

EFEECTO DEL DITIOITREITOL SOBRE FOTOSÍNTESIS, RESPIRACIÓN, OXIDACIÓN Y ACTIVIDAD DE PEROXIDASA Y POLIFENOL OXIDASA DE BROTES *IN VITRO* DE *Picea chihuahuana* MARTINEZ.

Ortiz-Montiel, G.^{2*}, Chávez-Avila, V.¹, Bye, R.¹, Pozos-Ruiz, Y.¹, Ortiz-Melo, M.T.¹

¹ Jardín Botánico, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, C.P. 04510, México, D. F.,

²F. E. S. Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México

*Correspondencia: E-mail: jgerardo@unam.mx

RESUMEN

Se estudió el efecto de ditioneitol (DTT) sobre la actividad fotosintética, respiración y oxidación de brotes de *P. chihuahuana* regenerados *in vitro* a partir del cultivo de embriones cigóticos. El incremento en la actividad polifenoloxidasas (PPO) y peroxidasa soluble (POD) se usaron como marcadores bioquímicos de la oxidación. La presencia de DTT, 0.5 o 1.0 mM, controló efectivamente la oxidación en medio y explantes. Se observó la formación de callo friable en la zona de contacto en medios con DTT. La oxidación en los explantes de *P. chihuahuana* con DTT ocurrió lentamente y solo en el callo en formación, sin progresar al brote durante los tres meses de incubación. Se observó el incremento hasta de tres veces en la actividad peroxidasa y una elevada actividad PPO en los explantes con 0.5 mM de DTT, los explantes en el medio con 1 mM tuvieron valores semejantes a los iniciales sugiriendo un efecto inhibitorio del DTT sobre PPO. La actividad respiratoria de los explantes no fue afectada por el DTT, observándose con 1mM de DTT dicha actividad disminuida. De la misma forma, la actividad fotosintética de los brotes tampoco fue afectada por DTT (0.5 o 1.0 mM). La adición de DTT en el medio con el objeto de controlar la oxidación en *P. chihuahuana* puede ser una opción adecuada en la composición básica de los medios de propagación.

Palabras Clave: *Picea chihuahuana*, oxidación, fotosíntesis, respiración, peroxidasa, polifenoloxidasas.

Abreviaturas: DTT: Ditioneitol; PPO: Polifenol oxidasas; POD: Peroxidasas.

INTRODUCCIÓN.

Uno de los mayores problemas asociados con la micropropagación de plantas es el oscurecimiento u oxidación de los explantes y propágulos que invariablemente llevan a la muerte de los mismos (Madhusudhanan and Rahiman, 2000). Cuando las células se dañan, los contenidos de citoplasma y vacuolas se mezclan y los compuestos fenólicos contenidos se oxidan por el aire, y por las actividades de polifenoloxidasas (PPO) y peroxidasa (POD). La actividad peroxidasa soluble se relaciona fuertemente con la oxidación de compuestos fenólicos y ácido indolacético (Ros-Barceló *et al.*, 1990), explicando de esta forma que un incremento en esta actividad pueda ser un marcador de enraizamiento (von Arnold and Grönroos; 1986 Grönroos,

ABSTRACT

We evaluated the effect of 1,4-dithio-DL-threitol (DTT) on photosynthetic activity, respiration, browning and necrosis of *P. chihuahuana* shoots, regenerated from cultured zygotic embryos under *in vitro* conditions. The increase in polyphenoloxidase (PPO) activity and soluble peroxidase (POD) activity was used as a biochemical marker for oxidation. The presence of DTT (0.5 or 1.0 mM) controlled effectively the browning of the medium and the explants. A friable callus mass was obtained at the contact zone with DTT. The browning of *P. chihuahuana* explants with DTT occurred slowly and affected only the developing callus; it did not affect the shoot during the three-month incubation. An increment of POD activity (three times higher than the control) and elevated PPO activity was observed in the explants on 0.5 mM DTT medium, whereas the explants on medium added with 1 mM DTT presented similar values as initial, suggesting an inhibitory effect of DTT on PPO. The respiratory activity of the explants was not affected by DTT, although it diminished in the 1 mM DTT. Similarly, the photosynthetic activity of the shoots was not affected by DTT (0.5 or 1.0 mM). The addition of DTT to control *P. chihuahuana* browning may be adopted as a basic element in the preparation of propagation media.

Key words: *Picea chihuahuana*, oxidation, photosynthesis, respiration, peroxidase, polyphenoloxidase.

Abbreviations: DTT: 1,4-dithio-DL-threitol; IAA: indol-3-acetic acid; PPO: polyphenoloxidase; POD: peroxidase.

INTRODUCTION.

