

Nuevo papel de los compuestos del fenilpropanoide durante la micropropagación de la caña de azúcar en Biorreactores de Inmersión Temporal (BIT)

Aydiloide Bernal Villegas¹, Ariel D. Arencibia Rodríguez², María La O Echevarría¹, Ricardo Acevedo Rojas¹, Jorge L. Montes de Oca Suárez¹, Pablo Machado Armas¹, Mayra Jiménez Vázquez¹, Zenaida Occeguera Águila¹, Ramiro Castillo León¹.

1. Instituto de Investigaciones de la Caña de Azúcar (INICA), Cuba.
2. Universidad Católica del Mule, Chile

aydiloide@inicavc.azcuba.cu

Resumen

El estudio se desarrolló a partir de observaciones realizadas durante la propagación *in vitro* de explantes de caña de azúcar en Biorreactores de Inmersión Temporal (BIT), estos producían metabolitos fenólicos que al contrario de la propagación convencional, donde estos compuestos se consideran indeseables, se obtuvieron vitroplantas con mayor vigor y más velocidad de crecimiento. La caracterización genómica de las plantas, se logró suprimiendo genes importantes de fenilpropanoide, como resultado de una nueva función de los metabolitos fenólicos. Genes relacionados con el metabolismo y desarrollo celular, defensa de las plantas, responsables del metil jasmónico, etileno, reacciones oxidativas y la ruta de las auxinas, entre otros, fueron encontrados para ser inducido en plantas de caña de azúcar propagadas en los BIT con metabolitos fenólicos. Como resultado se obtuvieron vitroplantas mejor adaptadas a las condiciones naturales, aumentando el número de raíces funcionales y mayor velocidad de crecimiento.

Palabras Calves: metabolitos fenólicos, propagación *in vitro*

New role of phenylpropanoid compounds during micropropagation of sugarcane in Temporary Immersion Bioreactors (TIB)

Abstract

The study was developed from observations made during the *in vitro* propagation of explants of sugarcane in Temporary Immersion Bioreactors (TIB), they produced phenolic metabolites that contrary to conventional breeding, where these compounds are considered undesirable, were obtained vitroplantas with greater vigor and growth rate. Genomic characterization of plants was achieved phenylpropanoid suppressing genes important as a result of a new function of phenolic metabolites. Genes related to metabolism and development, plant defenses, phenylpropanoids, methyl jasmonate response, ethylene, oxidative burst and, auxins pathways, among others were found to be induced in sugarcane plants propagating in TIB with phenolic metabolites. As a result plantlets were obtained better adapted to natural conditions, an increased number of functional roots, a high growth rate.

Key words: phenolic metabolites *in vitro* propagation

Introducción

Las plantas sintetizan una gran cantidad de compuestos a partir del metabolismo de los fenilpropanoides (Petersen y col., 1999). Estos compuestos tienen múltiples funciones, por ejemplo: influencia en la lignificación y propiedades físico-químicas de la pared durante la expansión celular, protección a radiaciones UV, como antioxidantes, aleloquímicos, entre otras (Booij-James y col., 2000; Boerjan y col., 2003; Merali y col., 2007). Sin embargo, se estima que la mayoría de las funciones de estos metabolitos

naturales aún no están completamente identificadas y caracterizadas relacionando a una gran variedad de eventos fisiológicos y de interacción con el ambiente.

Igualmente, se conoce que las heridas físicas (aquellas producidas en la manipulación en cultivo de tejido de plantas) producen cambios importantes en metabolismo de la planta. Uno de los más ocurridos son los pronunciados después de la oxidación y acumulación de compuestos fenólicos causados por el ennegrecido del tejido (Ke y Saltveit, 1989). Provocando un aumento de la actividad de amonialyasa fenilalanina; una enzima importante en la síntesis de compuestos fenólicos (Hahlbrock y Scheel, 1989).

El estudio se realizó a partir de observaciones que mostraron que durante la micropropagación de plantas de caña de azúcar en BIT, estas producían metabolitos fenólicos que al contrario de la micropropagación convencional donde estos compuestos se consideran indeseables, originaban vitroplantas con un mayor vigor, velocidad de crecimiento y mejor adaptación a condiciones de campo que los tratamientos donde se inhibía la producción de fenoles.

