

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

PROBLEMAS DE OXIDACIÓN Y OSCURECIMIENTO DE EXPLANTES CULTIVADOS *IN VITRO*¹

Álvaro Azofeifa²

RESUMEN

Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. En el presente trabajo se hace una revisión de literatura sobre aspectos relacionados al oscurecimiento de los explantes cultivados *in vitro*, fenómeno frecuente en varias especies, especialmente en las leñosas, con importantes implicaciones prácticas y económicas. Con el propósito de alcanzar un mayor entendimiento del fenómeno se abordan aspectos sobre causas, desarrollo, utilidad biológica, factores desencadenantes, entre otros. Finalmente se indican una serie de medidas y estrategias exitosas que se han empleado para solventar este problema.

Palabras clave: Antioxidantes, estrés oxidativo, fenoles, oscurecimiento de tejidos, necrosis.

ABSTRACT

Oxidation and browning of problems in explants grown *in vitro*. The present review focuses on several aspects related to the browning of tissue culture explants grown *in vitro*. This situation is frequently observed in several species, especially in woody plants, with important economic and practical implications. In order to achieve a better understanding of the phenomenon, this review discusses aspects of the causes, development, biological utility and triggering factors, among others. Finally, a list containing a series of measures and strategies that have been successfully employed to solve the problem is presented.

Key words: Antioxidants, browning, oxidative stress, necrosis, phenolic compounds.



INTRODUCCIÓN

La oxidación es el proceso a través del cual un átomo, o grupo de átomos, pierde uno o más electrones (se oxida) y los cede a otro (el cual se considera reducido). En sustratos orgánicos, la oxidación y reducción involucra la participación de átomos de carbono enlazados en forma covalente a otros átomos (Karp 1998).

La oxidación u oscurecimiento de tejidos cultivados *in vitro*, se puede definir como la oxidación, por radicales libres, de diferentes componentes celulares, así como, la oxidación de compuestos fenólicos catalizado por la enzima polifenol oxidasa (PPO) para producir quinonas, las cuales son especies químicas muy reactivas y propensas a reaccionar, generando daño e incluso la muerte celular (Amiot *et al.* 1996, Bray *et al.* 2000).

¹ Recibido: 5 de febrero, 2008. Aceptado: 20 de marzo, 2009.

² Centro para la Investigación en Granos y Semillas (CIGRAS). Facultad de Ciencias Agroalimentarias, Universidad de Costa Rica. 2060 San Pedro de Montes de Oca, San José, Costa Rica. alvaro.azofeifa@ucr.ac.cr

ORIGEN Y FACTORES DESENCADENANTES

La mayoría de radicales libres se producen a partir del metabolismo del oxígeno y se les llama especies de oxígeno reactivo o intermediarios de oxígeno reactivo (ROS). Estas son formas parcialmente reducidas del oxígeno atmosférico y típicamente resultan de la excitación del O_2 para formar el oxígeno singulete (1O_2) o también mediante la transferencia de uno, dos o tres electrones al O_2 para formar el radical súper óxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) o el radical hidroxilo (HO^{\cdot}) respectivamente. En las células vegetales, éstos se forman constantemente durante las reacciones redox de varias vías metabólicas; la incompleta reducción del oxígeno o de la oxidación del agua en el cloroplasto o la mitocondria, en la cadena de transferencia de electrones tanto de la fotosíntesis como de la respiración, en la β - oxidación de los ácidos grasos, oxidación del glicolato, del NADPH, oxalato y de las xantinas (Bray *et al.* 2000, Mittler 2002, Turrens 2003, Apel e Hirt 2004). Los ROS también se pueden generar en otras organelas celulares, como los peroxisomas y los lisosomas, a consecuencia de los cortes realizados en los explantes (Karp 1998). Adicionalmente, el $O_2^{\cdot-}$ puede reaccionar con el óxido nítrico para formar su radical (NO^{\cdot}). Este y otras formas oxidantes del óxido nítrico; dióxido de nitrógeno (NO_2^{\cdot}), peróxido nítrico ($ONOO^{\cdot}$), nitrosil catión (NO^+), etc., reciben en conjunto el nombre de especies reactivas de nitrógeno (RNS). El estrés ocasionado por ROS se le conoce como estrés oxidativo y el originado por RNS como estrés nitrosativo (Turrens 2003, Valderrama *et al.* 2007).

En condiciones normales de crecimiento la producción de ROS en la célula es baja: $240 \mu M/s$ $O_2^{\cdot-}$ y $0,5 \mu M/s$ de H_2O_2 en los cloroplastos. En situación de estrés, el nivel de $O_2^{\cdot-}$ en la célula se incrementa entre los $240 - 720 \mu M/s$ y entre los $5 - 15 \mu M/s$ de H_2O_2 en los cloroplastos (Mittler 2002). La producción de especies reactivas puede ser activada por inductores específicos (como parte del metabolismo normal de la planta) o también por mecanismos no específicos, por ejemplo en respuesta a un tipo de estrés. Minutos después de la estimulación inicial ocurre, en respuesta, una producción elevada de especies reactivas de oxígeno (Arauz 1998).

La célula vegetal sometida a un estrés reacciona produciendo mayores niveles de ROS y, o RNS; los

cuales generan una reacción en cascada, cuando el electrón libre se transfiere de una molécula a otra. Una de las consecuencias que trae consigo es la acción de enzimas oxidadas, frecuentemente nombradas como polifenol oxidadas (PPOs), fenolasas y tirosinasas, así como de las peroxidadas (POX). Las cuales son liberadas, sintetizadas o están presentes en ciertos sustratos y en condiciones oxidativas cuando los tejidos son lesionados o se encuentran senescentes. En muchos casos, la oxidación se ha relacionado directamente con el acumulo de PPO y decrecimiento de putrescina, espermidina, y espermina de los tejidos. Los sustratos para estas enzimas, que pueden variar entre los diferentes tejidos, son comúnmente la tirosina o los fenoles. Estas enzimas normalmente se encuentran compartimentalizadas, por ejemplo: PPO en cloroplastos, POX en peroxisomas, o se ubican en las membranas subcelulares y los sustratos son almacenados dentro de la vacuola. La enzima y el sustrato entran en contacto cuando la célula sufre algún daño, estrés o se encuentra senescente y, generalmente, da como resultado la muerte del explante (Bhat y Chandel 1991, George, 1996, Vatanpour-Azghandi *et al.* 2002, Tang y Newton, 2004, Gratião *et al.* 2005, Pompeu *et al.* 2008).

Factores ambientales como: intensidad de luz, cortes, herbicidas, senescencia, patógenos, metales pesados, lesiones, sustancias abrasivas pueden desencadenar el estrés oxidativo y nitrosativo (Bray *et al.* 2000, Pompeu *et al.* 2008). En el caso particular del cultivo de tejidos *in vitro*, los procesos de oxidación son causados principalmente por el efecto abrasivo del agente desinfectante aplicado durante la asepsia del explante, los cortes que sufre el explante, composición del medio de cultivo, volumen y calidad del frasco de cultivo (George 1993, Tabiyeh *et al.* 2006, Van Staden *et al.* 2006, Abdelwahd *et al.* 2008).

PROBLEMÁTICA Y SU DESARROLLO *IN VITRO*

El establecimiento *in vitro* de tejidos vegetales de algunas especies de plantas, especialmente leñosas, está, en gran medida, limitado por la ocurrencia de oscurecimientos letales en los explantes y en el medio de cultivo. Esto constituye uno de los problemas más serio y frecuente, desde el inicio y durante el mantenimiento de un tejido cultivado *in vitro* (George 1996,

Laukkanen *et al.* 2000, Murkute y Shanti-Patil 2003, Tang y Newton 2004). El desarrollo de este problema está estrechamente relacionado al estrés oxidativo y nitrosativo que sufren las células del explante cultivado. Este fenómeno se produce por el desbalance entre las reacciones pro-oxidación (excesiva formación de ROS y, o RNS o de naturaleza enzimática) y los mecanismos antioxidantes para detoxificar (antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos), generalmente causado por una generación incrementada de radicales libres (Novoa *et al.* 2001, Turrens 2003).

A nivel celular, los ROS y, o RNS son capaces de oxidar irrestrictamente varios componentes celulares y pueden conllevar a una destrucción oxidativa de la célula. Estas moléculas, especialmente el OH•, son altamente destructoras de lípidos, polisacáridos, proteínas y ácidos nucleicos, pudiendo ocasionar el colapso celular (Bray *et al.* 2000, Cassells y Curry 2001, Turrens, 2003, Apel e Hirt 2004, Mittler *et al.* 2004). Por ejemplo, en células de *Pinus virginiana*, Tang *et al.* (2004), correlacionaron la muerte celular con altos contenidos de H₂O₂. Asimismo, en la etapa de establecimiento *in vitro*, luego de ser cortados, muchos de los explantes empiezan a perder el color verde e inician un oscurecimiento, liberando frecuentemente exudados oscuros al medio de cultivo, cuya naturaleza no es precisa, aunque se conoce que son una mezcla compleja de sustancias fenólicas (metabolitos secundarios que modulan el desarrollo de la planta y su respuesta a estreses bióticos y abióticos). Por ejemplo, en explantes cultivados de tomate se ha reportado la presencia de vainilina, ácido p-coumárico, p-hidroxibenzaldehído y siringaldehído (Harms *et al.* 1983, Rao *et al.* 1985, Abdelwahd *et al.* 2008). No todos los exudados liberados al medio de cultivo son inhibitorios o tóxicos, pero en la mayoría de los casos el crecimiento del explante es inhibido, perdiendo gradualmente su capacidad de proliferar y, si no se remedia la situación, puede morir (George 1996, Ogita 2005). En *Eucalyptus tereticornis* y *Spondias purpurea*, el problema es tan severo que en torno de pocas horas el explante se oscurece y muere (Das y Mitra 1990, Azofeifa 2007).

La toxicidad de los exudados está en relación con el incremento en la producción de compuestos fenólicos ya que estos son oxidados para formar quinonas, debido a la actividad de enzimas oxidativas, y posteriormente polimerizados (Tabiyeh *et al.* 2006).

Además, se puede deber a la oxidación de proteínas, a que fenoles se unan con proteínas mediante puentes de hidrógeno (Harms *et al.* 1983), a la acción de enzimas peroxidasas, las cuales pueden calalazar su oxidación en presencia de peróxido. Este y otros radicales libres son liberados o generados durante el proceso de escisión, limpieza, desinfección y cultivo del explante (George 1996, Uddin y Titov 2007). La presencia de algunas sustancias fenólicas dañinas puede tener un efecto autocatalítico en su síntesis.

El daño que resulta de la producción de exudados es usualmente más severo durante los estados iniciales de cultivo. El problema tiende a cesar cuando el explante inicia su crecimiento. Por ejemplo, el cultivo de brotes y yemas de *Alnus oregona* produjo liberación y oxidación de sustancias durante las 10 primeras semanas en cultivo, provocando pérdidas importantes. Luego de la semana 22, cuando los explantes iniciaron su multiplicación, el problema desapareció (Garton y Moses 1986). Un fenómeno semejante se observó en *Gossypium hirsutum* L. (Ozyigit *et al.* 2007).

Aparte del oscurecimiento de explantes, al estrés oxidativo se le ha relacionado con el desencadenamiento de otros desordenes fisiológicos, morfológicos, epigenéticos y genéticos que ocurren en los explantes cultivados, tales como recalcitrancia, hiperhidricidad, variación somaclonal y habituación (Cassells y Curry 2001, van Staden *et al.* 2006).

