

Evaluación del efecto de las condiciones generadas por Biorreactores de inmersión temporal sobre enzimas y procesos clave del metabolismo del carbono en plantas *in vitro* de plátano cv. CEMSA ^{3/4}

Carlos E. Aragón*, Maritza Escalona, Iris Capote, Danilo Pina, Inaudis Cejas, Justo González-Olmedo. *Autor para correspondencia.

Laboratorio de Células y Cultivo de tejidos, Centro de Bioplantas, Universidad de Ciego de Ávila, CP 69 450, Cuba. e-mail: eduardo@bioplantas.cu

RESUMEN

Los Biorreactores de Inmersión Temporal (BIT) constituyen una herramienta eficaz para la propagación de plantas *in vitro*, pues aumentan el coeficiente de multiplicación y la calidad de las mismas. Poco se conoce hasta el momento sobre la ecofisiología de esta novedosa técnica de cultivo, donde las plantas son sometidas a una inmersión en medio de cultivo líquido y los cambios fisiológicos que se producen durante esta etapa son los responsables de la calidad de las plantas. En el presente trabajo se desarrolló la evaluación del efecto de las condiciones generadas por los BIT en la fisiología y metabolismo del carbono de plantas *in vitro* de plátano. Enzimas relacionadas con el metabolismo del carbono fueron la medida del comportamiento heterotrófico de las plantas 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 fosfoenol piruvato carboxilasa (FEPC), evidenciaron estos comportamientos. Los cambios inducidos por el ambiente sobre los indicadores de fotosíntesis neta y transpiración demostraron la tendencia de las plantas a utilizar en menor medida el metabolismo autotrófico. Las plantas durante las condiciones *in vitro* no dependieron totalmente de la fotosíntesis sino que presentaron un comportamiento fotomixotrófico.

Palabras clave: Fosfoenolpiruvato carboxilasa (FEPC), invertasa ácida (IA), piruvato quinasa (PQ), Sacarosa fosfato sintasa (SFS)

ABSTRACT

The technique of Temporary Immersion constitutes an effective tool for the plant propagation; it increases the multiplication coefficient and the quality of the same ones. Little it is known until the moment about the eco-physiology of this new cultivation technique where the plants are subjected to an immersion between liquid and the physiologic changes that take place during this stage will be those responsible for the plants quality. To evaluate the effects of these conditions in the physiologic change of plantain plants, a descriptive experiment was directed during the elongation phase. Enzymes related with the carbon metabolism were measure of the plant heterotrophic behaviour during the studied phase. High levels of acid invertase (AI) activities and pyruvato kinase (PK) accompanied by first floor levels of sucrose phosphate synthase (SPS) and phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC), evidence these behaviours. The changes induced by the atmosphere and the indicative net photosynthesis and transpiration demonstrate the tendency from the plants to be a less autotrophy systems. The plants during the *in vitro* conditions don't depend totally on the photosynthesis but rather they present photomixotrophic behaviour.

Key words: acid invertase (AI), Phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC), pyruvato kinase (PK), sucrose phosphate synthase (SPS)

INTRODUCCIÓN

El plátano constituye una de las frutas tropicales que más se comercializa en el mundo, con una producción de aproximadamente 70 millones de toneladas por año (Nguyen y Kozai, 2001). Con ello se ha emprendido la propagación masiva *in vitro* de genotipos seleccionados. La aplicación de la Inmersión Temporal, como técnica de micropropagación, constituye una de las variantes más novedosas y de gran utilidad en varios cultivos (Aitken-Christie *et al.*, 1995; Teisson y Alvard, 1995; Levin *et al.*, 1998; Lorenzo *et al.*, 1998; Escalona *et al.*, 1999; Jiménez *et al.*, 1999; Etienne y Berthouly, 2002; Escalona *et al.*, 2003a).