La micropropagación es un sistema biotecnológico avanzado para la producción plantas libres de patógenos para usos agrícolas y forestales. Recientemente la utilización de los medios de cultivos líquidos usando los Biorreactores de Inmersión Temporal (BIT) con diferentes frecuencias y tiempos de inmersión para mejorar la calidad de las plantas y mostró mejores tasas de multiplicación. Ziv (2000) corroboró la información sobre el uso de Biorreactores como un sistema para la propagación de la planta a través de la organogénesis.

Sin embargo, aunque la producción de fenoles ha sido considerada ampliamente como un rasgo indeseable en el cultivo de tejido tradicional, Li y col., (2003); He (2006) las plantas de caña de azúcar cultivadas en BIT mostraron mejor vigor y más desarrollo. Por esta razón el objetivo del presente trabajo fue realizar el primer estudio de expresión diferencial de genes en plantas de caña de azúcar propagadas *in vitro* en los BIT utilizando como control la supresión del metabolismo de los fenilpropanoides (tratamiento realizado convencionalmente para evitar la producción de fenoles durante el cultivo de tejidos).

Materiales y Métodos

Material Vegetal utilizado

Se utilizaron plantas *in vitro* de caña de azúcar del cultivar C90-317 obtenidas a través del cultivo de meristemo y micropropagadas de acuerdo con He y col., (1994) Las condiciones de cultivo fueron mantenidas a 110 mMm² s¹ de luz, 12-h de fotoperiodo, a las 28±1°C. Para el experimento se seleccionaron plantas vigorosas y libres de patógenos de 15 días de edad (después de los subcultivos).

Micropropagación utilizando Biorreactores de Inmersión Temporal.

Se seleccionaron explantes de caña de azúcar (10 plantas L⁻¹ de medio de cultivo) fueron transferidas a frascos estériles (5 L de capacidad). Los biorreactores de inmersión temporal contenían 2 L de medio de cultivo, compuesto por las sales MS (1962), suplementadas con 100 mgL⁻¹ myoinositol; 4 mgL⁻¹ 6-BAP (6-benzyl-aminopurina). Los tratamientos control en los BIT y convencional, el medio de cultivo líquidos se suplementó con ácido ascórbico (0.5 mgL⁻¹). Seguidamente se ajustó el pH a 5.8. La frecuencia de inmersión fue de 3 minutos cada 3 horas. El cultivo fue mantenido a 28±1°C con una intensidad de luz de 110 mM m² s¹. El experimento fue replicado tres veces y en tres fechas diferentes.

Determinación de los compuestos fenólicos.

La concentración de compuestos fenólicos fue moderada como se describe en los tratamientos anteriores. 1mL de medio de cultivo resultante de la micropropagación de la caña de azúcar, se mezcló

con 1 mL de Metanol (HPLC gradiente). La absorbancia fue leída a 320 nm (potencial browning) y 437 nm (quinones –solubles) utilizando un espectrofotómetro UV–VIS (PharmaSpec UV- 1700, Shimadzu, Kyoto, Japan). Se realizaron mediciones cada 5 días, durante los 25 días que estuvo el material en micropropagación. El tiempo cero (T0), fue considerado justo el tiempo en que las plantas fueron transferidas a los BIT.

Caracterización genómica de la planta

Se tomaron al azar 500 mg de material vegetal de cada uno de los tratamientos T0, T1 (15 días) y T2 (25 días) (incluidas las réplicas) e inmediatamente colocadas en líquido N₂. El material vegetal fue macerado en morteros pre tratados, hasta convertirlo en un polvo fino, los cuales se utilizaron para la realización de la extracción del ARN según los protocolos de ((PROMEGA, cat. # Z3100). Los RNAs fueron determinados y cuantificados en las proporciones 260/280 y 260/230. Para la síntesis del cDNA se utilizó el Sistema Universal RiboClone1 (PROMEGA, cat. # C4360). Los análisis de AFLP-ADNc se realizaron según Bachem y col. (1998). El ADNc se digirió con las enzimas de restricción *AseI* y *TaqI* y las reacciones de amplificación fueron con combinaciones de cebadores *AseI/TaqI*. Los PCR (Reacción en Cadenas de las Polimerasas) utilizando la combinación de los cebadores de *AseI/TaqI*, primeros en la lista de la Tabla 1. Los productos AFLP se separaron en gel de poliacrilamida 9% y visualizados mediante tinción con AgNO₃ (PROMEGA, cat. # Q4130).