UTILIDAD BIOLÓGICA Y APROVECHAMIENTO

Tradicionalmente las ROS han sido consideradas tóxicas. No obstante, en años recientes esta percepción ha cambiado. Actualmente se sabe que las plantas producen activamente ROS como moléculas señalizadoras de diferentes vías y procesos metabólicos, controlando actividades normales del crecimiento y desarrollo de la planta; germinación, mitosis, elongación celular, senescencia, muerte celular, lignificación de tejidos, formación de elementos cribosos del floema y xilema, regulación de la expresión génica asociada a estrés biótico y abiótico, sistema de defensa contra patógenos, etc. (Bray *et al.* 2000, Apel e Hirt 2004, Mittler *et al.* 2004, Kawiak *et al.* 2007, Marczak *et al.* 2008, Shao *et al.* 2008).

Por otro lado, investigaciones realizadas en cultivo *in vitro* asocian efectos benéficos en el desarrollo de los explantes con la presencia de algunas formas de ROS. En estos trabajos se describe cómo la adición intencional al medio de cultivo de algún agente reductor u oxidante puede estimular un tipo de respuesta particularmente benéfica. Por ejemplo, la adición de H₂O₂ incrementó la producción de embriones somáticos en explantes de coníferas (Kapik *et al.* 1986); de manera similar, la escisión de explantes de *Vitis* sp. y *Paulownia* sp. en presencia de oxígeno reactivo favoreció la formación de embriones somáticos (Krul y Worley 1977, Radojevic 1988). También se ha informado que el uso de agentes antioxidantes, mercaptoetanol, ditioneitol y ácido ascórbico, favoreció la embriogénesis en anteras de tabaco cultivadas *in vitro* (Harada e Imamura 1983). Finalmente, Mittler (2002) menciona la posibilidad de utilizar las concentraciones de los ROS como indicadores del estrés celular. De esta manera sería posible monitorear el estatus del explante en determinado ambiente de crecimiento.

MEDIDAS PRÁCTICAS PARA EL MANEJO DEL OSCURECIMIENTO DE LOS EXPLANTES CULTIVADOS *IN VITRO*

Estrategias

Las estrategias para evitar los procesos de oxidación que conllevan al oscurecimiento de los tejidos del explante cultivado *in vitro*, son numerosas. Para empezar, la prevención y disminución de las circunstancias que provocan o estimulan el estrés oxidativo en el explante es el mejor procedimiento para impedir el desencadenamiento de eventos que conllevan a la oxidación del mismo. Cuando el estrés oxidativo no se logra evitar, se puede recurrir a una serie de medidas prácticas. En el Cuadro 1, se presenta un resumen de las estrategias generales abordadas en la presente revisión. Posteriormente cada estrategia se ampliará en detalle.

Para algunas especies los investigadores solventaron el problema con la utilización de una sola estrategia. Por ejemplo, uso de medio líquido (Zepeda y Sagawa 1981), cambio del agente gelificante (Finch *et al.* 1992), uso de carbón activado (Harikrishnan *et al.* 1997), de polivinil pirrolidona (Chacón y Gómez

Cuadro 1. Resumen de las principales estrategias utilizadas en el cultivo *in vitro*, para evitar o disminuir los problemas oxidativos que ocurren en los explantes vegetales.

Nombre de la estrategia

Uso de explantes en estado juvenil o de material en crecimiento activo.
 Crecimiento del explante a baja luminosidad o en oscuridad.
 Crecimiento del explante en una temperatura baja.
 Subcultivos frecuentes.
 Cultivo en medio líquido.
 Uso de adsorbentes, en la preparación del explante para su cultivo o en el medio de cultivo.
 Uso de antioxidantes en la preparación del explante para su cultivo o en el medio de cultivo.
 Elección del medio de cultivo.
 Elección de los reguladores del crecimiento.
 Cambio del potencial osmótico del medio de cultivo.
 pH del medio de cultivo bajo.
 Inactivación de enzimas.

1996) o la sustitución del regulador de crecimiento (Jambor-Benczur *et al.* 1997). Desafortunadamente, un único método no siempre es suficiente debido a la complejidad del problema, requiriéndose una solución integral que involucre un mayor número de variantes. En este sentido, Thomas y Ravindra (1997) mencionan, para el cultivo *in vitro* de ápices de *Mangifera indica*, que la oxidación de tejidos y la exudación de fenoles, estuvieron interrelacionadas e influenciadas por un número de factores que incluyeron al genotipo, tipo y época de escisión del explante, tratamiento de desinfección y medio de cultivo. Por ejemplo, se observó menor exudación de fenoles y mayor sobrevivencia de explantes cuando se utilizó el medio de cultivo Murashige y Skoog, MS (1962) a mitad de su concentración en sales, comparado a un MS normal. Lo mismo al utilizar un MS semisólido que uno líquido. Respecto al tipo de explante, los factores: grado de desarrollo, incidencia de luz en el explante, longitud y grosor del ápice, daños en el explante y el número de pecíolos en contacto con el medio de cultivo fueron importantes. La edad del árbol y el número de hojas en el ápice no lo fueron. Además, la época de escisión del explante fue prominente, tanto en la exudación de fenoles como en la contaminación y viabilidad del

explante. La mejor edad fisiológica para la toma de material fue con ápices semi maduros.

A continuación se describe y discute una serie de estrategias, por medio de las cuales, diferentes investigadores solventaron de manera importante el problema del oscurecimiento de tejidos.

Reducción del posible daño durante el establecimiento

El problema de oxidación se puede disminuir reduciendo la duración del proceso de escisión y de esterilización del explante o con la sustitución del agente desinfectante. En algunas especies, este agente es el responsable de acentuar el problema del oscurecimiento. Este es el caso de explantes de *Syzygium cumini* (Yadav *et al.* 1990) y de *Anacardium occidentale* (Jha y Das 2004, Aliyu 2005). Cuando es evidente la participación del agente desinfectante en el problema de oxidación, se deben probar otros agentes. Así, Seneviratne y Wijesekara (1996), quienes trabajaron con brotes de *Hevea brasiliensis* para su establecimiento *in vitro*, encontraron que la desinfección de los explantes con hipoclorito de sodio (NaOCl), a diferentes concentraciones, promovió el oscurecimiento de los tejidos y la exudación de fenoles. Por su parte, el uso de cloruro de mercurio (HgCl₂) como agente desinfectante provocó menos problemas de oscurecimiento en los tejidos. En *Strelitzia reginae*, el uso de HgCl₂ al 0,3% fue menos lesivo que el hipoclorito de calcio al 9% (Ziv y Halevy 1983).

Remoción de sustancias fenólicas

La presencia de sustancias fenólicas en el medio de cultivo, liberadas por el explante, tiene un efecto autocatalítico. Por lo que la remoción y, o dispersión de las mismas se considera un método de control efectivo (George 1996). Esto se puede lograr mediante:

Pretratamientos

En especies que generan exudados con efectos perjudiciales, la implementación de un pretratamiento aplicado al explante puede ser de mucha utilidad. Por ejemplo, Pérez *et al.* (1985) y Peñuela *et al.* (1988) mencionan la utilidad de aplicar un baño de agua continua durante 16 a 24 horas para la remoción de sustancias fenólicas producidas en semillas de

Corylus sp. y *Juglans sp.*, respectivamente, antes de su desinfección. También, la aplicación de enjuagues al explante, con agua destilada estéril, luego del proceso de desinfección es necesario para eliminar efectivamente el agente desinfectante, así como para remover los fenoles oxidados y otros productos del daño celular formados durante la preparación y desinfección del explante. En algunos casos se utiliza la inmersión y agitación de los explantes en agua destilada estéril, sola o con algún aditivo, durante un cierto tiempo (que pueden ser 2 - 48 horas) antes de su cultivo definitivo (George 1996).

Subcultivos frecuentes

La implementación de subcultivos (transferencias) frecuentes a un medio de cultivo fresco en poco tiempo se torna imperativo si el medio de cultivo donde se encuentra el explante muestra indicios de oscurecimiento. El intervalo entre subcultivos se debe ajustar según la severidad del problema. Con frecuencia es necesario transferir, al inicio, a intervalos de uno a siete días, requiriéndose, normalmente, entre cinco y seis subcultivos para que la producción u oxidación de fenoles cese. No obstante, éste es un procedimiento demandante de tiempo y reactivos, por lo que si existiera otra alternativa para evitar el deterioro del explante sería preferible (George 1996).

El uso de subcultivos frecuentes, para evitar o reducir los problemas de oxidación, se ha utilizado en diferentes especies: *Rubus sp.* (Broome y Zimmerman 1978), *Musa sp.* (Banerjee y De Langhe 1985; Utino *et al.* 2001), *Psidium guajava* (Amin y Jaiswal 1988), *Eucalyptus tereticornis* (Das y Mitra 1990), *Hevea brasiliensis* (Seneviratne y Wijesekara 1996), *Fragaria indica* (Bhatt *et al.* 2000), *Punica granatum* (Murkute y Shanti-Patil 2003), *Anacardium occidentale* (Jha y Das 2004, Aliyu 2005), *Phyllostachis nigra* (Ogita 2005). En otras especies, como *Spondias purpurea*, su uso no fue suficiente para evitar el deterioro de los explantes (Azofeifa 2007).

Poda del tejido necrosado y uso de sellos en el explante

Tulecke *et al.* (1988) y George (1996) recomiendan eliminar el tejido lesionado del explante, producido durante la escisión de la planta donadora o al momento de la desinfección, previo a su cultivo. Asimismo, Ogita (2005) eliminó el tejido necrosado

en callos de *Phyllostachis nigra* para promover su recuperación y crecimiento.

Otro tipo de estrategia implica el uso de sellos en las áreas cortadas de los explantes. Así, Bhat y Chandel (1991) redujeron la liberación de fenoles en *Dioscorea alata* y el oscurecimiento del medio de cultivo, mediante el uso de sellos de cera parafina en los bordes cortados del explante.

Estado físico y volumen del medio de cultivo

Con frecuencia, los explantes son menos propensos al oscurecimiento si inicialmente se establecen en un medio de cultivo líquido, ya que, en este estado físico se propicia la dispersión de sustancias tóxicas. En los medios de cultivo sólidos, el agente gelificante favorece la retención de fenoles u otras sustancias dañinas en las inmediaciones del explante (George 1996). Por ejemplo, en el establecimiento *in vitro* de *Ananas comusus* (Zepeda y Sagawa 1981), *Cocos nucifera*, (Sugimura y Salvaña 1988), *Cattleya* spp. (Gutiérrez 1993) y *Cynodon transvaalensis* x *C. dactylon* (Qu y Chaudhury 2001) se redujeron los problemas del oscurecimiento y liberación de fenoles al utilizar medios de cultivo líquidos en agitación. De manera similar, Traumann y Visser (1989) y Linington (1991) mitigaron los problemas del oscurecimiento en callos de *Porthenium argentatum* y embriones cigóticos de *Dipterocarpus* sp., respectivamente, utilizando un medio de cultivo líquido con puentes de papel filtro como soporte de los explantes. Con este sistema lograron mantener un flujo continuo del medio de cultivo y evitaron la acumulación de sustancias tóxicas. Contrario a lo mencionado, en *Mangifera indica*, Thomas y Ravindra (1997) observaron menor exudación de fenoles y mayor sobrevivencia de explantes cuando se utilizó un medio semisólido comparado a uno líquido. Finalmente, en *Eucalyptus tereticornis*, Das y Mitra (1990) no encontraron diferencia significativa entre medio líquido o sólido respecto de la exudación de fenoles.