La estrategia de adaptación de las plantas a las condiciones de los Biorreactores de Inmersión Temporal es una combinación de características morfológicas, bioquímicas y fisiológicas que permiten un uso más eficaz de los recursos del medio interno en el frasco. Hojas formadas durante la fase de elongación son anatómicamente y fisiológicamente afectadas por este ambiente, frecuentemente se observan cambios de pigmentación que repercuten en las características fotosintéticas de las plantas. Sin embargo, en el caso de plátano no hay suficientes evidencias de las variaciones que ocurren a nivel enzimático durante el crecimiento de las plantas en estos sistemas. En consecuencia, en este trabajo se pretende evaluar el efecto de las condiciones

generadas por los BIT sobre enzimas y procesos clave del metabolismo del carbono en plantas *in vitro* de plátano cv. CEMSA ¾ .

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Las plantas *in vitro* de plátano (cultivar CEMSA ¾) (AAB) procedentes del tercer subcultivo en medio de cultivo semisólido MS (Murashige y Skoog, 1962) con 3 % de sacarosa, 8.88 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ de bencil adenina y 4.92 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ de ácido indolbutírico, se multiplicaron utilizando las condiciones de cultivo de inmersión temporal previamente establecidas para piña (Escalona *et al.*, 1999) en medio de cultivo MS de sales y vitaminas. El medio de cultivo se complementó además 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 1180 hPa durante 30 minutos. Las plantas se incubaron a 25°C bajo tubos fluorescentes blancos que proporcionaron 30-40 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ con un fotoperíodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad. Diez explantes de plátano provenientes de la micropropagación convencional (3er subcultivo) fueron colocados en cada biorreactor. Los brotes fueron decapitados y divididos longitudinalmente. El experimento se dirigió durante la etapa de elongación (21 días) con medio de cultivo MS sin reguladores del crecimiento.

Biorreactores de Inmersión Temporal

El sistema estuvo constituido por dos vasos transparentes de Nalgene Plástico con una capacidad de 250 ml, los dos recipientes se conectaron por una manguera de silicona, uno de los frascos contenía 100 ml de medio de cultivo (10 ml/explante). Los brotes se sumergieron durante cuatro minutos cada tres horas, 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 impulsó el medio de cultivo de un recipiente al otro para sumergir las plantas completamente. La corriente de aire fue invertida para retirar el medio de cultivo del recipiente. Un cronómetro electrónico controló la frecuencia y longitud del período de la inmersión, 10 válvulas de solenoide trifásicas proporcionaron el funcionamiento del encendido/apagado (Escalona *et al.*, 1999).

Determinación de parámetros morfológicos

Todas las mediciones fueron realizadas cada siete días durante la etapa de elongación con 30 medidas para los siguientes indicadores morfológicos: altura de la planta (cm), número de hojas, diámetro del tallo (cm), longitud de la hoja (cm), ancho de la hoja (cm), masa fresca (g) y masa seca (mg).

La masa fresca y seca fueron determinadas después de las medidas de intercambio de fotosíntesis y

transpiración (descritas más abajo). Para la determinación de la masa seca se secaron las plantas durante 72 horas a 70 °C.

Determinación de la concentración de sacarosa

Para la determinación de la concentración de sacarosa en las hojas y en el medio de cultivo se utilizó un Kit comercial (SIGMA - ALDRICH Co). Se tomó 1.0 ml de medio de cultivo cada siete días y 1 g de material vegetal de las hojas también cada siete días durante los 21 días de la etapa de elongación.