Tabla I. Primers utilizados para la realización de los AFLP.

Primer	Core sequence	SN ^a
<i>AseI-1</i>	5'-GAC TGC GTA CCT AAT	<i>at</i>
<i>AseI-2</i>	5'-GAT GAG TCC TGA CCG A	<i>cg</i>
<i>TaqI-1</i>	5'-GAT GAG TCC TGA CCG A	<i>ta</i>
<i>TaqI-2</i>	5'-GAT GAG TCC TGA CCG A	<i>gt</i>
<i>TaqI-3</i>	5'-GAT GAG TCC TGA CCG A	<i>ca</i>

Secuenciación de bandas polimórficas

Los transcritos derivados de fragmentos polimórficos (TDFs) fueron cortados, marcados e inoculados en 150 mL de TE (10 mMTris, pH 7.5, y 1 mM EDTA, pH 8.0) en la noche 37 °C. El extracto de las bandas fue usado como plantillas para el re-amplificación por PCR. Los transcritos polimórficos, derivados de fragmentos de (TDFs) fueron cortados, marcados e inoculados en 150 mL de TE (10 mMTris, pH 7.5, y 1 mM EDTA, pH 8.0) en la noche 37 °C. El extracto de las bandas fue usado como plantillas para la re-amplificación por PCR. Las secuencias fueron determinadas con un secuenciador automático (PerkinElmer ABI PRISM Dye Terminator Cycle sequencing kit and ABI Model 377 DNA sequencer), usando los adaptadores de AFLP respectivos como cebadores.

Los fragmentos de transcripción derivados polimórficos (FDT) fueron marcados, cortados e incubados en 150 mL de TE (10 mMTris, pH 7.5, y EDTA 1 mM, pH 8,0) durante la noche a 37 °C. Extraídas las bandas se utilizan como plantillas para la re-amplificación por PCR. La secuencias se determinaron por un secuenciador automático (Perkin Elmer ABI PRISM Dye Terminator Cycle kit de secuenciación y ABI Modelo 377 secuenciador de ADN), usando los respectivos adaptadores de AFLP como cebadores. El programa de alineación de secuencias BLASTX [34] se utilizó para comparar las secuencias de nucleótidos con los depositados en la Base de datos GenBank. Una búsqueda de secuencias homólogas en el TIGR caña de azúcar (*S. officinarum*) EST base de datos de Gene índices (Sogi), fue también llevado a cabo utilizando las bandas de AFLP-ADNc producido.

Adaptación a las condiciones mediambientales

Las plantas fueron transferidas al medio MS (1962), suplementadas con 10mgL^{-1} de Ácido Indol acético (AIA). A los 15 días, fueron separadas y trasplantadas a bandejas que contenían 80% de compost y 20% de zeolita. A los 10 días siguientes se fue reduciendo la humedad de 70%, 60%, 50%, la intensidad luminosa se fue incrementando gradualmente de 75%, 90% y 100% (condiciones naturales). Los experimentos fueron replicados tres veces y las variables evaluadas fueron número de raíces funcionales antes del trasplante, porcentaje de aclimatización y desarrollo de las plantas.

Análisis Estadístico

Se combinaron las medias todas las réplicas y los efectos de los tratamiento, se les realizó un ANOVA simple y las diferencias fueron significativas para 5% de LDS de los valores.

Resultados y Discusión

Multiplicación en Biorreactores de Inmersión Temporal.