One of the major problems associated with plant micropropagation is the browning and necrosis of explant and propagule tissues, which invariably leads to their death (Madhusudhanan and Rahiman, 2000). When cells are damaged, cytoplasm and vacuole liquids are mixed while polyphenols and peroxides are oxidized by air and by polyphenoloxidase (PPO) and peroxidase (POD) activity. Soluble peroxidase activity is strongly related with the oxidation of phenolic and indolacetic acid compounds (Ros-Barceló *et al.*, 1990), thus explaining how the increase of this activity may be a marker for rooting activity (von Arnold and Grönroos, 1986; Grönroos, 1987). On the other hand, cell wall-bound peroxidase activity is associated with wound

1987) y la unida a la pared celular se asocia con respuesta a lesiones o daño celular y la formación de ligninas. Tanto la PPO como la POD son enzimas capaces de catalizar la formación de quinonas a partir de compuestos fenólicos en pinos en cultivo *in vitro*; estos productos de oxidación pueden inhibir la actividad enzimática del metabolismo basal, afectando el metabolismo fotosintético o respiratorio y resultar en un oscurecimiento del medio de cultivo y subsecuentemente el oscurecimiento y muerte del tejido (Laukkanen *et al.*, 1999). Esta oxidación ha sido controlada en diferentes especies incorporando al medio de cultivo carbón activado o antioxidantes como polivinilpolipirrolidona (PVPP), 1,4-ditio-DL-threitol (Tang *et al.*, 2004), ácido ascórbico o cisteína (Madhusudhanan and Rahiman, 2000). El mismo problema se ha observado *in vitro* en gimnospermas: en protoplastos y callos de *Pinus oocarpa* y *P. patula* (Lainé *et al.*, 1988), en callos de *Pinus sylvestris* (Laukkanen *et al.*, 1999), *Pinus lambertiana* (Gupta and Durzan, 1986), *Picea engelmannii* y *Picea glauca* (Roberts *et al.*, 1990) y en otras especies de coníferas donde la aplicación de PVP, ácido ascórbico, ácido cítrico o carbón activado no ha controlado este oscurecimiento (Hohtola 1988; Laukkanen *et al.*, 1997). En especies de pino también se ha observado una asociación de este fenómeno con la actividad PPO y POD, así como con un incremento en la concentración de taninos (Laukkanen *et al.*, 1997; 1999). El ditiotreitol (DTT), es un compuesto tiol con actividad fuertemente reductora y es uno de los principales agentes inhibidores de la actividad de la polifenoloxidasas presente en cloroplasto (Negishi and Ozawa, 2000), su aplicación solo o en combinación con auxinas también está relacionada con su capacidad inductora de la formación de raíz en varias especies como *Malus domestica* (Auderset *et al.*, 1996), *Mandevilla sp.*, *Dipladenia sp.* y *Daphne odora* (Auderset *et al.*, 1997).

Picea chihuahuana Martínez (Pinaceae), "pinabeto espinoso", es endémico de México en escasas áreas de la Alta Tarahumara, Chihuahua y Durango. En los últimos años sus poblaciones se están perdiendo en forma alarmante. Las poblaciones de *P. chihuahuana* son relictas, muy valiosas por su información biológica y no obstante que formó bosques abundantes en México, sus escasas poblaciones no se han estudiado y se desconoce el potencial que pudieran tener (madera, resinas, aceites, celulosa, etc.), aun cuando *Picea* es el género maderable más importante de América del Norte. Es utilizado como leña, en ocasiones para muebles y las puntas son cortadas para usarlas como arbolitos de navidad. Es un recurso natural importante para los Tarahumaras no sólo por sus usos religiosos sino como fuente de madera para sus diversas actividades, además, proporciona la cubierta vegetal para varias especies y evita la erosión de las inclinadas pendientes en que crece. Su propagación no ocurre en forma eficiente en la naturaleza, ni en vivero, por lo que Mata-Rosas *et al.* (2001), regeneraron *in vitro* brotes adventicios a partir de embriones cigóticos de *Picea chihuahuana*, sin embargo, una seria limitante en este sistema de reproducción es la frecuente muerte de los brotes por necrosis (oxidación), fenómeno que sólo se ha

response or cell damage repair and lignification. Both PPO and POD enzymes are capable to catalyze quinone production from phenolic precursors in pine trees under *in vitro* culture; these oxidation products may inhibit basal metabolic enzyme activity and affect photosynthesis or respiration, which results in the browning of the culture medium and the subsequent browning and death of tissues (Laukkanen *et al.*, 1999). This reaction has been controlled in different species by incorporating into the culture medium activated coal or antioxidants like polyvinylpolypyrrolidone (PVPP), 1,4-dithio-DL-threitol (Tang *et al.*, 2004), ascorbic acid or cysteine (Madhusudhanan and Rahiman, 2000). The problem has been observed in several gymnosperm species *in vitro*: in protoplasts and callus from *Pinus oocarpa* and *P. patula* (Lainé *et al.*, 1988), in callus from *Pinus sylvestris* (Laukkanen *et al.*, 1999), *Pinus lambertiana* (Gupta and Durzan, 1986), *Picea engelmannii* and *Picea glauca* (Roberts *et al.*, 1990) as well as in other conifers for which the application of PVP, ascorbic acid, citric acid or activated coal did not control this darkening (Hohtola, 1988; Laukkanen *et al.*, 1997). In pine species, moreover, this phenomenon has been associated with PPO and POD activity, as well as with increasing tannin concentrations (Laukkanen *et al.*, 1997; 1999). The 1,4-dithio-DL-threitol (DTT) compound is a thiol compound with strong reductive activity and is one of the principal inhibitors of the polyphenoloxidase activity in the chloroplast (Negishi and Ozawa, 2000); its application, pure or in combination with auxins, is also related with the rooting capacity in several species like *Malus domestica* (Auderset *et al.*, 1996), *Mandevilla sp.*, *Dipladenia sp.* and *Daphne odora* (Auderset *et al.*, 1997).

