

con daños en las células oclusivas, un menor contenido de compuestos fenólicos, una pobre organización del xilema e hipolignificación.

Los resultados indican que la respuesta hiperhídrica pudiera implicar una disminución de la capacidad fotosintética, antioxidante y fotoprotectora de los brotes.

Determinación del contenido de endógeno de reguladores del crecimiento

La cuantificación del contenido endógeno de reguladores del crecimiento mostró que el mayor contenido de Z se obtuvo en los brotes Tipo 3 ($97,02 \mu\text{g.gMF}^{-1}$). Aunque los niveles de Z se incrementaron proporcionalmente de los brotes Tipo 1 al Tipo 2 y de este a los de Tipo 3, solo en los brotes Tipo 3 el incremento fue significativo respecto al control ($79,54 \mu\text{g.gMF}^{-1}$) (Fig. 21).

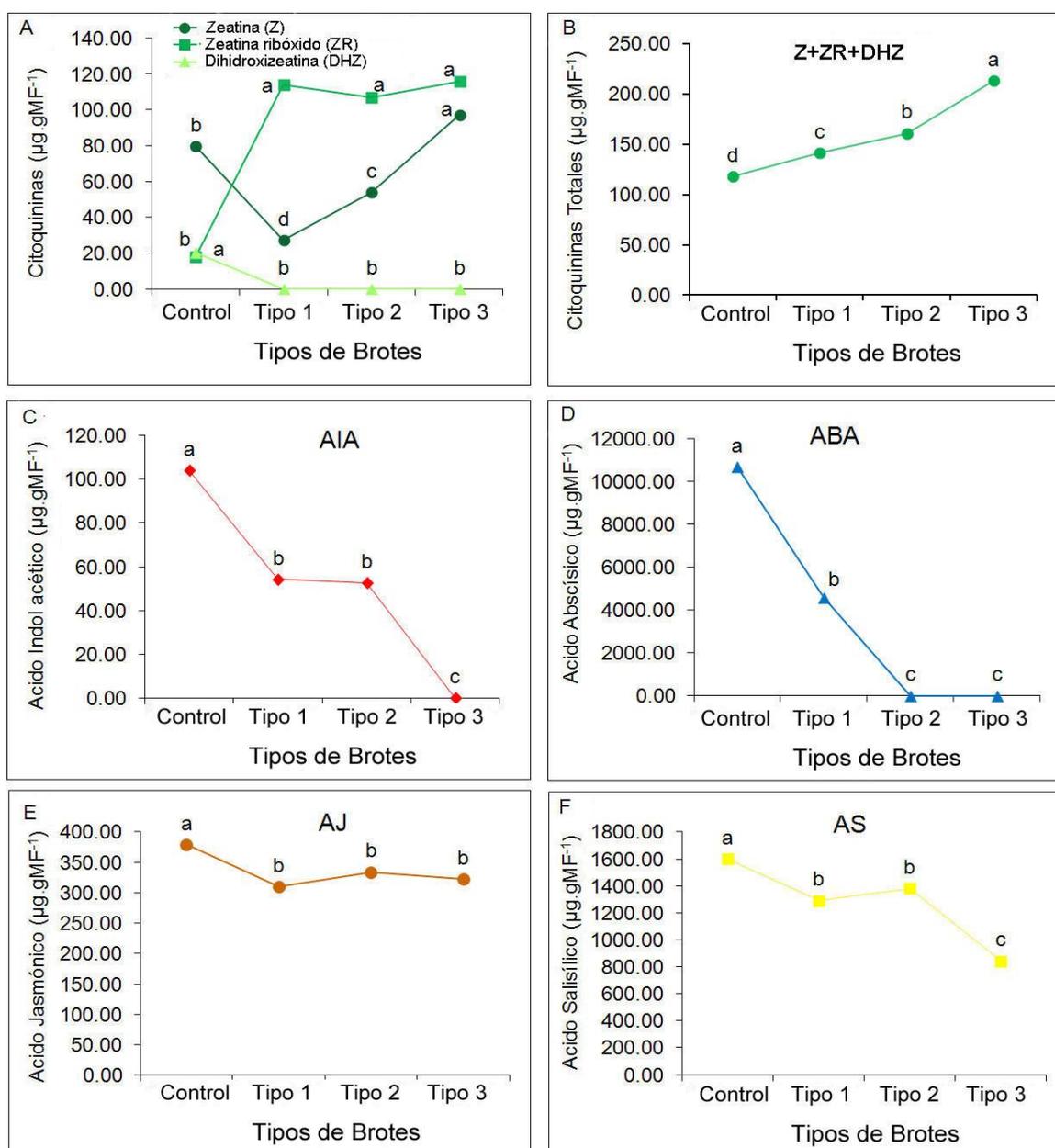


Figura 21. Contenido de fitohormonas endógenas en diferentes tipos de brotes de *Tectona grandis* L., obtenidos en los SIT a las cuatro semanas de cultivo. A) Citoquininas (Z, ZR, DHZ). B) Citoquininas totales (Z+ZR+DHZ). C) Ácido Indol acético (AIA). D) Ácido Abscísico (ABA). E). Ácido Jasmónico (AJ). F) Ácido salicílico (AS). Medias con letras distintas indican diferencias significativas (ANOVA simple; Tukey; $p \leq 0,05$). Para el tratamiento estadístico, los datos fueron transformados de acuerdo con $x' = (x+0,5)^{0,5}$. Los datos que se presentan en la figura son no transformados, (n=6). Leyenda: **Control**: brotes cultivados sin 6-BAP, **Tipo 1**, **Tipo 2** y **Tipo 3**: brotes cultivados con 4,44 μM de 6-BAP.

En cuanto al contenido RZ, se determinó que respecto al control (17,83 $\mu\text{g.gMF}^{-1}$), los valores se incrementaron significativamente en los brotes Tipo 1, Tipo 2 y Tipo 3 (114,05; 106,84 y 115,79 $\mu\text{g.gMF}^{-1}$, respectivamente), aunque no se observaron diferencias significativas entre ellos.

Los niveles de citoquininas totales se incrementaron significativamente en los diferentes tipos de brotes, a medida que fueron más evidentes los rasgos de vitrificación. Los valores detectados fueron de 117,76; 141,37; 160,90 y 212,81 $\mu\text{g.gMF}^{-1}$ en los brotes control, Tipo 1, Tipo 2 y Tipo 3, respectivamente.

El mayor contenido de AIA se detectó en los brotes del control (103,94 $\mu\text{g.gMF}^{-1}$), este fue superior al contenido de los brotes Tipo 1 y Tipo 2 (54,28 y 52,60 $\mu\text{g.gMF}^{-1}$), respectivamente, entre los cuales no se observaron diferencias significativas. En los brotes Tipo 3 no se detectó la presencia de AIA, posiblemente porque los contenidos eran muy bajos. En cuanto al ABA, los mayores niveles se detectaron en los brotes del control (10691,07 $\mu\text{g.gMF}^{-1}$), este contenido se redujo a la mitad en los brotes Tipo 1 (4585,05 $\mu\text{g.gMF}^{-1}$) y no se detectó la presencia de este regulador del crecimiento en los brotes Tipo 2 y Tipo 3.

El contenido de AJ disminuyó en los brotes Tipo 1 (310,57 $\mu\text{g.gMF}^{-1}$) respecto al control (378,59 $\mu\text{g.gMF}^{-1}$) y no se observaron diferencias significativas entre los brotes Tipo 1, Tipo 2 (334,06 $\mu\text{g.gMF}^{-1}$) y Tipo 3 (322,94 $\mu\text{g.gMF}^{-1}$).

De forma similar ocurrió con el AS, el contenido disminuyó en los brotes Tipo 1 (1290,91 $\mu\text{g.gMF}^{-1}$) respecto al control (1599,28 $\mu\text{g.gMF}^{-1}$) y no se observaron diferencias significativas entre el Tipo 1 y el Tipo 2 (1381,06 $\mu\text{g.gMF}^{-1}$), mientras que el menor contenido de AS se detectó en los brotes Tipo 3 (843,49 $\mu\text{g.gMF}^{-1}$).

Los reguladores del crecimiento y los mensajeros secundarios (ej. Ca^{2+}) son los encargados de transmitir la señal desde la membrana, de ahí su gran poder para controlar la morfogénesis (Gaspar *et al.*, 2002). Los niveles de citoquininas detectados en los brotes control, podrían ser explicado por la presencia de raíces en estos brotes, las cuales pudieron haber sintetizado citoquininas. Las

raíces constituyen el lugar de síntesis de las citoquininas libres como la zeatina y la zeatina ribósido (Barceló *et al.*, 2006).

Los resultados demuestran que el contenido de citoquininas endógenas se incrementó proporcionalmente a medida que fueron más visibles los rasgos de vitrificación en los brotes y el incremento del contenido de agua. Por lo que pudiera atribuirse la hiperhidricidad observada en los brotes Tipo 2 y Tipo 3 y mayormente en estos últimos, a la sobreacumulación de citoquininas en formas activas como la Z y la ZR, lo cual es consistente con los resultados descritos durante la cuantificación del contenido endógeno de reguladores del crecimiento en BH de *Alloe pollyphyla* L. (Ivanova, 2009) y *Actinidia deliciosa* L. (Moncaleán *et al.*, 2009).

Santoni *et al.* (1997) durante el estudio del mutante *cri1* de *Arabidopsis thaliana* L. capaz de sobreacumular citoquininas, demostraron por primera vez una correlación entre el incremento de los niveles endógenos de citoquininas y el desarrollo de un fenotipo hiperhídrico. Sin embargo, solo el incremento de los niveles endógenos no fue suficiente para inducir la hiperhidricidad, teniendo en cuenta que el mutante *amp1*, el cual era capaz de sobreproducir citoquininas y que mostraba similares niveles endógenos que el *cri1*, no desarrolló un fenotipo hiperhídrico, pero destacan que la causa pudo estar determinada por errores en la transmisión de la señal de la citoquinina, con lo cual no se descarta que la sobreacumulación de citoquininas endógenas a niveles tóxicos pudo ser la causa de la hiperhidricidad.

Los valores de AIA detectados confirman claramente la relación antagónica descrita para las auxinas y citoquininas (Barceló *et al.*, 2006; Vásquez y Torres, 2006). Mientras que en los brotes control el balance auxina/citoquinina parece estar equilibrado, debido a que ambos niveles fueron casi iguales (Fig. 21 B y C). En los brotes Tipo 1, Tipo 2 y Tipo 3, la relación es cada vez más favorable a las citoquininas, alcanzando su mayor desbalance en los brotes Tipo 3, lo que coincide con la apariencia vítrea y traslúcida de los brotes y además el mayor contenido de agua. Este desbalance auxina/citoquinina favorable a las citoquininas, principalmente por una sobreacumulación de citoquininas endógenas en formas activas, podría ser el factor inductor de la respuesta hiperhídrica en los brotes de teca.

La disminución del contenido endógeno de ABA en los brotes Tipo 1 y la ausencia de este regulador del crecimiento en los brotes Tipo 2 y Tipo 3, podría ser justificada por el bajo contenido de carotenoides detectados en estos tipos de brotes, teniendo en cuenta que la vía de

formación del ABA en plantas superiores es a partir de los carotenoides (Taylor, 2005). Estos resultados concuerdan con los descritos en estudios realizados en clavel (*Dianthus caryophyllus* L.), donde se determinó que las plantas normales tenían mayor contenido de ABA que las plantas hiperhídricas (Kidelman *et al.*, 1997). La limitada capacidad de las plantas *in vitro* para producir ABA, constituye una de las principales causas de la pobre funcionalidad de los estomas (Aguilar *et al.*, 2000), lo que afecta la supervivencia de las plantas durante la aclimatización (Pospíšilová *et al.*, 2009). En plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* L., el contenido reducido de ABA estuvo asociado con defectos en el desarrollo, como la formación de un mesófilo desorganizado y alteraciones en la morfogénesis de los estomas (Barrero *et al.*, 2005). Los niveles de ABA en los brotes Tipo 2 y Tipo 3 fueron muy bajos y no se detectaron para los estándares utilizados. Estos bajos niveles de ABA podrían justificar la presencia de estomas más abiertos y deformados, al parecer no funcionales, observados en este tipo de brotes, principalmente en los brotes Tipo 3, donde coincidió además con la apariencia vítrea y traslúcida de los brotes y con el mayor contenido de agua. A la vez esto podría justificar la excesiva transpiración, debido al mal funcionamiento de los estomas, que diferentes autores refieren en las plantas hiperhídricas durante la aclimatización (Pospíšilová *et al.*, 1998; Hazarika *et al.*, 2006; Moncaleán *et al.*, 2007). En las hojas el ABA induce una cascada de señales de traducción que conduce al incremento de la concentración de Ca^{2+} citosólico y la reducción del potencial osmótico mediante la salida de K^+ y Cl^- y el cierre estomático (Zhang y Outlaw, 2001). Aunque no se determinó en este estudio el contenido de Ca^{2+} , se conoce que los BH tienen un menor contenido de este ión, por lo que se podría asumir que los brotes Tipo 3, debido a su condición hiperhídrica podrían tener menor contenido de Ca^{2+} citosólico, lo que sumado al bajo contenido de ABA justificaría la mayor apertura estomática detectada en estos brotes.

El AJ y el AS parecen jugar un papel fundamental en los mecanismos de defensa de las plantas, al activar rutas que conducen a la expresión de fenómenos de resistencia a diversos agentes bióticos y abióticos (Afroz *et al.*, 2011). La disminución del contenido de AJ y AS en los brotes Tipo 1, Tipo 2 y Tipo 3 y mayoritariamente en estos últimos, para el caso del AS, indican que el desarrollo de una respuesta hiperhídrica en los brotes, pudiera implicar una disminución de la capacidad de respuesta de estas plantas ante el ataque de patógenos o condiciones ambientales adversas y por tanto una menor capacidad adaptativa.

4.3. Perfil proteómico de la hoja de *Tectona grandis* L. e identificación de proteínas que se expresan diferencialmente en los brotes durante la inducción de la respuesta hiperhídrica

4.3.1. Perfil proteómico de la hoja de *Tectona grandis* L

La electroforesis bidimensional permitió determinar 998 puntos resolutivos detectados en los geles dentro de un pH lineal de 3-11 y un rango de M_r de 10-114 kDa. Un total de 120 puntos fueron digeridos y sujetos a espectrometría de masas. Dentro de estas, 100 especies de proteínas no redundantes fueron identificadas, para un 75% de efectividad en la identificación.

Todas las proteínas identificadas, con su número de acceso, organismo de referencia a partir del cual fue identificada, el M_r y pI experimental y teórico, los valores de la varianza biológica, el valor acumulado asignado por el MASCOT, así como la función molecular asignada para cada proteína según el KEEG, se muestran en el Anexo 2. Mientras que el mapa proteómico de la hoja de teca, con las 100 proteínas identificadas, se muestran señaladas en el gel de la Figura 22.

El porcentaje de efectividad en la identificación de los péptidos (75%), puede ser explicado por la escasa disponibilidad de secuencias genómicas y proteómicas depositadas en bases de datos públicas de esta especie. Se utilizaron diferentes bases de datos públicas, pero algunos puntos no se pudieron identificar aún cuando la secuencia de los péptidos estaba dentro del tamaño de los 10-30 aminoácidos. Estas secuencias son probablemente características de la teca, de ahí la baja probabilidad de ser identificadas por homología en bases de datos con otras especies. Por otro lado, la longitud de estos péptidos identificados no fue suficiente para establecer una comparación estructural a partir de sus dominios, lo cual impidió además su clasificación funcional. Esto es uno de los inconvenientes que suele presentarse cuando se trabaja con especies consideradas “huérfanas”, por su escasa presencia en bases de datos y explica además la baja eficiencia de identificación, comparada con especies modelo secuenciadas completamente como *Populus trichocarpa* Torr & A.Gray o *Arabidopsis thaliana* L. Sin embargo, este porcentaje de identificación es similar al alcanzado en otras especies “huérfanas” como *Pinus radiata* Morelet (66%) (Valledor *et al.*, 2008) o *Quercus suber* L. (80%) (Jorge *et al.*, 2005; Abril *et al.*, 2011) y son superiores por ejemplo a las descritas para embriones cigóticos de *Phoenix dactylifera* L. (35%) (Sghaier-Hammami *et al.*, 2009).

Por otro lado, para varias proteínas identificadas, se observó diferencias entre la M_r y el pI experimental y el teórico. Esto puede explicarse por la influencia de diferentes factores, como el

hecho de que la proteína de referencia es a partir de una especie diferente a la teca, modificaciones post-traduccionales o producto a la degradación. En algunos casos, la misma proteína fue detectada en múltiples puntos, lo cual puede ser resultado de modificaciones post-traduccionales, separación de variantes, degradación de proteínas o variación alélica (Bianco *et al.*, 2009).

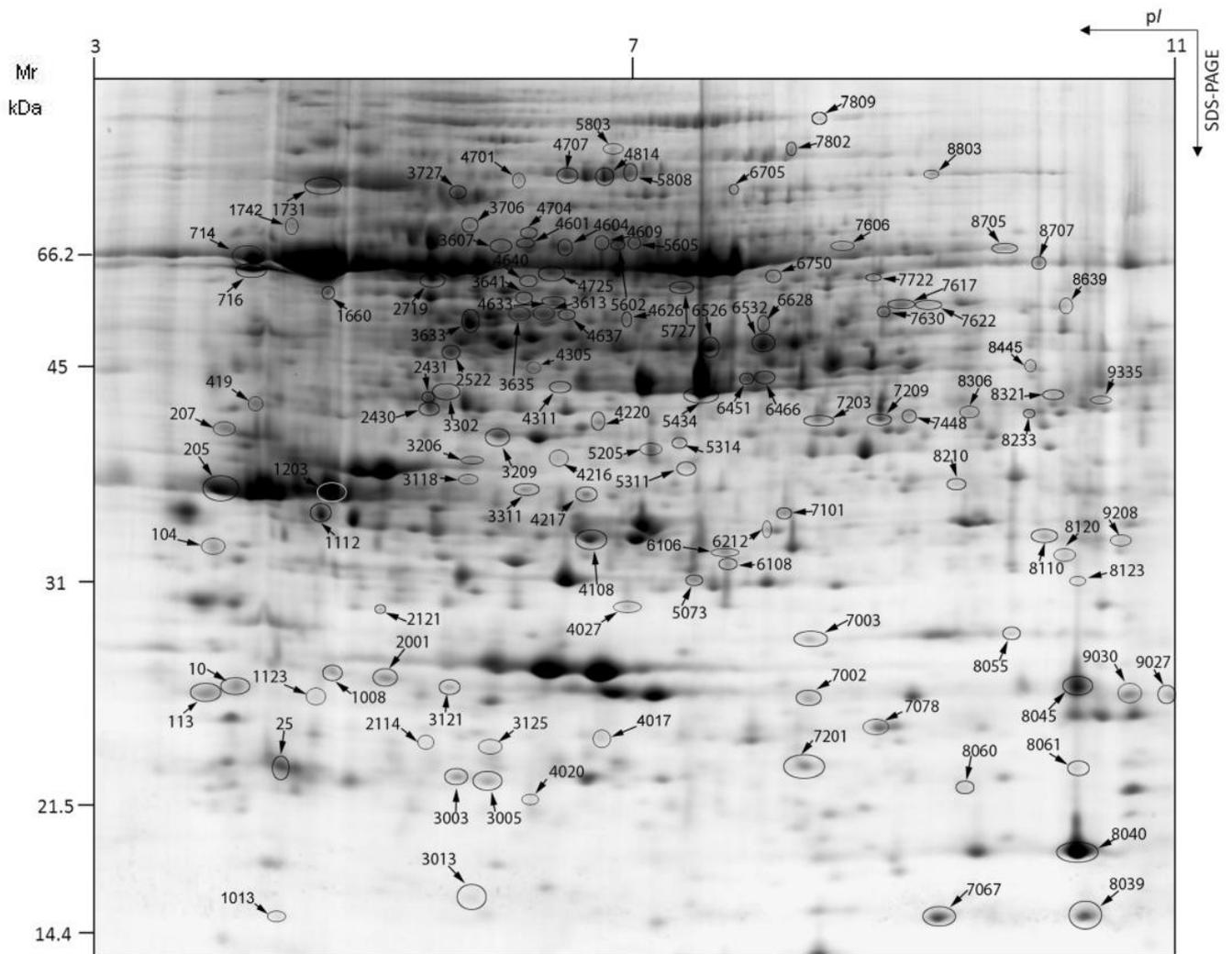


Figura 22. Mapa proteómico de la hoja de *Tectona grandis* L, obtenido a partir de plantas del banco de donantes. **Mr**: Masa molecular relativa. **pI**: punto isoeléctrico. Los puntos señalados, corresponden a las 100 proteínas seleccionadas para su identificación.

Las proteínas identificadas fueron clasificadas en 13 categorías de acuerdo al KEGG y la función molecular fue resumida en 24 categorías (Fig. 23A).

Las funciones más abundantes fueron las referidas a transferencia de electrones (10%) actividad sintasa (9%), seguidas por factor de traducción, actividad oxido reductasa, GTP y unión de proteínas, todas presentes en igual proporción (7%). Algunas funciones como la actividad de

transporte, degradación de proteínas, unión de nucleótidos y empaquetamiento de proteínas estuvieron presentes en igual proporción, pero en pequeña fracción (1%).