Las plantas *in vitro* de caña de azúcar fueron transferidas a los BIT (suplementado o no el medio de cultivo con 0.5mgL^{-1} de ácido ascórbico) para se ciclo de micropropagación. En los BIT suplementados con ácido ascórbico el medio de cultivo permanecieron transparente de color amarillo hasta los 25 días. Se observa que según lo esperado en el tratamiento con ácido ascórbico hubo un adecuado control en la producción de los fenoles en BIT. (Fig. 1A). Este resultado confirma que el ácido ascórbico evitó el oscurecimiento del medio de cultivo al suprimir las enzimas de las rutas del fenopropanoide. Para el caso del tratamiento sin ácido ascórbico en los BIT se demuestra una elevada producción de estos metabolitos, evidenciada por el oscurecimiento del medio de cultivo, mostrándose opaco-oscuro-amarillo antes de los 15 días (Fig. 1B) y de forma oscura consistente hasta los 25 días de cultivo (Fig. 1C). Diferencias notables mostraron la coloración de las hojas de las plantas en los BIT sin ácido ascórbico con una coloración verde más intensa y mejor vigor que les que se encontraban en los BIT con ácido ascórbico. Se destaca que en los BIT donde se producen los fenoles las plantas tienen una coloración verde más intensa lo que constituye una primera evidencia visual de un estado fotomixotrófico. No hay diferencia en el número de brotes producido por planta.

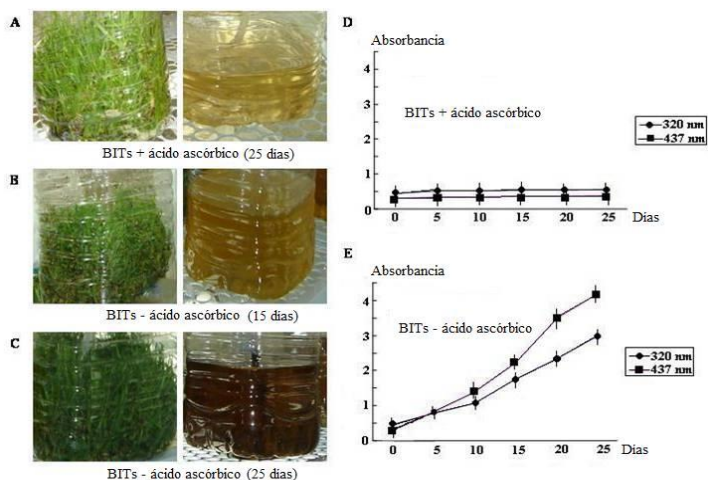


Figura 1. Micropropagación de caña de azúcar cultivar C90-317 en BIT. (A) Plantas micropropagadas en BIT+ ácido ascórbico. (B y C). Plantas micropropagadas en BITs – ácido ascórbico. (D y E). Análisis

espectrofotométrico de la concentración de compuestos fenólicos (oscurecimiento potencial-320 nm) y presencia de *o*-quinonas solubles (437 nm).

El oscurecimiento del medio de cultivo es asociado con daños del tejido de la planta de caña de azúcar durante el cultivo de tejidos. Sin embargo nunca antes los fenoles fueron relacionados con el color oscuro en el medio de cultivo, los cuales tienen un rol muy importante para la inducción /expresión de genes durante la propagación en los BIT. Estos genes están relacionados con el metabolismo y desarrollo celular, la defensa de la planta, son responsables el metil jasmónico, el fenilpropanoide, el etileno, estallido oxidativo y la ruta de las auxinas. Sin embargo se identificaron principalmente en plantas de caña de azúcar micropropagadas en los BIT con metabolitos fenólicos.

Se observa que según lo esperado en el tratamiento con ácido ascórbico hubo un adecuado control en la producción de los fenoles en BIT (figura 1). Para el caso del tratamiento sin ácido ascórbico en BIT se demuestra una elevada producción de estos metabolitos evidenciada por el oscurecimiento del medio de cultivo y las mediciones espectrofotométricas a 320 nm y 437 nm. Se destaca que en los BIT donde se producen los fenoles las plantas tienen una coloración verde más intensa lo que constituye una primera evidencia visual de un estado fotomixotrófico.