Picea chihuahuana Martínez (Pinaceae), "pinabeto espinoso", is endemic in Mexico and scarcely found in the Tarahumara Mountains in the Federal States of Chihuahua and Durango. Over the last years, its populations have diminished alarmingly. The relict *P. chihuahuana* populations provide important biological information and, although they once constituted abundant forests in Mexico, its scarce populations have not been studied. Moreover, notwithstanding the importance of the *Picea* genus in the North American wood production, the potential of *P. chihuahuana* (for wood, resins, oils, cellulose, etc.) is yet unknown. It is used as firewood and occasionally for furniture, while the top is cut off as Christmas tree. It is an important natural resource for the Tarahumara tribes, not only because of its religious uses, but also as a source of wood for their diverse activities. Moreover, it provides vegetative protection for several other species, and prevents erosion of the steep hills on which it grows.

Due to its difficult propagation both under natural circumstances as in nurseries, Mata-Rosas *et al.* (2001) regenerated *in vitro* adventitious shoots from zygotic embryos of *Picea chihuahuana*. However, a serious disadvantage of this methodology is the frequent death of the shoots by browning and necrosis, a phenomenon that is only partially controlled by the application of activated coal and antioxidants in the culture medium (Mata-Rosas *et al.*, 2001).

controlado parcialmente con carbón activado y antioxidantes en el medio de cultivo con resultados variables (Mata-Rosas *et al.*, 2001).

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la aplicación de ditiotreitól sobre la actividad fotosintética, respiración y oxidación de los brotes de *P. chihuahuana* utilizando como marcadores bioquímicos de la oxidación el incremento en la actividad polifenoloxidasas y peroxidasa.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron brotes verdes de *P. chihuahuana* cultivados *in vitro* por 6 meses con 8 ± 2 mm de altura. Estos fueron asépticamente cortados en dos o tres fracciones y transferidos a un medio de cultivo SH (Schenk and Hildebrandt, 1972), a la mitad de su concentración con $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de Mio-inositol, $6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de agar, $15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sacarosa, pH 5.8 y diferentes concentraciones de DTT: Medio A: 0 mM DTT, Medio B: 0.5 mM DTT y Medio C: 1 mM DTT. En todos los casos se utilizaron frascos de vidrio de 70 mL de capacidad y con 20 mL de medio y tres repeticiones por tratamiento. Todos los medios se esterilizaron en autoclave a $121 \text{ }^\circ\text{C}$, por 15 min y los explantes se incubaron a $25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, con fotoperiodo 16 horas de luz y $90 - 100 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de radiación fotosintéticamente activa (PAR). La actividad de POD y PPO se determinó de acuerdo a lo propuesto por Laukkanen *et al.* (1999), con las siguientes modificaciones. Se maceró el tejido (20 - 90 mg de peso fresco), en nitrógeno líquido y se homogeneizó con 3 mL de amortiguador de fosfato de sodio 100 mM y pH 7.5, se centrifugó a 13000 g, 15 min, 4°C ; sólo para POD se resuspendió el sedimento con 3 mL del mismo amortiguador, pero con NaCl 1 M incubándolo por 24 horas para volver a centrifugarlo y obtener el sobrenadante como extracto de POD unida a pared celular. La actividad de POD soluble se determinó con 100 μL de extracto, 1300 μL de amortiguador de fosfato de sodio 100 mM, pH 5.5; 500 μL de guayacol 10 mM y 100 μL de H_2O_2 20 mM. Se midió como el cambio de absorbancia a 470 nm durante 5 min. La actividad de PPO se determinó con 500 μL de extracto adicionados a la mezcla de reacción conteniendo amortiguador de fosfato de sodio 100 mM y pH 8.7, con 10 mM de catecol. Se midió el cambio de absorbancia a 410 nm durante 5 min de incubación a $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

La clorofila se extrajo macerando el tejido en oscuridad en acetona al 80 % (4°C), se centrifugó a 10000 Gs por 5 min y se determinó su absorbancia a 647 y 664 nm calculando las concentraciones de clorofila a y b de acuerdo con Hall y Rao (1994). Ambas determinaciones se realizaron en un espectrofotómetro Perkin Elmer Mod. *Lambda 2*. La actividad fotosintética se determinó mediante un analizador infrarrojo de CO_2 (CI - 301, CID, Inc.), en sistema cerrado con una cámara de 10 mL. La respiración se determinó directamente por medición polarográfica de oxígeno mediante un electrodo de Clark en un Oxímetro YSI 5300.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En algunos de los explantes originales se observó una ligera clorosis por lo que se determinó la concentración de

The objective of this work was to evaluate the effect in to medium of 1,4-dithio-DL-threitol on photosynthetic activity, respiration, browning and necrosis of *P. chihuahuana* shoots, by considering the increase of polyphenoloxidase and peroxidase activity as biochemical markers for oxidation.

MATERIALS AND METHODS

Green *P. chihuahuana* shoots were used, 8 ± 2 mm high, derived from a six-month *in vitro* culture. The shoots were aseptically cut in two or three fractions and placed in a half-concentrated SH culture medium (Schenk and Hildebrandt, 1972) with $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ mioinositol, $6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ agar, $15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ sucrose, pH 5.8 and two different concentrations of DTT: Medium A - 0 mM DTT; Medium B - 0.5 mM DTT; and Medium C - 1 mM DTT. Always using 70 ml glass bottles with 20 ml medium and three repetitions per treatment. All media were sterilized by autoclaving at $121 \text{ }^\circ\text{C}$ for 15 min and explants were incubated at $25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ under a photoperiod of 16 hours illumination and $90 - 100 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ radiation.