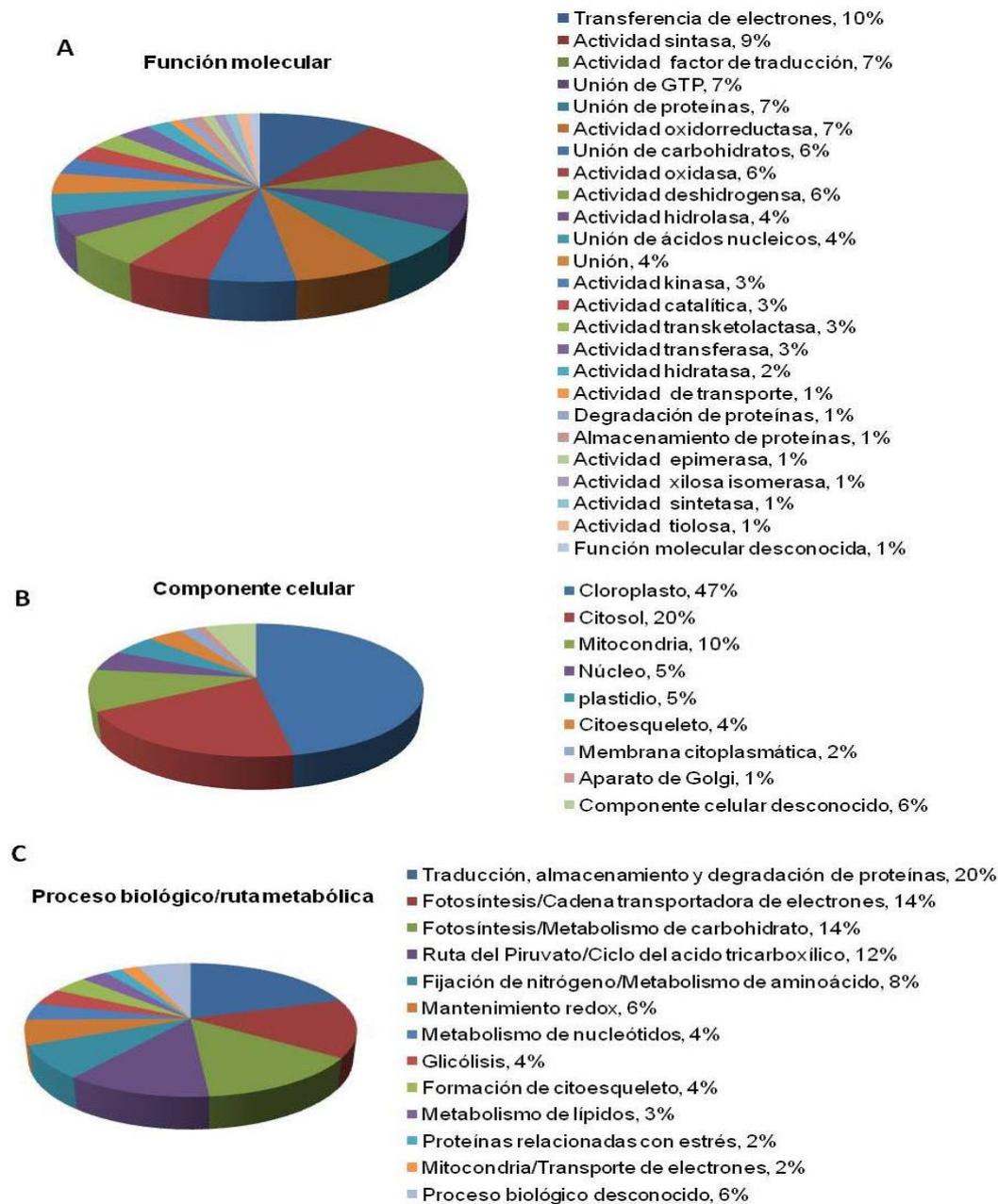


Figura 23. Clasificación de las proteínas expresadas, según la Ontología de la Enciclopedia de Genes y Genoma de Kioto (KO). A) Función molecular. B) Componente celular. C) Proceso biológico/ruta metabólica. Las proporciones relativas en cada término ontológico se expresan en porcentajes.

Las proteínas fueron clasificadas en ocho grupos basadas en el correspondiente componente celular en el cual se localizan (Fig. 23B). De acuerdo a esta localización, 77 de las 100 proteínas no redundantes identificadas, correspondieron a tres componentes celulares: cloroplasto (47%),

citosol (20%) y mitocondria (10%). En el aparato de Golgi y la membrana se localizó una pequeña fracción de proteínas, 1 y 2% respectivamente.

Teniendo en cuenta su función en los diferentes procesos biológicos, las proteínas fueron clasificadas en 12 categorías (Fig. 23C). Esta clasificación reveló que las más abundantes, fueron proteínas involucradas en la fotosíntesis, la traducción y la producción de energía.

De las 100 proteínas identificadas, 28 están involucradas en la fotosíntesis (cadena transportadora de electrones y ruta de los carbohidratos). En este grupo abundaron también proteínas como la Subunidad 2 del complejo Citocromo B6-F hierro-azufre, Subunidad II del centro de reacción del Fotosistema I, Proteína psbP del centro de reacción del Fotosistema II y la NADP⁺Ferredoxina reductasa, involucradas en la transferencia de electrones. Se identificaron otras proteínas como la Ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa y Fosforribulokinasa (PRK), las cuales están involucradas en la fijación del carbono fotosintético y el proceso de competencia de la fotorespiración y juegan un importante papel en el ciclo de Calvin. Todas estas enzimas pueden ser definidas como potenciales candidatas marcadoras de productividad en *T. grandis*, a partir de que son esenciales para el crecimiento y desarrollo de las plantas (Watson *et al.*, 2003).

Un gran número de proteínas estuvieron asociadas con la traducción, el plegamiento y la degradación de proteínas (20%). Este grupo estuvo compuesto por diferentes proteínas de tipo traslocasa, proteasa, peptidasas y proteínas facilitadoras del transporte de diferentes moléculas dentro de los compartimentos celulares. El análisis reveló la presencia del Factor de iniciación de la traducción en Eucariotas 5A (eIF-5A), la Subunidad tipo beta del proteosoma, el Factor de elongación TuA (EF-TuA), la S10 proteína ribosomal 40S, la Adenosina quinasa, entre otras.

También se identificaron abundantes enzimas relacionadas con la ruta del Piruvato y el Ciclo de los Ácido Tricarboxílicos (12%). En este sentido, se detectaron varias enzimas con actividad oxido reductasa y deshidrogenasa dentro de ellas la Aldo-ceto reductasa, Dehidroflavonol reductasa, Isocitrato dehidrogenasa, Tetrahidrofolato dehidrogenasa, entre otras.

Un importante grupo de proteínas relacionadas con el mantenimiento redox (6%) y proteínas de estrés (2%) estuvieron presentes en el perfil. En este sentido, se detectaron varias enzimas involucradas en la detoxificación y la respuesta a estrés. Dentro de estas, se detectaron enzimas relacionadas con el mecanismo antioxidante como Ascorbato peroxidasa (APX), Polifenol oxidasa, Tiorredoxina, entre otras. Se detectaron además dos importantes proteínas relacionadas

con la respuesta a estrés por temperatura (HSP), la Proteína 1 de 70 kDa de Choque Térmico (HSP70 kDa) y otra similar a Proteína de Choque Térmico (HSP). Estas están generalmente involucradas en la estabilización del empaquetamiento de las proteínas en respuesta a diferentes tipos de estímulos y durante el desarrollo de las plantas. Su función además incluye la prevención de la desnaturalización o el desempaquetado de las proteínas desnaturalizadas y la regulación de la actividad de muchas proteínas de señalización (Muccilli *et al.*, 2009). Estas proteínas identificadas involucradas en el mantenimiento redox y la respuesta a estrés pudieran ser posibles candidatas marcadoras de respuesta al estrés en teca, teniendo en cuenta que son esenciales para la adaptación de las plantas al ambiente.

El número de proteínas involucradas en la glicólisis, metabolismo de los nucleótidos y la conformación del citoesqueleto estuvieron presentes en la misma proporción (4%). También estuvieron presentes proteínas relacionadas con el metabolismo de los lípidos (3%) y la transferencia de electrones en las mitocondrias (2%).

Se detectaron seis proteínas con función desconocida. En todos los análisis de proteomas, generalmente aparecen proteínas de las cuales no se conoce su función, al no mostrar homologías con proteínas de otros organismos (Kwon *et al.*, 2005; Jamet *et al.*, 2006). Se plantea que estas proteínas podrían ser específicas de la especie, ya que la función de la mayoría de las proteínas identificadas se deduce por homología con proteínas de otro organismo (Novo *et al.*, 2009), en algunos casos puede llegar a suponer el 26% del total (Borderies *et al.*, 2003). Por lo general estas proteínas constituyen las proteínas de mayor interés para ser identificadas completamente, ya que serían nuevas proteínas descritas para la ciencia. Por lo tanto, las proteínas de función desconocida son uno de los grandes retos para futuros estudios de proteómica en teca.

Las imágenes de los geles y los datos de las identificaciones empleadas se encuentran disponibles en la base de datos pública: World 2-D PAGE de ExPasy. (<http://world-2dpage.expasy.org/repository/0035/>). Estos resultados constituyen los primeros estudios de proteómica en la especie *Tectona grandis* L. y teniendo en cuenta la gran cantidad de puntos resolutivos obtenidos en los geles teñidos y la detección e identificación de una gran variedad de proteínas relacionadas con diferentes rutas metabólicas, como la fotosíntesis, la producción de energía, el mantenimiento redox, la biosíntesis de proteínas, entre otras, se determinó que los aspectos experimentales y

analíticos utilizados fueron efectivos y pueden ser utilizados para futuros estudios de expresión diferencial de proteínas en teca.

4.3.2. Identificación de proteínas expresadas diferencialmente en los brotes de teca (*Tectona grandis* L.) durante la inducción de la respuesta hiperhídrica

El análisis de la influencia del 6-BAP en la expresión diferencial de proteínas en brotes de teca con diferente morfología, se realizó mediante el análisis comparativo del perfil proteómico de los brotes cultivados sin 6-BAP, considerados como control, los brotes cultivados con 4,44 μ M de 6-BAP que no mostraban cambios morfológicos considerados como normales (Tipo 1) y los brotes que solo mostraban cambios morfológicos en la forma y coloración de sus hojas considerados como Tipo 2 y brotes que mostraban una morfología anormal de sus hojas y con una apariencia vítrea y traslúcida, considerados como hiperhídricos (Tipo 3).

La electroforesis bidimensional en gel de acrilamida permitió detectar más de 1000 puntos resolutivos en un rango de pH lineal de 3-11, el rango de masa molecular de las proteínas estuvo entre 10 y los 114 kDa. El promedio de los puntos detectados fue 988 ± 14 , 1010 ± 17 , 991 ± 31 y 947 ± 8 en valores de media \pm DS, en los brotes del control, Tipo 1, Tipo 2 y Tipo 3, respectivamente.

El análisis estadístico (ANOVA simple y FDR, $p\leq 0,05$), permitió determinar que 39 puntos cambiaron significativamente de un perfil a otro, de ellos 36 fueron extraídos de los geles para su identificación. El análisis de componentes principales (PCA) clasificó las muestras proteicas dentro de los diferentes tipos de brotes. El PC1, el cual aporta el 21,2% de la varianza total mostró una correlación con el grado de hiperhidricidad (Fig. 24). Todos los grupos fueron claramente diferenciados excepto los brotes Tipo 2, los cuales ocupan una posición intermedia entre los brotes Tipo 1 y Tipo 3. Teniendo en cuenta la habilidad del PC1 para diferenciar las muestras, los 10 puntos que más aportaron a este componente fueron seleccionados para su identificación.

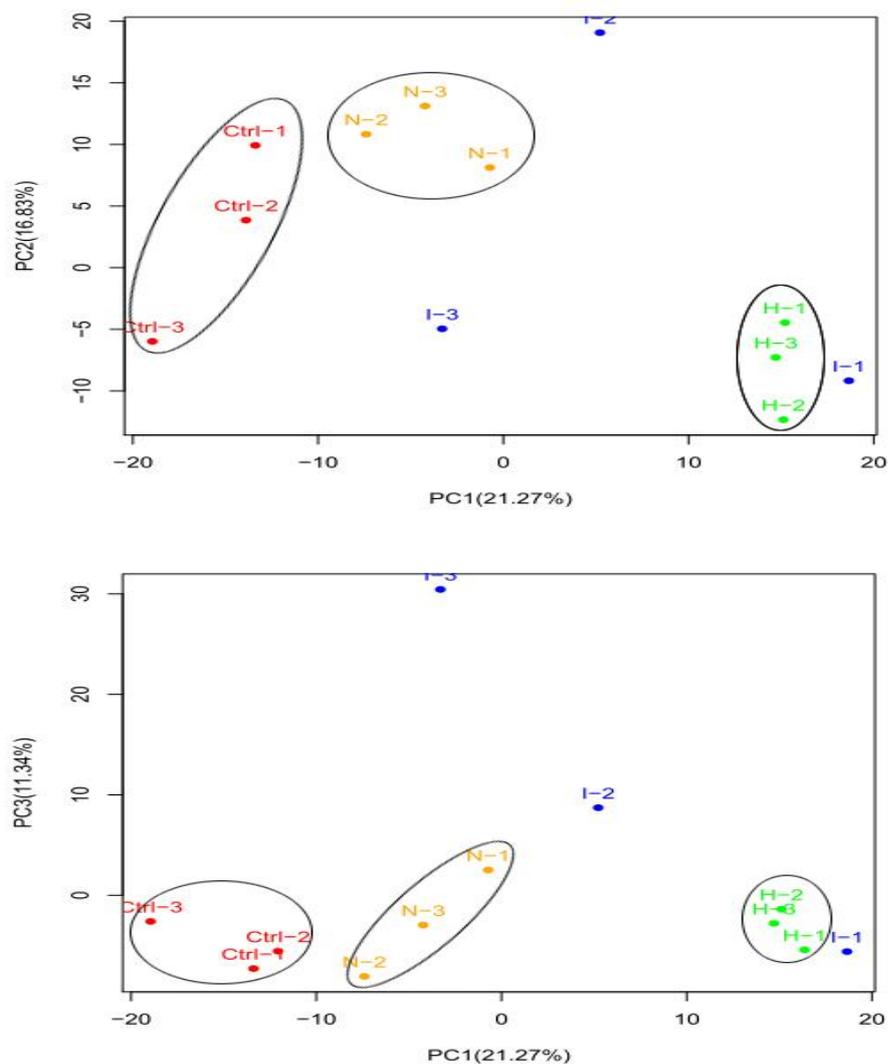


Figura 24. Clasificación por componentes principales de muestras proteicas de diferentes tipos de brotes de *Tectona grandis* L., obtenidos en los SIT a las cuatro semanas de cultivo. **Leyenda:** **Ctrl**) brotes cultivados sin citoquininas. **N**) brotes Tipo 1. **I**) brotes Tipo 2. **H**) brotes Tipo 3, cultivados con 4,44 μ M de 6-BAP.

Como resultado del ANOVA simple, prueba de FDR y el PCA, un total de 46 puntos fueron seleccionados y sujetos a espectrometría de masas. La combinación de la técnica de la huella péptida y la espectrometría de masas permitió identificar 38 proteínas a partir de los puntos seleccionados, para un 82,6% de efectividad, similar a la de especies no secuenciadas.

Los resultados obtenidos para la identificación de proteínas en los brotes de teca, mediante la búsqueda en bases de datos de proteínas del NCBI de la secuencia de los péptidos obtenidos por espectrometría de masas se muestran en el Anexo 3, mientras que los resultados de la identificación de las proteínas del PC1, que más aportaron a la varianza se muestran en el Anexo 4. Los aspectos recogidos en las tablas comprendieron el número de identificación del punto proteico en la imagen del gel asignado por el programa PDQuest Advanced (SSP), el nombre de la proteína

homóloga, el organismo de referencia, el número de acceso a la base de dato, la M_r y el pI experimental y teórico, la media de la cantidad de proteína, la desviación estándar, el valor acumulado según la comparación del programa Mascot y la función molecular.

El análisis estadístico (ANOVA, FDR $p \leq 0,05$) reveló cambios en la intensidad de 17 puntos del perfil de los brotes Tipo 1 con respecto al perfil de los brotes del control. Seis puntos incrementaron de intensidad en los brotes Tipo 1 (puntos 113, 1008, 3017, 5414, 6451 y 7809), mientras que un punto estuvo presente en los brotes Tipo 1, pero ausente en los brotes del control (punto 5414). Otro grupo de cuatro puntos disminuyó de intensidad en los brotes Tipo 1, en comparación con el control (puntos 1331, 2749, 7617 y 4609); mientras que siete puntos no fueron detectados en los brotes Tipo 1 (puntos 4601, 6705, 8306, 3406, 4217, 4637 y 7722).

La intensidad de 17 puntos cambió significativamente en el perfil de los brotes Tipo 2, en comparación con el perfil de los Tipo 1. De ellos dos puntos incrementaron de intensidad en los brotes Tipo 2 (puntos 4701 y 3017), mientras que tres puntos disminuyeron de intensidad (3302, 1331 y 5609) y un importante grupo de 12 puntos (4601, 6705, 8306, 1742, 3706, 3406, 4217, 4220, 4637, 7722, 2749 y 4609) no fueron detectados en el perfil proteómico de este tipo de brote.

Cuando se comparó el perfil de los brotes Tipo 3 con el de los brotes Tipo 1, se detectó que un grupo de 21 puntos cambió de intensidad. De ellos, dos puntos incrementaron de intensidad (puntos 4701 y 3017), un punto disminuyó de intensidad (punto 4814), mientras que un importante grupo de 18 puntos (puntos 4601, 6705, 3017, 8306, 1742, 3706, 3406, 3302, 3417, 4217, 1331, 4220, 4637, 7722, 2749, 3301, 4609, 5609) no fueron detectados en el perfil proteómico de los brotes Tipo 3. Todos los puntos resultaron ser proteínas conocidas y registradas en la base de datos del NCBI y su función metabólica fue asignada según KEGG. El pI y la M_r experimental no coincidió con el teórico para varias proteínas, esto puede ser resultado de modificaciones post-traduccionales o producto a la degradación. En algunos casos, la misma proteína fue detectada en múltiples puntos, pero con el pI y la M_r diferente, lo cual puede ser resultado de modificaciones post-traduccionales, separación de variantes, degradación de proteínas o variación alélica (Bianco *et al.*, 2009).

En la Figura 25, se muestran imágenes comparativas de fracciones de los geles donde se pueden observar algunos de los puntos proteicos que cambiaron significativamente de un perfil proteómico a otro en los diferentes tipos de brotes de teca. Por ejemplo el punto 1008 que con

respecto al control aumenta de intensidad en los brotes cultivados con 6-BAP, aunque se observa sobre-expresado en los brotes Tipo 1 y con respecto a este disminuye en los Tipo 2 y Tipo 3. El punto 3406 aparece solo en el perfil de los brotes control, los puntos 10 y 113 disminuyen de intensidad en los brotes control y el punto 8550 desaparece del perfil en los Tipo 2 y Tipo 3.

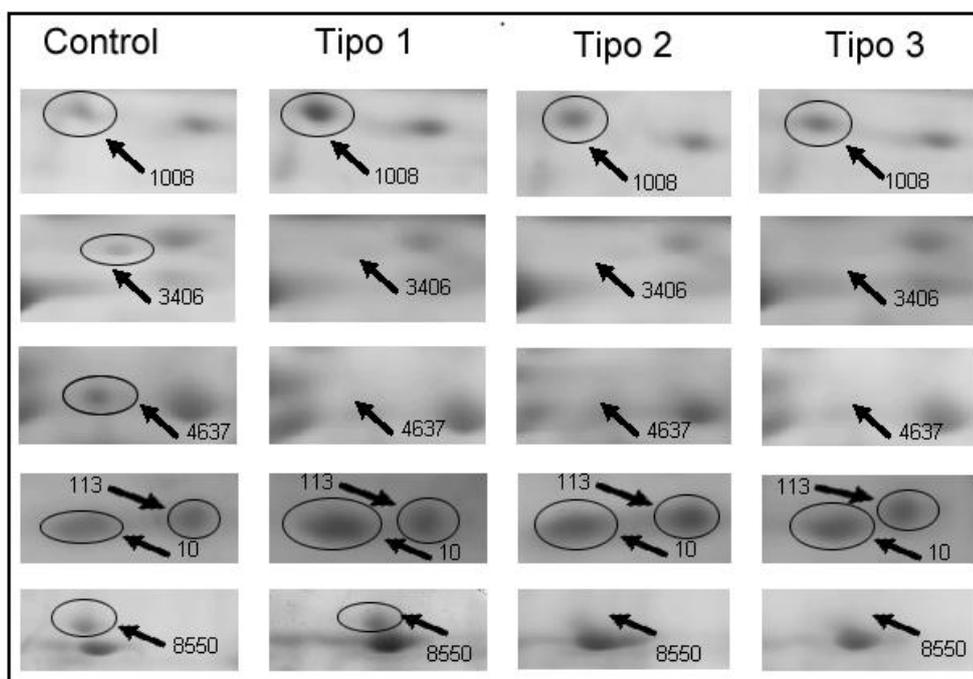


Figura 25. Fracción de geles 2-D con puntos correspondientes a un número representativo de proteínas expresadas diferencialmente, en diferentes tipos de brotes de *Tectona grandis* L, cultivados en SIT. **Leyenda:** **Control:** brotes cultivados sin 6-BAP. **Tipo 1,** **Tipo 2,** **Tipo 3:** brotes cultivados con 4,44 μ M de 6-BAP.

Los resultados mostraron que los brotes Tipo 1, los cuales no difieren morfológicamente de los brotes control, mostraron un perfil de proteínas similar a estos últimos, pero sensiblemente diferente a los brotes Tipo 2 y Tipo 3. No obstante, se debe destacar que aún cuando en los brotes Tipo 1 no se observaron diferencias morfológicas con respecto a los brotes control, sí se determinaron cambios anatómicos y bioquímicos en estos brotes. Estos resultados sugieren que la presencia del 6-BAP en el medio de cultivo provoca cambios a nivel anatómico y molecular, prueba de ello es el incremento del contenido de agua en los brotes Tipo 1, la disminución del contenido de fenoles totales, de carotenoides y mayores niveles de citoquininas endógenas. Esto también es soportado por una menor presencia de ligninas en el tejido vascular y una mayor apertura estomática.