Los BIT podrían considerarse como lo más natural del cultivo de tejidos. Ziv (2000) demostró que son una herramienta fiable en esta investigación. La mejora del contacto-aire de la planta enriquecido el ambiente con CO₂, parece ser crítica para la producción de compuestos fenólicos, en el tratamiento sin supresión fenilpropanoide. En paralelo, en corto tiempo y sistemáticamente (3min cada 3 h) contacto planta con el medio de cultivo podría ser un factor clave, en el que los compuestos fenólicos puedan actuar como inductor o moléculas inductoras de otros genes y rutas bioquímicas. La vinculación primaria y directa entre el fenilpropanoide y fotosíntesis podrían apoyar los resultados obtenidos y corroborar la hipótesis principal de que los compuestos fenólicos de plantas de caña de azúcar constituyen el primer paso. Sin embargo, la aparición de la etapa mixotrófica podría estar relacionada la producción de compuestos fenólicos en los BIT, suplementados con CO₂.

El análisis con el espectrofotómetro confirmó que ambos compuestos fenólicos solubles y *o*-quinones permanecían a bajos niveles durante los 25 días de cultivo en los BIT+ ácido ascórbico (Fig. 1D). Sin embargo, un aumento estable en ambas variables demostraba que la ruta del fenilpropanoide permanecía activa durante el cultivo en los BIT con ácido ascórbico (Fig. 1E). Este tratamiento también mostró una concentración más alta de *o*-quinones soluble que el de los compuestos fenólicos desde el 5^{to} día. Todos los compuestos fenólicos aumentaron los *o*-quinones solubles de 6.5 hasta 12.6-fold en los BIT+ ácido ascórbico.

Análisis Genómico

Las muestras de la planta fueron colectadas en un T0 (justo después de ser transferidas), T1 (15 día) y T2 (25 día) para determinar las diferencias genómicas cuando la caña de azúcar creció en los BIT suplementados o no con 0.5 mgL⁻¹ de ácido ascórbico. Seis copias de cebadores (las combinaciones de los cebadores de AseI–TaqI listadas en la Tabla 1), dio bandas reproducibles. Únicamente bandas polimórficas fiables entre los tratamientos en los BIT fueron considerados expresión diferencial para ambas secuencias y más allá el análisis del Northern Blot. Entretanto, esas bandas polimórficas están relacionadas con el tratamiento (control) del medio de cultivo utilizado en la micropropagación convencional, fueron asociaciones medidas en las plantas cultivadas en los BIT y no se relacionó con presencia de los compuestos del fenilpropanoide. En ambos su migración en el gel (del más alto al peso molecular al más bajo) y el cebador de la copia usado en el AFLP, la expresión diferencial de los TDFs codificaron como AG en un orden creciente (Fig. 2).

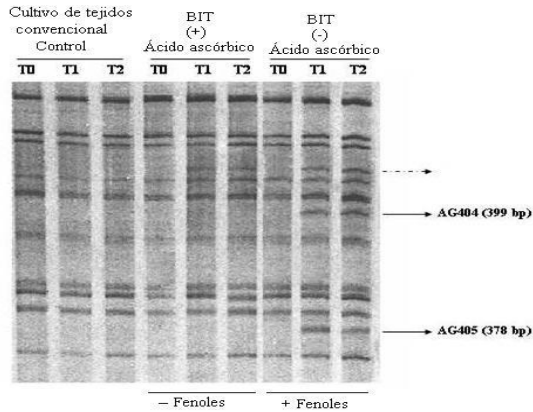


Figura 2. Sección de gel AFLP-ADNc que muestra la expresión diferencial de transcritos en plantas de caña de azúcar micropropagadas en los BIT.

El estudio mediante AFLP-ADNs permitió identificar en geles de poliacrilamida (9%) un total de 64 FDTs con expresión diferencial (ejemplo en la figura 3), sin embargo, solo se obtuvieron datos confiables de secuencia en 50 FDTs para un 78.1% de eficiencia.

Se obtuvo un predominio de FDTs (35) que fueron inducidos en el tratamiento sin ácido ascórbico lo que representó el 70% de los transcritos diferenciales, la mayoría de estos fueron inducidos desde los primeros 15 días. Siete transcritos (12%) se reprimieron en el tratamiento BIT con ácido ascórbico. La categorización funcional de los FDTs diferenciales se muestra en la figura 3.