En relación con la cantidad del medio de cultivo, Bhat y Chandel (1991) sugieren que el volumen que se utiliza de éste en cada recipiente juega un papel importante en el desarrollo del oscurecimiento. Mencionan que en *Dioscorea alata* el oscurecimiento de los explantes fue más severo cuando se trabajó con volúmenes pequeños.

Con relación al tipo y calidad del agente gelificante, Finch *et al.* (1992) observaron que el cultivo de brotes apicales de arces silvestres en un medio de cultivo gelificado con agar desencadena el oscurecimiento de los explantes. Esto no ocurre si el agar es sustituido por agarosa como agente gelificante.

Uso de adsorbentes

Carbón activado (CA)

Mediante la adición de CA al medio de cultivo es posible remover compuestos fenólicos. Evitando o disminuyendo el deterioro del explante. Este es el caso de *Sequoiadendron giganteum* (Bon *et al.* 1988), *Hevea brasiliensis* (Seneviratne y Wijesekara 1996) y *Anacardium occidentale* (Aliyu 2005).

El efecto benéfico del CA se atribuye a su capacidad para remover sustancias inhibitorias o tóxicas del medio de cultivo que son producidas durante el autoclavado del medio o liberadas por el explante. Dentro de las sustancias producidas durante el autoclavado, se ha reportado la presencia del 5-(hidroximetil)-2-furaldehído (HMF). Este es un compuesto inhibitorio, formado primeramente a partir de la fructuosa, ya sea agregada al medio de cultivo, o formada por hidrólisis de la sacarosa durante el proceso de autoclavado. Otras sustancias removidas son producidas por el mismo explante. Por ejemplo las quinonas (Ebert *et al.* 1993, Petersen *et al.* 1999, Bhatia y Ashwath 2008).

Como se observa en el Cuadro 2, el empleo del CA agregado al medio de cultivo es muy frecuente, especialmente en especies de la familia Arecaceae. Así, Sugimura y Salvaña (1988) mencionan que el cultivo *in vitro* de diferentes tipos de palmeras presentan graves problemas de oxidación y la inclusión de CA al medio de cultivo tiene un papel preponderante en la disminución de este problema.

Las concentraciones empleadas que se observan en la literatura varían entre 0,5 y 10 g/l, siendo más frecuentes las dosis de 2,0 y 3,0 g/l.

No obstante las referencias anteriores, en investigaciones realizadas en *Anacardium occidentale* (D' Silva y D' Souza 1993), *Punica granatum* (Murkute y Shanti-Patil 2003) y *Parakmeria lotungensis* (Mengyun y Jingmin 2004), la adición de CA al medio de cultivo no fue suficiente para solventar los serios y frecuentes problemas de oxidación.

Cuadro 2. Dosis de carbón activado adicionadas al medio de cultivo para mitigar los problemas de oxidación de tejidos en especies vegetales.

Cultivo	Dosis (g/l)	Referencia
<i>Acorus calamos</i>	2,0	Harikrishnan <i>et al.</i> (1997)
<i>Anacardium occidentale</i>	5,0	Sudripta <i>et al.</i> (1996)
Azaleas	2,5	George (1996)
Coco	2,5	Fisher y Tsai (1978)
<i>Dioscorea oppositifolia</i>	3,0	Poornima y Ravishankar (2007)
<i>Dioscorea pentaphylla</i>	3,0	Poornima y Ravishankar (2007)
<i>Eucalyptus tereticornis</i> Smith.	2,0	Das y Mitra (1990)
Forestales	3,0	Bonga y Durzan (1982)
Palma Aceitera Africana	0,5	Teixeira <i>et al.</i> (1993)
Palma Aceitera Africana	0,5	Kanchanapoom y Domyoas (1999)
Palma Aceitera Africana	1,0	Upadhyay <i>et al.</i> (1999)
Palma Datil	3,0	Reynolds y Murashige (1979)
<i>Paphiopedilum</i>	2,0	George (1996)
<i>Vicia faba</i>	10	Abdelwahd <i>et al.</i> (2008)
Zingiber	3,0	Wang y Huang (1976)

Polivinil pirrolidona (PVP) y polivinil polipirrolidona (PVPP)

El PVP es una poliamida. Esta sustancia fue inicialmente utilizada como adsorbente en la técnica de separación por cromatografía de sustancias ácidas aromáticas, aldehídos y fenoles. Para el caso de los fenoles, estos son adsorbidos a través de uniones hidrógeno, previniendo su oxidación y polimerización (George 1996).

Tanto el PVP como el PVPP han sido utilizados en la prevención del oscurecimiento de tejidos, ya sea, aplicado como enjuague al explante o mediante su incorporación al medio de cultivo. El PVP se ha aplicado como tratamiento al momento de separar el explante de la planta donadora (Amin y Jaiswal 1988), como pretratamiento anterior o posterior al proceso de desinfección (Gannoun *et al.* 1995, Figueiredo *et al.* 2001). En ambos casos, los explantes son inmersos en la solución de PVP, la cual generalmente se encuentra en agitación durante cierto tiempo (desde unos minutos, 45 minutos, hasta de un día para otro). Además, Gupta *et al.* (1980) mencionan que el PVP

se puede disolver en una solución de sacarosa (20 g/l) para mejorar su acción (Cuadro 3). La gran mayoría de referencias encontradas utilizan el PVP incorporado al medio de cultivo (Cuadro 4).

Cuadro 3. Dosis de polivinil pirrolidona o polivinil polipirrolidona utilizadas durante el enjuague del explante al momento de su desinfección, previo a su establecimiento *in vitro*.

Especie	Dosis de PVP (g/l)	Referencia
<i>Pinus sylvestris</i> .	10	Hohtola (1988)
<i>Pistacia terebinthus</i>	10	Gannoun <i>et al.</i> (1995)
<i>Pistacia vera</i>	10	Gannoun <i>et al.</i> (1995)
<i>Psidium guajava</i>	5 (PVPP)	Amin y Jaiswal (1988)
<i>Rollinia mucosa</i>	0,5	Figueiredo <i>et al.</i> (2001)
<i>Rosa hydrida</i>	4	Mederos y Rodríguez (1987)
<i>Tectona grandis</i>	7 (+ 20 g/l de sacarosa)	Gupta <i>et al.</i> (1980)
Tomate	10	Fish y Jones (1988)
<i>Vicia faba</i>	1	Abdelwahd <i>et al.</i> (2008)

Adicionalmente, Amin y Jaiswal (1988), Teixeira *et al.* (1993), Gannoun *et al.* (1995) y Abdelwahd *et al.* (2008) mencionan la conveniencia de combinar el uso del PVP con algún agente antioxidante u otro adsorbente para disminuir la oxidación en los tejidos. Contrario a las referencias anteriores, en *Anacardium occidentale* (D' Silva y D' Souza 1993), *Dendrocalamus latiflorus* (Huang *et al.* 2002), *Parakmeria lotungensis* (Mengyun y Jingmin 2004), *Phyllostachis nigra* (Ogita 2005) y *Spondias purpurea* (Azofofeifa 2007), la adición de PVP al medio de cultivo no ayudó a controlar el problema. Como efecto indirecto, Bonga y Durzan (1982) mencionan que el PVP agregado al medio de cultivo, con el fin de reducir la actividad de la PPO, fue inhibitorio para el crecimiento de callos en *Eucalyptus grandis*, pero en embriones somáticos de *Dendrocalamus strictus* lo promovió (Saxena y Dhawan 1999).

Modificación de las condiciones ambientales

Factores ambientales dentro del recipiente de cultivo, en el cuarto de crecimiento o en el que se encuentra la planta donadora, se pueden modificar para evitar

Cuadro 4. Dosis de polivinil pirrolidona o polivinil polipirrolidona incorporadas al medio de cultivo, para el manejo de la oxidación en explantes de diferentes especies vegetales.

Especie	Dosis de PVP (g/l)	Referencia
<i>Aconitum napellus</i>	0,5 (PVPP insoluble)	Cervelli (1987)
<i>Cynodon transvaalensis</i> x <i>C. dactylon</i>	6 (PVPP)	Qu y Chaudhury (2001)
<i>Dendrocalamus strictus</i>	0,25	Saxena y Dhawan (1999)
<i>Elaeis guineeses</i>	5	Teixeira <i>et al.</i> (1993)
<i>Eucalyptus tereticornis</i>	0,5	Subbaiah y Minocha (1990)
<i>Hamamelis</i>	10	Christiansen y Fannesbech (1975)
<i>Malus</i>	5 – 20	Walkey (1972)
<i>Pinus brutia</i>	0,001 (PVP insoluble)	Abdullah <i>et al.</i> (1987)
<i>Pinus virginia</i>	5 (PVPP)	Tang <i>et al.</i> (2004)
<i>Pouteria lucuma</i>	1- 3	Jordan y Oyanedal (1992)
<i>Quercus</i> spp.	0,05 - 0,1	Ahuja (1986)
<i>Quercus</i> spp.	0,5	Bellarosa (1988)
<i>Rubus</i> sp.	10	Chacón y Gómez (1996)

los problemas del oscurecimiento en los explantes. De acuerdo con la literatura consultada, el factor ambiental que con mayor frecuencia se modifica es la luz, tanto en su intensidad, calidad o duración. La modificación generalmente la realizan, ya sea, en el ambiente donde crece la planta donadora de los explantes o en el cuarto de crecimiento donde se colocan los explantes luego de su cultivo. Al respecto tenemos:

Plantas donadoras creciendo en oscuridad

Algunas investigaciones enfatizan la importancia de aplicar tratamientos al material donante, así como, considerar su origen, a modo de controlar la oxidación. En este sentido, George (1996) indica que la oxidación del explante puede ser evitada o reducida si este se toma de plantas donadoras etioladas, sea, que han crecido en oscuridad total, con intensidad de luz baja o incluso en días cortos. Al respecto, Zavaleta-Mancera *et al.* (2007) mencionan que en días con alta irradiación, la cantidad

de energía lumínica recibida en el cloroplasto es mayor a la requerida para la fijación del CO₂ durante la fotosíntesis, los excesos de energía son entonces captados por aceptores de electrones alternos, estimulando la formación de ROS. Además, Kefeli *et al.* (2003) indican que la luz incrementa la biosíntesis de sustancias fenólicas (entre ellas, los flavonoides) en el cloroplasto, el cual constituye su principal sitio de síntesis. Posteriormente los fenoles son acumulados en la vacuola en cantidades relativamente altas o depositados como lignina en las paredes celulares. Asimismo, Marks y Simpson (1990) demostraron que el mecanismo de oxidación fenólica y la inhibición del crecimiento en plantas leñosas pueden ser controlado por el nivel de irradiación recibido por la planta donante. Estos autores basaron su estudio en el metabolismo de fenoles, ya que la actividad de muchos sistemas enzimáticos, que participan en la síntesis y oxidación de los mismos, es inducida por la luz. En su investigación, con arbustos ornamentales, redujeron considerablemente la oxidación de los explantes cuando estos fueron tomados de plantas que crecieron en oscuridad total (*Hamamelis* sp.) o bajo cubierta plástica (*Garrya elliptica*), que permitía el paso de apenas un 1% de la luz del día. No obstante, para *Quercus robur* este beneficio fue relativo, ya que, los efectos detrimentales de la liberación de polifenoles aparecieron a los 56 días en el 70% del material expuesto a la luz. En relación, con lo anterior, Watad *et al.* (1992) mencionan que para evitar la oxidación y muerte de explantes de *Protea obtusifolia*, fue muy útil cubrir previamente con bolsas de papel los brotes de la planta donadora. También, en *Psidium guajava* (Pirela 1996, León *et al.* 1997) la sobrevivencia de los explantes estuvo afectada por la exposición de las plantas donantes a la irradiación solar. Se observó mayor sobrevivencia en los explantes tomados de plantas tratadas en oscuridad o con baja intensidad de luz. Además, indican que la protección solar de la planta donadora resultó en una reducción del contenido de fenoles preexistentes en los explantes. Por lo anterior, consideran la relación entre el contenido de compuestos fenólicos preexistentes en los meristemos apicales y la sobrevivencia de los mismos durante su cultivo *in vitro*.

