

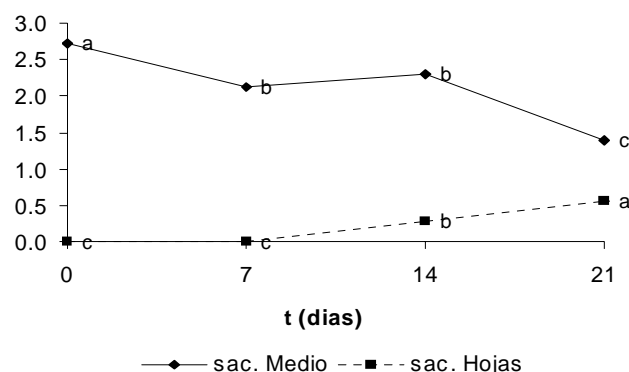
Tabla I. Indicadores morfológicos de las vitroplántulas durante la fase de elongación

Indicadores morfológicos	Días				es	Sig.
	0	7	14	21		
Altura (cm)	4.55 b	4.85 b	5.00 b	7.02 a	0.35	*
Número de hojas	4.85 b	5.08 a	5.08 a	4.50 b	0.26	*
Diámetro del tallo (cm)	0.57 ab	0.58 ab	0.57 a	0.51 b	0.19	*
Longitud de la hoja (cm)	3.07	3.19	3.17	2.87	0.42	ns
Ancho de la hoja (cm)	1.18	1.23	1.24	1.13	0.36	ns
Masa fresca (g)	2.13	2.21	2.2	1.87	0.39	ns
Masa seca (mg)	43.23 b	42.18 b	103.56 a	137.03 a	0.88	*

Letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias para un grado del 5 % en la prueba de *Tukey* (n=30)

Los estudios de los niveles de sacarosa en el medio de cultivo demostraron que de una concentración inicial de 30 g.L⁻¹, al cabo de los 21 días esta se redujo a 13.8 g.L⁻¹, equivalente al 46 % de los niveles iniciales de sacarosa (Figura 1). En las hojas la técnica empleada no permitió detectar sacarosa al inicio del proceso de elongación; ya a partir de los siete días y hasta los 21

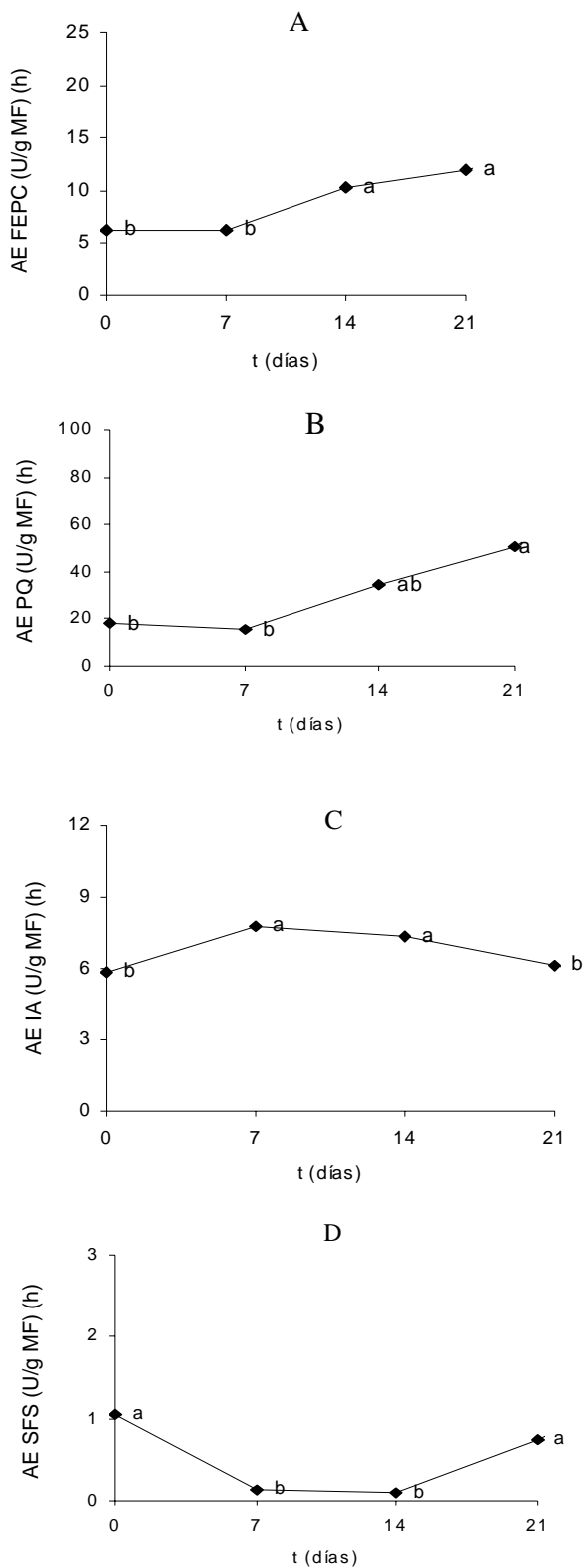
días de elongación se observó un incremento gradual. A partir de los siete días, la incorporación de la sacarosa del medio de cultivo es evidente, pasando al interior de las hojas como fuente primaria de carbono. Estas reservas pudieran ser utilizadas posteriormente durante la aclimatación (9).



Letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias, para un grado del 5 % en la prueba de *Student-Newman-Keuls*; n=9

Figura 1. Contenido de sacarosa en el medio de cultivo (g/100 mL) (es=0.19) y en las hojas (mg/g MF) (es=0.09) durante la fase de elongación

La actividad de la enzima FEPC, responsable de la síntesis de fosfoenolpiruvato y vinculada a procesos anabólicos, aumentó en la segunda semana del proceso evaluado (Figura 2A). Los mayores niveles se alcanzaron a los 14 y 21 días de elongación. El comportamiento de la actividad PQ, enzima sintetizadora de piruvato a partir de fosfoenolpiruvato y vinculada a procesos catabólicos, fue similar al de la FEPC durante la fase evaluada, con una tendencia al aumento (Figura 2B). Existe una estrecha relación funcional competitiva entre estas dos enzimas, donde comparten el mismo sustrato (fosfoenolpiruvato) para desempeñar su función catalítica. La alta actividad de ambas enzimas durante el final de la fase de elongación, revela un suficiente suministro de sacarosa a las células por parte del medio de cultivo, aspecto que favorece la no competencia entre ellas. La invertasa ácida mostró un incremento en el comienzo de la fase de elongación, debido a la necesidad de las plántulas de degradar la sacarosa presente en el medio para ser utilizada como fuente de carbono (12) (Figura 2C). El descenso ocurrido a los 21 días puede estar relacionado con los momentos donde aún con sacarosa en el medio de cultivo la planta no hace uso de ella. Los resultados de sacarosa en las hojas revela la incorporación de este carbohidrato en ellas, gracias a la incorporación de la sacarosa por medio de la IA. Por otra parte, la actividad de la SFS, enzima encargada de sintetizar sacarosa a expensas de las hexosas obtenidas en la fotosíntesis, mostró una baja actividad durante la elongación (20) (Figura 2D).



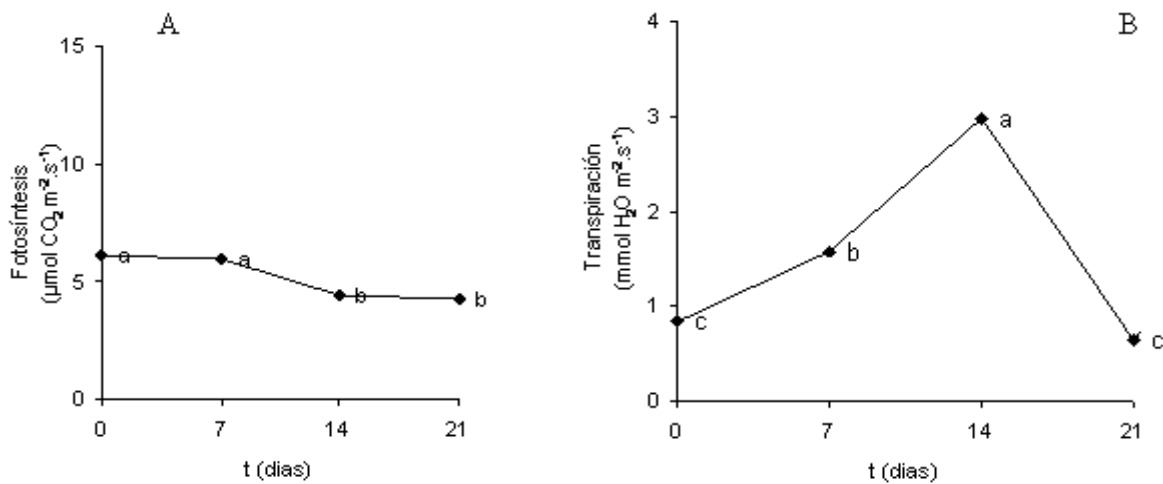
Letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias para un grado del 5 % en la prueba de *Student-Newman-Keuls* (n=9)