Implicación de las proteínas expresadas diferencialmente por efecto del 6-BAP en las rutas metabólicas

El listado general de todas las proteínas identificadas expresadas diferencialmente se muestra en el Anexo 3 y las de mayor implicación en las diferentes rutas metabólicas relacionadas con los cambios morfo-anatómicos y fisiológicos inducidos en los brotes por efecto del 6-BAP y descritos en los acápite anteriores se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4. Clasificación de acuerdo a su función en las diferentes rutas metabólicas, de las proteínas expresadas en brotes de *Tectona grandis* L. con diferentes morfología, cultivados en SIT.

Ruta metabólica	Proteína	Nivel de expresión			
		Control	Tipo 1	Tipo 2	Tipo 3
Cloroplasto: Fotosíntesis: Cadena transportadora de electrones y ruta de los carbohidratos	Subunidad 2 del Citocromo complejo B6-F Fe-S	xx	xxx	xxx	xxx
	Isoforma 1 de la Anhidrasa Carbónica (EC: 4.2.1.1)	xx	xx	x	-
	Isoenzima de la NADP-Ferredoxina reductasa	xxx	-	-	-
	Ribulosa 1,5-bisfosfato carboxilasa (EC: 4.1.1.39)	xx	xx	-	-
	Subunidad beta de unión a la subunidad mayor de la RuBisCO	xx	xx	-	-
	Fosforribuloquinasa (PRK) (EC: 2.7.1.19)	xxx	-	-	-
Mitocondria: Ruta del Piruvato y Ciclo del ATC	Piruvato deshidrogenasa (EC: 1.2.4.1)	xxx	xx	x	-
	Aldo ceto reductasa (EC: 2.3.1.170)	xx	xx	-	-
	Monodehidroascorbato reductasa (EC: 1.6.5.4)	xxx	-	-	-
	Adenil succinato sintetasa	xxx	-	-	-
Fijación de Nitrógeno y Metabolismo de aminoácidos	Cetol-acida reductoisomerasa (EC:1.1.1.86)	xxx	xxx	xx	-
	Cetol acida reductoisomerasa (EC:1.1.1.86)	xxx	xx	-	-
	Transaminasa mtnE (EC: 2.6.1.1)	-	xxx	xxx	xxx
Traducción, plegamiento y degradación de proteínas	Factor de iniciación de traducción	xx	xxx	xxx	xxx
	Isoforma III del Factor 5A de iniciación de traducción en Eucariota	x	xxx	xxx	xxx
	Pectina acetilesterasa (PAE) (EC: 3.1.1.6)	xx	xx	-	-
	Peptidasa dependiente de Zn	xxx	-	-	-
Citosol: Glicólisis	Germina (GL22)	xxx	xx	-	-

Mantenimiento Redox	1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidasa 1; (ACC oxidasa)	xxx	xxx	xx	-
	Ascorbato peroxidasa (EC: 1.11.1.11)	xx	-	-	-
	Peroxiirredoxina Q, (EC:1.11.1.15)	xxx	xxx	xx	x
	Precursor de Peroxidasa 16 (peroxidasa III) (EC: 1.11.1.7)	xxx	xxx	x	-
	Properoxidasa (EC: 1.11.1.7)	xxx	xxx	xx	-
Proteínas de respuesta a Estrés	Proteína de estrés térmico (HSP) (EC: 1.3.1.74)	xx	xx	xxx	xxx

Tabla simplificada del listado general de proteínas del Anexo 3. **Leyenda:** **Control:** brotes cultivados sin 6-BAP. **Tipo 1, Tipo 2, Tipo 3:** brotes cultivados con 4,44 μ M de 6-BAP

Fotosíntesis: cadena transportadora de electrones y ruta de los carbohidratos

En presencia de 6-BAP se determinó un aumento en la expresión de la proteína identificada como la Subunidad 2 del complejo Citocromo B6-F Hierro-azufre involucrada en la cadena de transporte de electrones, lo que pudiera indicar que el 6-BAP favoreció la transferencia de electrones. Sin embargo, la disminución o ausencia de otras enzimas implicadas en la fotosíntesis, ya sea en la cadena transportadora de electrones o en la síntesis de carbohidratos sugieren una afectación de la actividad fotosintética. En este sentido, en los brotes cultivados con 6-BAP y en mayor medida en los brotes Tipo 2 y Tipo 3, disminuyó de expresión o no fueron detectadas proteínas como la isoforma 1 de la Anhidrasa carbónica, una isoenzima de la Ferredoxina-NADP reductasa, la Ribulosa 1,5 bifosfato carboxilasa (RuBisCo), la subunidad Beta de unión a la subunidad mayor de la RuBisCo y una Fosforribuloquinasa (PRK). La menor expresión de estas enzimas involucradas en la fotosíntesis en los brotes Tipo 2 y Tipo 3, sumado a los menores contenidos de pigmentos fotosintéticos detectado en este tipo de brotes, podría indicar una disminución de la actividad fotosintética y justificaría la baja eficiencia fotosintética que diferentes autores atribuyen a los brotes hiperhídricos (Kevers *et al.*, 2004; Hazarika, 2006; Sreedhar *et al.*, 2009; Ivanova y Van Staden, 2011). Por otro lado, otro factor adicional que podría limitar la expresión de estas enzimas principalmente de la RuBisCo en los brotes Tipo 3, podría estar asociado al limitado intercambio de gases como el O₂ y el CO₂, que pudiera provocar la capa de agua que rodea las células en los tejidos hiperhídricos. Al respecto estudios realizados con líneas transgénicas (T^{Rst}L) de Tabaco (*Nicotiana tabacum* L.), transformadas con el gen que codifica para la subunidad mayor de la RuBisCo en girasol (*Helianthus annuus* L.) demuestran que con niveles de CO₂ del 0,5%, a diferencia del control no transformado, en las líneas transgénicas ocurrió una disminución del

contenido de RuBisCo. Esto se manifestó además con cambios en el fenotipo de las hojas, las cuales pasaron de estar completamente expandidas, con una forma aovada y bordes lisos en el control a una forma lanceolada, con hendiduras en la zona del mesófilo y con bordes rizados y encorvados hacia el haz de la hoja en las líneas transgénicas. Sin embargo, cuando la concentración de CO₂ se incrementó al 1%, en la línea transformada se incrementaron los niveles de RuBisCo y las nuevas hojas formadas desarrollaron una morfología similar al control, lo que demuestra que tanto las modificaciones del gen que codifica para la subunidad mayor de la RuBisCo, como los niveles de CO₂ disponibles pueden variar los niveles de esta enzima (Sharwood y Whitney, 2010). Por otro lado, la relación entre el menor contenido de la RuBisCo y el cambio en la morfología de las hojas descrito en estos estudios, podrían justificar el cambio de la forma aovada hacia una forma lanceolada con bordes rizados y encorvados, observados en los brotes Tipo 2 y en forma de cinta en los Tipo 3 y mayormente en estos últimos, donde se detectaron los menores niveles de expresión de esta enzima.

Ruta del Piruvato y Ciclo del Ácido Tricarboxílico (ATC)

La ruta metabólica del piruvato y el ciclo de los ATC fue afectada en los brotes cultivados con 6-BAP y mayormente en los brotes Tipo 2 y Tipo 3. De cuatro proteínas implicadas en estas rutas y detectadas en los brotes del control (Piruvato deshidrogenasa, Aldoceto reductasa, Monodihidroascorbato reductasa (MDHAR) y Adenilsuccinato sintetasa), dos no fueron detectadas en los brotes Tipo 1, tres en el Tipo 2 y las cuatro estuvieron ausentes en el Tipo 3, lo cual sugiere una disminución de la actividad de esta ruta y por lo tanto posiblemente la producción de NADPH a medida que se hacen más visibles los rasgos hiperhídricos.

El NADPH y el NADH están involucrados en muchas reacciones bioquímicas, dentro de ellas las de tipo oxido reductasa, deshidrogenasas y la transferencia de electrones. El NADPH suministra el poder reductor necesario para los sistemas antioxidantes y la eliminación de las especies reactivas de oxígeno (EROs). En las plantas las fuentes fundamentales de NADPH provienen de la fotosíntesis y del ciclo de las pentosas fosfatos en los tejidos no fotosintéticos (Kevers *et al.*, 2004). Estudios realizados en *Prunus* sp., demostraron que en los BH, existió una disminución de NADPH y de NADH en comparación con los brotes normales, lo cual justifica la baja actividad de la ruta Asada–Halliwell, referida por Frank *et al.* (1995) para este tipo de brotes (Kevers *et al.*, 2004). Los resultados demuestran que los sistemas antioxidantes representado por el ciclo

ascorbato-glutation, enzimas neutralizadoras de EROs y la ruta de las pentosas fosfatos como generadora de poder reductor, se encontraron disminuidos en los brotes cultivados con 6-BAP y mayormente en los brotes Tipo 3, lo que coincidió con la apariencia hiperhídrica y con el menor contenido de sustancias antioxidantes como los carotenoides y los compuestos fenólicos. Los resultados indican que los sistemas antioxidantes tanto de naturaleza enzimática como no enzimática se encontraron disminuidos en los brotes Tipo 2 y Tipo 3 y en mayor medida en estos últimos considerados como hiperhídricos, lo que indica que tienen una menor capacidad antioxidante, por lo que pueden ser más susceptibles a este tipo de estrés. Todos estos elementos muestran que el metabolismo de respuesta al estrés oxidativo es menos eficiente en los brotes cultivados con 6-BAP, mayormente en los brotes hiperhídricos, lo que pudiera justificar la baja calidad morfo-fisiológica descrita para este tipo de brotes (Gaspar, 2002; Franck *et al.*, 2001; Kevers *et al.*, 2004).

Los resultados también indican que los brotes del control se encuentran en condiciones de estrés, pero que son capaces de activar adecuadamente los mecanismos de respuestas elevando los niveles de sustancias y enzimas antioxidantes. Esto es soportado por el mayor contenido de carotenoides, compuestos fenólicos, así como una sobreexpresión de proteínas involucradas en el ciclo ascorbato-glutation y de proteínas con función de enzimas que juegan un papel fundamental en la producción de poder reductor (NADPH) necesario para activar los sistemas antioxidantes.

Traducción, plegamiento y degradación de proteínas

Con respecto a las proteínas relacionadas con la traducción, plegamiento y degradación de proteínas, se determinó que en comparación con los brotes control, dos proteínas identificadas como el Factor de iniciación de la traducción y la Isoforma 3 del Factor de iniciación 5A de la traducción en Eucariota incrementaron sus niveles de expresión en los brotes cultivados con 6-BAP, independiente de sus rasgos morfológicos. Esto confirma el papel inductor y regulador que se le atribuye a las citoquininas en la síntesis de proteínas (Criado *et al.*, 2009; Nobel, 2009).

Relacionadas con esta ruta, se detectó que dos proteínas implicadas en la xilogénesis y la biosíntesis de la pared celular, disminuyeron de expresión o no fueron detectadas en los brotes cultivados con 6-BAP, una de ellas identificada como una Peptidasa dependiente de Zn con actividad hidrolasa y la segunda proteína correspondió a la Pectina acetilesterasa (PAE). Se ha descrito que durante la formación de la pared secundaria ocurre un aumento de la actividad de

algunas enzimas hidrolíticas, como la Peptidasa dependiente de Zinc y la Pectina acetilesterasa, esta última incrementa su actividad al final del proceso de diferenciación (Pesquet *et al.*, 2005; Ubeda-Tomas *et al.*, 2007).

La disminución de los niveles de expresión o la ausencia de estas enzimas involucradas en la xilogénesis y la biosíntesis de la pared celular, podría implicar cambios o modificaciones en la estructura de la pared celular. Esto se corresponde con la poca organización del xilema observado en las secciones transversales del tallo, teñidas con floroglucinol-HCl, en los brotes Tipo 2 y Tipo 3, lo que coincidió además con el incremento del contenido de agua en los brotes y la aparición de síntomas visibles de hiperhidricidad. Por lo que estos resultados sugieren que posibles modificaciones en la estructura de la pared celular podrían ser una de las causas de la hiperhidricidad.

Citosol: Glicólisis

Relacionado con la glicólisis, se encontró que una proteína identificada como la Glioxisoma beta-cetoacil-tiolasa disminuyó de expresión en los brotes cultivados con 6-BAP, mientras que otra proteína de tipo Germina (GL-22) disminuye de expresión en los brotes Tipo 1 y desaparece del perfil proteómico de los brotes Tipo 2 y Tipo 3. Las germinas (GLPs) son proteínas que pertenecen a la superfamilia de las cupinas y presentan un amplio rango de actividades enzimáticas y aunque fueron descritas en principio en el contexto de la germinación, se expresan en muchos tejidos vegetales y en diferentes estados de desarrollo (Schlesier *et al.*, 2004). Algunas son enzimas oxidasas, con actividad superóxido dismutasa (SODs), que protege a las células del estrés oxidativo (Khuri *et al.*, 2001), otras son inhibidores de proteasas (Segarra *et al.*, 2003), mientras que otras parecen ser receptores o proteínas estructurales y oxidasas fuertemente asociadas a la hemicelulosa y a la extensibilidad de la pared celular (Novo, 2008). Por ejemplo la expresión de la germina en el embrión del trigo está asociada con el desarrollo de los tejidos y la diferenciación de los tejidos vasculares (Lane, 2000). Las germinas también se sintetiza en las hojas adultas que sufren estrés y muchas de ellas se inducen por estrés biótico (Schweizer *et al.*, 1999) y abiótico (Vallelian-Bindschedler *et al.*, 1998), lo que sustenta que los brotes cultivados sin citoquinina (control) se encuentran bajo condiciones de estrés oxidativo. Además, dado su papel en el desarrollo de la pared celular y la xilogénesis, la no expresión de esta Germina en los brotes Tipo 2 y Tipo 3, podría justificar el pobre desarrollo y

organización del xilema detectado mediante técnica histoquímica en este tipo de brotes. La baja expresión de estas enzimas involucradas en la biosíntesis de la pared celular sugiere que probablemente estos brotes presenten modificaciones en la pared celular, por lo que en concordancia con lo señalado con anterioridad por otros autores, esta podría ser una de las causas de la hiperhidricidad (George, 1998; Frank *et al.*, 2001).

Fijación de nitrógeno y metabolismo de aminoácidos

En cuanto al metabolismo del nitrógeno y la síntesis de aminoácidos, se pudo observar la ausencia en los brotes control de la enzima Transaminasa mtnE con actividad transferasa involucrada en la transferencia de grupos amino. Esto demuestra que las citoquininas podrían estimular la asimilación de compuestos nitrogenados, como resultado de la alta demanda necesaria para la formación de nuevos brotes (Ivanova, 2009). Sin embargo, la disminución de los niveles de expresión en los brotes Tipo 2 y Tipo 3 de la enzima Cetol-ácida reductoisomerasa y otra isoenzima de esta, involucrada en la síntesis de aminoácidos como cisteína, valina e isoleucina pudieran indicar una disminución en la síntesis de estos tipos de aminoácidos. Los aminoácidos con un extremo de cadena hidrofóbica como la isoleucina y la valina tienden a estar ubicados en el interior de la membrana y en interacción con los fosfolípidos le confieren propiedades hidrofóbicas (Nobel, 2009). Esta disminución de la actividad de la Cetol-ácida reductoisomerasa sugiere una disminución en la síntesis de este tipo de aminoácidos en los brotes Tipo 2 y Tipo 3, lo que podría afectar el contenido de componentes hidrofóbicos en la membrana celular disminuyendo su capacidad para evitar la entrada de agua. Esto podría ser una de las causas del aumento del contenido de agua en este tipo de brotes y en mayor medida en los BH (Tipo 3), en los cuales no se detectó la presencia de esta enzima. Lo cual sustenta además la hipótesis de que la hiperhidricidad pudiera estar provocada por el bajo potencial redox de la membrana plasmática, debido a modificaciones en su composición y cambios en la pared celular (Franck *et al.*, 2001).

Mantenimiento redox

Los resultados mostraron que algunas enzimas como la ACC oxidasa, que cataliza la última reacción en la formación del etileno se encontró sobre-expresadas en los brotes control, lo cual es un indicador de que estos brotes se encuentran en condiciones de estrés. La ACC oxidasa disminuye su expresión en los brotes Tipo 1 y Tipo 2 y no fue detectada en los brotes Tipo 3. Se encontró que la enzima Ascorbato peroxidasa (APX) involucrada en el ciclo Ascorbato-Glutation,

solo se detectó en el perfil proteómico de los brotes control, en los cuales se determinó un elevado contenido de compuestos fenólicos y una abundante acumulación de ligninas en el tejido vascular. La APX se encuentra en cada compartimento de la célula vegetal, esta participa en la eliminación del peróxido de hidrógeno (H_2O_2), como parte del ciclo Ascorbato-Glutation o ruta Assada-Halliwell-Foyer; su función es, en dependencia de la disponibilidad del sustrato, de reducir el ácido ascórbico y en algunos casos el glutatió, lo cual está en dependencia de la actividad relativa de la Monodehidroascorbato reductasa (MDHAR) y la Dehidroascorbato reductasa (DHAR) (Miller y Poulos, 2005). Sin embargo, aunque el papel más atribuido a las APX es la de participar en el control del estado redox de la pared celular, también tienen una implicación en la biosíntesis de ligninas, ya que son capaces de oxidar sus precursores fenólicos, facilitando la polimerización (Ros-Barceló *et al.*, 2006).

Se encontró además, que tres importantes enzimas con actividad peroxidasa, como la Peroxiredoxina Q y dos peroxidasas de clase III, como el precursor 16 de la Peroxidasa y una Properoxidasa, disminuyen de expresión o desaparecen del perfil proteómico de los brotes Tipo 2 y Tipo 3. Las peroxirredoxinas desempeñan un papel fundamental en la respuesta al estrés oxidativo en las células vegetales, necesitan ser renovadas para su actividad metabólica (Dietz *et al.*, 2002; Rouhier y Jacquot, 2002). En cuanto a las peroxidasas de clase III pueden considerarse como enzimas bifuncionales, ya que oxidan varios sustratos en presencia de H_2O_2 (Ros *et al.*, 2006) por lo que están directamente implicadas en la eliminación del H_2O_2 , pero también producen EROs debido a sus dos posibles ciclos catalíticos (peroxidativo y oxidativo) (Passardi *et al.*, 2005). Su implicación en procesos fisiológicos y de desarrollo es muy amplio, destacándose su papel en la respuesta a estrés (Novo, 2008), la polimerización de extensinas, oxidación de fenoles y el catabolismo de las auxinas y especialmente en la síntesis de ligninas (Quiroga *et al.*, 2000). La disminución de los niveles de expresión en los brotes Tipo 2 y Tipo de 3 de estas enzimas peroxidasas de clase III, directamente implicadas en el proceso de lignificación, indican una baja actividad peroxidasa y justifican la hipolignificación observada en el tejido vascular de estos brotes. La ausencia de este tipo de enzimas del perfil proteómico de los brotes Tipo 3, lo que coincidió con la apariencia vítrea de los brotes, indican que esta podría ser la causa de la hiperhidricidad. Estudios realizados en tejidos hiperhídricos de *Dianthus caryophyllus L.*, han demostrado que la baja actividad de enzimas involucradas en la síntesis de los precursores de

las ligninas y en su polimerización (ej. Peroxidasa ácidas), estuvo asociada con un menor contenido de ligninas (Kevers *et al.*, 1984).

La sobre-expresión de enzimas de tipo peroxidasa, sumado al aumento de los niveles de expresión de enzimas involucradas en el ciclo ascorbato-glutation en los brotes control, justifican la abundante acumulación de ligninas detectados en este tipo de brotes. Los resultados también confirman que los brotes cultivados sin 6-BAP, se encuentra en condiciones de estrés, pero que son capaces de responder adecuadamente activando los mecanismos de respuestas, lo cual está sustentado por el incremento de la expresión de enzimas antioxidantes en estos brotes, lo cual coincidió además con el mayor contenido de sustancias antioxidantes, como los compuestos fenólicos y los carotenoides.

En cuanto a los brotes cultivados con 6-BAP, debido a la baja intensidad de expresión o la no detección de proteínas marcadoras de estrés oxidativo en estos brotes, los resultados obtenidos hasta el momento, sugieren que los brotes cultivados con 6-BAP no se encuentran en condiciones de estrés. Sin embargo, esto es cuestionable, teniendo en cuenta que las especies reactivas de oxígeno (EROs), se forman en todos los organismos vegetales como resultado de los diferentes procesos metabólicos, como la fotosíntesis y que además quedó demostrado que estos brotes tienen disminuido los sistemas de enzimas y sustancias antioxidantes. En estos brotes podría estar ocurriendo la formación por ejemplo de anión superóxido, a partir de las enzimas de la cadena de transporte de electrones, de las cuales una de ellas se encontró sobre-expresadas en los brotes cultivados con 6-BAP. En este sentido, se ha descrito que este tipo de enzimas son auto-oxidables y bajo condiciones limitantes de NADP, pueden provocar la formación de anión superóxido (Kevers *et al.*, 2004). Esto cobra mayor relevancia si se tiene en cuenta que al analizar anteriormente la ruta del Piruvato y el ciclo del ATC, se determinó una disminución de la actividad de esta ruta y por tanto de la producción de poder reductor necesario (NADPH) para activar los sistemas antioxidantes. Existe la hipótesis de que la acumulación de H₂O₂ debido a la ausencia de enzimas antioxidantes conduce a la hiperhidricidad (Le Dily *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 2007). Varios estudios sostienen esta hipótesis, como es el caso de Olmos *et al.* (1997) quienes encontraron que el contenido de peroxidasa en el mesófilo y en la pared celular de las células del xilema de hojas hiperhídricas de clavel fue significativamente menor que en las hojas normales; mientras que Chen y Ziv (2001) mostraron que la baja actividad APX y catalasa (CAT) estuvo

correlacionada con la hiperhidricidad en brotes de Narciso (*Narcissus sp*), lo cual según ellos, sugiere que las enzimas antioxidantes juegan un importante rol en la prevención de la hiperhidricidad de los brotes.