The POD and PPO activity was determined following the methodology proposed by Laukkanen *et al.* (1999), with the following modifications. Tissue (20 - 90 mg fresh weight) was macerated in liquid nitrogen, homogenized with 3 ml 100 mM sodium phosphate buffer, pH 7.5, and centrifuged at 13000 Gs, 15 min, $4 \text{ }^\circ\text{C}$. For cell wall-bound POD the sediment was resuspended with 3 ml of the same buffer but with 1 M NaCl and incubated for 24 hours, followed by a second centrifugation to obtain the supernatant cell wall-bound POD extract.

The soluble POD activity was determined using 100 μL extract, 1300 μL 100 mM sodium phosphate buffer, pH 5.5, 500 μL 10 mM guayacol and 100 μL 20 mM H_2O_2 ; the absorption change was monitored at 470 nm for 5 min.

PPO activity was determined by adding 500 μL extract to the reaction mixture containing 100 mM sodium phosphate buffer, pH 8.7, and 10 mM catecol. The absorption change was registered at 410 nm for 5 min at $25 \text{ }^\circ\text{C}$ incubation.

Chlorophyll was extracted by macerating tissue in obscurity with 80 % acetone ($4 \text{ }^\circ\text{C}$), followed by centrifugation at 10000 Gs for 5 min, absorbance determination at 647 and 664 nm and calculation of chlorophyll a and b concentrations as proposed by Hall and Rao (1994).

Both determinations were realized with a Perkin Elmer Mod. *Lambda 2* spectrophotometer. Photosynthetic activity was measured by an infrared CO_2 analyzer (CI - 301, CID Inc.) with a 10 mL closed loop chamber. Respiration was determined directly by polarographic oximetry by using a Clark electrode (Oximeter YSI 5300).

RESULTS AND DISCUSSION

Some of the original explants presented slight chlorosis (Fig. 1). However, no significant differences were found between chlorophyll a, b and total concentrations, indicating that the chlorosis was probably associated with illumination quality and quantity during the culture (Boeuf *et al.*, 1999).

clorofila a, b y total (Fig. 1), sin encontrar diferencias significativas entre ellos, clorosis que probablemente estuvo asociada con la calidad y cantidad de luz durante el cultivo (Boeuf *et al.*, 1999).

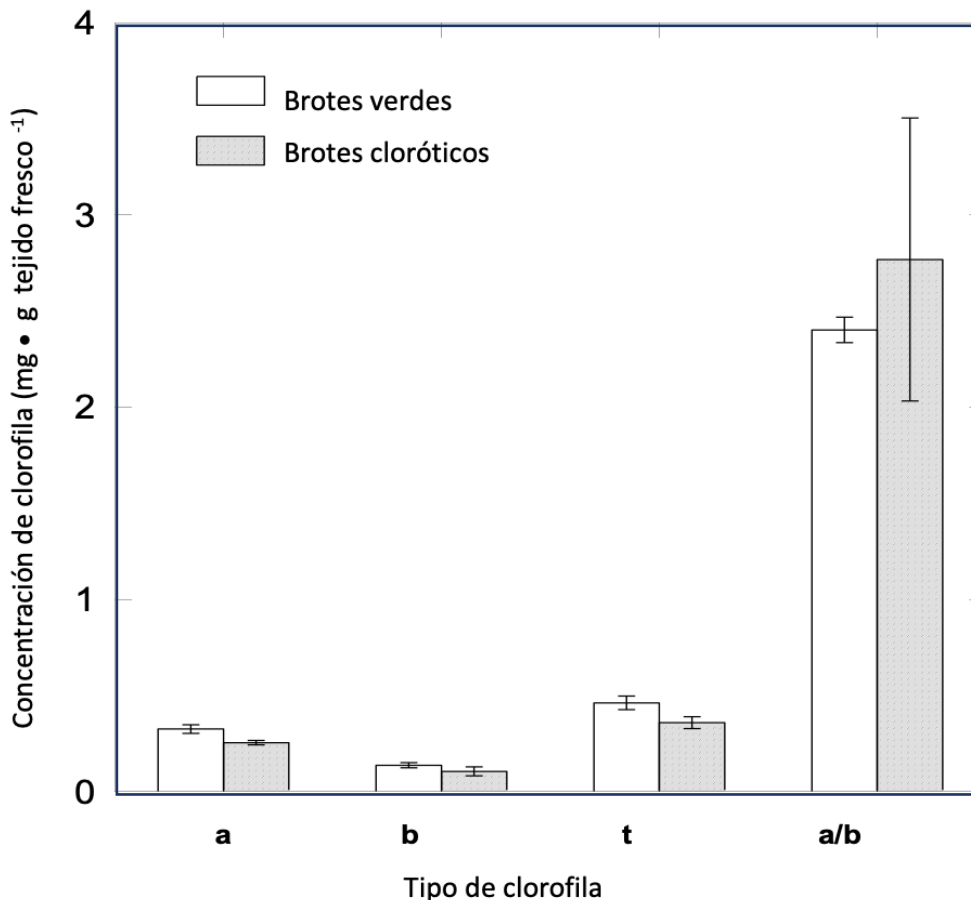


Fig.1 Concentración de clorofila a, b, total (t) y relación clorofila a/b, en brotes de *P. chihuahuana* cloróticos y normales (verdes), bajo cultivo *in vitro*. Las barras representan el promedio de tres repeticiones \pm la desviación estándar. No se observaron diferencias significativas t de Student ($p = 0.05$).