Crecimiento de explantes en oscuridad o en baja irradiación

La oxidación de explantes, en varias especies vegetales, disminuye o se evita si éstos, luego de

su establecimiento *in vitro*, son puestos a crecer en una condición de oscuridad por algunas semanas. Posteriormente, los explantes se transfieren a un ambiente con luz normal, o en ciertas ocasiones, a una condición de baja luminosidad (7-15 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) para ayudar a prevenir la oxidación (George 1996). En relación con ésto, Villalobos y Arias (1987) con caña de azúcar, Seneviratne y Wijesekara (1996) con *Hevea brasiliensis*, así como Sudripta *et al.* (1996) y Jha y Das (2004) en *Anacardium occidentale*, implementaron el crecimiento de explantes en oscuridad durante la primera semana de cultivo para prevenir los problemas de oxidación. Además, Kvaalen y Appelgren (1999) reportan diferencias significativas en la oxidación de explantes (embriones somáticos de *Picea abies*) según la fuente de luz (intensidad, tipo de luz, marca comercial de la fuente) que se utiliza en las cámaras de crecimiento. No obstante, la oscuridad o los bajos niveles de luz no siempre pueden reducir la oxidación. Este es el caso de *Eucalyptus tereticornis* (Das y Mitra 1990) y *Hamamelis sp.* y *Garrya elliptica* (Marks y Simpson 1990), en donde la oxidación de fenoles en los explantes no disminuyó a pesar que los mismos fueron puestos a crecer en oscuridad desde el inicio.

Tratamientos con baja temperatura

George (1996) menciona que el oscurecimiento de los tejidos cultivados *in vitro* de algunas especies de plantas se puede disminuir o evitar aplicando a los explantes una temperatura, en el cuarto de crecimiento, ligeramente menor a la normalmente empleada, sin que sea lesiva al explante. La disminución en la temperatura persigue reducir la actividad fenolosa y la disponibilidad de su sustrato. Esta temperatura se mantiene hasta obtener crecimiento y, o morfogénesis en los explantes. Por ejemplo, Selva *et al.* (1989) evitaron el oscurecimiento de brotes de *Vicia faba* cambiando la temperatura, de 22 °C a 14 - 18 °C, en el cuarto de crecimiento. Similar resultado se logró en *Begonia venosa* (Pierik y Tetteroo 1987), utilizando una temperatura entre los 17 y 21°C.

Por otro lado, Anderson y Ievinsh (2002) mencionan que la implementación de un pretratamiento, almacenamiento de las plantas donadoras por cuatro meses en un ambiente frío, permitió disminuir la actividad de la peroxidasa y consecuentemente la oxidación de explantes en *Pinus sylvestris*. También,

el uso de un pretratamiento térmico, 4 °C durante dos horas, aplicado al explante previo a su cultivo, fue suficiente para reducir los problemas de oxidación en *Parakmeria lotungensis* (Mengyun y Jingmin 2004).

Composición del medio de cultivo

Sales

El oscurecimiento de tejidos es con frecuencia más pronunciado en un tipo de medio de cultivo que en otro, lo que implica que el mismo puede ser causado por el uso inapropiado de alguno de los nutrientes empleados en el medio. Con frecuencia el oscurecimiento es menor en un medio diluido que en uno alto en sales, como el MS (George 1996, Cassells y Curry 2001).

Entre las modificaciones que frecuentemente se emplean, según se pueden observar en la literatura consultada, están diluciones en las concentraciones de N y K y en su fuente, la dilución general de las sales del medio de cultivo o el uso de medios de cultivo bajos en sales. Así, Anderson (1975) indica que los altos niveles de K del MS acentuaron el oscurecimiento observado en explantes de *Rhododendron*. El oscurecimiento no fue evidente cuando se redujo el KNO_3 a la mitad de su concentración normal. También, Hohtola (1988) menciona que los explantes de *Pinus sylvestris* se oscurecieron y necrosaron cuando se cultivaron en un MS normal. Su crecimiento fue satisfactorio cuando las concentraciones de NH_4NO_3 , KNO_3 y CaCl_2 se redujeron a la mitad y la del KH_2PO_4 se duplicó. En *Begonia venosa* (Pierik y Tetteroo 1987), *Hevea brasiliensis* (Seneviratne y Wijesekara 1996) y *Musa AAB* (Utino *et al.* 2001) se redujo el oscurecimiento de los tejidos cuando se cultivaron los explantes en un medio MS diluido a la mitad o a un cuarto de su concentración de sales. De manera más extrema, Uosukainen (1987) evitó el oscurecimiento de brotes apicales de varias especies leñosas recién establecidas *in vitro*, mediante el empleo de un MS diluido diez veces. Posteriormente los explantes se transfirieron a un MS normal.

Según George (1996), se ha encontrado que el medio de cultivo para plantas leñosas, WPM (Lloyd y McCown 1981) reduce el oscurecimiento de los explantes, comparado a otros medios. La razón de ésto no es obvia, aunque se sugiere que ciertos componentes del medio de cultivo están implicados en el oscurecimiento de los tejidos. También, Afele y De

Langhe (1991) utilizaron el medio Knudson (Knudson 1950) para el cultivo de *Musa balbisiana*, ya que es un medio de cultivo bajo en sales y sin la presencia de varios nutrimentos, lo que ayudó a evitar la oxidación de los tejidos del explante.

Otra estrategia empleada es evitar el uso de Cu^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{3+} y de Zn^{2+} en la elaboración de medios nutritivos, ya que están involucrados en la actividad de enzimas oxidativas (George 1996, Skellern 1989). Así, Banerjee y De Langhe (1985) redujeron el oscurecimiento de brotes de *Musa* sp. empleando un MS desprovisto de Cu^{2+} y de Zn^{2+} . Barghchi (1986) redujo la oxidación en *Pistacia* sp. al omitir el FeSO_4 (Fe^{3+}) del medio de cultivo. Como estrategia relacionada, Parra y Amo-Marco (1996) redujeron el oscurecimiento en explantes de *Myrtus communis*, al preincubar temporalmente los explantes en un medio de cultivo desprovisto de sales minerales.

Carbohidratos

Davies (1972) y Lux-Endrich *et al.* (2000) sugieren que los carbohidratos son requeridos para la biosíntesis de compuestos fenólicos. Mencionan respectivamente, que en suspensiones celulares de rosa y en el cultivo de brotes de manzano, la reducción de los niveles de sacarosa en el medio de cultivo conllevó a decrecer los contenidos de polifenoles presentes en los explantes, por lo que el problema de oxidación disminuyó.

Reguladores del crecimiento

La producción de polifenoles está influenciada por los reguladores del crecimiento agregados al medio de cultivo (George 1996). No obstante, su efecto y relación con el oscurecimiento de explantes no es consistente, pues un mismo regulador que induce oscurecimiento en una especie en otra no tiene igual efecto. Esto se debe, según Van Staden *et al.* (2006) a las diferencias genéticas entre los materiales. Además señalan, que un desbalance hormonal, debido al tipo, combinación y concentración de reguladores del crecimiento agregados al medio de cultivo, puede generar un estrés oxidativo, de tal manera, que los ROS generados alteran diferentes vías metabólicas y respuestas fisiológicas del explante, pudiendo incluso matarlo.

De acuerdo con la literatura consultada, primero las auxinas y luego las citoquininas son los grupos de

reguladores del crecimiento más relacionados con el problema de oscurecimiento de explantes. Dentro de las auxinas, el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), y en las citoquininas, la 6-bencilaminopurina (BAP), son los reguladores que cuentan con un mayor número de referencias que asocian su uso con el problema del oscurecimiento.

Auxinas

Baker y Wetzstein (1994) cultivaron cotiledones inmaduros de *Arachis hypogaea* en niveles crecientes de auxinas, sea el ácido naftalenacético (ANA) 20 a 50 mg/l, o el 2,4-D 5 a 60 mg/l. Estos autores señalan que conforme aumentaron los niveles de auxinas en el medio de cultivo se incrementaron los problemas de oxidación en los explantes (especialmente con el uso del 2,4-D). La mayoría de explantes se oxidó a partir de dosis mayores a 40 mg/l de 2,4-D. El fenómeno de oxidación no fue importante cuando se utilizó ANA en el medio. Asimismo, Brisson *et al.* (1988) mencionan que en *Chrysosplenium americanum* el oscurecimiento de brotes ocurrió con la adición de 2,4-D al medio de cultivo pero no cuando se utilizó ANA o el ácido indol-3-acético (AIA). Por su parte, Giri *et al.* (1993) indican que los callos de *Aconitum heterophyllum* cultivados en un medio con 1 mg/l de 2,4-D liberaron sustancias fenólicas. Cuando los mismos se transfirieron a un medio de cultivo al cual se le cambió el 2,4-D por 5 mg/l de ANA, el problema no se presentó. De manera similar, Cañas y Benbadis (1988) evitaron los problemas de oxidación, en callos de olivo, al sustituir el 2,4-D por el ácido indolbutírico (AIB). Sugimura y Salvaña (1988) mencionan que en *Cocos nucifera* y en la mayoría de palmeras, la disminución de los niveles de 2,4-D en el medio de cultivo tiene un efecto benéfico en la disminución de la oxidación.

En otras especies la respuesta puede ser diferente. Mathur (1993) logró la formación de callos de *Nardostachys jatamansi* en un medio MS adicionado con 1,6 μM de ANA. Los callos obtenidos a concentraciones más elevadas de ANA mostraron altos niveles de oxidación y muerte de tejidos.

Citoquininas

A pesar de que el BAP previene o retrasa la degradación de la clorofila, ligado a decrecimientos de clorofilasa, Mg-dequelatasa y peroxidasas (Hörtensteiner

1999, Costa *et al.* 2005, Zavaleta-Mancera *et al.* 2007), su incorporación al medio de cultivo se ha relacionado con decoloraciones y oscurecimiento del explante. Por ejemplo, en *Phyllostachis nigra* (BAP a 1 – 30 μM) causó un fuerte oscurecimiento de tejidos (Ogita 2005). Lo mismo que en *Ailanthus altissima* cv. “Purple Dragon” (Jambor-Benczur *et al.* 1997). Para evitar el problema, estos investigadores, sustituyeron el BAP por su ribósido (BAR). Este cambio redujo a la mitad el número de explantes oscurecidos. También, Brisson *et al.* (1988) mencionan que en el cultivo de *Chrysosplenium americanum* el oscurecimiento de brotes ocurrió cuando se utilizó BAP. El problema se evitó con el uso de kinetina (kin) o Zeatina. Al contrario, callos de *Aconitum heterophyllum*, cultivados en un medio con 0,5 mg/l de kin liberaron sustancias fenólicas. Cuando éstos se transfirieron a un medio con 1 mg/l de BAP el problema no se presentó (Giri *et al.* 1993). Finalmente, Debergh y Maene (1977) mencionan que con niveles mayores de 1 mg/l de kin, los explantes de *Pelargonium* liberaron exudados oscuros al medio de cultivo, los cuales afectaron la sobrevivencia de los mismos. El cultivo de brotes recién establecidos en un medio sin reguladores, durante una semana previa a su transferencia al medio con kin, disminuyó el problema.