Proteínas de respuesta a estrés

Se detectó un aumento de la expresión de una proteína de la familia de Proteínas de Respuesta a Estrés Térmico (*Heat Shock Protein*), conocidas como HSP, en los brotes Tipo 2 y Tipo 3, con respecto a los brotes Tipo 1 y del control. La inducción de las HSP constituyen un mecanismo de defensa para proteger los sistemas enzimáticos del daño de las EROs (Cassells y Curry, 2001). En pimiento (*Capsicum annuum* L), estudios de proteómica señalan que la hiperhidricidad afectó la síntesis de proteínas e indujo la expresión de proteínas BiP (*Binding Protein*), las cuales pertenecen a la familia de las HSP70 (Fontes *et al.*, 1999), estas se inducen en condiciones de estrés y pudieran servir como un monitor de la hiperhidricidad (Picoli *et al.*, 2001). Las EROs generalmente se eliminan mediante una cooperación del mecanismo de defensa de enzimas y sustancias antioxidantes (Cassells y Curry, 2001). La primera respuesta defensiva de las plantas a la formación de las EROs, es la estimulación de moléculas antioxidantes como el ácido ascórbico, el glutatión, los carotenoides, etc. y la activación de enzimas antioxidantes incluidas las superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión reductasa (GR) y ascorbato peroxidasa (APX). Una respuesta adicional involucra la activación de las HSP, para proteger las enzimas del daño oxidativo y de proteasas para degradar proteínas dañadas. El ciclo celular se hace más lento para minimizar la transmisión de mutaciones a las nuevas células que se forman producto de la mitosis y facilitar la reparación del ADN y se activan los mecanismos de respuesta a estrés oxidativo. Los resultados del control del estrés oxidativo dependerán del equilibrio entre la magnitud o concentración de las EROs y la respuesta acoplada de los sistemas antioxidantes. El desequilibrio puede conducir a una respuesta controlada, como la inducción de resistencia a patógenos, pero un desbalance excesivo puede provocar daños celulares, mutaciones y la activación de la muerte celular programada (Cassells y Curry, 2001).

Este análisis aplicado a los resultados obtenidos, sugiere que las condiciones que se crean en los SIT en un medio de cultivo sin 6-BAP, provocan la formación de EROs en los brotes, posiblemente H₂O₂. Sin embargo, los niveles de estas EROs no son suficiente para causar daños oxidativos, pero si para inducir una respuesta controlada, que involucra a toda la compleja red de

enzimas y sustancias antioxidantes y que conduce a una resistencia a estrés biótico y abiótico. Lo cual está sustentado por los indicadores fisiológicos descritos en acápite anteriores en los brotes del control, como el mayor contenido de carotenoides, compuestos fenólicos, contenido de ABA y la sobre-expresión de proteínas involucradas en el ciclón ascorbato-glutation. A esto podría sumarse, que el ambiente ventilado de los SIT, podría evitar la acumulación y el efecto tóxico de gases como el etileno (Berthouly y Etienne, 2005; Aragón *et al.*, 2010), cuyos niveles de formación podrían ser más elevados bajo estas condiciones de estrés (ausencia de citoquinina), lo que es sustentado por el incremento de la actividad de la ACC oxidasa, la cual se encontró sobre-expresada en los brotes control. Todo ello conduce a la activación de mecanismos de defensa en este tipo de brotes que le confiere mayor capacidad adaptativa. Sin embargo en los brotes cultivados con 6-BAP y en mayor medida en los BH (Tipo 3), la sobreacumulación endógena de citoquininas en formas activas, de algún modo podría haber interferido en la transmisión de la señal o en la formación de EROs, que juegan un rol fundamental en activar los mecanismos de defensa de la planta, como por ejemplo el H₂O₂. Esto pudiera inhibir la actividad de enzimas dependiente del H₂O₂, como las peroxidasas, que participan en la xilogénesis y la lignificación de las paredes celulares, pero que a la vez también juegan un importante papel en la defensa antioxidante. Es válido, recordar que cuatro de estas peroxidasas disminuyeron su expresión o no fueron detectadas en estos brotes, lo que se correspondió con una pobre organización del xilema e hipolignificación en los brotes Tipo 3. La hipolignificación de las células en los BH, debido a la alteración de las peroxidasas ácidas pudiera debilitar las paredes celulares y facilitar el contacto entre las células y el medio de cultivo desequilibrando el balance osmótico de la célula (Gaspar, 1991; Olmos *et al.*, 1997) y por otro lado disminuir la capacidad antioxidante de los brotes. El agua contenida en los espacios intercelulares (Gribble *et al.*, 1998) pudiera además reducir el intercambio de gases induciendo un estrés adicional por hipoxia celular o alteración del intercambio del CO₂ y el etileno (Frank *et al.*, 2004), condiciones bajo las cuales se producen EROs capaces de causar daño oxidativo (ej. anión superóxido, radical hidroxilo, etc.) (Asada, 1992). Sin embargo, aunque se pudo demostrar que en los brotes cultivados con 6-BAP y en mayor medida los BH (Tipo 3) se encuentran disminuidos los sistemas de enzimas y sustancias antioxidantes, fue difícil determinar si estos se encontraban estresados o no, teniendo en cuenta que no se detectó en ellos sobre-expresión de proteínas marcadoras de estrés oxidativo. Aunque el

aumento de expresión en estos brotes de una proteína de estrés por choque térmico (HSP), las cuales se activan para proteger los sistemas enzimáticos del daño oxidativo, pudieran indicar un aumento de los niveles de EROs.

Otros modelos diseñados para estudiar la hiperhidricidad desarrollado en *Prunus sp.* (Franck *et al.*, 2004) y clavel (*Dianthus caryophyllus L.*) (Saher *et al.*, 2004) han demostrado que en los BH además de los desórdenes anatómicos y fisiológicos, existe un incremento de la actividad de enzimas marcadoras de estrés oxidativo. La causa de que en nuestro modelo no encontráramos una sobre-expresión de este tipo de enzimas y la aparición de los rasgos hiperhídricos, podría estar en que en los modelos de Prunus y Clavel, se compararon los brotes con rasgos morfológicos extremos, o sea brotes normales con BH, en los cuales se apreciaba la pérdida de la capacidad morfogenética, síntomas de necrosis o muerte apical. Sin embargo, en nuestro estudio los BH (Tipo 3) no presentaron ninguno de estos síntomas. Lo que indica que los BH de Prunus y Clavel, se encontraban en una fase más agravada del fenómeno de la hiperhidricidad, donde debido a elevados niveles de EROs, sumado a una disminución de la señal de la citoquinina al final del cultivo, quizás pudo favorecer el aumento de la actividad de enzimas involucradas en la respuesta al estrés oxidativo. No obstante, los bajos niveles de sustancias antioxidantes de estos brotes (Prunus y Clavel), sumado a la activación tardía de los sistemas de enzimas antioxidantes, pudo conllevar a un ineficiente control de las EROs y a un desbalance extremo, provocando daños celulares, mutaciones, la pérdida de la capacidad morfogenética, la activación de la muerte celular programada y la muerte celular (Cassells y Curry, 2001).

Con el modelo experimental de *Tectona grandis L.* se pudo demostrar que no existe un estado hiperhídrico, sino que es un proceso progresivo, acompañado de cambios graduales en la anatomía y la fisiología de los brotes, en el cual las citoquininas juegan el rol fundamental y donde se afectan principalmente los sistemas antioxidantes. Nuestro modelo demuestra que incluso en la fase final donde aparecen los síntomas de vitrificación, pueden existir varios niveles de hiperhidricidad antes de que ocurra la pérdida de la capacidad morfogenética. Los resultados confirman lo planteado por Debergh *et al.* (1992), acerca de que pueden existir varios niveles de hiperhidricidad, de manera que estos desórdenes pueden estar presente en el material vegetal, sin que exista manifestación visual en la morfología de los brotes, por lo que la apariencia vítrea sería el indicador mas distintivo de la etapa final de la hiperhidricidad. Este generalmente coincide con

un grado severo de desórdenes anatómicos y fisiológicos e incluso la pérdida de la capacidad morfogénica o la activación de la muerte celular programada (Ziv, 1991). Los resultados obtenidos están en concordancia además con los descritos durante el estudio de la hiperhidricidad en *Vanillia planifolia* L., donde los autores señalan un grado de desórdenes anatómicos y bioquímico cada vez mayor a medida que aparecieron cambios morfológicos en las hojas, la coloración de los brotes y la apariencia vítrea (Sreedhar *et al.*, 2009).

Al integrar estos resultados con los ya expuestos hasta el momento se puede plantear que el 6-BAP induce cambios en la morfo-anatomía y la fisiología de los brotes de *Tectona grandis* L cultivados en los SIT y que el incremento de la concentración exógena en niveles iguales o superiores a 4,44 μM de 6-BAP conlleva a una sobreacumulación en los brotes de citoquininas en formas activas (Z y ZR). Esta sobreacumulación de citoquininas disminuye la expresión de proteínas involucradas en diferentes rutas metabólicas, lo que afecta la fotosíntesis, la traducción, el plegamiento y degradación de proteínas, el mantenimiento redox, la producción de energía y el metabolismo de los amino ácidos. La disminución de la expresión o ausencia principalmente enzimas de tipo peroxidasa, involucradas en la lignificación, la formación de la pared celular, la defensa antioxidante y los mecanismos de respuesta a estrés biótico y abiótico, afecta la calidad morfo-fisiológica de los brotes e induce una respuesta hiperhídrica en ellos que disminuye su capacidad adaptativa. Esto además justifica, los resultados obtenidos en el acápite 4.1, donde el menor porcentaje de supervivencia *ex vitro* se obtuvo en los brotes cultivados con 6,66 μM de 6-BAP, lo coincidió con una sobreacumulación de citoquininas endógenas en formas activas, el mayor número de BH y el mayor contenido de agua en los brotes, la disminución del contenido de sustancias antioxidantes, desórdenes anatómicos en el aparato estomático e hipolignificación del tejido vascular, así como una limitada capacidad de respuesta a estrés biótico y abiótico.

5. Conclusiones

1. Con una concentración de 2,22 μM de 6-BAP se logró incrementar el número de brotes en los sistemas de inmersión temporal (4,1 brote/explante) sin la presencia de brotes hiperhídricos. Estos brotes sobrevivieron en un alto porcentaje (91,7%) durante la aclimatización.
2. Se demostró que en los sistemas de inmersión temporal en ausencia o con baja concentración de 6-BAP (2,22 μM) se obtienen plantas con características similares a las plantas *in vivo*. Las plantas bajo estas condiciones desarrollaron estomas funcionales y un sistema conductor bien lignificado y desde la fase *in vitro* fueron capaces de activar mecanismos de defensa antioxidante y de respuesta a estrés biótico y abiótico, que les permitió desarrollar mayor capacidad adaptativa.
3. Se comprobó que el 6-BAP provocó cambios en la morfo-anatomía y la fisiología de los brotes de teca y la inducción de una respuesta hiperhídrica. Estos cambios implicaron un incremento del contenido de agua en los brotes, desórdenes en el aparato estomático y un sistema conductor hipolignificado. Además, de una disminución de la capacidad antioxidante y de respuesta a estrés biótico y abiótico con un efecto residual de citoquininas en formas activas, lo que en conjunto disminuyó la capacidad adaptativa de los brotes y afectó la supervivencia *ex vitro*.
4. El perfil proteómico de la hoja de teca obtenido a partir de 100 proteínas identificadas mediante espectrometría de masas y el análisis de la huella peptídica permitió establecer por primera vez, aspectos experimentales y analíticos para los estudios de expresión diferencial de proteínas en esta especie.
5. Los cambios inducidos por el 6-BAP en la morfología de los brotes de teca y el desarrollo de un fenotipo hiperhídrico correspondieron a cambios a nivel anatómico y fisiológico, que son el resultado de alteraciones en los niveles de expresión de proteínas involucradas en diferentes rutas metabólicas. La respuesta hiperhídrica implicó afectaciones en la fotosíntesis, la traducción, el plegamiento y degradación de proteínas, el mantenimiento redox, la producción de energía y el metabolismo de los aminoácidos.

6. Se demostró que el mecanismo mediante el cual el 6-BAP provocó una respuesta hiperhídrica en los brotes de teca, estuvo asociado a una sobreacumulación de citoquininas endógenas en formas activas, que provocó una disminución o ausencia de expresión de varias enzimas de tipo Peroxidasa, involucradas en la defensa antioxidante, la xilogénesis, la biosíntesis de la pared celular y la lignificación, lo que constituye la causa principal de la hiperhidricidad y de la baja capacidad adaptativa de estos brotes.

6. Recomendaciones

1. Emplear los sistemas de inmersión temporal con una concentración de 2,22 μM de 6-BAP durante la multiplicación de los brotes de teca, como pretratamiento *in vitro* para lograr altos porcentajes de supervivencia durante la aclimatización.
2. Utilizar el modelo experimental descrito en este trabajo, para estudiar el efecto del 6-BAP en la respuesta morfo-fisiológica de otras especies agroforestales de interés.
3. Iniciar los estudios para identificar por otros métodos las proteínas no identificadas por el método basado en la huella peptídica y la homología en bases de datos, las cuales podrían ser proteínas específicas de la especie *Tectona grandis* L. y cuya identificación podrían constituir nuevas proteínas descritas para la ciencia.

7. Referencias Bibliográficas

1. Abdelnour A y Muñoz A (2005) Micropropagación de teca (*Tectona grandis* L.). Revista Forestal Kuru 5: 1-11.
2. Abril N, Gion JM, Kerner R, Müller-Starck G, Cerrillo NR, Plomion C, Renaut J, Valledor L, Jorrin-Novo JV (2011) Proteomics research on forest trees, the most recalcitrant and orphan plant species. *Phytochemistry* 233-254.
3. Afreen F, Zobayed SMA, Kozai T (2002) Photoautotrophic culture of *Coffea arabusta* somatic embryos: development of a bioreactor for large scale plantlet conversion from cotyledonary embryos. *Annals of Botany* 90, 21-29.
4. Afroz A, Ali GM, Mir A, Komatsu S (2011) Application of proteomics to investigate stress-induced proteins for improvement in crop protection. *Plant Cell Rep* 30:745–763
5. Agarwal R, Matros A, Melzer M, Mockb HP, Sainisa JK (2010) Heterogeneity in thylakoid membrane proteome of *Synechocystis* 6803. *Journal of Proteomics* 73: 976-991.
6. Agudelo N (2002) Requerimientos edáficos para Caoba. El Zamorano (Honduras). Escuela Agrícola Panamericana. (Página web en línea) Disponible en: www.fao-sict.un.hn/ensayos/unload/770.pdf.
7. Aguilar ML, Espadas FL, Coello J, Maust BE, Trejo C, Robert ML, Santamaria, JM (2000) The role of abscisic acid in controlling leaf water loss, survival and growth of micropropagated *Tagetes erecta* plants when transferred directly to the field. *Journal of Experimental Botany*, vol. 51, No. 352, pp. 1861-1866.
8. Ahsan N, Lee DG, Lee SH, Kang KY, Lee JJ, Kim PJ (2007) Excess copper induced physiological and proteomic changes in germinating rice seeds. *Chemosphere* 67:1182–93
9. Aitken-Christie J, Jones C (1987) Towards automation: radiate pine shoot hedges in vitro. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 8:185–196.
10. Aitken-Christie J, Kozai T, Takayama S (1995) Automation in plant tissue culture – general introduction and overview. In: Aitken-Christie J, Kozai T, Smith L (eds) *Automation and Environmental Control in Plant Tissue Culture*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 1–18.
11. Akram M y Aftab F (2008) High frequency multiple shoot formation from nodal explants of teak (*Tectona grandis* L.) induced by thidiazuron. *Propag Ornament Plant*, 8: 72-75.

12. Akula A, Becker D, Bateson M (2001) High-yielding repetitive somatic embryogenesis and plant recovery in a selected tea clone, TRI-2025, by temporary immersion. *Plant Cell Rep.* 19: 1140-1145
13. Albacete A, Ghanem ME, Martínez-Andújar C, Acosta M, Sánchez-Bravo J, Martínez V, Lutts S, Dodd IC, Pérez-Alfocea F (2008) Hormonal changes in relation to biomass partitioning and shoot growth impairment in salinised tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants. *Journal of Experimental Botany* 59, 4119–4131.
14. Albarrán J, Bertrand B, Lartaud M, Etienne H (2005) Cycle characteristics in a temporary immersion bioreactor affect regeneration, morphology, water and mineral status of coffee (*Coffea Arabica* L.) somatic embryos. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 81:27–36.
15. Alfaro C (2004) Proyecto de investigación interinstitucional. Ciencia y tecnología. Micropropagación de caoba, Piñón y Teca. N° 24. [Página web en línea] Disponible en: www.conicit.go.cr/boletin/boletin24/index.html.
16. Aloni R. (2001) Foliar and axial aspects of vascular differentiation: Hypotheses and evidence. *J. Plant Growth Regul.* 201: 22 – 34.
17. Alvard D, Cote F, Teisson C. 1993. Comparison of methods of liquid medium culture for banana micropropagation. Effects of temporary immersion of explants. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* 32: 55-60.
18. Antonio, G.; Rodríguez, R.; Cid, M.; Pina, D.; González-Olmedo, J. 2004. Efecto de un análogo de Brasinoesteroides (MH5) en la propagación de *Eucalyptus urograndis* en Biorreactores de Inmersión Temporal. *Cultivos Tropicales.* 25: 39-44.
19. Apóstolo NM, LLorente B (2000) Anatomy of the normal and hyperhydric leaves and shoots of *in vitro* grown *Simmondsia chinensis* (Link) Schn. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 36: 243–249.
20. Aragón C, Carvalho L, González J, Escalona M, Amancio S (2009) Sugarcane (*Saccharum* sp. Hybrid) propagated in headspace renovating systems shows autotrophic characteristics and develops improved anti-oxidative response. *Trop Plant Biol* 2:38–50.
21. Aragón CE, Carvalho L, González J, Escalona M, Amancio S (2010b) *Ex vitro* acclimatization of plantain plantlets micropropagated in temporary immersion bioreactor. *Biol Plant* 54:237–244.

22. Aragón CE, Escalona M, Rodríguez R, Cañal MJ, Capote I, Pina D, González-Olmedo J (2010a). Effect of sucrose, light, and carbon dioxide on plantain micropropagation in temporary immersion bioreactors. *In Vitro Cell Dev Biol - Plant* 46: 89–94.
23. Aranjuelo I, Molero G, Erice G, Avice JC, Nogués S (2011) Plant physiology and proteomics reveals the leaf response to drought in alfalfa (*Medicago sativa* L.) *Journal of Experimental Botany* 62: 111–123.
24. Argita L, Fernández AG, González A, Tamés RS (2005) Effect of the application of benzyladenine pulse on organogenesis, acclimatization and endogenous phytohormone content in kiwi explants cultured under autotrophic conditions. *Plant Physiol. Biochem.* 432: 161 – 167.
25. Asada K (1992) Ascorbate peroxidase – a hydrogen peroxide –scavenging enzyme in plants. *Physiol Plant.* 85: 235–241.
26. Ayliffe M, Jin Y, Kang ZS, Persson M, Steffenson B, Wang SP, Leung H (2011) Determining the basis of nonhost resistance in rice to cereal rusts. *Euphytica* 179:33–40.
27. Bandyopadhyay T, Gangopadhyay G, Poddar R, Mukherjee K (2004) Trichomes their diversity, distribution and density in acclimatization of Teak (*Tectona grandis* L.) plants grown in vitro. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 78:113–121.
28. Barrero JM, Piqueras P, Gonzalez-Guzman M, Serrano R, Rodriguez PL, Ponce MR, Micol JL (2005) A mutational analysis of the ABA1 gene of *Arabidopsis thaliana* highlights the involvement of ABA in vegetative development. *J. Exp. Bot* 56: 2071–2083.
29. Bassi R y Caffarri S (2000) Lhc proteins and the regulation of photosynthetic light harvesting function by xanthophylls. *Photosynthesis Research* 64: 243–256, 2000.
30. Berthouly M y Etienne H (2005) Temporary immersion systems: a new concept for use liquid medium in mass propagation. En: Hvoslef-Eide A. K. y Preil W. (Springer Ed). *Liquid Culture Systems or in vitro Plant Propagation*. pp. 165-195.
31. Berthouly M, Dufour M, Alvard D, Carasco C, Alemano L, Teisson C (1995) Coffee micropropagation in a liquid medium using the temporary immersion technique. In: ASIC Publishers (eds) 16th International Scientific Colloquium on Coffee, Kyoto, Japon. Vevey, Switzerland. pp. 514-519.