Fig.1 Chlorophyll a, b, total and a/b concentrations in chlorotic and normal (green) *P. chihuahuana* buds under *in vitro* culture. Vertical lines represent mean values from three repetitions \pm standard deviation. No significant differences were found ($p = 0.05$) t of Student.

Se llevó a cabo una evaluación previa de la actividad POD soluble y unida a pared celular y de PPO soluble, en brotes cultivados en el mismo medio de cultivo pero sin DTT, y con sacarosa 15 o 30 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, encontrando una disminución significativa de la actividad POD soluble al incrementarse la sacarosa y un incremento de la actividad POD unida a pared relacionada también con el incremento de la sacarosa (Fig.2); de acuerdo a estos resultados con sacarosa 15 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ se incrementa la actividad de la enzima asociada con el catabolismo de AIA y la oxidación de fenoles y con sacarosa 30 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ se incrementa la lignificación de los brotes.

A previous evaluation of soluble and cell wall-bound POD activity and soluble PPO activity of shoots, which were derived from the same culture medium but without DTT, and with 15 or 30 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ sucrose, showed a significant decrease in soluble POD activity with increasing sucrose levels as well as an increase in cell wall-bound POD activity with increasing sucrose levels (Fig. 2). As such, 15 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ sucrose activates the enzyme associated with indolacetic acid catabolism and phenol oxidation, while 30 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ sucrose induces shoot lignification. It has been observed that lignification, darkening and subsequent death of suspended *Picea abies* cells is also associated with the application of high concentrations of cytokinins like kinetin (Simola *et al.*, 1992). The PPO activity was not affected by the sucrose concentrations used. As a result of the former, the 15 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$

sucrose concentration was used as culture medium to obtain maximum levels of oxidized compounds

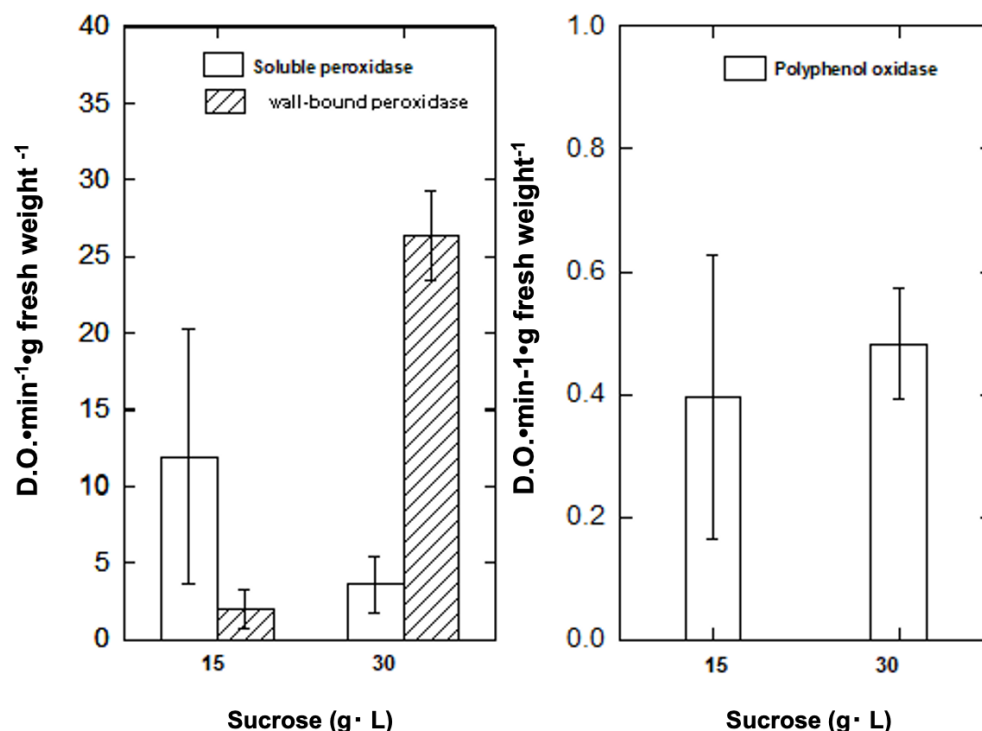


Fig. 2 Efecto de la concentración de sacarosa sobre la actividad de peroxidasa (soluble y unida a pared celular), y actividad polifenoloxidasas soluble en brotes de *P. chihuahuana* bajo cultivo *in vitro*. Las barras representan el promedio de tres repeticiones \pm desviación estándar.

Fig. 2 Effect of sucrose concentration on peroxidase activity (soluble and cell wall-bound) and soluble polyphenoloxidase activity in *P. chihuahuana* buds under *in vitro* culture. Vertical lines represent mean values from three repetitions \pm standard deviation.