Por primera vez y utilizando la caña de azúcar como modelo para la caracterización genómica de las plantas micropropagadas en Biorreactores de inmersión temporal fueron estudiadas suprimiendo los genes activadores de la ruta del fenilpropanoide. Se identificó un total de 50 transcritos por expresión diferencial, los cuales confirmaron la eficacia del diseño experimental aplicado y la confiabilidad de la herramienta molecular empleada. Como era de esperar, con la inhibición de la ruta del fenilpropanoide, se liberan los metabolitos secundarios, se agrupan los compuestos fenólicos. Sin embargo, se revelan genes de otras rutas metabólicas que pueden ser visualizados antes de durante el experimento.

Caracterización genómica- funcional de la planta.

La caracterización funcional del diferencial TDFs se muestra en Fig. 3. un primer y mayor grupo de 10 de TDFs (20%) fue relacionado con el metabolismo de la célula y desarrollo de la planta, incluyendo transcritos asociados con las rutas del ubiquitin (AG207), actin (AG408) y fotosíntesis (AG405, AG609). El segundo grupo, la mayoría representativo se corresponde a los relacionados con los genes de defensa (nueve TDFs 18%) incluyendo el Osmotin (AG103), genes del b-glucanasa (AG303, AG501) y las proteínas elicitoras-patógeno-inducido (AG407 y AG508, respectivamente). En TDFs de caña de azúcar se encontraron rutas de expresión diferencial del fenilpropanoide expresadas (7–14%), incluyendo aquéllos que codifican a enzimas importantes PPO y PAL que fueron bajas reguladoras en el tratamiento en los BIT+ ácido ascórbico. Con cinco TDFs (10%), proteínas relacionadas con el etileno y la respuesta del metilo jasmónico con función ya conocida. Las auxinas y oxidadasas se encontraron en las rutas representadas por por tres TDFs (6%) cada uno. Un total de ocho TDFs (16%) no mostró homología significativa con los genes de función conocida informados en bancos de datos públicos, mientras demostró homologías con las secuencias de las transcripciones de *S. officinarum*

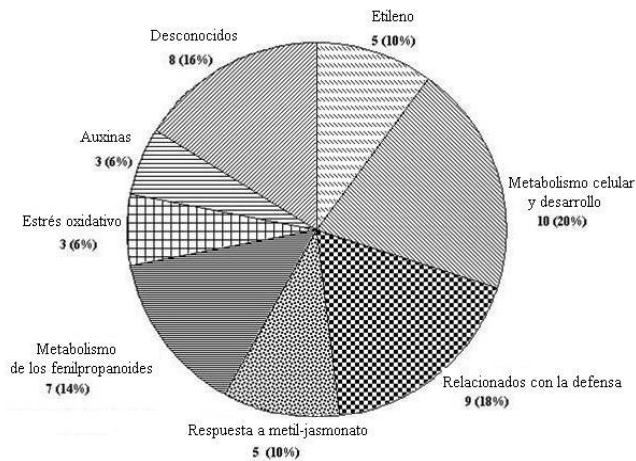


Figura 3. Caracterización genómico - funcional de los FDTs expresados diferencialmente en la micropropagación de caña de azúcar en BIT.

Los resultados permiten establecer que la presencia de metabolitos fenólicos durante la micropropagación en BIT induce genes de respuesta defensiva en las vitroplantas de caña de azúcar. En las plantas desarrolladas en los BIT + ácido ascórbico se observó la supresión de la actividad en los genes claves, por ejemplo aquellos que codifican para el PPO y el PAL de proteínas (AG503 y AG603 respectivamente). La adición de TDF similar al rubisco (AG609), dos genes relacionados con las auxinas (AG294, AG607), una proteína quinasa putativa (AG201) y una proteína del complejo de oxidación del agua (AG307) fueron reguladas en los tratamientos en los BIT + ácido ascórbico. Debido a que todas estas transcripciones mantienen una expresión consistente en los tratamientos en los BIT sin ácido ascórbico, este resultado demuestra el rol principal que juegan la regulación de la expresión de genes en el cultivo de tejido conteniendo fenoles.