Determinación de parámetros fotosintéticos

Los parámetros fotosintéticos determinados fueron la fotosíntesis neta que se expresó en $\mu\text{mol de CO}_2.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ y la transpiración expresada en $\text{mmol de H}_2\text{O}.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Para la medición de la capacidad fotosintética máxima, se utilizaron hojas totalmente extendidas de las plantas *in vitro* de plátano entre cuatro y cinco horas después del principio del fotoperíodo. Las capacidad fotosintética máxima y la transpiración fueron medidas con un Sistema Portátil de Fotosíntesis CIRAS-2 (PP Systems, UK) acoplado a una cubeta universal (PLC6). El área de la cubeta se cubrió completamente con la hoja más joven completamente expandida (2.5 cm^2). La concentración de dióxido de carbono y la humedad relativa fueron valores ambientales 375 $\mu\text{mol.mol}^{-1}$ y 80 %, bajo luz controlada. Las mediciones se hicieron a cinco plantas con diez repeticiones para un total de 50 valores. 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 $\mu\text{mol de fotones.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

Medición de las actividades enzimáticas para la fosfoenolpiruvato carboxilasa (FEPC) y piruvato quinasa (PQ)

Fueron colocados 250 mg de fragmentos de las hojas directamente en nitrógeno líquido y se maceraron en un mortero. Las enzimas fueron extraídas resuspendiendo el material vegetal en 1.0 ml de 50 mmol.l^{-1} Hepes-KOH, 12 mmol.l^{-1} MgCl_2 , 1.0 mmol.l^{-1} ácido dietilenglicol etilendiamino tetra-acético, 1.0 mmol.l^{-1} ácido etilendiamino tetra-acético (EDTA), 1.0 mmol.l^{-1} de ditiotreitól (DTT), 10 de % glicerol, 2.0 mmol.l^{-1} de benzamidina, 2.0 mmol.l^{-1} ácido n-amino capríco a pH 7.4 según Siegel y Stitt (1990). La reacción catalizada por la PEPC se acopló con la reacción de la malato deshidrogenada, se ensayó a 25°C y se registró la utilización de dinucleótido de nicotina y adenina (NADH) a 340 nm en un espectrofotómetro (Farmacia). La solución de ensayo contuvo un volumen total de 1.0 ml de solución (Le *et al.*, 1991) el cual estuvo dividido en: 718 μl 50 mmol.l^{-1} Hepes-KOH, pH 7.6, 10 μl 1.0 mol.l^{-1} NaHCO_3 , 10 μl 20 mmol.l^{-1} NADH, 10 μl 1.0

mol.l⁻¹ MgCl₂, 1.0 µl 1.0 mol.l⁻¹ DDT, 1.0 µl 1.0 mol.l⁻¹ EDTA, 5.0 unidades de malato deshidrogenasa, 20 µl 1.0 mmol.l⁻¹ glucosa-6P y 25 µl del extracto de hojas. Las reacciones fueron iniciadas con 5.0 µl 1.0 mol.l⁻¹ de fosfoenolpiruvato. La reacción de PK se acopló con la reacción de la lactato deshidrogenasa y se ensayó a 25°C seguida por el consumo de NADH a 340 nm. La actividad de PK se ensayó en tampón imidazol-HCl 50 mmol.l⁻¹, 2.0 mmol.l⁻¹ fosfoenolpiruvato, 2.0 mmol.l⁻¹ adenosin di fosfato, 10 mmol.l⁻¹ MgCl₂, 30 mmol.l⁻¹ KCl, 0.15 mmol.l⁻¹ NADH y 2.5 unidades.ml⁻¹ desalinizados de lactato deshidrogenasa de músculo de conejo (SIGMA), para un volumen final de 1.0 ml a pH 7.0.

Medición de la actividad enzimática para las invertasas ácidas (IA) y sacarosa fosfato sintasa (SFS)

Se colocaron 250 mg de segmentos de las hojas directamente en nitrógeno líquido y fueron maceradas en un mortero. Las enzimas se extrajeron por el método descrito por Geigenberg y Stitt (1991). Las actividades SPS e IA se midieron utilizando el procedimiento informado por Raphael Anguenot (2003). La síntesis de sacarosa se determinó por el método de la antrona (Van Handel, 1968) y la formación de hexosas según Miron y Schaffer (1991).