Se ha observado que la lignificación, el oscurecimiento y después la muerte de células en suspensión de *Picea abies*, están también asociadas a la aplicación de altas concentraciones de citocininas como la cinetina (Simola *et al.*, 1992).

La actividad de la PPO no presentó cambios en ambas concentraciones de sacarosa. Por lo anterior se seleccionó la concentración de sacarosa 15 g·L⁻¹ en el medio de cultivo, para que se expresaran los mayores valores de oxidación de los tejidos. La inducción de la formación de raíz en los brotes por la adición de DTT al medio, se ha propuesto como un efecto adicional a la inhibición de la actividad de la PPO (Auderset *et al.*, 1997). Sin embargo, no se observó la formación de raíz en ningún caso para esta especie. La dificultad de enraizamiento en coníferas se ha encontrado en especies como: *Pinus taeda* (McKeand and Allen, 1984), *Picea glauca* (Hakman and von Arnold, 1988) y en *Pinus ayacahuite* en donde la mejor opción fue la inducción de raíz mediante compuestos difundidos a partir de *Agrobacterium tumefaciens* (Saborio *et al.*, 1999). La presencia de DTT 0.5 o 1.0 mM controló efectivamente la oxidación en el medio y en los explantes; los primeros signos de oscurecimiento por oxidación fueron asincrónicos, lo que concuerda con lo observado por Laukkanen *et al.* (1999), en cultivos de *Pinus*

in the tissues. A dual effect of DTT has been proposed, one on inhibition PPO activity and one as root formation stimulator (Auderset *et al.*, 1997). However, no root formation was observed for this species. The difficult root formation of conifers has been found for such species as: *Pinus taeda* (McKeand and Allen, 1984), *Picea glauca* (Hakman and von Arnold, 1988) and *Pinus ayacahuite*, for which the best root formation was obtained by using compounds from *Agrobacterium tumefaciens* (Saborio *et al.*, 1999). The presence of 0.5 or 1.0 mM DTT effectively controlled browning of the medium and explants. The first signs of darkening by oxidation of compounds were asynchronous, as was previously observed by for *Pinus sylvestris* cultures (Laukkanen *et al.*, 1999). Some explants started browning some days after tissue cleavage, and this progressed to maximal levels at 30 days for treatments without DTT (Table 1). All explants with DTT formed a friable callus mass in the contact zone with the medium, which does not coincide with the results of Auderset *et al.* (1997) who observed the absence or strong diminution of callus formation with DTT for *Daphne odora*, *Mandevilla sanderi* and *Malus domestica*. Browning of *P. chihuahuana* explants with DTT was found only in the callus without affecting the bud during the three-month incubation.

Tabla 1. Efecto de la presencia de Ditiotreitól en el medio sobre la oxidación de brotes de *P. chihuahuana* durante 3 meses de incubación.
 Table 1. Effect of dithiothreitol on *P. chihuahuana* shoot browning during three-month incubation.

Medium	DTT (mM)	Medium oxidation *	Apparent tissue browning % **			Explants after 90 days
			30	60	90	
A	0	++	30	100	100	browning without callus
B	0.5	-	20	20	30	Green with browning callus
C	1.0	-	20	30	30	Green elongated with browning callus

*La oxidación en el medio se caracterizó con base en el color aparente del mismo con tres valores. ++ presencia de color café, + oscurecimiento ligero y - sin cambio.

**La oxidación de tejido se determinó de acuerdo con la proporción del explante en color café.

*Medium oxidation is characterized by colour change in three degrees: ++ brown coloration, + slight darkening and – without change.

**Tissue browning was determined as the brown coloured proportion of the explant.

No se registró actividad enzimática ni respiratoria o fotosintética en los explantes de los medios sin DTT después de 90 días (tabla 2), lo que comprobó su completa oxidación y muerte. Sin embargo, los explantes en el medio B y C presentaron crecimiento con elongación de brotes verdes, lo que probablemente es un indicio del efecto del DTT.

There was no enzymatic, respiratory or photosynthetic activity in the explants from media A without DTT after 90 days (Table 2), which confirms oxidation and their death. However, explants from media B and C presented elongated growth with green shoots, which is probably indicative for the DTT effect.

Tabla 2. Efecto de la presencia de Ditiotreitól en el medio sobre la Actividad Peroxidasa y Polifenoloxidasas en brotes de *P. chihuahuana*.

Table 2. Effect of dithiothreitol on peroxidase activity and polyphenoloxidase activity in *P. chihuahuana* shoots.

Medio	Actividad Peroxidasa soluble DO min ⁻¹ g ⁻¹		Actividad Polifenoloxidasas DO min ⁻¹ g ⁻¹	
	Días de incubación		Días de incubación	
	0	90	0	90
A	1.4000 ± 0.37b	0.0000a	0.1500 ± 0.08b	0.0000a
B		4.3800 ± 0.11b		0.3100 ± 0.11b
C		3.3660 ± 1.23b		0.2100 ± 0.09 b

Los valores son promedio de seis repeticiones ± desviación estándar

Letras iguales indican que no presentaron diferencias significativas con Tukey (p = 0.05)

Medio A) SH (Schenk and Hildebrandt, 1972), a la mitad de su concentración con 100 mg•L⁻¹ de Mio-inositol, 6 g•L⁻¹ de agar, 15 g•L⁻¹ de sacarosa, pH 5.8. Medio B) Idéntico más 0.5 mM de DTT. Medio C) Idéntico más 1 mM de DTT.