Las evidencias demuestran que la ruta del fenilpropanoide desempeña un papel principal en la inducción de los otros genes ya identificados y expresados diferencialmente. A lo largo del experimento, tanto PPO y PAL son genes continuaron su expresión en los BIT sin ácido ascórbico y la actividad los BIT + ácido ascórbico en el T0 podría explicarse debido a la manipulación del cultivo de tejidos, lo que causó heridas y estrés durante el subcultivo a la planta (Campos-Vargas y col, 2005).

Descartando la influencia del pH en los experimentos, la identificación diferencial de los TDFs en BIT + fenólicos es similares a genes oxidativos, podría dar evidencias para la inducción de resistencia sistémica. Las enzimas oxidativas toman acción en la generación de compuestos fenólicos, en un lado metabolitos antimicrobianos más tóxicos y en otro el aumento de la polimerización de monómeros que se acumularon en la pared celular e interferir con el desarrollo del patógeno (Apel e Hirt, 2004; Cona y col. 2006). La defensa de la planta se basa en una respuesta compleja provocada por impactos externos. El estado redox de las células y su alteración temporal, el estallido oxidativo, es un elemento regulador importante de esta respuesta de defensa. En el marco de la transducción de señales, H₂O₂ vía de señalización (s) es / son sólo una parte especial de la transducción de señal, pero interactuando con otras vías, influyen en todo el sistema traducción en varios puntos (Bó y Orba, 2007).

Es la primera vez que plantas de caña de azúcar propagadas en BIT con presencia de compuestos fenólicos se han estudiado a nivel de genómica. En consecuencia, se identificó un nuevo y benéfico papel de metabolitos fenilpropanoide durante la micropropagación de caña de azúcar en BIT, lo que podría

sostener la hipótesis acerca de una función similar para las plantas *en vivo*. La genómica integradora y enfoques metabólicos podrían ofrecer información básica sobre las mayoría de las moléculas piramidales y los genes, que son responsables de la respuesta de la planta. Además, los resultados de la producción de compuestos fenólicos en BIT deben fomentar nuevos estudios sobre el control de la vía fenilpropanoide por tanto, las formas de ingeniería convencionales o genéticas (Van der Rest y col, 2006).

Adaptación a las condiciones medioambientales.

Para la adaptación a las condiciones medioambientales, las plantas de caña de azúcar propagadas en BIT con ácido ascórbico (sin los compuestos del fenólicos) y viceversa fueron transferidas a condiciones controladas. En ambos tratamientos el número de raíces funcionales (vigorosas y más cortas con color del rojo-castaño) antes del trasplante y el porcentaje de adaptabilidad después de 30 días mostrado (Fig. 4) un aumento significativo en las plantas micropropagadas en los BIT sin ácido ascórbico (conteniendo compuestos fenólicos). Además, la proporción de crecimiento de las plantas se incrementó alcanzando 50 cm en aproximadamente 30 días, 8 días antes que aquellas que fueron micropropagadas en los BIT sin presencia de compuestos fenólico. El aumento de raíces funcionales antes del trasplante apoya el hecho de una fotosíntesis más eficiente en los BIT debido a las de condiciones para el mixotrofismos y, como un resultado; podrían obtenerse mejoras en las variables productivas adicionales. Estos resultados indican que la presencia de los compuestos del fenilpropanoide en los BIT prepara a las plantas de caña de azúcar para una mejor adaptabilidad a las condiciones naturales.

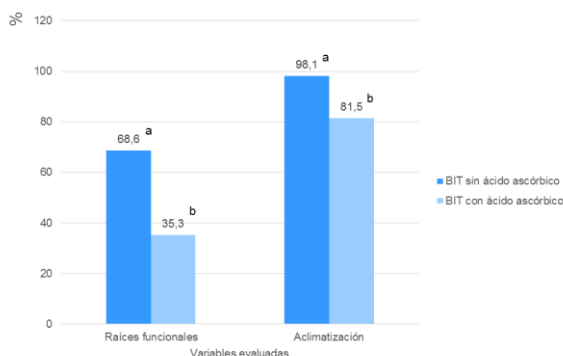


Figura 4. Acclimatización a las condiciones naturales de las plantas de caña de azúcar micropropagadas en BIT.