Modificación del potencial redox (E_h)

El E_h de una solución acuosa es una medida de su propensión a tomar o dar electrones (es decir a ser reducida u oxidada). Un mayor valor positivo indica un poder oxidante superior y un valor negativo, en concordancia, su poder reductor. El E_h de una solución está afectado por el pH (E_h incrementa con reducciones en el pH), la temperatura, la presión de gases, la concentración de oxígeno disuelto, con la actividad respiratoria de las células o tejidos en crecimiento, entre otros (George 1993).

La tendencia de un compuesto a ser oxidado o reducido depende del E_h de la solución, por lo que la modificación del mismo constituye una herramienta útil en el manejo del oscurecimiento de explantes (George 1996). Según se observó en la literatura consultada, la modificación se realiza principalmente mediante el empleo de sustancias antioxidantes. Éstas se utilizan en tres momentos principales: a) en forma de aspersión o en inmersión del explante recién aislado de la planta donadora y hasta el inicio del proceso de desinfección, b) luego del proceso de desinfección o c) agregado al

medio de cultivo. Los antioxidantes más empleados, para el cultivo de células vegetales *in vitro*, son el ácido ascórbico (AA), ácido cítrico (AC) y la cisteína (CIS), ya sea solos o en mezcla. Es importante mencionar, que aunque el AA y AC son productos que se degradan con el autoclavado (George 1996) y se deben agregar al medio de cultivo, o utilizar en una solución aséptica, mediante un filtrado estéril, se observa en el Cuadro 5, que solamente en cuatro de 25 referencias se indica que fueron esterilizados mediante filtración. En este mismo cuadro, se aprecia que la principal tendencia es aplicar el tratamiento mediante la incorporación del antioxidante al medio de cultivo, siendo el AA el de mayor uso. Cuando el tratamiento se aplica en solución, la tendencia es mezclar el AC con el AA.

Antioxidantes

En términos generales, un agente antioxidante es un compuesto que inhibe o demora la oxidación de un sustrato propenso al fenómeno. La descomposición de los ROS y, o RNS formados o la prevención de su formación, son los posibles mecanismos de su acción. De esta forma evitan las reacciones en cascada de los radicales libres (Matkowski 2008). Los antioxidantes incluyen agentes reductores, los cuales pueden remover oxígenos de moléculas e incluso de compuestos que actúan con mecanismos alternativos, tales como capturadores o desactivadores de iones; reaccionando con intermediarios en el equilibrio redox o en la catálisis del transporte de electrones. Agentes reductores con bajo E_h en solución, previenen el oscurecimiento de tejidos, ya que evitan la oxidación de fenoles y ayudan a una rápida remoción de las quinonas formadas. Los principales antioxidantes endógenos de plantas superiores mencionados incluyen a la glutatona, ascorbato, tocoferol, prolina y la betaina (George 1996, Shao *et al.* 2008).

Antioxidantes en solución

Para solventar la fuerte oxidación de explantes en *Anacardium occidentale*, D’Silva y D’Souza (1993) implementaron un pretratamiento, que consistió en la inmersión de los mismos, durante una hora, en una solución de AA (49,32 mg/l). Esto ayudó a reducir considerablemente el problema pero no en su totalidad. Cuando la estrategia anterior se acompañó con una solución de CIS o una mezcla de AC y AA

aplicado al momento de la escisión del explante, así como la incorporación de 176 mg/l de AA al medio de cultivo, se logró eliminar el problema. Para especies forestales, Bonga y Durzan (1982) sugieren el empleo de una solución antioxidante (100 mg/l de AA + 150 mg/l de ácido acético) para mantener los explantes recién separados de la planta donadora y hasta su establecimiento. En microinjertos de *Anacardium occidentale* (Ramanayake y Kovoov 1999), se implementó el uso de baños, aplicados tanto al patrón como al injerto, con una solución de AC para evitar los problemas de oxidación. Contrario a lo mencionado, Seneviratne y Wijesekara (1996) encontraron que la aplicación de un pretratamiento de inmersión de explantes de *Hevea brasiliensis* en una solución de AC 50 mg/l y AA 100 mg/l incrementó la oxidación de los mismos. En el Cuadro 5 se presenta un listado de

referencias que utilizan el AC, el AA o una mezcla de ambos, como tratamientos en solución para combatir los problemas de oxidación de explantes.

Adición de antioxidantes al medio de cultivo

Murashige (1974) señala que en la etapa de establecimiento *in vitro* de los explantes algunas veces es necesario agregar al medio de cultivo un antioxidante que retarde o evite la oxidación, sea del explante o del medio de cultivo. Por ejemplo, Seneviratne y Wijesekara (1996) mencionan que en *Hevea brasiliensis*, la incorporación al medio de cultivo del AA y del AC disminuyó considerablemente la oxidación que ocurre en los explantes. Esto contrastó con resultados previos poco efectivos, en donde, el AA y el AC solo fueron utilizados para la inmersión de los explantes durante

Cuadro 5. Dosis de ácido cítrico o ácido ascórbico utilizadas como tratamiento, aplicado en solución al explante o incorporado al medio de cultivo, para el manejo de la oxidación del explantes durante su establecimiento *in vitro*.

Ácido cítrico mg/l	Ácido ascórbico mg/l	Especie	Aplicación	Referencia
	25*	Banano y plátano	Al medio	Gupta (1986)
	50	Café	Al medio	Duhem <i>et al.</i> (1988)
	2.000	<i>Cynodon transvaalensis</i> <i>x C. dactylon</i>	En solución	Qu y Chaudhury (2001)
	50 – 100	En general	Al medio	Constabel (1984)
	100	<i>Mangifera indica</i>	Al medio	Litz <i>et al.</i> (1984)
	500	<i>Maytenus ilicifolia</i>	En solución	Flores <i>et al.</i> (1998)
	25	<i>Musa AAB</i>	Al medio	Utino <i>et al.</i> (2001)
	10	<i>Musa balbisiana</i>	Al medio	Afele y De Langhe (1991)
	10	<i>Musa spp</i>	Al medio	Banerjee y De Langhe (1985)
1.250 **		<i>Musa sp cv. Kanthali</i>	En solución	Titov <i>et al.</i> (2006)
1.500	1.000	<i>Musa textilis</i>	En solución	Mante y Tepper (1983)
	70 – 140	<i>Nicotiana tabacum</i>	Al medio	Joy <i>et al.</i> (1988)
	10	<i>Parakmeria lotungensis</i>	Al medio	Mengyun y Jingmin (2004)
10*	10*	<i>Phleum pratense</i>	Al medio	Guo <i>et al.</i> (1999)
150	150	<i>Phoenix dactylifera</i>	En solución	Tisserat <i>et al.</i> (1979)
	100	<i>Pistacia terebinthus</i>	Al medio	Gannoun <i>et al.</i> (1995)
	100	<i>Pistacia Vera</i>	Al medio	Gannoun <i>et al.</i> (1995)
	10.000	<i>Platanus occidentalis</i> L.	Al medio	Feng-jie <i>et al.</i> (2007)
75	50	<i>Psidium guajava</i>	En solución	Amin y Jaiswal (1988)
75	50	<i>Psidium guajava</i>	En solución	Pirela (2002)
	10000	<i>Ruscus hypophyllum</i>	En solución	Ziv (1983)
	300	<i>Spondias purpurea</i>	Al medio	Azofeifa (2007)
5 - 10	1	<i>Triticum aestivum</i>	Al medio	Trottier <i>et al.</i> (1993)
	1*	<i>Vicia faba</i>	Al medio	Abdelwahd <i>et al.</i> (2008)
100	100	<i>Vigna radiata</i>	En solución	Mathews (1987)

* Esterilizado por filtración. ** Solución de Citrato de potasio:Citrato (relación 4:1 p/p).

su preparación previa a su cultivo y no evitaron el problema. En el Cuadro 5 se presenta un listado con referencias que utilizan el AC, el AA o una mezcla de ambos incorporados al medio de cultivo, como tratamiento antioxidante.

Otros antioxidantes

La literatura hace referencia a otros antioxidantes utilizados en menor frecuencia. Así, Rugini y Fontanazza (1981) implementaron la inmersión de explantes de olivo (recién separados de la planta donadora y hasta su cultivo *in vitro*) en una solución de glutatona reducida (200 ml/l). De manera similar se hizo con explantes de *Pistacia vera* con una solución de 0,1 mM (Tabiyeh *et al.* 2006). Para la CIS, Gutiérrez y Kuan-Jou (1993) sumergieron ejes florales de *Phalaenopsis* "Golden Emperador Sweet" en una solución de 100 mg/l durante 10 minutos previo a su establecimiento *in vitro*. También se agregó este compuesto, incorporado al medio, para el cultivo de fresa, en dosis de 4 g/l (Sánchez-Cuevas y Salaverría 2004). Por otro lado, Bonga y Durzan (1982) informaron que la CIS y la tirosina, agregadas al medio de cultivo, con el fin de reducir la actividad de la PPO, para el cultivo de callos de *Eucalyptus grandis*, fue inhibitorio para su crecimiento. Otro efecto, reportado por Harada e Imamura (1983), refiere al incremento de la embriogénesis en anteras de tabaco, debido a la incorporación de los agentes antioxidantes mercaptoetanol, ditiotreitil y AA al medio de cultivo. Asimismo, se redujo la formación de raíces en *Prunus avium* con ditiotreitil (0,25

mM). Se cree que estos efectos benéficos se deben a la protección antioxidante que reciben las hormonas endógenas presentes en los explantes (Vasar 2004). Otros antioxidantes, agregados al medio de cultivo, se mencionan en el Cuadro 6.

Compuestos que pueden acomplejar iones metálicos (Agentes quelatantes)

Los agentes quelatantes o acomplejantes pueden proporcionar una cierta interferencia a la actividad de enzimas involucradas con el estrés oxidativo. Weinstein *et al.* (1951) descubrieron que el ácido etilendiaminotetracético (EDTA) inhibió la actividad de la PPO en los tejidos de hoja de girasol cultivados *in vitro*, lo cual sugiere que estos compuestos remueven iones metálicos que son esenciales para la actividad de enzimas oxidasas. También el ditiocarbamato (DIECA) y la 8-hidroxiquinolina (8-HQ) son fuertes agentes acomplejantes del Cu²⁺. Entre los primeros informes, Wetmore y Morel (1949), se menciona que el DIECA utilizado a una dosis de 250 mg/l redujo el oscurecimiento en brotes de *Equisetum*. Con el mismo fin, Jonard *et al.* (1983) y Jelaska (1987) lo utilizaron en solución (1 – 2 g/l) aplicado a cortes de los microinjertos, así como Muneta (1981), en el cultivo de papa *in vitro*. Otro compuesto que forma complejos estables del tipo quelato con el Mn²⁺, Zn²⁺ y particularmente con el Cu²⁺ es la tiourea. Posiblemente, mediante esta acción es capaz de inhibir varias enzimas con actividad peroxidasa (Skellern 1989). Al respecto, Traumann y Visser (1989) agregaron 50 mg/l de tiourea al medio

Cuadro 6. Dosis de cisteína, mercaptoetanol, ditiotreitil y tiosulfato de sodio, agregadas al medio de cultivo como antioxidantes, para disminuir la oxidación del explante durante su establecimiento *in vitro*.