32. Berthouly M, Etienne H (2005) Temporary immersion systems: a new concept for use liquid medium in mass propagation. En: Hvoslef-Eide A. K. y Preil W. (Ed). Liquid Culture Systems or *in vitro* Plant Propagation. Springer.pp. 165-195.
33. Bianco L, Lopez L, Scalone AG, Di Carli M, Desiderio A, Benvenuto B, Perrotta G (2009) Strawberry proteome characterization and its regulation during fruit ripening and in different genotypes, *Journal of proteomics* 72, 586 – 607.
34. Billard C y Lallana V (2005) Multiplicación *in vitro* de *Eucaliptus dunnii*. Ciencia, Docencia y Tecnología 16 (30): 192-216. [Página web en línea] Disponible en: www.redalyc.uaemex.mx.
35. Borderies G, Jamet E, Lafitte C, Rossignol M, Januneau A, Boudart G, Monsarrat B, Esquerré-Tugayé MT, Boudet A y Pont-Lezica R. 2003. Proteomics of loosely bound cell wall proteins of *Arabidopsis thaliana* L. cell suspension cultures: a critical analysis. *Electrophoresis* 24: 3421-3432.
36. Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 86: 248-254.
37. Cabasson C, Alvard D, Dambier D, Ollitrault P, Teisson C (1997) Improved Citrus somatic embryo development by temporary immersion. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* 50: 33-37.
38. Cabrera JM, Gómez-Kosky R, Cabrera RA, De Fera M, Basail MP, Medero VV, López TJ (2011) Performance of yam microtubers from temporary immersion system in field conditions. *African Journal of Biotechnology* 10: 9268-9271.
39. Cabrerías M (2009) Formación de microtubérculos de ñame (*Dioscorea alata* L.) en sistemas de inmersión temporal como material vegetal de plantación. Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas: 100p.
40. Cañal MJ, Fernández H, Fernández P, Centeno ML, Fernández B (2000) Uptake and metabolism of 6-benzyladenine in ventilated cultures of Kiwifruit plants. *Plant Growth Regulation* 30: 209-214.
41. Casado V (2004) Aproximación cinética, molecular y proteómica al estudio de podredumbre apical en frutos de tomate (*Lycopersicon esculentum* M). Implicación de la polifenol oxidasa (PPO) y enzimas antioxidantes. Tesis doctoral. Universidad de Alicante. p 231

42. Cassells AC y Curry RF (2001) Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 64: 145–157.
43. Castro D y González-Olmedo J (2002) Micropropagación de eucalipto (*Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden) en el sistema de inmersión temporal. *Agricultura Técnica* 62:68–78.
44. Castro D, Díaz J, Linero JC (2002) Propagación clonal *in vitro* de árboles élite de Teca (*Tectona grandis* L.). *Revista Colombiana de Biotecnología* 4(1):49-53.
45. Castro FJ, Mora DF (2007) Establecimiento *in vitro* y pruebas preliminares de micropropagación en medio semisólido y líquido de frambuesa (*Rubus idaeus* L.). *Tecnología en Marcha*. Vol. 20-3.
46. Centeno ML, Rodríguez A, Feito I, Fernández B (2003) Uptake and metabolism of N⁶-benzyladenine and I-naphthaleneacetic acid and dynamics of indole-3-acetic.
47. Chacón AG, Sabono F, Gómez L, Torres S, Valverde R (2000) El tipo de gelificante en el desarrollo *in vitro* y la aclimatización de plantas de Yampi (*Dioscorea trifida*) y ñame (*Diocorea alata*). *Agronomía Costarricense* 24(2):57-64.
48. Chakrabarty D, Dewir Y H, Hahn E J, Datta SK, Paek KY (2007) The dynamics of nutrient utilization and growth of apple root stock ‘M9 EMLA’ in temporary versus continuous immersion bioreactors. *Plant Growth Regul* 51:11–19.
49. Chakrabarty D, Subodh A (2008) Micropropagation of gerbera: lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities during acclimatization process. *Acta Physiol. Plant* 30: 325-331.
50. Chávez MM (2007) Propagación de *Tectona grandis* L. en sistemas de inmersión temporal. Tesis de Pregrado. p 60.
51. Chen J, Ziv M (2001) The effect of ancymidol on hyperhydricity, regeneration, starch and antioxidant enzymatic activities in liquid-cultured *Narcissus*. *Plant Cell Rep* 20: 22–27.
52. Criado MV, Caputo C, Roberts I, Castro MA, Barneix AJ (2009) Cytokinin- induced changes of nitrogen remobilization and chloroplast ultrastructure in wheat (*Triticum aestivum*) *Journal of Plant Physiology* 166: 1775-1785.
53. Cristina-Maria V, Lalanne C, Plomion C, Schlink K (2008) Heat induced changes in protein expression profiles of Norway spruce (*Picea abies*) ecotypes from different elevations. *Proteomics* 8:4287–4302.

54. Cruz N y Ramos L (2003) Micropropagación clonal *in vitro* de árboles seleccionados de *Tectona grandis* L. (Teca). Agronomía Costarricense: 1-5.
55. Damiano C, La Starza SR, Monticcielli S, Gentile A, Carboni E, Frattarelli A (2005) Propagation of *Prunus* and *Malus* by temporary immersion. En: Hvoslef-Eide AK y Preil W (Springer Dordrecht Eds) Liquid Culture Systems for *in vitro* Plant Propagation, pp. 243-251.
56. Daquinta M, Ramos L, Capote I, Lezcano Y, Rodríguez R, Trina D, Escalona M (2001) Micropropagación de la teca (*Tectona grandis* L.). Comunicación técnica. *Revista Forestal Centroamericana*: 25-28.
57. De Camino RV, Alfaro MM, Sage LFM (1998) Teak (*Tectona grandis* L.) in Central America, Forest Plantations Working Papers. Roma, IT, FAO. (Working Paper FP/19): 64 p.
58. De Fera M, Jiménez E, Barbón R, Capote A, Chávez M, Quiala E (2003) Diferenciación y germinación de embriones somáticos de *Coffea arabica* L. cv. Catimor 9722 obtenidos en agitador orbital. *Revista de Biotecnología Vegetal*, 2: 15-19.
59. De Klerk GJ (2002) Rooting of microcuttings: theory and practice. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 38: 415–422.
60. De Smet I, Signora L, Beeckman T, Inze D, Foyer CH, Zhang H (2003) An abscisic acid sensitive checkpoint in lateral root development of *Arabidopsis*. *Plant J* 33: 543–555.
61. Debergh PC (1983) Effects of agar brand and concentration on the tissue culture medium. *Physiol Plant* 59: 270–276.
62. Debergh PC, Aitken-Christie J, Cohen D, Grout B, von Arnold S, Zimmerman R, Ziv M (1992) Reconsideration of the term vitrification as used in micropropagation. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 30: 140–165.
63. Debergh PC, Harbaoui Y, Lemeur R (1981) Mass propagation of globe artichoke (*Cynara scolymus*): Evaluation of different hypotheses to overcome vitrification with special reference to water potential. *Physiol Plant* 53: 181–187.
64. del Valle JRE, Castañeda CG, García SP, Mendoza RNM, y Castillo MMC (2001) Efectos de los ácidos acetilsalicílico e indolbutírico en el enraizamiento *in vitro* y rendimiento de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Rev. Fitotec. Mex* 24:71 – 78.
65. Desjardins Y (1995) Photosynthesis *in vitro* on the factors regulating CO₂ assimilation in micropropagation systems. *Acta Hort.* 393: 345-353.

66. Desjardins Y (2007) How ‘Micropropagation-Omics’ can contribute to a better understanding of phenomena taking place in plant tissue culture. *Acta Hort.* 748: 39-54.
67. Dietz K, Horling F, König J, Baier M (2002) The function of the chloroplast 2-cysteine peroxiredoxin in peroxide detoxification and its regulation. *J. Exp. Bot.* 53: 1321-1329.
68. Downs C.G, Somerfield SD, Davery MC (1997) Cytokinin treatment delays senescence but not sucrose loss in harvested broccoli. *Postharvest Biol. Technol.* 112: 93 – 100.
69. Dubos C y Plomion C (2003) Identification of water-deficit responsive genes in maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.) roots. *Plant Mol. Biol.* 51, 249–262.
70. Ducos JP, Alenton R, Reano JF, Kanchanomai C, Deshayes A, Pétiard V (2003) Agronomic performance of *Coffea canephora* P. trees derived from large-scale somatic embryo production in liquid medium. *Euphytica* 131:215–223.
71. Durrant WE, Dong X (2004) Systemic acquired resistance. *Annu Rev. Phytopathol.* 42: 185–209.
72. Enciclopedia de Genes y Genoma de Kioto (KEGG) [Página web en línea] Disponible en: <http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>.
73. Escalona M, Lorenzo JC, González B, Daquinta M, González JL, Desjardins Y, Borroto CG (1999) Pineapple (*Ananas comosus* L. (Merr)) micropropagation in temporary immersion systems. *Plant Cell Rep* 18:743–748.
74. Escalona M, Samson G, Borroto C, Desjardins Y (2003) Physiology of the effects of Temporary Immersion Bioreactors on micropropagated pineapple plantlets. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 39: 651-656.
75. Escalona M (2006) Temporary immersion beats traditional techniques on all fronts. *Prophyta annual*: 48-50.
76. Etienne H, Bertrand B, Anthony F, Côte F, Berthouly M (1997a) L’embryogenèse somatique: un outil pour l’amélioration génétique du caféier. In: ASIC Publishers (eds) 17th International Scientific Colloquium on Coffee, Nairobi, pp 457–465.
77. Etienne H, Lartaud M, Michaux-Ferrière N, Carron MP, Berthouly M, Teisson C (1997b) Improvement of somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis* (Müll. Arg.) using the temporary immersion technique. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 33: 81–87.
78. Etienne HP y Berthouly M (2002) Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 69:215–231.

79. Etienne–Barry D, Bertrand B, Vásquez N, Etienne H (1999) Direct sowing of *Coffea arabica* somatic embryos mass-produced in a bioreactor and regeneration of plants. *Plant Cell Rep.* 19:111–117.
80. Fermino-Júnior PCP, Nagao EO, Scherwinski-Pereira JE (2009) Estabelecimento, germinação e multiplicação *in vitro* de teca (*Tectona grandis* L.) a partir de genótipos da Amazônia Sul-Occidental. *Scientia Forestalis*, Piracicaba, 37(84): 427-435.
81. Fermino-Júnior PCP, Raposo A, Scherwinski-Pereira JE (2011) Enraizamento *ex vitro* e aclimatização de plantas micropropagadas de *Tectona grandis*. *Floresta*, Curitiba, PR, 41(1):79-86.
82. Fontes MA, Otoni WC, Carolino SMB, Brommonschenkel SH, Fontes EPB, Fari M, Luoro RP (1999) Hyperhydricity in pepper plants regeneration *in vitro*: involvement of BiP (Binding Protein) and ultrastructural aspects. *Plant Cell Rep.* 19: 81–87.
83. Franck T, Crèvecoeur M, Wuest J, Greppin H, Gaspar Th (1998) Cytological comparison of leaves and stems of *Prunus avium* L. shoots cultured on a solid medium with agar or gelrite. *Biotech. Histochem.* 73: 32–43
84. Franck T, Gaspar T, Kevers C, Penel C, Dommes J, Hausman JF (2001) Are hyperhydric shoots of *Prunus avium* L. energy deficient?. *Plant Sci* 160: 1145–1151.
85. Franck T, Kevers C, Gaspar T (1995) Protective enzymatic systems against activated oxygen species compared in normal and vitrified shoots of *Prunus avium* L. raised *in vitro*. *Plant Growth Regul* 16: 253–256.
86. Franck T, Kevers C, Gaspar T, Dommes J, Deby C, Greimers S, Deby-Dupont G (2004) Hyperhydricity of *Prunus avium* shoots cultured on gelrite: a controlled stress response. *Plant Physiol and Bioch.* 42: 519–527
87. Gangopadhyay G, Das S, Mitra SK, Poddar R, Modak BK, Mukherjee KK (2002) Enhanced rate of multiplication and rooting through the use of coir in aseptic liquid culture media. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 68:301–310.
88. Gaspar T (1991) Vitrification in micropropagation, in: Y.P.S. Bajaj (Ed.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, vol. 17, *High-Tech and Micropropagation I*, Springer-Verlag, Berlin, pp117–126.
89. Gaspar T, Franck T, Bisbis B, Kevers C, Jouve L, Hausman JF, Dommes J (2002) Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures. *Plant Growth Regulation* 37: 263–285.

90. Gaspar T, Kevers C, Bisbis B, Franck T, Crèvecoeur M, Greppin H, Dommes J (2000) Loss of plant organogenic totipotency in the course of *in vitro* neoplastic progression, *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 36:171–181.
91. Genkov T, Tsoneva P, Ivanova I (1997) Effect of cytokinins on photosynthetic pigments and chlorophyllase activity in *in vitro* cultures of axillary buds of *Dianthus caryophyllus* L. *J. Plant Growth Regul.* 163: 169 – 172.
92. George EF (1996) *Plant Propagation by Tissue Culture: Part 2 – In Practice. Exegetics*, Basingstoke. 640p.
93. Gion JM, Lalanne C, Le Provost G, Ferry-Dumazet H, Paiva J, Chaumeil P, Frigerio JM, Brach J, Barre A, Daruvar AD (2005) The proteome of maritime pine wood-forming tissue. *Proteomics* 5, 3731–3751.
94. Goltsev V, Genkov T, Lexa M, Ivanova I (2001) Effect of benzyladenine, 4-PU-30 and thidiazuron on millisecond delayed and prompt chlorophyll fluorescence of *Dianthus caryophyllus* L. axillary buds cultured *in vitro*. *Sci. Hortic.* 891: 41 – 54.
95. Gómez-Kosky R, De Feria M, Posada LP, Gilliard T, Bernal FM, Reyes MV, Chávez MM, Quiala EM (2002) Somatic embryogenesis of the banana hybrid cultivar FHIA-18^c (AAAB) in liquid medium and scale-up in a bioreactor. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 68: 21-26.
96. Goswami H, Keng CL, Teo CKH (1999) *In vitro* shoot proliferation of *Tectona grandis* L. *J Biosci* 10:47–54.
97. Grace SC (2005) Phenolics antioxidants. In: *Antioxidants and reactive oxygen species in plants*. (Ed. Nicholas Smirnoff) Blackwell Publishing LTD, UK. p 141-168.
98. Gribble K, Tingle J, Sarafis V, Heaton, Holford P (1998) Position of water in vitrified plants visualised by NMR imaging, *Protoplasma* 201: 110–114.
99. Grigoriadou K, Vasilakakis M, Tzoulis T, Eleftheriou EP (2005). Experimental use of a novel temporary immersion system for liquid culture of olive microshoots. A.K. Hvoslef-Eide and W. Preil (eds.), *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation*, 263–274.
100. Gupta P K, Nadgir AL, Mascarenhas AF, Jagannathan V (1980) Tissue culture of forest trees: clonal multiplication of *Tectona grandis* L. (teak) by tissue culture. *Plant Sci Lett.* 17: 259-268.

101. Gyves EM, Royani JI, Rugini E (2007) Efficient method of micropropagation and *in vitro* rooting of teak (*Tectona grandis* L.) focusing on large-scale industrial plantations. *Ann For Sci* 64: 73–78.
102. Hazarika B (2003) Acclimatization of tissue-cultured plants. *Current Science*. 85: 1704-1712.
103. Hazarika BN (2006) Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants. *Sci Hort* 108:105–120.
104. Ivanova M (2009) Regulation of hyperhydricity in *Aloe polyphylla* L. propagated *in vitro*. Dissertation, University of KwaZulu-Natal. p 240.
105. Ivanova M y Van Staden J (2008) Effect of ammonium ions and cytokinins on hyperhydricity and multiplication rate of *in vitro* regenerated shoots of *Aloe polyphylla*. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 92:227–231.
106. Ivanova M y Van Staden J (2011) Influence of gelling agent and cytokinins on the control of hyperhydricity in *Aloe polyphylla*. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 104:13–21.
107. Ivanova M, Novák O, Strnad M, Van Staden J Endogenous cytokinins in shoots of *Aloe polyphylla* cultured *in vitro* in relation to hyperhydricity, exogenous cytokinins and gelling agents. *Plant Growth Regul.* 50:219–230, 2006.
108. Jamet E, Canut H, Boudart G, Pont-Lezica RF (2006) Cell wall proteins: a new insight through proteomics. *Trends Plant Sci* 11:33–9.
109. Jeon MW, Ali MB, Hahn EJ, Paek KY (2005) Effect of photon flux density on the morphology, photosynthesis, and growth of a CAM orchid, *Doritaenopsis* during post-micropropagation acclimatization. *Plant Growth Reg* 45:139–147.
110. Jiménez E (2005). Mass propagation of tropical crops in temporary immersion systems. En: Hvoslef-Eide AK y Preil W (Springer, Dordrecht Eds.) *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation*, pp. 197-211.
111. Jiménez E, Carlos R, Machado P, Pérez-Alonso N, Capote A, Pérez A, Eichler-Loebermann B (2011) *In vitro* propagation of the medicinal plant *Morinda royoc* L. *Bioteconología vegetal* 11(1): 43-47
112. Jiménez E, Pérez N, de Feria 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.

113. Jiménez-Tello (2008) Propagación *in vitro* de *Tectona grandis* L. a partir de ápices de brotes axilares de plantas de origen epicórmico. Tesis de maestría. p 67.
114. Jo UA, Murthy HN, Hahn EJ, Paek KY (2008) Micropropagation of *Alocasia amazonica* using semisolid and liquid cultures. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 44: 26–32.
115. Jorge I, Navarro RM, Lenz C, Ariza D (2005) I. The holm oak leaf proteome: analytical and biological variability in the protein expression level assessed by 2-DE and protein identification tandem mass spectrometry de novo sequencing and sequence similarity searching. *Proteomics* 5: 222-234.
116. Jorrián J, Maldonado AM, Echevarría-Zomeño S, Valledor L, Castillejo MA, Curto M, Valero J, Sghaier B, Donoso G, Redondo I (2009) Plant proteomics update (2007–2008): Second-generation proteomic techniques, an appropriate experimental design, and data analysis to fulfill MIAPE standards, increase plant proteome coverage and expand biological knowledge. *Journal of proteomics* 72: 285-314.
117. Kadleček P, Tichá I, Haisel D, Čápková V, Schäfer C (2001) Importance of *in vitro* pretreatment for ex vitro acclimatization and growth. *Plant Sci* 161:6701–6955.
118. Kataeva NV, Alexandrova IG, Butenko RG, Dragavteeva EV (1991) Effect of applied and international hormones on vitrification and apical necrosis of different plants cultured *in vitro*. *Plant cell Tissue and Organ Culture* 27:149-154.
119. Kevers C y Gaspar T (1986) Vitrification of carnation *in vitro*: changes in water content, extracellular space, air volume, and ion levels. *Physiol. Vég.* 24: 647–653.
120. Kevers C, Coumans M, Coumans-Gilles MF, Gaspar T (1984) Physiological and biochemical events leading to vitrification of plants cultured *in vitro*. *Physiol Plant* 61: 69–74.
121. Kevers C, Franck T, Strasser R, Dommes J, Gaspar T (2004) Hyperhydricity of micropropagated shoots: a typically stressinduced change of physiological state. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 77:181–191.
122. Kevers C, Greimers R, Franck T, Bisbis B, Domme J, Gaspar T (1999) Flow cytometry estimation of nuclear size and ploidy level of habituated calli of sugar beet. *Biol. Plant.* 42: 321–332.
123. Khuri S, Bakker FT y Dunwell JM (2001) Phylogeny, function and evolution of the cupins, a structurally conserved, functionally diverse superfamily of proteins. *Mol Biol Evol* 18: 593-605.

- 124.Kidelman ADO, Cañal MJ, Centeno ML, Feito I, Fernández B (1997) Endogenous plant growth regulators in carnation tissue cultures under different conditions of ventilation. *Plant Growth Reg* 22:169–174.
- 125.Kim KY y Yi GS (2008) Sequential KNN imputation method v.101 Cram R project. <http://cran.r-project.org/web/packages/SeqKnn/index.html>.
- 126.Kim SH y Kim SK (2002) Effect of cytokinins on *in vitro* growth of Grapes (*Vitis* spp.). *Korean Journal Plant Biotechnology* 29: 87-91.
- 127.Kirca A y Arslan E (2008) Antioxidant capacity and total phenolic content of selected plants from Turkey. *Int J Food Sci Technol* 43:2038–2046.
- 128.Kjellsen TD, Shiryayeva L, Schröder W, Strimbeck R (Proteomics of extreme freezing tolerance in Siberian spruce (*Picea obovata*). *Journal of Proteomics* 73: 965 – 975.
- 129.Kozai T y Smith MAL (1995) Environmental control in plant tissue culture. In: Aitken-Christie J, Kozai T, Smith MAL (eds) *Automation and Environmental Control in Plant Tissue Culture*. Dordrecht: Kluwer, p. 301–18.
- 130.Kozai T, Jeong R, Kubota C, Murai Y (1995) Effects of volume and initial strength of medium on the growth, photosynthesis and ion uptake of potato (*Solanum tuberosum* L.) plantlet *in vitro*. *J. Japan Soc. Hort. Sci.* 64: 63 – 71.
- 131.Kozai T, Kubota C (2005) Unit and terminology use for the studies of photoautotrophic micropropagation. En: *Photoautotrophic (sugar-free medium) micropropagation as a new propagation and transplant production system (Eds.)* by T. Kozai, F. Afreen, SMA. Zobayed. pp. 6-17.
- 132.Krishnapillay B (2000) Silviculture and management of teak plantations, *Unasyuva*, No. 201, Teak. *Int J Forestry Forest Ind (FAO)*, 51- 2000/2: 4-11.
- 133.Kriswhnapillay B (2001) Estrategias de ordenación y requisitos ecológicos para mejorar el crecimiento y la calidad del árbol de teca en plantaciones. *Unasyuva* No. 201 Teca. 20p.
- 134.Kulaeva O N, Burkhanova EA, Karavaiko NN, Selivankina SY, Porfirova SA, Maslova GG, Zemlyachenko YU, Borner T (2002) Chloroplasts affect the leaf response to cytokinin. *J Plant Physiol* 15912: 1309 – 1316.
- 135.Kumar P, Kaur J, Singh P (2011) A liquid culture system for shoot proliferation and analysis of pharmaceutically active constituents of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 105:299–307.