Análisis estadístico

Se realizaron los análisis estadísticos con el uso del utilitario 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 Kruscall Wallis y una prueba de clasificación Student-Newman-Keuls para un 5% de significación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Determinación de parámetros morfológicos

Las variables morfológicas de calidad de los brotes durante la etapa de elongación sugirieron un desarrollo de las plantas durante esta etapa, donde todas las variables se incrementaron fundamentalmente a los 21 días (Tabla 1). La altura de las plantas y el número de hojas demostraron que, dentro de la etapa de elongación, a los 21 días fue el momento de mayor desarrollo del material vegetal. La variación de la masa seca fue significativa en el final de esta fase como una de las variables más confiables para medir el desarrollo de las plantas *in vitro* de plátano. La disminución del número de hojas y el diámetro del tallo a los 21 días pudieron estar relacionados con el momento en el que el volumen del frasco fue limitante y el crecimiento en longitud de las plantas fue máximo, además, de los factores adversos que pudieran estar relacionados con el agotamiento en la fuente de carbono.

Tabla 1. Indicadores morfológicos de plantas *in vitro* de plátano (cv CEMSA 3/4) durante la etapa de elongación en BIT.

Indicadores Morfológicos	Días			
	0	7	14	21
Altura (cm)	4.55 b	4.85 b	5.00 b	7.02 a
No. hojas	4.85 b	5.08 a	5.08 a	4.50 b
Diámetro del tallo (cm)	0.57 ab	0.58 ab	0.57 a	0.51 b
Longitud de la hoja (cm)	3.07	3.19	3.17	2.87
Ancho de la hoja (cm)	1.18	1.23	1.24	1.13
Masa fresca (g)	2.13	2.21	2.2	1.87
Masa seca (mg)	43.23 b	42.18 b	103.56 a	137.03 a

Medias con letras diferentes en una misma fila indican diferencias significativas entre las medias para un grado de confiabilidad del 5% para la prueba de Tukey (n=30).

Determinación de la concentración de sacarosa

El análisis de la concentración de sacarosa en el medio de cultivo demostró que de una concentración inicial de 30 g.l⁻¹, al cabo de los 21 días ésta se redujo a 13.8 g.l⁻¹, equivalente al 46 % de la concentración inicial (Figura 1). En las hojas no se detectó sacarosa al inicio del proceso de elongación, ya a partir de los siete días y hasta los 21 días se observó un incremento gradual lo que indicó la incorporación de la sacarosa del medio de cultivo y su transporte al interior de las hojas como fuente primaria de carbono.

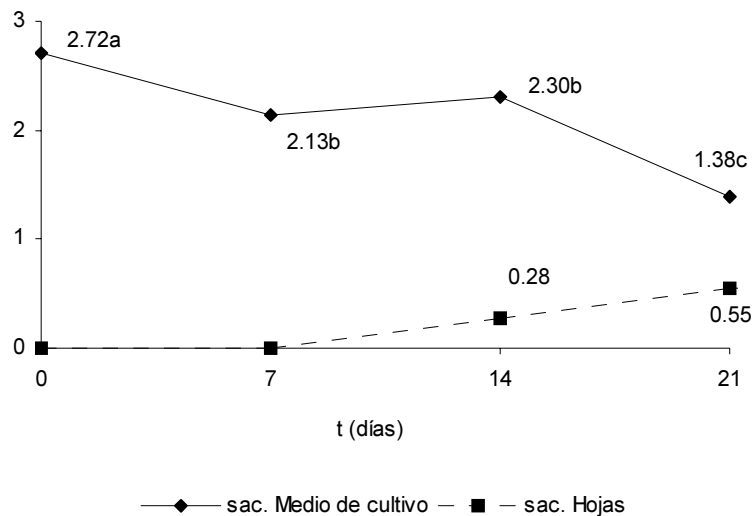
Determinación de parámetros fotosintéticos