Antioxidante	Dosis (mg/l)	Especie	Referencia
Cisteína	10-50	Café	Monco <i>et al.</i> (1977)
Cisteína	100	Caña de azúcar	Villalobos y Arias (1987)
Cisteína	20	<i>Dioscorea</i> sp.	Ng (1988)
Cisteína	50	<i>Musa</i>	Jarret <i>et al.</i> (1985)
Ditiotreitil	0,5	<i>Parakmeria lotungensis</i>	Mengyun y Jingmin (2004)
Ditiotreitil	2.000	<i>Pinus virginiana</i>	Tang <i>et al.</i> (2004)
Ditiotreitil	400	<i>Strelitzia reginae</i>	Ziv y Halevy (1983)
Mercaptoetanol	1 (ml)	<i>Parakmeria lotungensis</i>	Mengyun y Jingmin (2004)
Mercaptoetanol	1 (ml)	No indica	Ziv y Halevy (1983), Han y Liu (1990)
Tiosulfato de sodio	1.000	No indica	Ziv y Halevy (1983), Han y Liu (1990)

B5 logrando retardar el oscurecimiento en callos de *Parthenium argentatum*.

Reducción de la disponibilidad de oxígeno

George (1996) indica que la tasa de oscurecimiento del explante también depende del Eh de la superficie cortada del tejido, por lo que se puede esperar que el oscurecimiento se reduzca si se disminuye la exposición del explante al oxígeno. Se menciona, además, que el oxígeno se disuelve rápidamente en la "sopa" celular del explante seccionado cuando este se encuentra expuesto al aire, pero, al estar inmerso en un líquido, la tasa de absorción ocurre más lentamente. Algunas estrategias mencionadas en la literatura, con la finalidad de disminuir el daño oxidativo son: reducir el tiempo entre la obtención del explante y su inmersión en una solución antioxidante o su cultivo definitivo (Navarro 1988, Guerra y Handro 1988), realizar los cortes con el material vegetal inmerso en agua o en alguna solución antioxidante, por ejemplo al momento de separar el explante de la planta donadora (Lidemann *et al.* 1970), finalmente disminuyendo el área de corte en el explante (Ripley y Preece 1986).

Fenoles, actividad fenolasa y disponibilidad de sustrato

El oscurecimiento enzimático de los tejidos, causado por la oxidación de compuestos fenólicos para formar quinonas, está principalmente catalizado por las PPOs (Fraignier *et al.* 1995), y la tasa de oxidación fenólica puede ser disminuida mediante una reducción en la actividad de las enzimas oxidativas o mediante la disminución del sustrato disponible para su oxidación (George 1996).

Como la actividad de las enzimas relacionadas con la biosíntesis y la oxidación de los fenoles puede ser manipulada, y disminuye en ausencia de luz, en diversos estudios (Villalobos y Arias 1987, Marks y Simpson 1990, Pirela 1996, Sudripta *et al.* 1996, Seneviratne y Wijesekara 1996, León *et al.* 1997), se incluyó el acondicionamiento del material donante o de los explantes establecidos *in vitro* a crecimiento en oscuridad durante cierto tiempo a fin de lograrlo. Asimismo, Ichihashi y Kako (1977) plantean la alteración del pH del medio de cultivo como una forma de reducir la actividad de las PPOs, la cual es muy importante a un pH de 6,5, y decrece a pH menores. Por ejemplo,

Huang *et al.* (2002) mencionan una correlación directa entre la actividad de la PPO con el oscurecimiento de explantes en *Dendrocalamus latiflorus* y *Phyllostachys nigra*. Indican que la actividad de la PPO en los explantes fue mayor a pH 8 en el medio de cultivo, y decrece a pH menores. En su estudio demostraron, con extractos de la PPO, que su actividad enzimática es casi nula a pH menores de 7 y considerablemente alta a 9. Así, el uso temporal de un medio de cultivo más ácido reduciría los problemas de oxidación.

También, George (1996) considera que se debe prestar atención al tipo de gelificante que se utiliza, pues algunos tipos de agar presentan altos contenidos de cobre, cofactor enzimático, y en los explantes propensos a oxidarse puede ser un problema serio. Además indica, que el potencial osmótico del medio de cultivo puede aumentar o inhibir la biosíntesis de compuestos fenólicos, su difusión y oxidación.

En relación con la disponibilidad del sustrato, los compuestos fenólicos, principalmente los ésteres de Cafeoil y Catequinas, son los principales sustratos para la actividad de la PPO (Amiot *et al.* 1996). Si la disponibilidad del sustrato es limitada la actividad de la enzima se verá disminuida. Por esta razón, Dalal *et al.* (1999) prefirieron cultivar brotes laterales (con menor contenido de fenoles con respecto de los brotes apicales) para el establecimiento *in vitro* de dos variedades de uva. Con esta medida lograron disminuir los problemas de oxidación.

Material donante

Diferentes factores como el genotipo, la ubicación, el tipo y tamaño del explante, la edad, así como la época del año en que se toma el material de la planta donadora influyen en los problemas del oscurecimiento. A continuación se presentan algunos ejemplos publicados.

La oxidación del tejido y el grado de inhibición del crecimiento en el explante son muy dependientes del genotipo. Esto es especialmente cierto en aquellos géneros de plantas (por ejemplo: *Castanea*, *Hamamelis*, *Juglans*, *Quercus*, *Paeonia*, *Rhododendro*, y muchas coníferas) que naturalmente contienen altos niveles de taninos u otros hidroxifenoles, y que presentan mayor tendencia a que los tejidos cultivados *in vitro* se oxiden (George 1996). Muchas veces se encuentran diferencias entre especies del mismo género (Huang *et al.* 2002) e incluso cultivares de una misma especie. Tal es el caso

de *Anigozanthos* sp. (McComb y Newton 1981), *Aconitum napellus* y *A. noveboracense* (Cervelli 1987), *Sorghum bicolor* (Cai y Butler 1990) y de variedades de uva (Dalal *et al.* 1999). Asimismo, se ha informado que materiales clonales de *Hevea brasiliensis*, mostraron diferentes susceptibilidades y grados de oxidación durante su cultivo *in vitro* (Seneviratne y Wijesekara 1996). La diferencia entre genotipos no es evidente solamente en la cantidad de sustancias fenólicas producidas, sino también en su toxicidad. Muchas de las respuestas diferenciales están bajo control genético (George 1996, Jha y Das 2004). En el caso de *Oryza sativa* ssp. Indica, un único gen, Ic1 (*Induced callus 1*), ubicado en el cromosoma 1, reguló el oscurecimiento del explante (Zhong *et al.* 2007). En *Arabidopsis* se estima que más de 152 genes están involucrados en el manejo de los niveles de ROS (Mittler *et al.* 2004).

Respecto a la ubicación de los explantes en la planta donadora, en el cultivo *in vitro* de *Eucalyptus tereticornis*, Das y Mitra (1990) encontraron que las yemas de brotes apicales terminales del tronco principal presentaron mayor propensión a oxidar que sus iguales ubicadas en las ramas laterales basales. Un comportamiento similar fue reportado en el cultivo de uva por Dalal *et al.* (1999), quienes indican que la respuesta observada se debe al mayor contenido de sustancias fenólicas en los brotes apicales.

En relación al tipo y tamaño de explante, la regeneración en *Syzygium cumini* se vio limitada por la alta oxidación ocurrida en los brotes apicales y segmentos nodales utilizados como explantes (Yadav *et al.* 1990). Para evitar el problema y contar con material vegetal adecuado para sus investigaciones, debieron utilizar como explante plántulas provenientes de semillas germinadas en condiciones asépticas. En *Cocos nucifera*, Sugimura y Salvaña (1988) indican que fue preferible usar explantes tomados del pedúnculo floral con forma de rodajas en vez de cilíndricas. Asimismo, los segmentos de inflorescencia pequeños presentaron mayor sobrevivencia respecto de los explantes grandes, debido a una menor oxidación. En *Digitaria sanguinalis*, Van Le *et al.* (1997) utilizaron el cultivo de capas celulares delgadas (0,1 a 0,3 mm de espesor) cortadas transversalmente, a través de diferentes tipos de tejidos, o longitudinalmente, con tres a seis capas de células epidermales y corticales. Este procedimiento permitió reducir la secreción de compuestos fenólicos en caso de presentarse.

Con respecto a la edad del material donante, las plantas muestran diferentes comportamientos dependiendo de su ontogenia. Así, George (1996) indica que los tejidos juveniles son menos propensos al oscurecimiento que los tejidos adultos. Por esta razón, Thomas y Ravindra (1997) utilizaron el cultivo de ápices nuevos en crecimiento para el establecimiento *in vitro* de *Mangifera indica*. De igual forma, Sugimura y Salvaña (1988) mencionan que, en *Cocos nucifera*, los problemas de oxidación se pueden minimizar seleccionando el estado de desarrollo y tamaño más adecuado del explante. No obstante lo indicado, en cultivares de *Saccharum* spp., el cultivo de explantes tiernos, con menos de 20 a 25 días de formados, presentaron una fuerte oxidación, comparados a los explantes más desarrollados (Aftab e Iqbal 1999).

Con respecto a la época del año idónea para la toma de material, Das y Mitra (1990) realizaron pruebas durante todo un año, para el cultivo *in vitro* de *Eucalyptus tereticornis*. Encontraron diferencias importantes relativas a su propensión a exudar sustancias fenólicas según la época en que se recolecta el material de la planta donadora.

AGRADECIMIENTO

Se agradece a Ph.D. Víctor M. Jiménez y Ph.D. Eric Guevara por la revisión realizada al presente trabajo.

LITERATURA CITADA

- Abdelwahd, R; Hakam, N; Labhilili, M; UduPA, S. 2008. Use of an adsorbent and antioxidants to reduce the effects of leached phenolics in *in vitro* plantlet regeneration of faba bean. *African Journal of Biotechnology* 7: 997-1002.
- Abdullah, A; Yeoman, M; Grace, J. 1987. Micropropagation of mature Calabrian pine (*Pinus brutia* Ten.) from fascicular buds. *Tree Physiology* 3:123-136.
- Afele, J; De Langhe, E. 1991. Increasing *in vitro* germination of *Musa balbisiana* seed. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 27: 33-36.
- Aftab, F; Iqbal, J. 1999. Plant regeneration from protoplasts derived from cell suspension of adventive somatic