- 136.Kwon HK, Yokoyama R, Nishitani K (2005) A proteomic approach to apoplastic proteins involved in cell wall regeneration in protoplasts of *Arabidopsis* suspension-cultured cells. *Plant Cell Physiol* 46: 843-857.
- 137.Lane BG (2000) Oxalate oxidase and differentiating surface structure in wheat: germins. *Biochem J* 49: 309-321.
- 138.Le Dily F, Huault C, Gaspar T, Billard JP (1993) Does altered nitrogen metabolism and H₂O₂ accumulation explain the vitrified status of the fully habituated callus of *Beta vulgaris* (L)? *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 35: 69–74.
139. Le Dily F, Huault C, Gaspar Th, Billard JP (1993) Does altered nitrogen metabolism and H₂O₂ accumulation explain the vitrified status of the fully habituated callus of *Beta vulgaris* (L)? *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 35: 69–74.
- 140.Letham DS, Palni MS (1983) The biosynthesis and metabolism of cytokinins. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 34, 163–197.
- 141.Li H, Goodwin P, Qingmei H, Huang L, Kang Z (2011) Microscopy and proteomic analysis of the non-host resistance of *Oryza sativa* to the wheat leaf rust fungus, *Puccinia triticina* f. sp. *Tritici*. *Plant Cell Rep* DOI 10.1007/s00299-011-1181-0.
- 142.Li-Hua Z, Xue-Yuan L, Welander M (2005) Optimization of growing conditions for the apple rootstock M26 grown in RITA containers using temporary immersion principle. In: A.K. Hvoslef-Eide and W. Preil (eds.), *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation*, 253–261.
- 143.Lippert D, Chowrira S, Ralph SG, Zhuang J (2007) Conifer defence against insects: proteome analysis of Sitka spruce (*Picea sitchensis*) bark induced by mechanical wounding or feeding by white pine weevils (*Pissodes strobe*). *Proteomics* 7: 248–70.
- 144.Lorenzo O y Solano R (2005) Señalización de ácido Jasmónico e interacciones con otras hormonas. *Biojournal Net.* 1: 1-16.
- 145.Louro RP, Dos Santos AV, Machado RD (1999) Ultrastructure of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla*. I. Shoots cultivated *in vitro* in multiplication and elongation-rooting media. *Int J Plant Sci* 160: 217–227.
- 146.Mahjoub A, Hernould M, Joubes J, Decendit A, Mars M, Barrieu F, Hamdi S, Delrot S (2009) Overexpression of a grapevine R2R3-MYB factor in tomato affects vegetative development, flower morphology and flavonoid and terpenoid metabolism. *Plant Physiology and Biochemistry* 47: 551–561.

- 147.
148. Majada JP, Fal MA, Sánchez-Tamès R (1997) The effect of ventilation on proliferation and hyperhydricity of *Dianthus caryophyllus* L. In *Vitro Cell Dev Biol Plant* 33: 62–69.
149. Majada JP, Sierra MI, Sánchez-Tamès R (2001) Air exchange rate affects the *in vitro* developed leaf cuticle of carnation. *Sci Hortic* 87: 121–130.
150. Mathesius U, Keijzers G, Natera SHA, Djordjevic MA, Rolfe BG (2001) Establishment of a root proteome reference map for the model legume *Medicago truncatula* using the expressed sequence tag database for peptide mass fingerprinting. *Proteomics* 1, 1424–40.
151. McAlister B, Finnie J, Watt MP, Blakeway F (2005) Use of the Temporary Immersion Bioreactor System (RITA[®]) for the production of commercial Eucalyptus clones at Mondi Forests (SA). In: Hvoslef-Eide AK, Preil W(eds) *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation*. Springer, Dordrecht. pp 425–442.
152. Menéndez-Yuffá A, Barry-Etienne D, Bertrand B, Georget F, Etienne H (2010) A comparative analysis of the development and quality of nursery plants derived from somatic embryogenesis and from seedlings for large-scale propagation of coffee (*Coffea arabica* L.) *Plant Cell Tiss Organ Cult* 102: 297–307.
153. Merkle S y Nairn J (2005) Hardwood tree biotechnology. In *Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 41:602–619.
154. Miller R, Poulos TL (2005) Ascorbate peroxidase. In: *Antioxidants and reactive oxygen species in plants*. (Ed. Nicholas Smirnoff) Blackwell Publishing LTD, UK. p 87-100.
155. Miranda J. Williams R (2007) Developmental influence of *in vitro* light quality and carbon dioxide on photochemical efficiency of PS II of strawberry leaves (*Fragaria x ananassa*). *Journal of Applied Horticulture*. 9: 13-16.
156. Moncaleán P, Alonso P, Centeno ML, Cortizo M, Rodríguez A, Fernández B, Ordas RJ (2005) Organogenic responses of *Pinus pinea* cotyledons to hormonal treatments: BA metabolism and cytokinin content. *Tree Physiology* 25: 1-9.
157. Moncaleán P, Fal MA, Castañón S, Fernández B, Rodríguez A (2009) Relative water content, *in vitro* proliferation, and growth of *Actinidia deliciosa* plantlets are affected by benzyladenine. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 37:351–359.
158. Moncaleán P, Fernández B, Rodríguez A (2007) *Actinidia deliciosa* leaf stomatal characteristics in relation to benzyladenine incubation periods in micropropagated explants. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 35: 159- 169.

159. Monk LS, Fagerstedt KV, Crawford RMM (1989) Oxygen toxicity and superoxide dismutase as an antioxidant in physiological stress. *Physiol Plant* 76: 438–745.
160. Monteuis O, Bon MC, Goh DKS (1998) Teak propagation by *in vitro* culture. *Bois et forest des tropiques* 256:1–11.
161. Morini S, Melai M (2005) Net CO₂ exchange rate of *in vitro* plum cultures during growth evolution at different photosynthetic photon flux density. *Hort. Sci.* 105: 197-211.
162. MOWSE (Daresbury, UK) (<http://www.dl.ac.uk/SEQNET/mowse.html>),
163. Muccilli V, Licciardello C, Fontanini D, Russo MP, Cunsolo V, Saletti R, Recupero GR, Foti S (2009) Proteome analysis of *Citrus sinensis* L. (Osbeck) flesh at ripening time. *Journal of proteomics* 73, 134 –152.
164. Munne-Bosch S y Lalueza P (2007) Age-related changes in oxidative stress markers and abscisic acid levels in a drought-tolerant shrub, *Cistus clusii* grown under Mediterranean field conditions. *Planta* 225. 1039–1049.
165. Murashige T y Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473–497.
166. Murch SJ, Liu CZ, Romero RM, Romero M, Saxena PK (2004) *In vitro* culture and temporary immersion bioreactor production of *Crescentia cujete*. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 78: 63–68.
167. Murillo O y Badilla Y (2005) Propagación vegetativa de la Teca en Costa Rica. Cartago de Costa Rica. 12p.
168. Nagori R, Purohit SD (2004) *In vitro* planted regeneration in *Annona squamosa* L. through direct shoot bud differentiation on hypocotyls segments. *Sci. Hortic.* 991: 89–98.
169. NCBI (*National Center of Biotechnology Information*) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).
170. Ndimba BK, Thomas LA, Ngara R. (2010) Sorghum 2-Dimensional Proteome Profiles and Analysis of HSP70 Expression Under Salinity Stress. *Kasetsart J. (Nat. Sci.)* 44 : 768 - 775.
171. Nehra NS, Becwar MR, Rottmann WH, Pearson L, Chowdhury K, Chang SH, Dayton WH, Kodrzycki RJ, Zhang C, Gause KC, Parks DW y Hinchee MA (2005) Invited review: Forest biotechnology: innovative methods, emerging opportunities. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 41:701–717.
172. Ngara R, Ndimba BK (2011) Mapping and characterisation of the sorghum cell suspension culture secretome. *African Journal of Biotechnology* Vol. 10 (2), pp. 253-266.

173. Nguyen Q y Kozai T (2001) Growth of *in vitro* banana (*Musa spp.*) shoots under photomixotrophic and photoautotrophic conditions. *In Vitro Cell. Dev. Biol Plant* 37: 824-829.
174. Nilson SE; Assmann SM (2007) The control of transpiration. Insights from *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 143: 19-27.
175. Nobel PS (2009) *Plant Physiology* (fourth edition). Elsevier academic press, p 571.
176. Novo EU (2008) Lignificación en cultivos celulares de gimnospermas basales. Tesis doctoral. Facultade de Ciencias Departamento de Bioloxía Celular e Molecular, Universidad A Coruña, p 222.
177. Novo UE, Gómez-Ros LV, Hernández JA, Pedreño MA, Cuello J, Ros BA (2009) Analysis of the soluble cell wall proteome of gymnosperms. *Journal of Plant Physiology* 166: 831-843.
178. Ochatt SJ, Muneaux E, Machado C, Jacas L, Pontécaille C (2002) The hyperhydricity of *in vitro* regenerants of grass pea (*Lathyrus sativus* L.) is linked with an abnormal DNA content, *J. Plant Physiol.* 159:1021–1028.
179. Oliveira LM, Renato P, Santana JRF, Alves E, Cravo NR, Pereira FD (2008) Effect of cytokinins on *in vitro* development of autotrophism and acclimatization of *Annona glabra* L. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant*. DOI 10.1007/s11627-008-9119-0.
180. Olmos E, Piqueras A, Martínez-Solano JR, Hellin E (1997) The subcellular localization of peroxidase and the implication of oxidative stress in hyperhydrated leaves of regenerated carnation plants, *Plant Sci.* 130: 97–105.
181. Olmos S, Luciani G, Galdeano E (2004) Micropropagación. En *Bioteconología y Mejoramiento Vegetal*. Eds. INTA (Argentina): 163-172.
182. Ontología de Genes (OG) (<http://www.geneontology.org/>).
183. Orczyk W, Dmochowska-Boguta M, Czembor HJ, Nadolska-Orczyk A (2010) Spatiotemporal patterns of oxidative burst and micronecrosis in resistance of wheat to brown rust infection. *Plant Pathol* 59:567–575.
184. Palama TL, Menard P, Fock I, Choi YH, Bourdon E, Govinden-Soulange J, Bahut M, Payet B, Verpoorte R, Hippolyte K (2010) Shoot differentiation from protocorm callus cultures of *Vanilla planifolia* (Orchidaceae): proteomic and metabolic responses at early stage. *BMC Plant Biology*. DOI:10.1186/1471-2229-10-82

- 185.Palanisamy K, Gireesan K, Nagarajan V, Hegde M (2009) Selection and clonal multiplication of superior trees of teak (*Tectona grandis* L.) and preliminary evaluation of clones. *Journal of Tropical Forest Science* 21(2): 168–174.
- 186.Pandey R, Heidmann S, Lehner CF (2005) Cellular re-organization and dynamics of progression through mitosis. *J. Cell Sci.* 118(Pt 4): 733-742.
- 187.Park SW, Jeon JH, Kim HS, Parlk YM, Aswath C, Joung H (2004) Effect of sealed and vented gaseous microenvironments on hyperhydricity of potato shoots *in vitro*. *Sci. Hort.* 99:199–205.
- 188.Passardi F, Cosio C, Penel C and Dunand C (2005) Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. *Plant Cell Reports* 24 (5): 255-265.
- 189.Pérez-Alonso N, Wilken D, Gerth A, Annett J, Nitzsche HM, Kerns G, Capote-Pérez A, Jiménez E (2009) Cardiotonic glycosides from biomass of *Digitalis purpurea* L. cultured in temporary immersion system. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 99:151–156.
- 190.Perry PL, Ueno K, Shetty K (1999) Reversion to hyperhydration by addition of antibiotics to remove pseudomonas in unhyperhydrated oregano tissue culture. *Process Biochem* 34:717–723.
191. Pesquet E, Ranocha P, Legay S, Digonnet D, Barbier A, Pichon M, Goffner D (2005) Novel Markers of Xylogenesis in *Zinnia* Are Differentially Regulated by Auxin and Cytokinin. *Plant Physiology* vol. 139 no. 4: 1821-1839
- 192.Picoli EAT, Otoni WC, Figueira ML, Carolino SMB, Almeida RS, Silva EAM, Carvalho CR, Fontes EPB (2001) Hyperhydricity in *in vitro* eggplant regenerated shoots: structural characteristics and involvement of BiP (Binding Protein). *Plant Sci* 160: 857–868.
- 193.Plomion C, Lalanne C, Claverol S, Meddour H, Kohler A, Bogeat, Triboulot MB, Barre A, Le PG, Dumazet H, Jacob D, Bastien C, Dreyer E, de Antoine D, Guehl JM, Schmitter JM, Martin F, Bonneu M (2006) Mapping the proteome of poplar and application to the discovery of drought stress-responsive proteins. *Proteomics* 6:6509–6527.
- 194.Porra RJ (2002) The chequered history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination of chlorophylls a and b. *Photosynthesis Research* 73: 149–156.

195. Pospíšilová J, Catsky J, Sesták Z (1997) Photosynthesis in plant cultivated *in vitro*. In: Passaraki, M. Hadbook of photosynthesis. Kluwer Academic publishers. Netherland. (ed.). pp. 525-540.
196. Pospíšilová J, Synkova D, Haisel D, Semoradova S (2007) Acclimatization of plantlets to *ex vitro* conditions: Effect of air humidity, irradiance, CO₂ concentration and abscisic acid (a review). *Acta Hort.* 748: 29-38.
197. Pospíšilová J, Synkova H, Haisel D, Batkova P (2009) Effect of abscisic acid in photosynthetic parameters during *ex vitro* transfer of micropropagated tobacco plantlets. *Biologia Plantarum* 53(1):11-20.
198. Pospíšilová J, Tichà I, Kadlecěk P, Haisel D, Plzaková S (1999) Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions. *Biol Plant* 42: 481–497.
199. Pospíšilová J, Wilhelmova N, Synkova H, Catsky J, Krebs D, Tichà I, Hanackova B, Snopek J (1998) . Acclimation of tobacco plantlets to *ex vitro* conditions as affected by application of abscisic acid. *Journal of Experimental Botany* 49: 863-869.
200. Preil W (2005) General introduction: a personal reflection on the use of liquid media for *in vitro* culture. In: Hvoslef-Eide AK, Preil W (eds) *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation*. Springer, Dordrecht, pp 1–18.
201. Programa informático MASCOT (<http://www.matrixscience.com/home.html>).
202. Quiala E, Barbón R, Jiménez E, de Feria M, Chávez M, Capote A, Pérez N (2006) Biomass production of *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf, a medicinal plant, in temporary immersion system. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 42: 298–300.
203. Quintanilla K (2007) Establecimiento *in vitro* de Loroco (*Fernaldia pandurata* W) *Revista Agronomía Mesoamericana* 18: 75-84.
204. Quiroga M, Guerrero C, Botella MA, Barceló A, Amaya I, Medina MI, Alonso FJ, Milrad de Forchetti S, Tigier H, Valpuesta V (2000) A tomato peroxidase involved in the synthesis of lignin and suberin. *Plant Physiol* 122: 1119-1127.
205. Read P (2007) Micropropagation: Past, present and future. *Acta Hort.* 748: 17-28.
206. Renaut J, Hoffmann L, Hausman JF (2005) Biochemical and physiological mechanisms related to cold acclimation and enhanced freezing tolerance in poplar plantlets. *Physiol Plant* 125:82–94.

207. Renaut J, Lutts S, Hoffmann L, Hausman JF (2004) Responses of poplar to chilling temperatures: proteomic and physiological aspects. *Plant Biol* (Stuttgart, Germany) 6:81–90.
208. Reyes-Díaz M, Ivanov AG, Huner NPA, Alberdi M, Corcuera LJ, Bravo L (2009) Thermal energy dissipation and its components in two developmental stages of a shade-tolerant species, *Nothofagus nitida*, and a shade-intolerant species, *Nothofagus dombeyi*. *Tree Physiology* 29, 651–662.
209. Reyes-Díaz M, Alberdi M, Piper F, Bravo LA, Corcuera LJ (2005) Low temperature responses of *Nothofagus dombeyi* (Mirb.) Blume and *Nothofagus nitida* (Phil.) Krasser, two evergreen species from south central Chile. *Tree Physiol.* 25:1389–1398.
210. Ríos D, Avilés F, Sánchez-Olante M, Escobar R, Pereira G (2005) Variación de la tasa de enraizamiento asociada al número de subcultivo y diámetro de microtallos de castaño (*Castanea sativa* Mill.). *Agricultura Técnica* 65(3): 258-264.
211. Robinson DG, Ehlers U, Herken R, Herrmann BH, Mayer F, Schuermann FW (1987) Methods for SEM. In: MuEhlethaler K (ed) *Methods of Preparation for Electron Microscopy*. Springer, Berlin, pp 145–172.
212. Roels S, Noceda C, Escalona M, Sandoval J, Canal MJ, Rodríguez R, Debergh P (2006) The effect of headspace renewal in a temporary immersion bioreactor on plantain (*Musa AAB*) shoot proliferation and quality. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 84: 155–163.
213. Ros-Barceló BA, Gómez-Ros LV, Ferrer MA, Hernández JA (2006) The apoplastic antioxidant enzymatic system in the wood forming tissues of trees. *Trees Struct Funct* 20:145–156.
214. Rouhier N, Jacquot J (2002) Plant peroxiredoxins: alternative hydroperoxide scavenging enzymes. *Photosynthesis Research.* 74: 259-268.
215. Saher S, Piqueras A, Hellin E, Olmos E (2004) Hyperhydricity in micropropagated carnation shoots: the role of oxidative stress. *Physiologia Plantarum* 20: 152–161.
216. Sankar-Thomas YD y Lieberei R (2011) Camptothecin accumulation in various organ cultures of *Camptotheca acuminata* Decne grown in different culture systems. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 106: 445–454.
217. Santamaría E, Toorop P, Rodríguez R, Cañal MJ (2010) Dormant and non-dormant *Castanea sativa* Mill. buds require different polyvinylpyrrolidone concentrations for optimal RNA isolation. *Plant Sci* 178: 55–60.

- 218.Santamaría JM, Davies WJ, Atkinson CJ (1993) Stomata of micropropagated Delphinium plants respond to ABA, CO₂, light and water potential, but fail to close fully. *Journal of experimental Botany* 44: 99-107.
- 219.Santoni V, Rouquié V, Doumas P, Mansion M, Boutry M, Degand M, Dupree P, Packman L, Sherrier J (1997) Use of a proteome strategy for tagging proteins present at the plasma membrane. *The Plant Journal* [16\(5\)](#): 633–641.
- 220.Savangikar VA, Savangikar C, Daga RS, Pathak S (2005) Potentials for cost reduction in a new model of commercial micropropagation. A.K. Hvoslef-Eide and W. Preil (Eds.), *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation*, Springer. pp. 403–414.
221. Schillmiller AL y Howe GA (2005) Systemic signaling in the wound response. *Curr Opin Plant Biol* 8: 369–377.
- 222.Schlesier B, Berna A, Bernier F y Mock HP (2004) Proteome analysis differentiates between two highly homologous germin-like proteins in *Arabidopsis thaliana* ecotypes Col-0 and Ws-2. *Phytochemistry* 65: 1565-1574
- 223.Schweizer P, Christoffel A, Dudler R (1999) Transient expression of members of the germin-like gene family in epidermal cells of wheat confers disease resistant. *Plant J* 20: 541-552.
- 224.Segarra CI, Casalongué CA, Pinedo ML, Ronchi VP y Conde RD (2003) A germin-like protein of wheat leaf apoplast inhibits serine proteases. *J Exp Bot* 54: 1335-1341.
- 225.Sekimoto YS, Taki N, Obayashi T, Aono M, Matsumoto F (2005) Coordinated activation of metabolic pathways for antioxidants and defence compounds by jasmonates and their roles in stress tolerance in *Arabidopsis*. *Plant J*. 44: 653–68.
- 226.Seth SK y Kaul ON (1978) *Tropical forest ecosystems of India: the Teak forest*. Paris (France) UNESCO, pp. 628-640.
- 227.Sghaier-Hammami B, Valledor L, Drira N, Jorrin-Novo JV (2009) Proteomic analysis of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) zygotic embryos development and germination. *Proteomics* 9: 2543-2554
- 228.Sharwood RE y Whitney SM (2010) Engineering the Sunflower Rubisco Subunits into Tobacco Chloroplasts: New Considerations. In: Constantin A. Rebeiz et al. (eds.), *The Chloroplast: Basics and Applications*, Springer, Science+Business Media B.V, pp. 285–306.

229. Shevchenko V (2001) Expanding the organismal scope of proteomics: Cross-species protein identification by mass spectrometry and its implications. *Proteomics* 3 (1): 19–28.
230. Shu-Han Y y Der-Ming Y (2008) *In vitro* leaf anatomy, *ex vitro* photosynthetic behaviours and growth of *Calathea orbifolia* (Linden) Kennedy plants obtained from semisolid medium and temporary immersion systems. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* 93: 201-207.
231. Spanos GA y Wrolstad RE (1990) Influence of processing and storage on the phenolic composition of Thompson Seedless grape juice. *J Agric Food Chem* 38: 1565–1571.
232. Sreedhar RV, Venkatachalam, Neelwarne B (2009) Hyperhydricity-Related Morphologic and Biochemical Changes in Vanilla (*Vanilla planifolia* L.). *J Plant Growth Regul* 28: 46–57.
233. Suhita D, Agepati S, Raghavendra J, Kwak M, Vavasseur A (2004) Cytoplasmic Alkalization Precedes Reactive Oxygen Species Production during Methyl Jasmonate- and Abscisic Acid-Induced Stomatal Closure¹ *Plant Physiology* 134 (4):1536-1545
234. Takayama, S. 2002. Practical aspects of Bioreactor application in mass propagation. 1st Int. Symp. –Liquid Systems for in vitro Mass Propagation of Plant. pp. 60-62.
235. Taylor IB, Sonneveld T, Bugg TDH, Thompson AJ (2005). Regulation and manipulation of the biosynthesis of ABA including the supply of xanthophyll precursors. *J. Plant Growth Regul* 24, 253–273.
236. Teisson C y Alvard D (1995) A new concept of plant in vitro cultivation liquid medium: temporary immersion. In: Terzi M, Celia R, Falavigna A. (Kluwer, Dordrecht eds) *Current Issues in Plant Molecular and Cellular Biology*: 105–110.
237. Tichà I, Radochovaà B, Kadlecèk P (1999) Stomatal morphology during acclimatization of tobacco plantlets to *ex vitro* conditions. *Biol Plant* 42: 469–474.
238. Timperio MA, Egidi MG, Zolla L (2008) Proteomics applied on plant abiotic stresses: Role of heat shock proteins (HSP) *Journal of Proteomics* 71: 391– 411.
239. Tiwari SK, Tiwari KP, Siril EA (2002) An improved micropropagation protocol for teak. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 71: 1–6.
240. Toro B (2003) Protocolo de micropropagacion para cv. Carmenerè. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 77: 7–12.
241. Tossi V (2012) ABA says NO to UV-B: a universal response?. *Trends in Plant Science*, 17 (9): 510-517.