Figura 2. Cambios en las actividades enzimáticas Fosfoenol Piruvato Carboxilasa (FEPC) ($es=2.03$) (A); Piruvato Quinasa (PQ) ($es=8.55$) (B), Invertasa Acida (IA) ($es=0.11$) (C) y Sacarosa Fosfato Sintasa (SFS) ($es=0.06$) (D) durante la fase de elongación. 1 U corresponde a 1 μmol de sustrato transformado por hora

Las plántulas cultivadas *in vitro* en condiciones heterotróficas no requieren de la síntesis de sacarosa, pues la obtienen del medio con gran facilidad, además que los niveles de fotosíntesis, como suministros de azúcares, en estas condiciones fueron bajos. Los mayores niveles de actividad enzimática corresponden con los momentos donde la concentración de sacarosa en el medio es baja, final de multiplicación y final de elongación, momento en el cual la actividad de la enzima es necesaria aún cuando no se observen aumentos de la actividad fotosintética (Figura 3A).

Los mayores valores de fotosíntesis se obtuvieron al inicio del proceso, los cuales pueden estar relacionados con el agotamiento de sacarosa en el medio de multiplicación y de ahí la necesidad de ser sintetizada por la planta (Figura 3A). En general, la fotosíntesis en las plántulas en condiciones *in vitro* es menor que *ex vitro* (12). La causa fundamental es la presencia de un medio heterotrófico por los niveles de sacarosa, lo cual disminuye la actividad de la enzima RubisCO (21, 22). Para bananos se han informado valores de fotosíntesis *in vitro* generalmente bajos (23), los cuales pudieran estar según Karstens *et al.* (24) en el orden de -1.5 a $0.5 \mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ y de 10 a $28 \mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ para las condiciones *ex vitro*. Los estudios de transpiración realizados de forma conjunta con el rendimiento fotosintético, revelaron que durante la fase de elongación la introducción de un medio rico en sacarosa, un sistema cerrado y un cultivo en medio líquido son factores que favorecen la apertura de los estomas en las hojas y con ello registros altos de transpiración, mostrados a los 14 días de elongación (25) (Figura 3B). A los 21 días de la fase de elongación, se hace evidente una disminución quizá por condiciones de estrés causadas por limitación del volumen del frasco y el momento de mayor desarrollo de las plántulas, además del agotamiento del medio de cultivo en cuanto a nutrientes como sacarosa, lo que en general puede inducir el cierre estomático como un mecanismo para evitar la pérdida de agua por las hojas. Los resultados en los análisis morfológicos del número de hojas y diámetro del tallo respaldan este comportamiento.

La fotosíntesis *in vitro* fue influida por los BIT en comparación con los niveles informados en la micropropagación convencional; para el caso del plátano estos niveles en los BIT son mayores (23). La fase de elongación de las plántulas en los BIT fue descrita bajo un carácter heterotrófico por la marcada actividad de la enzima piruvato quinasa, enzima glicolítica y por ende sustentadora de una nutrición heterotrófica, además de la baja actividad de la enzima sacarosa fosfato sintasa. Para el caso de la IA, valores similares de actividad han sido informados para otros cultivos como tomate micropropagados por vía convencional (9), aspecto sobre el cual los BIT no crearon diferencias. La presencia de niveles de fotosíntesis corrobora más que el carácter heterotrófico, el comportamiento fotomixotrófico del cultivo *in vitro* en BIT (26).



Letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias para un grado del 5 % para la prueba de Tukey, n=50

Figura 3. Fotosíntesis neta (A) (es 0.3) y transpiración (B) (es 0.5) para las plántulas durante la fase de elongación

La asimilación de la sacarosa del medio de cultivo quedó descrita a través de la actividad de la enzima invertasa ácida y el balance de la sacarosa en el medio de cultivo y las hojas. Las caracterizaciones metabólica y fisiológica del cultivo *in vitro* en BIT con medio líquido como medio de cultivo, constituyen aportes a estas nuevas técnicas de cultivo y a comprender la evolución ecofisiológica de los ambientes generados en los sistemas de inmersión temporal. El comportamiento fotomixotrófico demostrado para las plántulas de plátano en los BIT, demuestra que es una técnica que le confiere a las plántulas un acercamiento a una forma de obtención de energía más favorable, para enfrentar las condiciones externas durante la aclimatización (27, 28). Resultados similares en cuanto a la no dependencia total de los brotes de la fotosíntesis fueron obtenidos en brotes de piña (8). La combinación de ambas formas de obtención de energía pudiera permitir mejor la adaptación de las plántulas hasta alcanzar el completo autotrofismo.

AGRADECIMIENTOS

A la Comunidad Europea por el financiamiento aportado para la investigación (proyecto INCO ICA4-CT-2001-10063).

REFERENCIAS

- Teisson, C. y Alvard, D. A new concept of plant *in vitro* cultivation liquid medium: temporary immersion. En: Current issues in plant molecular and cellular biology. Dordrecht : Kluwer Academic Publisher. 1995. p. 105-110.
- Aitken-Christie, J.; Kozai, T. y Takayama, S. Automation in plant tissue cultures - general information and overview. En: Automation and environmental control in plant tissue culture. Dordrecht : Kluwer Academic Publisher. 1995. p. 1-18.
- Levin, R.; Gaba, V. y Beni, T. Automated plant tissue culture for mass propagation. *Bio/Technology*, 1998, vol. 6, p. 1035-1038.
- Lorenzo, J. C.; Blanco, M. A.; Peláez, O.; González, A.; Cid, M.; Iglesias, A.; González, B.; Escalona, M.; Espinosa, P. y Borroto, C. G. Sugarcane micropropagation and phenolic excretion. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2001, vol. 65, no. 3, p. 1-8.
- Escalona, M.; Lorenzo, J. C.; González, B.; Daquinta, M.; Borroto, C. G.; González, J. L. y Desjardins, Y. Pineapple micropropagation in temporary immersion systems. *Plant Cell, Rep.*, 1999, vol. 18, p. 743-748.
- Jimenez, E.; Pérez, N.; Feria, M. de; Barbón, R.; Capote, A.; Chávez, M.; Quijál, E. y Pérez, J. Improved production of potato microtubers using a temporary immersion system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1999, vol. 59, p. 19-23.
- Etienne, E. y Berthouly, M. Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2002, vol. 69, p. 215-231.
- Escalona, M.; Cejas, I.; Gonzalez-Olmedo, J.; Capote, I.; Roels, S.; Cañal, M. J.; Rodríguez, R.; Sandoval, J. y Debergh, P. The effect of meta-topolin on plantain propagation using a Temporary Immersion Bioreactor. *INFOMUSA*, 2003, vol. 12, no. 2, p. 28-30.
- Van Huylbroeck, J. M. y Riek, J. de. Sugar and starch metabolism during *ex vitro* rooting and acclimatization of micropropagated *Spathiphyllum* 'Petite' plantlets. *Plant Sci.*, 1995, vol. 111, p. 19-25.
- Preece, J. E. y Sutter, E. G. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. En: Micropropagation. The Netherlands : Kluwer Academic Publishers; 1991, p. 71-93.
- Wilson, S. B.; Kubota, C.; Heo, J. W.; Rajapakse, N. C.; Young, R. E. y Kozai, T. Carbohydrate status of micropropagated photoautotrophic and photomixotrophic plantlets. En: Abstr. Intl. Symp. on transplant production in closed system for solving the global issues on environmental conservation, food, resource and energy (2000 feb. 28-mar. 2:Chiba), 2000.