- embryos in sugarcane (*Saccharum* spp. hybrid cv. CoL-54 and cv. CP-43/33). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 56: 155-162.
- Ahuja, M. 1986. Micropropagation of juvenile and mature beech and oak. In *Absstracts VI International Congress Plant Tissue and Cell Culture*. Minneapolis, USA. p. 11.
- Aliyu, O. 2005. Application of tissue culture to cashew (*Anacardium occidentale* L.) breeding: An appraisal. *African Journal of Biotechnology* 4: 1485-1489.
- Amin, M.; Jaiswal, V. 1988. Micropropagation as an aid to rapid cloning of a guava cultivar. *Scientia Horticulturae* 36: 89-95.
- Amiot, M.; Forget, F.; Goupy, P. 1996. Polyphenol, oxidation and colour: progress in the chemistry of enzymatic and non-enzymatic derived products. *Herba Polonica* 42: 237-247.
- Anderson, J. 1975. Propagation of rhododendrons by tissue culture. I. Development of a culture medium for multiplication of shoots. *Combined Proceeding International Plant Propagator's Society* 25: 129-135.
- Anderson, U.; Ievinsh, G. 2002. Changes of morphogenic competence in mature *Pinus sylvestris* L. buds *in vitro*. *Annals of Botany* 90: 293-298.
- Apel, K.; Hirt, H. 2004. Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* 55: 373-399.
- Arauz, F. 1998. Fitopatología; un enfoque agroecológico. San José Costa Rica. Editorial de la Universidad de Costa Rica. 467 p.
- Azofeifa, A. 2007. Desarrollo de metodologías para la caracterización de materiales promisorios de jocote (*Spondias purpurea* L.) por medio de marcadores moleculares, para el rescate de embriones y para el cultivo de yemas *in vitro*. Tesis Mag. Sc., Sistema de Estudios de Posgrado, Universidad de Costa Rica. 134 p.
- Baker, C.; Wetzstein, H. 1994. Influence of auxin type and concentration on peanut somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 36: 361-368.
- Banerjee, N.; De Langhe, E. 1985. A tissue culture technique for rapid clonal propagation and storage under minimal growth conditions of *Musa* (banana and plantain). *Plant Cell Reports* 4: 351-354.
- Barghchi, M. 1986. *In vitro* culture of mature commercial *Pistacia vera* L. cultivars. *Combined Proceeding International Plant Propagator's Society* 35: 331-333.
- Bellarosa, R. 1988. *In vitro* propagation of oaks (*Q. suber*, *Q. pubescens*, *Q. cerris*). *Acta Horticulturae* 227: 433-435.
- Bhat, S.; Chandel, K. 1991. A novel technique to overcome browning in tissue culture. *Plant Cell Reports* 10:358-361.
- Bhatia, P.; Ashwath, N. 2008. Improving the quality of *in vitro* cultured shoots of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Red Coat.). *Biotechnology* 7: 188-193.
- Bhatt, I. Uppeandra, D.; Dhar, U. 2000. Micropropagation of Indian wild strawberry. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 60:83-88.
- Bon, M.; Gendraud, M.; Francllet, A. 1988. Roles of phenolic compounds on micropropagation of juvenile and mature clones of *Sequoiadendron giganteum*: influence of activated charcoal. *Scientia Horticulturae* 34: 283-291.
- Bonga, J.; Durzan, D. 1982. *Tissue culture in forestry*. Nijhoff / Junk Publishers. London, England. 420 p.
- Bray, E.; Bailey-Serres, J.; Weretilnyk, E. 2000. Responses to abiotic stresses. In: Buchanan, B.; Gruissem, W.; Jones, R. eds. *Biochemistry and molecular biology of plants*. American Society of Plant Physiologists. Maryland, USA. p. 1158-1203.
- Brisson, L.; Ibrahim, R.; Rideau, M. 1988. Tissue culture of *Chrysosplenium americanum* and its potential for flavonoid production. *Plant Cell Reports* 7: 130-133.
- Broome, O.; Zimmerman, R. 1978. *In vitro* propagation of blackberry. *HortScience* 13: 151-153.
- Cai, T.; Butler, L. 1990. Plant regeneration from embryogenic callus initiated from immature inflorescences of

- several high-tannin *sorghums*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 20: 101-110.
- Cañas, L; Benbadis, A. 1988. *In vitro* plant regeneration from cotyledon fragments of the olive tree (*Olea europaea* L.). *Plant Science* 54: 65-74.
- Cassells, A; Curry, R. 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.
- Cervelli, R. 1987. *In vitro* propagation of *Aconitum noveboracense* and *Aconitum napellus*. *HortScience* 22: 304-305.
- Chacón, G; Gómez, L. 1996. Micropropagación de una variedad local de mora (*Rubus* sp.) *In: Memoria X Congreso Nacional Agronómico y de Recursos Naturales, III Congreso Nacional de Fitopatología, II Congreso Nacional de Suelos. Volumen I. EUNED, EUNA. San José, Costa Rica. p 303.*
- Christiansen, J; Fonnesbech, M. 1975. Prevention by polyvinylpyrrolidone of growth inhibition of *Hamamelis* shoot tips grown *in vitro* and of browning of the agar medium. *Acta Horticulturae* 54: 101-104.
- Constabel, F. 1984. Callus culture: Induction and maintenance. *In: Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants. Vol 1. Indra Vasil. Academic Press. p. 27-34.*
- Costa, ML; Cívello, PM; Cháves, AR; Martínez, GA. 2005. Effect of ethephon and 6-benzylaminopurine on chlorophyll degrading enzymes and a peroxidase-linked chlorophyll bleaching during post-harvest senescence of broccoli (*Brassica oleracea* L.) at 20 °C. *Postharvest Biology and Technology* 35: 191-199.
- Dalal, M; Sahni, C; Khan, A; Surinder, K; Kumar, S. 1999. Effect of explant source and stock plant treatment on pre-existing total phenols and culture initiation of grapevine *in vitro*. *Applied Biological Research* 1: 95-98.
- Das, T; Mitra, G. 1990. Micropropagation of *Eucalyptus tereticornis* Smith. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 22: 95-103.
- Davies, M. 1972. Polyphenol synthesis in cell suspension cultures of Paul's Scarlet Rose. *Planta* 104: 50-65.
- Debergh, P; Maene, L. 1977. Rapid clonal propagation of pathogen free pelargonium plants starting from tips and apical meristems. *Acta Horticulturae* 78: 449-454.
- D'Silva, I; D'Souza, L. 1993. Controlling contamination and browning of *in vitro* cultures of cashew. *Journal of Plantation Crops* 21: 22-29.
- Duhem, K; Le Mercier, N; Boxus, P. 1988. Difficulties in the establishment of axenic *in vitro* cultures of field collected coffee and cacao germplasm. *Acta Horticulturae* 225: 67-75.
- Ebert, A; Taylor, F; Blake, J. 1993. Changes of 6-benzylaminopurine and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid concentrations in plant tissue culture media in presence of activated charcoal. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 33: 157-162.
- Feng-Jie, T; Zhi-Yi, Z; Jun, Z; Na, Y; Dong-Mei, W. 2007. Contamination and browning in tissue culture of *Platanus occidentalis* L. *Forestry Studies in China* 9: 279-282.
- Figueiredo, SFL; Albarello, N; Viana, VRC. 2001. Micropropagation of *Rollinia mucosa* (JACQ.) BAILL. *In vitro Cellular and Development Biology – Plant* 37: 471-475.
- Finch, R; Baset, A; Slamet, I; Cocking, E. 1992. *In vitro* shoot culture of wild *Oryza* and other grass species. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 30: 31-39.
- Fish, N; Jones, M. 1988. A comparison of tissue culture response between related tetraploid and dihaploid *S. tuberosum* genotypes. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 15: 201-210.
- Fisher, J; Tsai, J. 1978. *In vitro* growth of embryos and callus of coconut palm. *In vitro* 14: 307-311.
- Flores, R; Stefanello, S; Franco, E; Mantovani, N. 1998. Regeneração *in vitro* de espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart.). *Revista Brasileira de Agrociência* 4: 201-205.

- Fraignier, M; Marques, L; Fleuriet, A; Macheix, J. 1995. Biochemical and immunochemical characteristics of polyphenol oxidases from different fruits of *Prunus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43: 2375-2380.
- Gannoun, S; Lionakis, S; Gerasopoulos, D; Kaska, N; Kuden, A; Ferguson, L; Michailides, T. 1995. Aspects of *in vitro* culture of *Pistacia terebinthus* and *P. vera*. *Acta Horticulturae* 419: 201-206.
- Garton, S; Moses, M. 1986. Production of native plants in tissue culture. *Combined Proceeding International Plant Propagator's Society* 35: 306-315.
- George, E. 1993. Plant propagation by tissue culture; part 1. The technology. 2 ed. Exegetics Limited. England. 574 p.
- George, E. 1996. Plant propagation by tissue culture; part 2. In Practice. 2 ed. Exegetics Limited. England. 1361 p.
- Giri, A; Ahuja, P; Ajaykumar, P. 1993. Somatic embryogenesis and plant regeneration from callus culture of *Aconitum heterophyllum* Wall. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 32: 213-218.
- Gratão, PL; Polle, A; Lea, PJ; Azevedo, RA. 2005. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. *Functional Plant Biology* 32: 481-494.
- Guerra, M; Handro, W. 1988. Somatic embryogenesis and plant regeneration in embryo cultures of *Euterpe edulis* Mart. (Palmae). *Plant Cell Reports* 7: 550-552.
- Guo, Y; Sewón, P; Pulli, S. 1999. Improved embryogenesis from anther culture and plant regeneration in timothy. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 57: 85-93.
- Gupta, P. 1986. Eradication of mosaic disease and rapid clonal multiplication of bananas and plantains through meristem tip culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 6: 33-39.
- Gupta, P; Nadgir, A; Mascarenhas, A; Fagannathan, V. 1980. Tissue culture of forest trees: clonal multiplication of *Tectona grandis* L. (Teak) by tissue culture. *Plant Science Letters* 17: 259-268.
- Gutiérrez, C. 1993. Propagación clonal *in vitro* de *Cattleya* por medio de meristemo. *In: Resúmenes IX Congreso Nacional Agronómico y de Recursos Naturales*. I-(2). San José, Costa Rica. p. 35.
- Gutiérrez, C; Kuan-Jou. 1993. Propagación clonal *in vitro* de ejes florales de *Phalaenopsis* "Golden Emperor Sweet". *In: Resúmenes IX Congreso Nacional Agronómico y de Recursos Naturales*. II-(2). San José, Costa Rica. p. 131.
- Han, B; Liu, S. 1990. Walnut. *In: Handbook of plant Cell Culture*. Vol 6. Perennial Crops. McGraw-Hill Publishing. p. 431-439.
- Harada, H; Imamura, J. 1983. Factors that stimulate pollen embryogenesis. *In: Cell and Tissue Culture Techniques for cereal crop improvement*. Gordon and Breach, Science Publishers Inc. New York. 549 p.
- Harikrishnan, K; Martin, K; Anand, P; Hariharan, M. 1997. Micropropagation of sweetflag (*Acorus calamus*) a medicinal plant. *Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences* 19: 427-429.
- Harms, C; Baktir, I; Oertli, J. 1983. Clonal propagation *in vitro* of red beet (*Beta vulgaris* spp.) by multiple adventitious shoot formation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 2: 93-102.
- Hohtola, A. 1988. Seasonal changes in explant viability and contamination of tissue cultures from mature Scots pine. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 15: 211-222.
- Hörtensteiner, S. 1999. Chlorophyll breakdown in higher plants and algae. *Cellular and Molecular Life Sciences* 56: 330-347.
- Huang, LC; Lee, YL; Huang, BL; Kuo, CI; Shaw, JF. 2002. High polyphenol oxidase activity and low titratable activity in browning bamboo tissue culture. *In Vitro Cellular and Developmental Biology -Plant* 38: 358-365.