Los mayores valores de fotosíntesis se obtuvieron al inicio de la etapa de elongación, los cuales pueden estar relacionados con el agotamiento de sacarosa en el medio de cultivo de multiplicación en esa fase previa y de ahí la necesidad de ser sintetizada por la planta (Figura 2A). En general la fotosíntesis en las plantas bajo condiciones *in vitro* es menor que bajo condiciones *ex vitro* (Desjardins, 1995). La causa fundamental es la presencia de un medio heterotrófico por los niveles de sacarosa, lo cual disminuye la

actividad de la enzima RubisCO (Hdider y Desjardins, 1994). Para bananos se han informado valores de fotosíntesis *in vitro* generalmente bajos (Nguyen y Kozai, 2001) los cuales pudieran estar según Karstens *et al.* (1996) en el orden de $-1.5 - 0.5 \mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ y de $10 - 28 \mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ para las condiciones *ex vitro*.

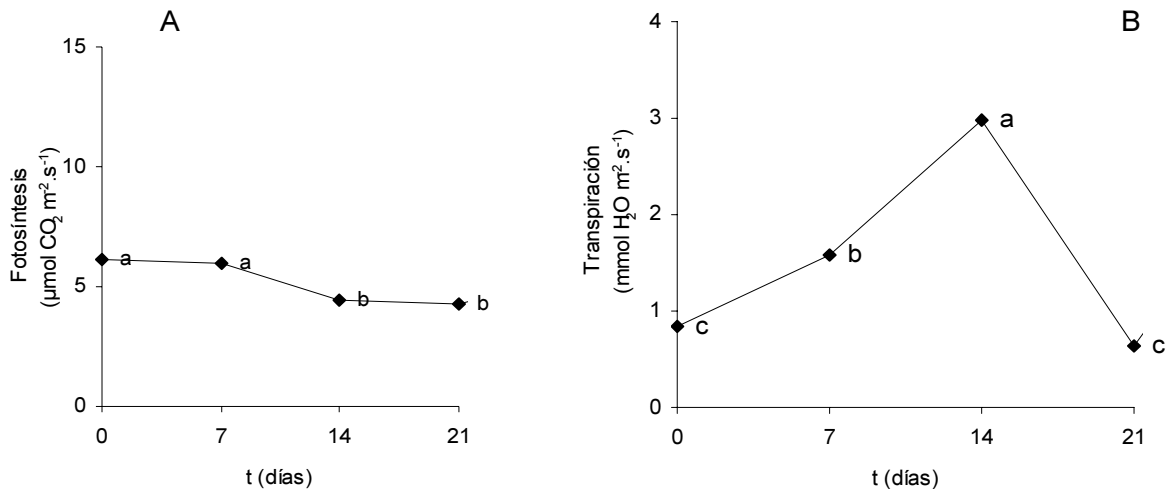
Los estudios de transpiración realizados de forma conjunta con el rendimiento fotosintético, revelaron que durante la etapa de elongación la introducción de un medio de cultivo rico en sacarosa, un sistema cerrado y un cultivo en medio líquido son factores que favorecen la apertura de los estomas en las hojas y con ello registros altos de transpiración (Yue *et al.*, 1992), resultados que se pudieron apreciar a los 14 días de elongación (Figura 2B). En los 21 días de la etapa de elongación una disminución de la

transpiración se hizo evidente quizá por condiciones de estrés causadas por limitación del volumen del frasco y el momento de mayor desarrollo de las plantas, así como agotamiento del medio de cultivo en cuanto a nutrientes como la sacarosa, lo que en general puede inducir el cierre estomático como un mecanismo para evitar la pérdida de agua por las hojas. Los análisis morfológicos del número de hojas y diámetro del tallo respaldan este resultado. Cambios inducidos por el ambiente sobre las mediciones fotosíntesis neta y transpiración demostraron la tendencia de las plantas al heterotrofismo. Aunque los resultados evidenciaron que en general el comportamiento *in vitro* no dependió totalmente del heterotrofismo sino que fue fotomixotrófico. Resultados similares en cuanto a la no dependencia total de los brotes de la fotosíntesis fueron obtenidos por Escalona *et al.* (2003b) en brotes de piña.