En comparación con el control, las plantas de caña de azúcar micropropagadas en BIT con los más altos niveles de compuestos fenólicos mostraron un mejor rendimiento durante su adaptación a condiciones naturales. El incremento de las raíces funcionales y la tasa de crecimiento pueden considerarse como evidencias directas de una mejorada etapa fisiológica alcanzada durante la micropropagación con presencia de metabolitos fenólicos.

Referencias Bibliográficas

1. Campos-Vargas, H. Nonogaki, T. Suslow, M.E. Saltveit. (2005). Heat shock treatments delay the increase in wound-induced phenylalanine ammonia-lyase activity by altering its expression, not its induction in Romaine lettuce (*Lactuca sativa*) tissue, *Physiol. Plantarum* 123 82–91.
2. Cona, G. Rea, R. Angelini, R. Federico, P. Tavladoraki, (2006). Functions of amine oxidases in plant development and defence, *Trends Plant Sci.* 11 80–88.
3. Bachem C.W.B., Oomen R.J.F, Visser R.G.F. (1998). Transcript imaging with cDNA-AFLP: a step-by-step protocol, *Plant Mol. Biol. Rep.* 16 157–173.
4. Ke D., Saltveit M.E. (1989). Plant hormone interaction and phenolic metabolism in the regulation of russet spotting in iceberg lettuce, *Plant Physiol.* 88 1136–1140.
5. Li H.M., Pan S.M, Li R.M, Wu S.H. (2003). Review on some developments in the effect of phenolic compounds on sugarcane tissue cultures, *Sugarcane Canesugar* 4 18–20.
6. Booij-James I.S., Dube S.K., Jansen M.A.K., Edelman M., Mattoo, A.K. (2000). Ultraviolet-B radiation impact light-mediated turnover of the photosystem II reaction center heterodimer in *Arabidopsis* mutants altered in phenolic metabolism, *Plant Physiol.* 124 1275–1283.
7. Apel K., Hirt H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction, *Annu. Rev. Plant Biol.* 55 373–399.
8. Boćka K., Orbań N. (2007). New aspect of H₂O₂ signaling, *Plant Signaling Behavior* 2 498–500.
9. Hahlbrock K., Scheel D. (1989). Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism, *Annu. Rev. Plant. Physiol. Mol. Biol.* 40 347–369.
10. Petersen M., Strack D., Matern U. (1999). Biosynthesis of phenylpropanoids and related compounds, in: M. Wink (Ed.), *Biochemistry of Plant Secondary Metabolism*, Annual Plant Reviews, CRC Press, Boca Raton, FL, , pp. 151–221.
11. Ziv M. (2000). Bioreactor technology for plant micropropagation, *Horticult. Rev.* 24 1–30.
12. Van der Rest R., Danoun S., Boudet A.M., Rochange S.F. (2006). Down-regulation of cinnamoyl-CoA reductase in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) induces dramatic changes in soluble phenolic pools, *J. Exp. Bot.* 57 1399–1411.
13. Murashige T., Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures, *Physiol. Plantarum* 15 473–497.
14. He X.M., He H., Zeng H., Yang X.Q., Wang T.S., He W.Z., Li S. (1994). The application of micropropagation technique to fast propagating improved sugarcane varieties, *Sugarcane* 1 10–13.
15. Boerjan W., Ralph J., Baucher M. (2003). Lignin biosynthesis, *Annu. Rev. Plant Biol.* 54 519–546.
16. He W.Z. (2006) The applications of sugarcane tissue culture research in China: an overview, in: *Proceedings of the International Symposium on Technologies to Improve Sugar Productivity*, Guilin, China Agriculture Press Beijing, pp. 613–618.
17. Merali Z., Mayer M.J., Parker M.L, Michael A.J., Smith A.C., Waldron K.W. (2007). Metabolic diversion of the phenylpropanoid pathway causes cell wall and morphological changes in transgenic tobacco stems, *Plant* 225 1165–1178.