242. Tsay HS, Lee CY, Agrawal DC, Basker (2006) Influence of ventilation closure, gelling agent and explant type on shoot bud proliferation and hyperhydricity in *Scrophularia yoshimurae* – a medicinal plant. *In Vitro Cell. Dev. Biol.—Plant* 42:445–449.
243. Ubeda-Tomas S, Edvardsson E, Eland C, Kumar Singh S, Zadik D, Aspeborg H, Gorzsàs A, Teeri TT, Sundberg B, Persson P, Bennett M y Marchant A (2007) Genomic-assisted identification of genes involved in secondary growth in *Arabidopsis* utilising transcript profiling of poplar wood-forming tissues. *Physiol Plantarum* 129: 415-428.
244. Valledor L, Castillejo MA, Lenz C, Rodríguez R, Canal MJ, Jorriin J (2008) Proteomic analysis of *Pinus radiata* needles: 2-DE map and protein identification by LC/MS/MS and substitution tolerant database searching. *J Proteome Res.* 7: 2616–2631.
245. Valledor L, Meijón M, Hasbún R, Cañal MJ, Rodríguez R (2010) Variations in DNA methylation, acetylated histone H4, and methylated histone H3 during *Pinus radiata* needle maturation in relation to the loss of in vitro organogenic capability. *J. Plant Physiol* 167: 351–357.
246. Vallelian-Bindschedler L, Mosinger E, Métraux JP y Schweizer P (1998) Structure, expression and localization of a germin-like protein in barley (*Hordeum vulgare* L.) that is insolubilized in stressed leaves. *Plant Mol Biol* 37: 297-308.
247. Van Dam NM y Bezemer TM (2006) Chemical communications between roots and shoots. In: M. Dicke and taken (Eds) *Chemical Ecology: from gene to ecosystem*: 127-140.
248. Van Huystee RS (1987) Some molecular aspects of plant peroxidase biosynthetic studies. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 38: 205–219.
249. Van Staden J, Fennell CW, Taylor NJ (2004) Plant Stress In Vitro: The Role of Phytohormones. *ISHS Acta Horticulturae* 725: V International Symposium on In Vitro Culture and Horticultural Breeding. Disponible en: www.actahort.org.
250. Vasil, I (1994) Automation in plant propagation. *Plant Cell Tiss and Organ Cult* 39(2): 105-108.
251. Vásquez E y Torres S (2006) *Fisiología Vegetal*. 3^{era} Ed. Felix Varela. La Habana (Cuba). 451p.
252. Vidal N, Ballester MC, Vietez C, Kevers M, Gaspar TH (1994) Biochemical characteristic of chestnut shoots related to in vitro multiplication and rooting capacities. *Adv. Horticultural Science* 8: 19-24.

253. Vilches J (2001) Embriogénesis somatic en guayaba (*Psidium guajava* L.). Tesis de Maestría. Universidad Central de Las Villas. Santa Clara, Cuba.
254. Wang X, Li X, Li Y (2007) A modified Coomassie brilliant blue staining method at nanogram sensitivity compatible with proteomic analysis. *Biotechnol Lett* 29:1599–1603
255. Watson BS, Asirvatham VS, Wang L, Sumner LW (2003) Mapping the proteome of barrel medic (*Medicago truncatula*). *Plant Physiol.* 131: 1104–1123.
256. Weaver P (1993) *Tectona grandis* L. Verbenaceae. Institute of Tropical Forestry. Southern Forest Experiment Station. Rio Piedras (Puerto Rico). 18p.
257. Weeda SM, Mohan Kumar GN, Knowles R (2010) Correlative changes in proteases and protease inhibitors during mobilisation of protein from potato (*Solanum tuberosum* L.) seed tubers. *Functional Plant Biology*, 37, 32–42.
258. Welander M, Li XY, Zhu LH (2001) Improved micropropagation of apple rootstocks by temporary immersion system. Cost 843, WG2: Quality enhancement of plant production through tissue culture. 2nd Meeting Thessaloniki, 22-25 September, Extended Abstracts: (pp. 7-8).
259. Werner T, Motyka V, Laucou V, Smets R, Van Onckelen H, Schmulling T (2003) Cytokinin in deficient transgenic *Arabidopsis* plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity. *Plant Cell* 15: 2532-2550.
260. White KJ (1991) Teak some aspects of research and development RAPA Bangkok.
261. Woodall AA, Lee SW, Weesie RJ, Jackson MJ, Britton G. (1997). Oxidation of carotenoids by free radicals: Relationship between structure and reactivity. *Biochem Biophys Acta* 1336: 33–42.
262. Yan H, Liang C, Li Y (2011) Axillary shoot proliferation and tuberization of *Discorea forii* Prain et Burk. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 104: 93–198.
263. Yang X, Lee S, So JH, Dharmasiri S, Dharmasiri N, Ge L, Jensen C, Hangarter R, Hobbie L, Estelle M (2004) The IAA1 protein is encoded by AXR5 and is a substrate of SCF (TIR1). *Plant J.* 40:772–782.
264. Yasodha R, Sumathi R, Gurumurthi K (2005) Improved micropropagation methods for teak. *J Trop For Sci* 17:63–75.

265. Zhang SQ y Outlaw WH (2001) The guard-cell apoplast as a site of abscisic acid accumulation in *Vicia faba* L. *Plant Cell Environ.* 24: 347-355.
266. Zhu JK (2002) Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu Rev Plant Biol* 53: 247-273.
267. Zhu LH, Xue-Yuan Li, Welander M (2005) Optimization of growing conditions for the apple rootstock M26 grown in RITA containers using temporary immersion principle. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 81: 313–318.
268. Ziv M (1991) Vitrification: morphological and physiological disorders of *in vitro* plants. In: Debergh PC, Zimmerman RH (eds) *Micropropagation: technology and application*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 45–69.
269. Ziv M (1995) *In vitro* aclimatización. En: Aitken-Christie., J. Kozait., T. Smith., M. A. (Eds). *Automation and environmental control in Plant Tissue Culture*. Kluwer Academic Publishers, pp. 405- 438.
270. Ziv M (2001) Vitrification. In: Debergh PC, Zimmerman RH (eds) *Micropropagation technology and application*. Kluwer, Dordrecht, pp 45–69.
271. Ziv M (2002) Simple bioreactor for mass propagations of plants. 1 st. Int. Symp. –Liquid Systems for *in vitro* Mass Propagation of Plant: 13-14.
272. Ziv M (2005) Simple bioreactors for mass propagation of plants. In: Hvoslef-Eide AK, Preil W (Springer, Dordrecht eds) *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation*, p 588.
273. Ziv M y Ariel M (1992) Vitrification in relation to stomatal deformation and malfunction in carnation leaves *in vitro*. In: Lumsden PJ, Nicholas JR, Davies WJ. (Eds): *Physiology, Growth and Development of Plants in Culture*: 143-154. Kluwer Academic Publishers.
274. Ziv M, Schawarts A, Fleminger D (1987) Malfunctioning stomata in vitreous leaves of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) plants propagated *in vitro*; implications for hardening. *Plant Science* 52: 127-134.
275. Zobayed SMA (2005) Ventilation in micropropagation. In: *Photoautotrophic (sugar-free medium) micropropagation as a new propagation and transplant production system* (Springer Eds.) by T. Kozai, F. Afreen, SMA. Zobayed: 143-182.

8. Anexos

Anexo 1. Características físico-químicas de los sustratos utilizados.

A) Composición química de la cachaza (100%) (Complejo Agroindustrial Azucarero “Efraín Alfonso”, Villa Clara).

Composición química		Valor
Calcio	CaO	231,23 mg/L
Potasio	K ₂ O	125,2 mg/L
Fósforo	P ₂ O ₅	1008,80 mg/L
Materia orgánica		41,3%
C.E		1,14 mol/cm ³
pH		7,6

B) Composición química de la zeolita (100%) (Empresa GEOMINERA, Villa Clara)

Composición química		%
Silicio	SiO ₂	70,10
Aluminio	Al ₂ O ₃	11,20
Hierro	Fe ₂ O ₃	2,20
	FeO	0,30
Magnesio	MgO	0,60
Calcio	CaO	4,50
Sodio	Na ₂ O	1,50
Potasio	K ₂ O	1,30
Fósforo	P ₂ O ₅	0,07
Agua	H ₂ O	4,70
Composición mineral		%
Clinoptilolita		40,00
Modernita		40,00
Otros (Calcita, cuarzo, feldespato)		20,00
Propiedades físicas		Valor
Tamaño de la partícula		0,01-1,0 mm
Densidad (δ)		0,37 g/cm ³
Densidad de la fase sólida (γ)		1,77 g/cm ³
Porosidad total (PT)		80,59 % vol.

Anexo 2. Tabla con las 100 proteínas identificadas en el proteoma de la hoja de plantas de teca, del banco de donantes establecido en casa de cultivo. Las proteínas fueron clasificadas de acuerdo a la Enciclopedia de Genes y Genoma de Kioto (KEGG, según sus siglas en inglés).

SSP	Proteína*	Organismo de referencia	Número de acceso a Base de datos ^a	Experimental		Teórico ^b		Var. Biológica		Valor del Mascot	Función Molecular ^c
				Mr	pI	Mr	pI	Media	DS		
Traducción, plegamiento y degradación de proteínas											
10	Translation initiation factor	<i>Carica papaya</i>	gi 151347490	21.25	4.59	17.43	5.60	2,101	0,071	91	Translation factor activity
113	Eukaryotic translation initiation factor 5A isoform III	<i>Hevea brasiliensis</i>	gi 33325121	20.97	4.08	17.60	5.60	0,398	0,690	404	Translation factor activity
3003	Glycine-rich RNA-binding protein	<i>Nicotiana tabacum</i>	gi 187373099	16.61	6.3	15.62	5.23	1,734	0,059	348	Translation factor activity
3613	Similar to Elongation factor Tu, chloroplastic	<i>Vitis vinifera</i>	gi 225456880	55.90	6.54	52.69	6.25	2,271	0,159	508	GTP-binding
3635	Chloroplast elongation factor TuA (EF-TuA)	<i>Nicotiana sylvestris</i>	gi 218310	55.77	6.47	49.73	6.09	2,135	0,142	255	GTP-binding
4305	Adenosine kinase, putative (EC:2.7.1.20)	<i>Ricinus communis</i>	gi 223528683	46.92	6.52	37.62	5.17	1,552	0,207	211	Kinase activity
4640	26S protease regulatory subunit 6B homolog	<i>Solanum tuberosum</i>	gi 1709798	62.13	6.5	46.53	5.50	1,215	0,348	289	Hydrolase activity
4601	Predicted protein: Zn-dependent peptidases (EC: 3.4.99.-)	<i>Populus trichocarpa</i>	gi 224141065	71.58	6.5	58.49	6.42	1,883	0,271	283	Translation factor activity
5803	Protein transport protein sec23, putative	<i>Ricinus communis</i>	gi 223544497	94.26	6.73	86.33	5.97	1,256	0,228	104	Transporter activity
6108	Proteasome subunit beta type-1 (EC:3.4.25.1)	<i>Petunia x hybrida</i>	gi 17380185	26.88	7.12	24.61	6.3	1,208	0,801	207	Protein degradation
6451	mRNA-binding protein precursor	<i>Nicotiana</i>	gi 32746733	45.48	7.19	44.24	6.51	1,804	0,185	125	Translation factor

		<i>tabacum</i>										activity
7002	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, putative (EC: 5.2.1.8)	<i>Ricinus communis</i>	gi 223545925	20.68	7.34	27.5	9.58	1,358	0,491	227	Protein folding	
7101	GTP-binding nuclear protein Ran2	<i>Solanum lycopersicum</i>	gi 585778	27.72	7.30	25.16	6.39	1,717	0,122	710	GTP-binding	
7630	GTP binding protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	gi 15221444	56.07	7.51	44.47	6.35	1,944	0,067	249	GTP-binding	
8060	Ubiquitin conjugating enzyme E2 (EC: 6.3.2.19)	<i>Solanum lycopersicum</i>	gi 441457	16.16	7.76	16.5	7.72	1,526	0,129	248	Protein binding	
8110	Proteasome subunit beta type, putative (EC: 3.4.25.1)	<i>Ricinus communis</i>	gi 223534323	28.35	8.15	32.76	8.26	1,195	0,742	131	Hydrolase activity	
8210	FLK (Flowering KH domain); nucleic acid binding	<i>Arabidopsis thaliana</i>	gi 15229321	31.64	7.74	63.4	4.57	1,132	0,147	170	Nucleic acid binding	
8707	Elongation factor 1-alpha	<i>Zea mays</i>	gi 195644104	65.66	8.11	49.28	9.15	1,562	0,194	401	GTP-binding	
9027	40S ribosomal protein S10-like	<i>Solanum tuberosum</i>	gi 81076822	20.81	10	20.12	9.73	1,402	0,352	333	Translation factor activity	
6705	Glycyl-tRNA synthetase (EC: 6.1.1.14)	<i>Ricinus communis</i>	gi 223548633	83.21	7.13	77.26	6.60	1,338	0,390	109	Translation factor activity	
Proteínas relacionadas con estrés												
1731	Heat shock cognate 70 kDa protein 1	<i>Vitis vinifera</i>	gi 225449497	83.65	5.76	71.17	5.17	2,104	0,394	714	Binding	
4701	Heat shock protein, putative (EC: 1.3.1.74)	<i>Ricinus communis</i>	gi 223532877	86.31	6.47	70.9	5.14	1,134	0,064	84	Binding	
Cloroplasto/Fotosíntesis/Cadena transportadora de electrones												
1008	Cytochrome B6-F complex iron sulfur subunit 2 (EC: 1.10.99.1)	<i>Sonneratia alba</i>	gi 146454654	21.89	5.9	16.59	6.04	1,894	0,091	277	Electron transfer	
2001	Cytochrome B6-F complex iron sulfur subunit 2 (EC: 1.10.99.1)	<i>Sonneratia alba</i>	gi 146454654	21.59	6.07	16.59	6.04	1,927	0,051	226	Electron transfer	
1112	Light harvesting chlorophyll a/b-binding protein	<i>Nicotiana glauca</i>	gi 3036942	29.52	5.76	28.13	5.15	1,892	0,596	264	Electron transfer	
2121	Chlorophyll a-b binding protein 6A, chloroplastic	<i>Solanum lycopersicum</i>	gi 115764	24.65	6.05	26.57	5.83	1,224	0,235	301	Electron transfer	
3121	Cytochrome B6-F complex iron sulfur subunit 2 (EC: 1.10.99.1)	<i>Sonneratia alba</i>	gi 146454654	21.28	6,26	16.6	6.04	0,985	0,305	112	Electron transfer	

5073	Hypothetical protein POPTRDRAFT_551203 (photosystem II reaction center psbP protein)	<i>Populus trichocarpa</i>	gi 224062595	26.06	6.99	28.19	7.68	1,560	0,349	124	Protein binding
5314	Carbonic anhydrase isoform 1 (EC: 4.2.1.1)	<i>Gossypium hirsutum</i>	gi 4754913	35.75	6.94	34.85	6.94	0,817	0,067	182	Hydratase activity
7003	Photosystem I reaction center subunit II, chloroplastic	<i>Glycine max</i>	gi 148372347	23.28	7.34	23	9.63	0,930	0,923	133	Protein binding
7067	Photosystem II 10 kDa polypeptide	<i>Sonmeratia alba</i>	gi 146454590	11.22	7.68	12.57	9.65	1,920	0,380	154	Protein binding
8045	Photosystem I reaction center subunit IV, chloroplastic	<i>Spinacia oleracea</i>	gi 131178	21.33	8.87	13.36	9.99	2,503	0,622	87	Electron transfer
8055	Photosystem I reaction center subunit II, chloroplast precursor	<i>Ricinus communis</i>	gi 223540112	23.62	7.98	23.08	9.68	0,541	0,698	360	Electron transfer
8233	Ferredoxin-NADP+ reductase enzyme (EC: 1.18.1.2)	<i>Oryza sativa Japonica Group</i>	gi 218163	40.18	8.07	35.56	7.59	1.407	0.167	154	Electron transfer
8306	Ferredoxin-NADP reductase, root isozyme (EC: 1.18.1.2)	<i>Zea mays</i>	gi 195640470	40.47	7.78	41.82	8.86	1.609	0.346	155	Electron transfer
8639	NADH:flavin oxidoreductase	<i>Populus tremula</i>	gi 190897006	57.52	8.49	20.17	7	1,272	0,324	176	Electron transfer
Metabolismo de nucleótidos											
4017	Nucleoside diphosphate kinase 2, chloroplastic (EC: 2.7.4.6)	<i>Nicotiana tabacum</i>	gi 75298577	18.54	6.69	25.3	8.46	0,888	0,586	309	Kinase activity
7606	UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase, putative (EC: 2.2.7.9)	<i>Ricinus communis</i>	gi 223534088	69.55	7.41	51.63	5.71	0,774	0,484	118	Catalytic activity
8803	RHM1/ROL1; UDP-glucose 4,6-dehydratase (EC:4.2.1.76)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	gi 15218420	87.24	7.6	75.37	6.84	1,476	0,077	499	Catalytic activity
8445	UDP-glucose 4-epimerase (EC: 5.1.3.2)	<i>Catharanthus roseus</i>	gi 148613129	47.26	8.08	27.17	7.73	1,549	0,066	89	Catalytic activity
Cloroplasto/Fotosíntesis/ruta de los Carbohidratos											
714	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase large subunit (EC: 4.1.1.39)	<i>Salvia texana</i>	gi 46326392	66.63	4.81	49.87	6.34	2,077	0,437	283	Carbohydrate binding
1013	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase large subunit (EC: 4.1.1.39)	<i>Plagiochilion oppositum</i>	gi 78102956	11.26	5.2	48.79	6.3	0,647	0,569	73	Carbohydrate binding
1742	Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase (EC: 4.1.1.39)	<i>Tectona grandis L.</i>	gi 2598059	74.31	5.36	51.8	6.22	1,113	0,169	176	Carbohydrate binding
8039	Ribulose 1,5 bisphosphate carboxylase (<i>Pisum sativum</i>	gi 12019640	13.49	7.8	16.2	7.86	2,368	0,150	436	Carbohydrate

	EC: 4.1.1.39)										binding
8040	Ribulose 1,5 biphosphate carboxylase (EC: 4.1.1.39)	<i>Pisum sativum</i>	gi 12019640	13.58	8.79	16.2	7.86	2,780	0,148	445	Carbohidrate binding
8061	Ribulose biphosphate carboxylase small chain 3A (EC: 4.1.1.39)	<i>Pisum sativum</i>	gi 132106	17.04	8.83	20.23	9.10	1,249	0,169	346	Carbohidrate binding
3706	RuBisCO large subunit-binding protein subunit beta	<i>Pisum sativum</i>	gi 2506277	74.96	6.34	62.98	5.85	1,140	0,283	116	Protein binding
6106	Ribulose-5-phosphate-3-epimerase (EC 5.1.3.1)	<i>Oryza sativa</i>	gi 4105561	27.58	7.1	29.08	8.93	1,692	0,076	430	Epimerase activity
2522	Phosphoribulokinase (EC: 2.7.1.19)	<i>Pisum sativum</i>	gi 1885326	49.45	6.27	39.02	5.41	2,159	0,034	82	Kinase activity
4707	Transketolase 1, chloroplastic (EC: 2.2.1.1)	<i>Capsicum annuum</i>	gi 3559814	86.51	6.61	80.1	6.16	2,071	0,204	226	Transketolactase activity
4814	Transketolase 1, chloroplastic (EC: 2.2.1.1)	<i>Capsicum annuum</i>	gi 3559814	86.88	6.7	80.1	6.16	2,431	0,050	202	Transketolactase activity
5808	Transketolase, putative (EC: 2.2.1.1)	<i>Ricinus communis</i>	gi 223548870	87.11	6.76	81.27	6.52	1,980	0,210	321	Transketolactase activity
4725	Xylose isomerase family protein (EC 5.3.1.5)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	gi 30696904	63.79	6.56	53.72	5.59	1,739	0,461	364	Xylose isomerase activity
6750	AOAT2 : L-alanine:2-oxoglutarate aminotransferase (EC:2.6.1.2)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	gi 15223186	63.01	7.25	53.44	6.21	1,540	0,544	389	Transferase activity
Mantenimiento redox											
3005	Thioredoxin (EC: 1.8.1.9)	<i>Limonium bicolor</i>	gi 154721452	16.44	6.39	20.27	9.63	1,652	0,232	92	Oxidase activity
3209	Ascorbate peroxidase (EC: 1.11.1.11)	<i>Lycopersicon esculentum</i>	gi 21039134	37.5	6.42	42.17	8.65	2,404	0,184	395	Oxidase activity
3302	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase 1; (ACC oxidase)	<i>Phelipanche ramosa</i>	gi 115499665	42.98	6.26	36.04	5.33	2,065	0,241	249	Oxidase activity
4108	Ascorbate peroxidase (EC: 1.11.1.11)	<i>Picrorhiza kurrooa</i>	gi 194716772	28.22	6.66	27.38	5.53	2,473	0,019	307	Oxidase activity
4217	Ascorbate peroxidase, putative (EC: 1.11.1.11)	<i>Cryptomeria japonica</i>	gi 90704781	30.62	6.65	27.22	5.47	1,459	0,035	127	Oxidase activity
4604	Polyphenol oxidase, chloroplastic (EC: 1.14.18.1)	<i>Spinacia oleracea</i>	gi 984207	68.84	6.6	73.13	5.89	1,735	0,432	131	Oxidase activity
Mitocondria/Ruta del Piruvato y Ciclo del ATC											
4220	Aldo-keto reductase, putative (EC: 2.3.1.170)	<i>Ricinus communis</i>	gi 223538939	39.33	6.69	35.84	5.59	1,431	0,251	126	Oxidoreductase activity