12. Van Quy, L.; Samsom, G. y Desjardins, Y. Opposite effects of exogenous sucrose on growth, photosynthesis and carbon metabolism of *in vitro* plantlets of tomato (*L. esculentum* Mill.) grown under two levels of irradiance and CO₂ concentration. *Plant Physiology*, 2001, vol. 158, p. 599-605.
13. Escalona, M.; Samson, G.; Borroto, C. y Desjardins, Y. Physiology of the effects of Temporary Immersion Bioreactors on micropropagated pineapple plantlets. *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, 2003, vol. 39, no. 6, p. 651-656.
14. Murashige, T. y Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology*, 1962, vol. 15, p. 473-497.
15. Geigenberger, P. y Stitt, M. A "futile" cycle of sucrose synthesis and degradation is involved in regulating partitioning between sucrose, starch and respiration in cotyledons of germinating *Ricinus communis* L. seedlings when phloem transport is inhibited. *Planta*, 1991, vol. 185, p. 81-90.
16. Van Handel, E. Direct microdetermination of sucrose. *Ann. Biochemistry*, 1968, vol. 22, p. 280-283.
17. Miron, D. y Schaffer, A. Sucrose phosphate synthase, sucrose synthase and invertase activities in developing fruit of *Lycopersicon esculentum* Mill. sucrose accumulation *Lycopersicon hirsutum* Humb and Bonpl. *Plant Physiology*, 1991, vol. 95, p. 623-627.
18. Van Quy, L.; Lamaze, T. y Champigny, M. L. Effect of light and NO₃⁻ on wheat leaf phosphoenolpyruvate carboxylase activity. Evidence for covalent modulation of the C3 enzyme. *Plant Physiology*, 1991, vol. 97, p. 1476-1482.
19. Siegel, G. y Stitt, M. Partial purification of two forms of spinach leaf sucrose-phosphate synthase which differ in their kinetic properties. *Plant Science*, 1990, vol. 66, p. 205-210.
20. Desjardins, Y. Photosynthesis *in vitro*. On factors regulating CO₂ assimilation in micropropagation systems. *Acta Horticulture*, 1995, vol. 393, p. 45-61.
21. Hdider, C. y Desjardins, Y. Effects of sucrose on Pn and phosphoenolpyruvate carboxylase activity of *in vitro* cultured strawberry plantlets. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1994, vol. 36, p. 27-36.
22. Pospíšilová, J.; Catsky, J. y Sesták, Z. Photosynthesis in plants cultivated *in vitro*. En: Handbook of photosynthesis. 1997, p. 525-540.
23. Nguyen, Q. T. y Kozai, T. Growth of *in vitro* banana (*Musa* spp.) shoots under photomixotrophic and photoautotrophic conditions. *In Vitro Cell, Development Biology*, 2001, vol. 37, p. 824-829.
24. Karstens, G. S.; Ebert, G. y Ludders, P. Diurnal time course of CO₂ exchange in closed and open gas systems for coffee (*Coffea arabica* L.), pomegranate (*Punica granatum* L.), citrus (*Citrus limonia* Osb.), grape (*Vitis vinifera* L.), and banana (*Musa x paradisiaca* L.) *in vitro* plantlets under different environment conditions. *Angew. Bot.*, 1996, vol. 70, p. 155-162.
25. Yue, D.; Desjardins, Y.; Lamarre, M. y Gosselin, A. Photosynthesis and transpirations of *in vitro* culture asparagus plantlets. *Science Horticulture*, 1992, vol. 49, p. 9-16.
26. Wilson, S. B.; Kubota, C.; Heo, J. W.; Rajapakse, N. C.; Young, R. E. y Kozai, T. Carbohydrate status of micropropagated photoautotrophic and photomixotrophic plantlets. Abstr. Intl. Symp. on transplant production in closed system for solving the global issues on environmental conservation, food, resource and energy (2000 feb. 28-nov. 2:Chiba) 2000.
27. Van Huylbroeck, J. M.; Piqueras, A. y Debergh, P. C. Photosynthesis and carbon metabolism in leaves formed prior and during *ex vitro* acclimatization of micropropagated plants. *Plant Sci.*, 1998, vol. 134, p. 21-30.
28. Van Huylbroeck, J. M.; Piqueras, A. y Debergh, P. C. The evolution of photosynthesis capacity and the antioxidant enzymatic system during acclimatization of micropropagated Calathea plants. *Plant Sci.*, 2000, vol. 155, p. 59-66.

Recibido: 18 de octubre de 2004

Aceptado: 9 de diciembre de 2005