Values are mean values from three repetitions ± standard deviation

No significant differences are found (p = 0.05) Tukey Test with the same letters

Medium A) SH (Schenk and Hildebrandt, 1972), at half its concentration with 100 mg•L⁻¹ of Myo-inositol, 6 g•L⁻¹ of agar, 15 g•L⁻¹ of sucrose, pH 5.8 . Medium B) Identical plus 0.5 mM DTT. Medium C) Identical plus 1 mM DTT.

Se observaron incrementos hasta de tres veces en la actividad peroxidasa de los brotes en los medios B y C, aun cuando estas determinaciones se propone, pueden ser marcadores bioquímicos de enraizamiento (Grönroos, 1987), en este trabajo no se asociaron con la formación de raíz; por lo que estos datos pueden estar relacionados a lo observado por Johnson-Flanagan y Owens (1985), quienes mencionan la presencia de un incremento de la actividad peroxidasa soluble asociada con la formación de súber y oxidación de tejidos (raíces) en *Picea glauca*. Por otro lado, se observó una elevada actividad PPO en los explantes con DTT 0.5 mM

A three-times increment of the peroxidase activity of shoots in medium B and C was observed than the initial value. However, though this activity has been proposed as a biochemical marker for rooting (Grönroos, 1987), no such association was found in this work; on the other hand, this activity may support the observations of Johnson-Flanagan and Owens (1985) who associate an increase in soluble peroxidase activity with wound periderm formation and oxidation of root compounds from *Picea glauca*. PPO activity was elevated for explants with 0.5 mM DTT, but not for explants with 1 mM DTT which presented constant

no así para los explantes en presencia de DTT 1 mM cuyos valores fueron semejantes a los iniciales, lo que sugiere un efecto inhibitorio del DTT sobre esta enzima, de acuerdo a lo encontrado por Auderset *et al.* (1997) y Negishi and Ozawa (2000).

values, suggesting a inhibitory effect of DTT upon this enzyme, as was also found by Auderset *et al.* (1997) and Negishi and Ozawa (2000).

Tabla 3. Efecto de la presencia de Ditiotreitolo en el medio sobre la Actividad Fotosintética y respiratoria en brotes de *P. chihuahuana*.

Table 3. Effect of dithiothreitol on the photosynthetic and respiratory activity in *P. chihuahuana* shoots.

Medio	Actividad respiratoria nmol O ₂ consumido min ⁻¹ g ⁻¹		Actividad fotosintética Ppm de CO ₂ fijado min ⁻¹ g ⁻¹	
	Días de incubación		Días de incubación	
	0	90	0	90
A	12.54 ± 1.32b	0.000a	31.23 ± 3.32b	0.00a
C		11.26 ± 2.31b		27.10 ± 5.1b
E		7.11 ± 2.51b		41.70 ± 7.1b

Los valores son promedio de tres repeticiones ± desviación estandar

Letras iguales indican que no presentaron diferencias significativas con Tukey (p = 0.05)

Medio A) SH (Schenk and Hildebrandt, 1972), a la mitad de su concentración con 100 mg•L⁻¹ de Mio-inositol, 6 g•L⁻¹ de agar, 15 g•L⁻¹ de sacarosa, pH 5.8. Medio B) Idéntico más 0.5 mM de DTT. Medio C) Idéntico más 1 mM de DTT.

La actividad respiratoria de los explantes pareció no haber sido afectada por el DTT (tabla 3), aún con 1 mM observándose dicha actividad disminuida y asociada con la mayor actividad fotosintética registrada (41.70 ppm de CO₂ fijado•min⁻¹•g⁻¹). De la misma forma la actividad fotosintética de los brotes tampoco fue afectada por DTT (0.5 o 1.0 mM). Aun cuando es necesario determinar la respuesta oxidativa de los brotes en medios de cultivo con hormonas y su interacción con la presencia de DTT, la adición de éste en el medio con el objeto de controlar la oxidación en *P. chihuahuana* puede ser una opción adecuada en la composición básica de los medios de propagación de esta especie.

The respiratory activity of the explants was not affected seriously by DTT (Table 3), even though the 1 mM treatment shows diminished respiration and incremented photosynthesis (41.70 ppm fixed CO₂•min⁻¹•g⁻¹). Also, the photosynthetic activity of the shoots was not affected by DTT (0.5 or 1.0 mM). Although additional response studies with other hormones against shoot browning are needed, browning in *P. chihuahuana* may be adequately controlled by adding DTT as a basic element in the preparation of propagation media.