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

Figura 1. Contenido de sacarosa en el medio de cultivo ($\text{g} \cdot 100 \text{ ml}^{-1}$) y en hojas ($\text{mg} \cdot \text{g MF}^{-1}$) durante la etapa de elongación de plantas *in vitro* de plátano (cv CEMSA %) en BIT.



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

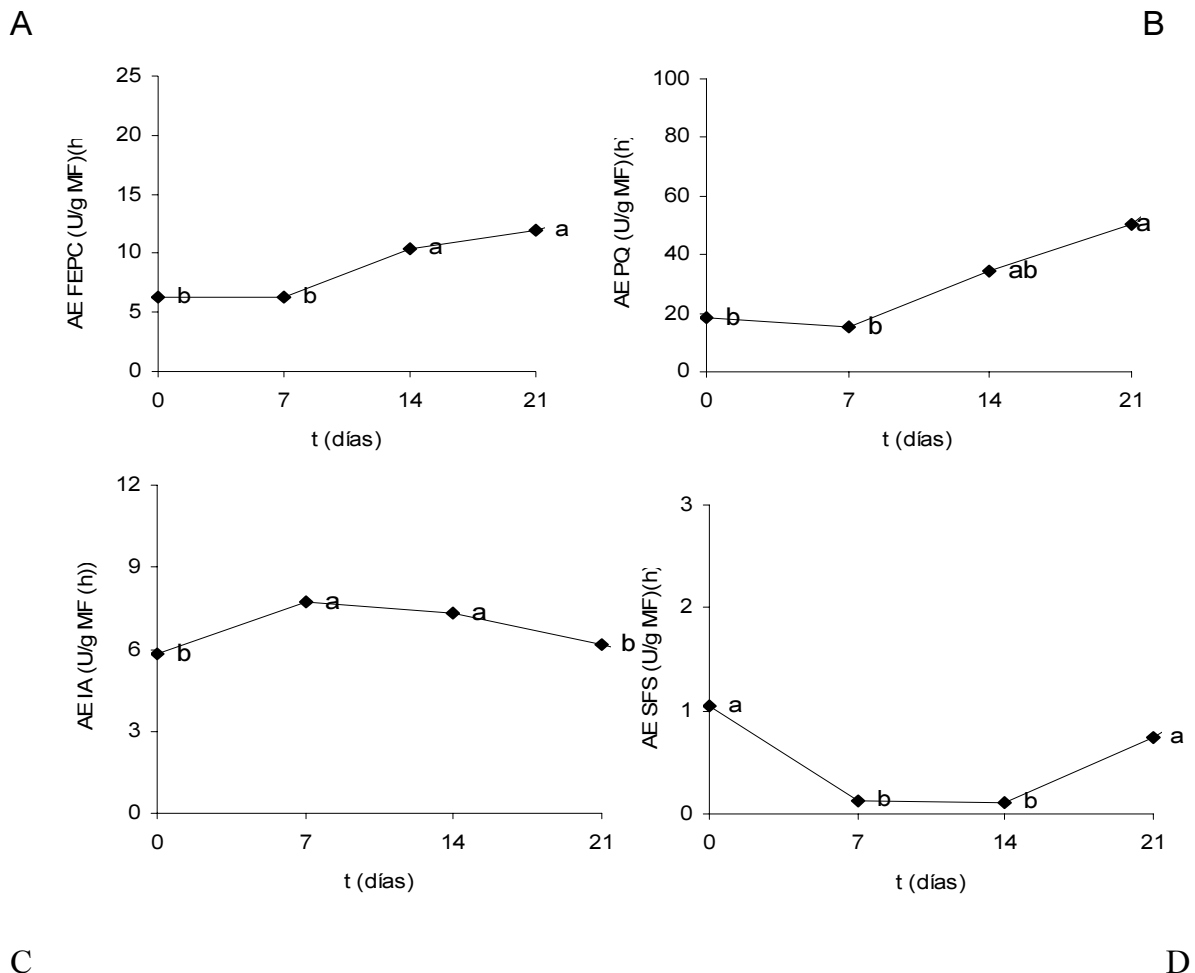
Figura 2. Fotosíntesis neta (A) y Transpiración (B) para plantas durante la etapa de elongación de plantas *in vitro* de plátano (cv CEMSA %) en BIT.