4311	NAD-malate dehydrogenase (EC: 1.1.1.37)	<i>Nicotiana tabacum</i>	gi 5123836	44.88	6.58	43.3	8.03	1,352	0,475	378	Dehydrogenase activity
4626	Dihydroflavonol reductase, Putative	<i>Ipomoea trifida</i>	gi 45935133	55.08	6.76	45.57	5.78	1,348	0,152	295	Oxidoreductase activity
4637	Monodehydroascorbate reductase (EC: 1.6.5.4)	<i>Acanthus ebracteatus</i>	gi 117067068	55.54	6.6	47.41	5.29	1,673	0,075	284	Oxidoreductase activity
6466	Putative aldo-keto reductase 1	<i>Salvia miltiorrhiza</i>	gi 151301846	45.57	7.23	40.07	5.97	2,412	0,280	125	Oxidoreductase activity
6628	Isocitrate dehydrogenase [NADP] (EC: 1.1.1.42)	<i>Nicotiana tabacum</i>	gi 1708402	54.49	7.23	46.72	6.06	1,499	0,400	363	Dehydrogenase activity
7448	Tetrahydrofolate dehydrogenase/cyclohydrolase (EC: 6.3.4.3)	<i>Populus trichocarpa</i>	gi 224067864	40.5	7.59	39.53	8.21	1,678	0,067	71	Dehydrogenase activity
7722	Predicted protein: adenylosuccinate synthetase	<i>Vitis vinifera</i>	gi 225441754	62.92	7.48	53.38	7.10	1,174	0,214	214	Synthetase activity
7802	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine methyltransferase (EC:2.1.1.14)	<i>Solenostemon scutellarioides</i>	gi 8134569	93.82	7.29	84.58	6.09	1,719	0,063	497	Syntase activity
7809	Aconitase, putative (EC: 4.2.1.3)	<i>Ricinus communis</i>	gi 223529808	104.5	7.35	98.54	5.90	0,803	0,010	138	Hydratase activity
8321	Succinyl-CoA ligase alpha 2 subunit (EC: 6.2.1.5)	<i>Lycopersicon esculentum</i>	gi 49617539	43.06	8.19	35.37	9.00	1,905	0,261	318	Binding
8705	Serine hydroxymethyltransferase 2 (EC:2.1.2.1)	<i>Flaveria pringlei</i>	gi 1346156	68.97	7.94	56.93	8.80	1,665	0,272	349	Transferase activity
Citosol/Glicólisis											
1660	Fructose-1,6-bisphosphatase, chloroplastic (EC:3.1.3.11)	<i>Ricinus communis</i>	gi 223532738	60.06	5.85	44.06	5.15	1,419	0,226	408	Dehydrogenase activity
6526	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, putative (EC 1.2.1.12)	<i>Ricinus communis</i>	gi 223547801	50.04	7.05	43.11	8.14	2,434	0,121	184	Dehydrogenase activity
6532	Formate dehydrogenase, putative (EC: 1.2.1.2)	<i>Ricinus communis</i>	gi 223543349	50.67	7.23	42.6	6.28	2,765	0,207	259	Dehydrogenase activity
7617	Glyoxysomal beta-ketoacyl-thiolase (EC: 2.3.1.16)	<i>Brassica napus</i>	gi 1066163	57.6	7.57	48.66	8.48	1,981	0,056	211	Thiolase activity
Fijación de Nitrógeno y Metabolismo de Aminoácidos											
2430	Cysteine synthase (EC: 2.5.1.47)	<i>Solanum tuberosum</i>	gi 11131626	41.55	6.21	34.34	6.27	2,162	0,129	406	Syntase activity

2431	O-acetylserine(thiol)-lyase (Cysteine synthase)(EC: 2.5.1.47)	<i>Sesamum indicum</i>	gi 158263556	43.19	6.22	34.33	5.62	1,660	0,305	539	Syntase activity
3013	Glycine-rich RNA-binding protein	<i>Nicotiana tabacum</i>	gi 187373099	11.89	6.32	15.6	5.23	0,638	0,728	293	Nucleic acid binding
4609	Cetol-acid reductoisomerase, chloroplast precursor, putative (EC:1.1.1.86)	<i>Ricinus communis</i>	gi 223535574	70.24	6.7	63.23	6.36	1,596	0,340	109	Oxidoreductase activity
3641	S-adenosylmethionine synthetase, SAM synthetase (EC 2.5.1.6)	<i>Medicago sativa</i>	gi 48093937	58.65	6.49	42.8	5.67	1,594	0,200	438	GTP-binding
4633	S-adenosylmethionine synthetase , SAM synthetase (EC 2.5.1.6)	<i>Medicago sativa</i>	gi 48093937	58.06	6.57	42.08	5.67	1,764	0,070	738	GTP-binding
4704	Acetolactate synthase (EC: 2.2.1.6)	<i>Amaranthus tuberculatus</i>	gi 121277641	75.23	6.51	72.76	6.88	1,487	0,099	218	Syntase activity
5605	Cetol-acid reductoisomerase, chloroplast precursor (EC 1.1.1.86)	<i>Ricinus communis</i>	gi 223538259	70.34	6.78	64.26	6.62	2,151	0,233	112	Oxidoreductase activity
Mitocondria/trasporte de electrones											
3727	V-ATPase A2 subunit isoform (EC: 3.6.3.14)	<i>Lycopersicon esculentum</i>	gi 27884018	81.73	6.3	68.71	5.30	2,331	0,069	725	Syntase activity
5602	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial (EC: 3.6.3.14)	<i>Oenothera biennis</i>	gi 114408	69.21	6.74	55.56	6.23	2,073	0,232	347	Syntase activity
Citoesqueleto											
2719	Tubulin A	<i>Glycine max</i>	gi 62546341	62.49	6.22	49.69	4.99	1,375	1,303	908	Binding
3633	Actin	<i>Striga asiatica</i>	gi 1531674	54.58	6.34	41.74	5.38	2,412	0,213	767	Protein binding
7203	LeArcA2 protein	<i>Solanum lycopersicum</i>	gi 4589836	39.54	7.35	35.81	7.63	1,563	0,235	334	Nucleic acid binding
7209	ArcA2 protein-like	<i>Solanum tuberosum</i>	gi 82621178	39.56	7.5	35.85	7.03	1,644	0,138	382	Nucleic acid binding
Metabolismo de lípidos											
5727	Hypothetical protein (Peptidase M16 inactive domain)	<i>Vitis vinifera</i>	gi 225444535	60.82	6.96	65.77	8.39	1,774	0,740	92	Syntase activity
7201	Naphthoate synthase (EC: 4.1.3.36)	<i>Ricinus communis</i>	gi 223535325	35.28	7.34	36.89	8.28	2,071	0,159	122	Syntase activity
7622	predicted protein: acetyl-CoA C-acyltransferase (EC: 2.3.1.16)	<i>Vitis vinifera</i>	gi 147866537	57.76	7.64	48.61	6.95	1,655	0,203	157	Transferase activity
Proceso biológico desconocido											
25	predicted protein	<i>Populus</i>	gi 224096197	17.14	5.20	18.57	4.68	2,265	0,359	84	Protein binding

<i>trichocarpa</i>											
205	predicted protein	<i>Populus trichocarpa</i>	gi 224138546	31.18	4.39	11.67	5.67	2,930	0,379	76	Syntase activity
716	Unknown	<i>Populus trichocarpa</i>	gi 118487530	64.71	4.76	78.29	5.98	2,506	0,186	72	Unknown molecular function
3311	hypothetical protein	<i>Vitis vinifera</i>	gi 147805616	30.89	6.49	27.17	5.64	1,106	0,732	166	Unknown molecular function
3607	Putative selenium-binding protein	<i>Ricinus communis</i>	gi 223540174	69.12	6.43	52.91	5.77	1,152	0,480	172	Oxidoreductase activity
5311	Unknown	<i>Picea sitchensis</i>	gi 116783747	33.43	6.96	35.88	6.75	0,980	0,168	161	Hydrolase activity
5434	Hypothetical protein	<i>Plantago major</i>	gi 53748437	43.29	7.02	28.84	5.24	2,422	0,185	135	Hydrolase activity
Puntos no identificados											
104, 207, 419, 1123, 1203, 2114, 3118, 3125, 3206, 4020, 4027, 4216, 5205, 6212, 7078, 8123, 9030, 9208, 9335											

*Las proteínas fueron identificadas por MALDI-TOF-TOF

^a El número de acceso a las bases de datos de acuerdo al SWISS-Prot (sp); NCBI *Inr*

^b El *Mr* (en Da) y *pI* de proteínas homólogas fue calculado con la herramienta disponible en el sitio http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html

^c Los términos de función molecular fueron inferidas a partir del KEGG

Anexo 3. Listado de proteínas identificadas expresadas diferencialmente en brotes de *Tectona grandis* L. con diferente morfología, cultivados en sistemas de inmersión temporal.

SSP	Nombre la Proteína	Organismo de referencia	Nro. de acceso a base de datos ^a	Experim ental		Teórico ^b		Control		Tipo 1		Tipo 2		Tipo 3		q-valor	Valor Mascot	Función molecular ^c
				Mr	pI	Mr	pI	X	SD	X	SD	X	SD	X	SD			
Cloroplasto/Fotosíntesis/Cadena transportadora de electrones																		
1008	Cytochrome B6-F complex iron sulfur subunit 2	Sonneratia alba	gi 146454654	21.89	5.9	16.59	6.04	1.894b ± 0.091	2.120a ± 0.089	2.114a ± 0.049	2.062ab ± 0.009	0.043	277	Transferencia de electrones				
3017	Predicted protein	Populus trichocarpa	gi 224083366	18.78	6.36	21.12	5.53	1.468b ± 0.028	1.769a ± 0.061	1.918a ± 0.167	2.052a ± 0.102	0.019	99	Transferencia de electrones				
5314	Carbonic anhydrase isoform 1 (EC: 4.2.1.1)	Gossypium hirsutum	gi 4754913	35.75	6.94	34.85	6.94	0.817a ± 0.067	0.965a ± 0.045	0.546b ± 0.474	0.000ca ± 0.000	0.033	182	Actividad hidratasa				
8306	Ferredoxin-NADP reductase, root isozyme	Zea mays	gi 195640470	40.47	7.78	41.82	8.86	1.609 ± 0.346	0.000b ± 0.000	0.000b ± 0.000	0.000b ± 0.000	0.000	155	Actividad oxido reductasa				
Cloroplasto/Fotosíntesis/ruta de los Carbohidratos																		
1742	Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase (EC: 4.1.1.39)	Tectona grandis L.	gi 2598059	74.31	5.36	51.8	6.22	1.113a ± 0.169	1.541a ± 0.523	0.000b ± 0.000	0.000b ± 0.000	0.006	176	Unión con carbohidratos				
3706	RuBisCO large subunit-binding protein subunit beta	Pisum sativum	gi 2506277	74.96	6.34	62.98	5.85	1,140a ± 0,283	1,054a ± 0,171	0,000b ± 0,000	0,000b ± 0,000	0,001	116	Protein binding				
3406	Phosphoribulokinase (PRK) (EC: 2.7.1.19)	Zea mays	gi 195645472	49.45	6.35	45.7	5.75	1.840a ± 0.240	0.000b ± 0.000	0.000b ± 0.000	0.000b ± 0.000	0.000	145	Actividad kinasa				
4814	Transketolase 1 , chloroplastic (EC: 2.2.1.1)	Capsicum annum	gi 3559814	86.88	6.70	80.1	6.16	2.431a ± 0.050	2.423a ± 0.103	2.228b ± 0.058	2.212b ± 0.029	0.034	202	Actividad transketolactasa				
Mantenimiento Redox																		
3302	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase 1; (ACC oxidase)	Phelipanche ramosa	gi 115499665	42.98	6.26	36.04	5.33	2.065a ± 0.241	1.816a ± 0.138	1.195b ± 1.044	0.000c ± 0.000	0.042	249	Actividad oxidasa				
4217	Ascorbate peroxidase, putative (EC: 1.11.1.11)	Cryptomeria japonica	gi 90704781	30.62	6.65	27.22	5.47	1.459a ± 0.035	0.000b ± 0.000	0.000b ± 0.000	0.000b ± 0.000	5.3E-1	127	Actividad oxidasa				
9025	Peroxiredoxin Q, chloroplastic (EC:1.11.1.15)	Populus trichocarpa	gi 75127599	17.26	9.75	23.41	9.62	1.211a ± 0.270	1.306b ± 0.183	1.129b ± 0.378	0.727c ± 0.014	0.024	245	Actividad oxidasa				
9328	Peroxidase 16 precursor, (EC: 1.11.1.7) (full: peroxidase 3, vacuole)	Ricinus communis	gi 223527445	5026	9.89	36.38	9.43	1.408a ± 0.457	1.864a ± 0.056	0.784b ± 0.947	0.000c ± 0.000	0.010	354	Actividad oxidasa				

9433	Properoxidase (EC: 1.11.1.7)	Picea abies	gi 113531028	50.94	9.83	37.03	9.15	1.458a	± 0.334	1.494a	± 0.083	0.976b	± 0.851	0.000c	± 0.000	0.010	113	Actividad oxidasa
Mitochondria/Ruta del Piruvato y Ciclo del ATC																		
1331	Predicted protein: pyruvate dehydrogenase (EC: 1.2.4.1)	Populus trichocarpa	gi 224053535	45.05	6.01	38.58	5.87	1.951a	± 0.420	1.429b	± 0.117	1.008c	± 0.879	0.000d	± 0.000	0.023	163	Actividad deshidrogenasa
4220	Aldo-Keto reductase, putative (EC: 2.3.1.170)	Ricinus communis	gi 223538939	39.33	6.69	35.84	5.59	1.431a	± 0.251	1.269a	± 0.421	0.000b	± 0.000	0.000b	± 0.000	0.031	126	Actividad oxido reductasa
4637	Monodehydroascorbate reductase (EC: 1.6.5.4)	Acanthus ebracteatus	gi 117067068	55.54	6.6	47.41	5.29	1.673a	± 0.075	0.000b	± 0.000	0.000b	± 0.000	0.000b	± 0.000	4.2E-09	284	Actividad oxido reductasa
6628	Isocitrate dehydrogenase [NADP] (EC: 1.1.1.42)	Nicotiana tabacum	gi 1708402	54.49	7.23	46.72	6.06	1.499a	± 0.400	1.430a	± 0.375	0.000b	± 0.000	0.000b	± 0.000	0.037	363	Actividad deshidrogenasa
7722	Predicted protein: adenylosuccinate synthetase	Vitis vinifera	gi 225441754	62.92	7.48	53.38	7.10	1.174a	± 0.214	0.000b	± 0.000	0.000b	± 0.000	0.000b	± 0.000	9.4E-05	214	Actividad sintetasa
Traducción, plegamiento y degradación de proteínas																		
10	Translation initiation factor	Carica papaya	gi 151347490	21.25	4.59	17.43	5.60	2.101b	± 0.071	2.298ab	± 0.121	2.405a	± 0.066	2.392a	± 0.046	0.041	91	Unión con ácidos nucleicos
113	Eukaryotic translation initiation factor 5A isoform III	Hevea brasiliensis	gi 33325121	20.97	4.08	17.60	5.60	0.398b	± 0.690	2.245a	± 0.364	2.455a	± 0.167	2.264a	± 0.002	0.027	404	Unión con ácidos nucleicos
4601	Predicted protein: Zn-dependent peptidases	Populus trichocarpa	gi 224141065	71.58	6.50	58.49	6.42	1.883a	± 0.271	0.000 b	± 0.000	0.000 b	± 0.000	0.000 b	± 0.000	1.8E-05	283	Actividad hidrolasa
6451	mRNA-binding protein precursor	Nicotiana tabacum	gi 32746733	45.48	7.19	44.24	6.51	1.804b	± 0.185	2.203a	± 0.207	2.404a	± 0.105	2.411a	± 0.062	0.05	125	Unión de nucleótidos
6705	Glycyl-tRNA synthetase (EC: 6.1.1.14)	Ricinus communis	gi 223548633	83.21	7.13	77.26	6.60	1.338a	± 0.390	0.000b	± 0.000	0.000b	± 0.000	0.000b	± 0.000	0.002	109	Unión con ácidos nucleicos
8550	PAE (Pectina cetylesterase) (EC 3.1.1.6)	Litchi chinensis	gi 192764525	53.43	7.82	52.87	8.51	1.159a	± 0.361	1.023a	± 0.912	0.000b	± 0.000	0.000b	± 0.000	0.046	72	Actividad esterasa
Proteínas de respuesta a estrés																		
4701	Heat shock protein, putative (EC: 1.3.1.74)	Ricinus communis	gi 223532877	86.31	6.47	70.9	5.14	1.134b	± 0.064	1.310b	± 0.066	1.604a	± 0.095	1.625a	± 0.034	0.002	84	Unión
Citosol/Glicolisis																		
2749	Putative germin (GL22)	Arabidopsis thaliana	gi 26449711	80.78	6.12	23.48	8.39	1.771a	± 0.897	1.029b	± 0.081	0.000c	± 0.000	0.000c	± 0.000	0.038	164	Unión
7617	Glyoxysomal beta-ketoacyl-thiolase (EC:	Brassica napus	gi 1066163	57.6	7.57	48.66	8.48	1.981a	± 0.056	1.711b	± 0.093	1.790b	± 0.103	1.675b	± 0.006	0.045	211	Actividad tiolasa

2.3.1.16)

Fijación de Nitrógeno y Metabolismo de Aminoácidos																		
2430	Cysteine synthase (EC: 2.5.1.47) Ketol-acid	Solanum tuberosum	gi 11131626	41.55	6.21	34.34	6.27	2.162a	± 0.129	1.886ab	± 0.127	1.407b	± 0.218	1.624b	± 0.116	0.043	406	Actividad sintasa
4609	reductoisomerase, chloroplast precursor, putative (EC:1.1.1.86)	Ricinus communis	gi 223535574	70.24	6.7	63.23	6.36	1.596a	± 0.340	0.925b	± 0.805	0.000c	± 0.000	0.000c	± 0.000	0.043	109	Actividad oxido reductasa
5414	Transaminase mtnE, putative (EC: 2.6.1.1)	Ricinus communis	gi 223538651	53.81	6.86	50.42	6.95	0.000b	± 0.000	1.347a	± 0.195	1.346a	± 0.120	1.263a	± 0.012	0.000	303	Actividad transferasa
5609	Ketol-acid reductoisomerase, chloroplast precursor (EC 1.1.1.86)	Ricinus communis	gi 223535574	70.31	6.87	63.23	6.36	2.196a	± 0.230	2.050a	± 0.158	1.282b	± 1.112	0.000c	± 0.000	0.043	381	Actividad oxido reductasa
Puntos no identificados																		
104, 1123, 3206, 5205, 9208																		

Leyenda: **Control:** Brotes cultivados sin 6-BAP. **Tipo 1, Tipo 2 y Tipo 3:** Brotes cultivados con 4,44 µM de 6-BAP

*Las proteínas fueron identificadas por MALDI-TOF-TOF y clasificadas de acuerdo a la Enciclopedia de Genes y Genoma de Kioto (KEGG, según sus siglas en inglés)

^a El número de acceso a las bases de datos de acuerdo al SWISS-Prot (sp); NCBI*nr*

^b El *Mr* (en Da) y *pI* de proteínas homólogas fue calculado con la herramienta disponible en el sitio http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html

^c Los términos de función molecular fueron inferidas a partir del KEGG.

Anexo 4. Listado de proteínas identificadas a partir del PC1.

SSP	Nombre de la proteína	Organismo de referencia	No.de acceso a bases de datos ^a	Experimental		Teórico ^b		Control		Tipo 1		Tipo 2		Tipo 3		Valor Mascot	PCA	Molecular Function ^c
				Mr	pI	Mr	pI	X	DS	X	DS	X	DS	X	DS			
Protein translation, folding and degradation																		
8110	Proteasome subunit beta type, putative (EC: 3.4.25.1)	Ricinus communis	gi 223534323	28.35	8.15	32.76	8.26	1.195	±0.742	1.7	±0.047	1.737	±0.065	1.73	±0.019	131	0.982	Hydrolase activity
6108	Proteasome subunit beta type-1 (EC:3.4.25.1)	Petunia x hybrida	gi 17380185	26.88	7.12	24.61	6.3	1.208	±0.801	1.678	±0.037	1.689	±0.082	1.645	±0.017	207	0.971	Hydrolase activity
Chloroplast: Photosynthesis: electron transfer chain																		
7003	Photosystem I reaction center subunit II, chloroplastic	Glycine max	gi 148372347	23.28	7.34	23	9.63	0.93	±0.923	1.603	±0.110	1.568	±0.09	1.657	±0.057	133	0.972	Protein binding
5314	Carbonic anhydrase isoform 1 (EC: 4.2.1.1)	Gossypium hirsutum	gi 4754913	35.75	6.94	34.85	6.94	0.817	±0.067	0.965	±0.045	0.546	±0.474	0.000	0.000	182	0.979	Hydratase activity
Redox Maintenance																		
3417	Lactoylglutathione lyase	Citrus x paradisi	gi 2213425	42.59	6.37	32.64	5.46	1.703	±0.037	1.772	±0.123	1.236	±1.071	0.000	0.000	203	0.982	Lyase activity
Nitrogen Fixation and Aminoacid Metabolism																		
3301	Cytosolic cysteine synthase (EC: 2.5.1.47)	Solanum tuberosum	gi 12081917	41.38	6.25	34.3	5.93	1.896	±0.254	1.946	±0.150	1.299	±1.128	0.000	0.000	182	0.969	Cysteine synthase activity
Unknown biological process																		
3311	Hypothetical protein	Vitis vinifera	gi 147805616	30.89	6.49	27.17	5.64	1.106	±0.732	1.614	±0.118	1.491	±0.082	1.541	±0.013	166	0.969	Unknown molecular function
No identified																		
7073, 9208, 9030																		

Leyenda: **Control:** Brotes cultivados sin 6-BAP. **Tipo 1, Tipo 2 y Tipo 3:** Brotes cultivados con 4,44 µM de 6-BAP

*Las proteínas fueron identificadas por MALDI-TOF-TOF y clasificadas de acuerdo a la Enciclopedia de Genes y Genoma de Kioto (KEGG, según sus siglas en inglés)

^a El número de acceso a las bases de datos de acuerdo al SWISS-Prot (sp); NCBI*nr*

^b El Mr (en Da) y pI de proteínas homólogas fue calculado con la herramienta disponible en el sitio http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html

^c Los términos de función molecular fueron inferidas a partir del KEGG.