REFERENCIAS

- Auderset G., C. Moncouisin, J. O'Rourke and D.J. Morré. 1996. Stimulation of root formation by thiol compounds. *HortScience* 31: 240 - 242.
- Auderset G., C. Moncouisin, J. O'Rourke and D.J. Morré. 1997. Stimulation of root formation in difficult to root woody cuttings by dithiothreitol. *Int. J. Plant Sci.* 158(2):132 - 135. <https://doi.org/10.1086/297422>
- Boeuf, G., B. Legrand and S. Rambur. 1999. Influence of light conditions on development, apoplastic peroxidase activities and peroxidase isoenzymes in chicory root explants. *Physiol. Plant.* 106:331 - 336. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.1999.106311.x>
- Grönroos, R. and S. von Arnold. 1987. Initiation of roots on hypocotyl cuttings of *Pinus contorta in vitro*. *Physiol. Plant.* 69: 227 - 236. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1987.tb04280.x>
- Grönroos, R. 1987. Rooting of *Pinus sylvestris* and *Pinus contorta* hypocotyl cuttings *in vitro*. Thesis Ph D. Department of Physiological Botany, Uppsala University, Uppsala, Sweden.
- Hakman, I. and S. von Arnold. 1988. Somatic embryogenesis and plant regeneration from suspension cultures of *Picea glauca* (White spruce). *Physiol. Plant.* 72: 579 - 587. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1988.tb09168.x>
- Hall, D.O. and K.K. Rao. 1994. Photosynthesis., 4^a. ed., Cambridge University Press. [https://doi.org/10.1016/0307-4412\(93\)90161-R](https://doi.org/10.1016/0307-4412(93)90161-R)
- Hohtola, A. 1988. Seasonal changes in explant viability and contamination of tissues culture from mature Scots pine. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 15: 211 - 222. 10.1007/BF00033645
- Johnson-Flanagan, A.M. and J.N. Owens. 1985. Peroxidase activity in relation to suberization and respiration in white spruce (*Picea glauca* [Moench] Voss) seedling roots. *Plant Physiol.* 79: 103 - 107. [10.1104/pp.79.1.103](https://doi.org/10.1104/pp.79.1.103)
- Lainé, E., H. David and A. David. 1988. Callus formation from cotyledon protoplasts of *Pinus oocarpa* and *Pinus patula*. *Physiol. Plant.* 72: 374 - 378. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1988.tb05847.x>
- Laukkanen, H., H. Häggman, S. Kountunen-Soppela and A. Hohtola. 1999. Tissue browning of *in vitro* cultures of Scots pine: Role of peroxidase and polyphenol oxidase. *Physiol. Plant.* 106: 337 - 343. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.1999.106312.x>
- Laukkanen, H., R. Julkunen-Tiitto and A. Hohtola. 1997. Effect of different nitrogen nutrients on the viability, protein synthesis and tannin production of Scots pine callus. *Physiol. Plant.* 100:982 - 988. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1997.tb00026.x>
- Madhusudhanan, K. and B.A. Rahiman. 2000. The effect of activated charcoal supplemented media to browning of *in vitro* cultures of *Piper* species. *Biologia Plantarum* 43 (2): 297 - 299. <https://doi.org/10.1023/A:1002729032527>
- Mata-Rosas M., Chávez Avila V.M. and R.B. Boettler. 2001. *In vitro* regeneration of plantlets from immature zygotic embryos of *Picea chihuahuana* Martínez, an endemic Mexican endangered species. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 37:73-78. <https://www.jstor.org/stable/4293421>
- McKeand, S.E. and H.L. Allen. 1984. Nutritional and root development factors affecting growth of tissue culture plantlets of loblolly pine. *Physiol. Plant.* 61: 523 - 528. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1984.tb06367.x>
- Negishi, O. and T. Ozawa. 2000. Inhibition of enzymatic browning and protection of sulfhydryl enzymes by thiol compounds. *Phytochemistry* 54: 481 - 487. [10.1016/s0031-9422\(00\)00125-4](https://doi.org/10.1016/s0031-9422(00)00125-4)
- Roberts, D.R., B. S. Flinn, D.T. Webb, F.B. Webster and B.C.S. Sutton. 1990. Abscisic acid and indole-3-butyric acid regulation of maturation and accumulation of storage proteins in somatic embryos of interior spruce. *Physiol. Plant.* 78: 355 - 360. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1990.tb09048.x>
- Ros-Barceló A., M.A. Pedreño, M.A. Ferrer, F. Sabater and R. Muñoz. 1990. Indole -3- methanol is the main product of the oxidation of indole -3- acetic acid catalyzed by two cytosolic basic isoperoxidases from *Lupinus*. *Planta* 181: 448 - 450.
- Saborio, F., M.M. Moloney, P. Tung and T. A. Thorpe. 1999. Root induction in *Pinus ayacahuite* by co-culture with *Agrobacterium tumefaciens* strains. *Tree Physiology* 19:383 - 389. [10.1093/treephys/19.6.383](https://doi.org/10.1093/treephys/19.6.383)
- Schenk, R.U. and A.C. Hildebrandt. 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can. J. Bot.* 50: 199 - 204. <https://doi.org/10.1139/b72-026>
- Simola, L.K., J. Lemmetyinen and A. Santanen. 1992. Lignin release and photomixotrophism in suspension cultures of *Picea abies*. *Physiol. Plant.* 84: 374 - 379. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1992.tb04678.x>
- Tang W., L. C. Harris, V. Outhavong and R. J. Newton. 2004. Antioxidants enhance *in vitro* plant regeneration by inhibiting the accumulation of peroxidase in Virginia pine (*Pinus virginiana* Mill.) *Plant Cell Rep.* 22:871-877. [10.1007/s00299-004-0781-3](https://doi.org/10.1007/s00299-004-0781-3)
- von Arnold, S. and R. Grönroos. 1986. Anatomical changes and peroxidase activity after cytokinin treatments inducing adventitious bud formation on embryos of *Picea abies*. *Bot. Gaz.* 147: 425-431. <https://www.jstor.org/stable/2474559>