La FEPC, enzima responsable de la síntesis de oxaloacetato, aumentó durante todo el período evaluado (Figura 3A), donde los mayores niveles se alcanzaron a los 21 días de la etapa de elongación. El comportamiento de la actividad PQ, enzima sintetizadora de piruvato a partir de fosfoenolpiruvato, fue similar al de la FEPC durante la fase evaluada, con una tendencia al aumento (Figura 3B). Una estrecha relación funcional competitiva existe entre estas dos enzimas, donde comparten el mismo sustrato para desempeñar su función catalítica (Lehninger, 1979). La alta actividad de ambas enzimas durante el final de la etapa de elongación reveló un suficiente suministro de sacarosa a las células por parte del medio de cultivo, aspecto que favorece la no competencia entre ellas.

Medición de la actividad enzimática para las invertasas ácidas (IA) y sacarosa fosfato sintasa (SFS)

La invertasa ácida mostró un incremento en el comienzo de la etapa de elongación debido a la necesidad de

las plantas de degradar la sacarosa presente en el medio de cultivo para ser utilizada como fuente de carbono (Lee *et al.*, 2001) (Figura 3C). Los resultados sobre la medición de la concentración de sacarosa en las hojas revelaron la incorporación de este carbohidrato en las mismas, debido a la asimilación de la sacarosa en la planta por medio de la enzima 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 (Lee *et al.*, 2001) (Figura 3D). Esto debido quizás a que plantas cultivadas *in vitro* bajo condiciones heterotróficas no requieren de la síntesis de sacarosa, pues la obtienen del medio de cultivo con gran facilidad. Los mayores niveles de actividad enzimática se correspondieron con los momentos donde la concentración de sacarosa en el medio de cultivo fue baja lo cual coincidió con el final de la fase de multiplicación y el final de la etapa de elongación donde la actividad de la enzima es más necesaria.



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

Figura 3. Cambios en las actividades enzimáticas Fosfoenol Piruvato Carboxilasa (FEPC) (A); Piruvato Quinasa (PQ) (B), Invertasa Ácida (IA) (C) y Sacarosa Fosfato Sintasa (SFS) (D) durante la etapa de elongación de plantas *in vitro* de plátano (cv CEMSA ¾) en BIT.

CONCLUSIONES

La etapa de elongación de las plantas de plátano en los BIT fue descrita bajo un carácter heterotrófico con niveles bajos de fotosíntesis y 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. La presencia de bajos niveles de fotosíntesis corroboró más que el carácter heterotrófico, el comportamiento fotomixotrófico del cultivo *in vitro* en BIT. Además, quedó descrita la asimilación de la sacarosa del medio de cultivo a través de la actividad de la enzima invertasa ácida y el balance de la sacarosa en el medio de cultivo y las hojas. La caracterización metabólica y fisiológica de la etapa de elongación dentro de la micropropagación de plantas de plátano (cv CEMSA ¾) en BIT con medio de cultivo líquido, constituyen aportes a estas nuevas técnicas de cultivo y ayudan a comprender la evolución ecofisiológica de los ambientes generados en los sistemas de inmersión temporal.

REFERENCIAS

- Aitken-Christie, J, Kozai T, Takayama S (1995) Automation in plant tissue cultures - general information and overview. En: Aitken-Christie J, Kozai T, Smith M A L (eds) Automation and environmental control in plant tissue culture. pp. 1-18. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht
- Anguenot, R (2003) Protocolos, sucrose synthase. [Online][Visited January, 2003]. Disponible in: URL:[http://www.agrobiotheque.ca/Protocolos/enzymo/sucrose synthase.html](http://www.agrobiotheque.ca/Protocolos/enzymo/sucrose%20synthase.html)
- Desjardins, Y (1995) Photosynthesis *in vitro*. On factors regulating CO₂ assimilation in micropropagation systems. *Acta Horticulture* 393: 45-61
- Escalona, M, Cejas I, Gonzalez-Olmedo J, Capote I, Roels S, Cañal MJ, Rodríguez R, Sandoval J, Debergh P (2003a) The effect of meta-topolin on plantain propagation using a Temporary Immersion Bioreactor. *INFOMUSA* 12 (2): 28-30
- Escalona, M, Lorenzo JC, González B, Daquinta M, Borroto CG, González JL, Desjardins Y (1999) Pineapple micropropagation in temporary immersion systems. *Plant Cell Rep* 18: 743-748
- Escalona, M, Samsom G, Borroto C, Desjardins Y (2003b) Physiology of the effects of Temporary Immersion Bioreactors on micropropagated pineapple plantlets. *In vitro Cell. Development. Biology* 39 (6): 651-656
- Etienne, E, Berthouly M (2002) Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 69: 215-231
- Geigenberger, P, Stitt M (1991) 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* 185: 81-90
- Hdider, C, Desjardins Y (1994) Effects of sucrose on photosynthesis and phosphoenolpyruvate carboxylase activity of *in vitro* cultured strawberry plantlets. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 36: 27-36
- Jimenez, E, Pérez N, de Fera M, Barbón R, Capote A, Chávez M, Quiala E, Pérez J (1999) Improved production of potato microtubers using a temporary immersion system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 59: 19-23
- Karstens, GS, Ebert G, Ludders P (1996) 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.* 70: 155-162
- Le, VQ, Lamaze T, Champigny ML (1991) Effect of light and NO₃⁻ on wheat leaf phosphoenolpyruvate carboxylase activity. Evidence for covalent modulation of the C3 enzyme. *Plant Physiology* 97: 1476-1482
- Lee, VG, Samsom G, Desjardins Y (2001) 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* 158: 599-605
- Lehninger, A L (1979) Bioquímica. Las bases moleculares de la estructura y función celular. Segunda edición. Editorial Pueblo y Educación: 649-651
- Levin, R, Gaba V, Beni T (1998) Automated plant tissue culture for mass propagation. *Bio/Technology* 6: 1035-1038
- Lorenzo, JC, Blanco MA, Peláez O, González A, Cid M, Iglesias A, González B, Escalona M, Espinosa P, Borroto CG (2001) Sugarcane micropropagation and phenolic excretion. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 65 (3): 1-8
- Miron, D, Schaffer A (1991) Sucrose phosphate synthase, sucrose synthase and invertase activities in developing fruit of *Lycopersicon esculentum* Mill. sucrose accumulation *Lycopersicon hirsutum* Humb and Bonpl. *Plant Physiology* 95: 623-627
- Murashige, T y Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays whit tobacco tissue cultures. *Plant Physiology* 15: 473 – 497
- Nguyen, QT, Kozai T (2001) Growth of *in vitro* banana (*Musa spp.*) shoots under photomixotrophic and photoautotrophic conditions. *In vitro Cell. Development Biology* 37: 824-829
- Siegel, G, Stitt M (1990) Partial purification of two forms of spinach leaf sucrose-phosphate synthase which differ in their kinetic properties. *Plant Science* 66: 205-210
- Teisson C, Alvard D (1995) A new concept of plant *in vitro* cultivation liquid medium: temporary immersion. En: Terzi, M, Celia R, Falavigna A (eds). Current issues in plant molecular and cellular biology. pp. 105-110. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht
- Van Handel, E (1968) Direct microdetermination of sucrose. *Ann. Biochemistry* 22: 280-83
- Yue, D, Desjardins Y, Lamarre M, Gosselin A (1992) Photosynthesis and transpirations of *in vitro* culture asparagus plantlets. *Science Horticulture* 49: 9-16