- Ichihashi, S; Kako, S. 1977. Studies in clonal propagation of *Cattleya* by tissue culture. II. Browning of *Cattleya*. Journal Japanese Society for Horticultural Science 46: 325-330.
- Jambor-Benczur, E; Nemenyi, A; Szendrak, E; Szafian, Z. 1997. *In vitro* propagation of *Ailanthus altissima* (Swingle) "Purple Dragon". Horticultural Science 29: 22-25.
- Jarret, R; Rodriguez, W; Fernandez, R. 1985. Evaluation, tissue culture propagation and dissemination of "Saba" and "Petipita" plantains in Costa Rica. Scientia Horticulturae 25: 137-147.
- Jelaska, S. 1987. Micropropagation of juvenile *Calocedrus decurrens*. Acta Horticulturae 212: 449-456.
- Jha, S; Das, S. 2004. Tissue culture of cashewnut. In: Plant biotechnology and molecular markers. Srivastava, P; Narula, A; Srivastava, S. Anamaya, Publishers, New Delhi, India. p. 244-260.
- Jonard, R; Hugard, J; Macheix, J; Martinez, J; Mosella-Chancel, L; Poessel, J; Villemur, P. 1983. *In vitro* micrografting and its applications to fruit science. Scientia Horticulturae 20: 147-159.
- Jordan, M; Oyanedal, E. 1992. Regeneration of *Pouteria lucuma* (Sapotaceae) plants *in vitro*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 31: 249-252.
- Joy, R; Patel, K; Thorpe, T. 1988. Ascorbic acid enhancement of organogenesis in tobacco callus. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 13: 219-228.
- Kanchanapoom, K; Domyoas, P. 1999. The origin and development of embryoids in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq) embryo culture. ScienceAsia 25: 195-202.
- Kapik, R; Earnshaw, B; Carlson, J; Johnson, M. 1986. The promotion of somatic embryogenesis by exogenous hydrogen peroxide. In: Abstracts VI International Congress Plant Tissue and Cell Culture, International Association Plant Tissue Culture, Minneapolis, Minn. USA. 165 p.
- Karp, G. 1998. Biología celular y molecular. Traducido por Dr. J. Pérez. UNAM. McGraw-Hill Interamericana. México D.F. México. 746 p.
- Kawiak, A; Piosik, J; Stasiłojc, G; Gwizdek-Wisniewska, A; Marczak, L; Stobieckj, M; Bigda, J; Lojkowska, E. 2007. Induction of apoptosis by plumbagin through reactive oxygen species mediated inhibition of topoisomerase II. Toxicology and Applied Pharmacology 223: 267-276.
- Kefeli, V; Kalevitch, M; Borsari, B. 2003. Phenolic cycle in plants and environment. Journal of Cell and Molecular Biology 2: 13-18.
- Knudson, L. 1950. Germination of seeds of vanilla. American Journal of Botany 37: 241-247.
- Krul, W; Worley, J. 1977. Formation of adventitious embryos in callus cultures of a French hybrid grape. HortScience 12: 411.
- Kvaalen, H; Appelgren, M. 1999. Light quality influences germination, root growth and hypocotyl elongation in somatic embryos but not in seedlings of Norway spruce. *In vitro* Cellular and Developmental Biology Plant 35: 437-441.
- Laukkanen, H; Rautiainen, L; Taulavuori, E; Hohtola, A. 2000. Changes of cellular structures and enzymatic activities during browning of Scots pine callus derived from mature buds. Tree Physiology 20: 467-475.
- León, S; Arenas, L; Viloría, Z. 1997. Efecto de la exposición solar de las plantas donantes en la iniciación del cultivo *in vitro* de guayabo (*Psidium guajava* L.). LUZ. Rev. Fac. Agron. Venezuela 14: 47-53.
- Lidemann, E; Gunckel, J; Davidson, O. 1970. Meristem culture of *Cattleya*. American Orchid Society Bulletin 39: 1002-1004.
- Liningtong, I. 1991. *In vitro* propagation of *Dipterocarpus alatus* and *Dipterocarpus intricatus*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 27: 81-88.
- Litz, R; Knight, R; Gazit, S. 1984. *In vitro* somatic embryogenesis from *Mangifera indica* L. callus. Scientia Horticulturae 22: 233-240.
- Lloyd, G; Mccow, B. 1981. Commercially feasible micropropagation of Mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by

- use of shoot tip culture. Proceeding International Plant Propagator's Society 30: 421-427.
- Lux-Endrich, A; Treutter, D; Feucht, W. 2000. Influence of nutrients and carbohydrate supply on the phenol composition of apple shoot cultures. *Plant Cell, tissue and Organ Culture* 60: 15-21.
- Mante, S; Tepper, H. 1983. Production of *Musa textilis* Nee plants from apical meristem slices *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 2: 151-159.
- Marczak, L; Wojtaszek, P; Stobiecki, M. 2008. Influence of plant secondary metabolites on *in vitro* oxidation of methyl ferulate with cell wall peroxidases from lupine apoplast. *Journal of Plant Physiology* 165(3): 239-250.
- Marks, T; Simpson, E. 1990. Reduced phenolic oxidation at culture initiation *in vitro* following the exposure of field-grown stock plants to darkness or low levels of irradiance. *Journal of Horticultural Science* 65: 103-111.
- Mathews, H. 1987. Morphogenetic responses from *in vitro* cultured seedling explants of mung bean (*Vigna radiata* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 11: 233-240.
- Mathur, J. 1993. Somatic embryogenesis from callus culture of *Nardostachys jatamansi*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 33: 163-169.
- Matkowski, A. 2008. Plant *in vitro* culture for the production of antioxidants – A review. *Biotechnology Advances* 26: 548-560.
- McComb, J; Newton, S. 1981. Propagation of Kangaroo paws using tissue culture. *Journal of Horticultural Science* 56: 181-183.
- Mederos, S; Rodríguez, E. 1987. *In vitro* propagation of "Golden Times" roses. Factors affecting shoot tips and axillary bud growth and morphogenesis. *Acta Horticulturae* 212: 619-624.
- Mengyun, S; Jingmin, J. 2004. A study on techniques of inducing callus and controlling browning of stem segments of *Parakmeria lotongensis*. *Forest Research* 17: 757-762.
- Mittler, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* 7: 405-410.
- Mittler, R; Vanderauwera, S; Gollery, M; Breusegem, F. 2004. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science* 9: 490-498.
- Monco, L; Sondahl, M; Carvalho, A; Crocomo, O; Sharp, W. 1977. Applications of tissue culture in the improvement of coffee. *In: Reinert, J; Bajaj, P. 1977. Applied and fundamental aspects of plant cell tissue and organ culture. Springer-Verlag, Berlin. p. 109-129.*
- Muneta, P. 1981. Comparisons of inhibitors of tyrosine oxidation in the enzymatic blackening of potatoes. *American Potato Journal* 58: 85-92.
- Murashige, T. 1974. Plant propagation through tissue culture. *Annual Review of Plant Physiology* 25: 135-166.
- Murashige, T.; Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497
- Murkute, A.; Shanti-patil, M. 2003. Exudation and browning in tissue culture of pomegranate. *Agricultural Science Digest* 23: 29-31.
- Navarro, L. 1988. Application of shoot tip grafting *in vitro* to woody species. *Acta Horticulturae* 227: 43-55.
- NG, S. 1988. *In vitro* tuberization in white yam (*Dioscorea rotundata* Poir). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 14: 121-128.
- Novoa, A; Motidome, M; Mancini-Filho, J; Linares, A; Tanae, M; Torres, L; Lapa, A. 2001. Actividad antioxidante y ácidos fenólicos del alga marina *Bryothamnion triquetrum* (S.G. Gmelim) Howe. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* 37: 373-382.
- Ogita, S. 2005. Callus and cell suspension culture of bamboo plant, *Phyllostachys nigra*. *Plant Biotechnology* 22: 119-125.
- Ozyigit, I; Kahraman, M; Ercan, O. 2007. Relation between explant age, total phenols and regeneration response in tissue cultured cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *African Journal of Biotechnology* 6: 3-8.

- Parra, R; Amo-Marco, J. 1996. Effect of plant growth regulators and basal media on *in vitro* shoot proliferation and rooting of *Myrtus communis* L. *Biologia Plantarum* 38: 161-168.
- Peñuela, R; Garavito, C; Sanchez-Tames, R; Rodríguez, R. 1988. Multiple shoot - but stimulation and rhizogenesis of embryogenic and juvenile explants of walnut. *Acta Horticulturae* 227: 457-459.
- Pérez, C; Rodríguez, R; Tames, R. 1985. *In vitro* filbert (*Corylus avellana* L.) micropropagation from shoot and cotyledonary node segments. *Plant Cell Reports* 4: 137-139.
- Petersen, K; Hansen, J; Krogstrup, P. 1999. Significance of different carbon sources and sterilization methods on callus induction and plant regeneration of *Miscanthus x ogiformis* Honda "Giganteus". *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 58: 189-197.
- Pierik, R.; Tetteroo, F. 1987. Vegetative propagation of *Begonia venosa* Skan *in vitro* from inflorescence explants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 10: 135-142.
- Pirela, E. 2002. Propagación clonal *in vitro* del guayabo (*Psidium guajava* L.) a partir de ápices caulinares, segmentos nodales y miniestacas de tallo. Consultado 22 agosto 2003. Disponible en <http://pegasus.ucla.edu/ve/ccc/resumen/agronomia/ca2-04-ag.htm>. 2p.
- Pompeu, G, Gratão, P; Vitorello, V; Azevedo, R. 2008. Antioxidant isoenzyme responses to nickel-induced stress in tobacco cell suspension culture. *Scientia Agricola* 65: 548-552.
- Poornima, G.; Ravishankar, R. 2007. *In vitro* propagation of wild yams, *Dioscorea oppositifolia* (Linn) and *Dioscorea pentaphylla* (Linn). *African Journal of Biotechnology* 6: 2348-2352.
- Qu, R; Chaudhury, A. 2001. Improved young inflorescence culture and regeneration of 'Tifway' Bermudagrass (*Cynodon transvaalensis* x *C. dactylon*). *International Turfgrass Society* 9: 198-201.
- Radojevic, L. 1988. Plant regeneration of *Aesculus hippocastanum* L. (Horse Chestnut) through somatic embryogenesis. *Journal of Plant Physiology* 132: 322-326.
- Ramanayake, S; Kovoov, A. 1999. *In vitro* micrografting of cashew (*Anacardium occidentale* L.). *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 74: 265-268.
- Rao, G; Willison, J; Ratnayake, W; Ackman, R. 1985. Phenolics of suberized envelopes generated by isolated tomato locule protoplasts. *Phytochemistry* 24: 2127-2128.
- Reynolds, J; Murashige, T. 1979. Asexual embryogenesis in callus cultures of palms. *In vitro* 15: 383-387.
- Ripley, K; Preece, J. 1986. Micropropagation of *Euphorbia lathyrio* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 5: 213-218.
- Rugini, E; Fontanazza, G. 1981. *In vitro* propagation of "Dolce Agogia" olive. *HortScience* 16: 492-493.
- Sánchez-Cuevas, M; Salaverría, J. 2004. Control de la oxidación y la contaminación en el cultivo *in vitro* de fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.). *UDO Agrícola* 4: 21-26.
- Saxena, S; Dhawan, V. 1999. Regeneration and large-scale propagation of bamboo (*Dendrocalamus strictus* Nees) through somatic embryogenesis. *Plant Cell Reports* 18: 438-444.
- Selva, E; Stouffs, B; Briquet, M. 1989. *In vitro* propagation of *Vicia faba* L. by micro-cutting and multiple shoot induction. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 18: 167-179.
- Seneviratne, P; Wijesekara, G. 1996. The problem of phenolic exudates in *in vitro* culture of mature *Hevea brasiliensis*. *Journal of Plantation Crop* 24: 54-62.
- Shao, H-B; Chu, L-Y; Shao, M-A; Cheruth, A, MI, H-M. 2008. Higher plant antioxidants and redox signaling under environmental stresses. *C.R. Biologies* 331: 433-441.
- Skellern, G. 1989. Thiocarbamides. *In: Sulphur containing drugs and related organic compounds: Chemistry,*

- Biochemistry and Toxicology. Vol 1. Ellis Horwood Ltd. Chichester. UK.
- Subbaiah, M; Minocha, S. 1990. Shoot regeneration from stem and leaf callus of *Eucalyptus tereticornis*. Plant Cell Reports 9: 370-373.
- Sudripta, D; Timir, B; Sumita, J. 1996. *In vitro* propagation of cashewnut. Plant Cell Reports 15: 615-619.
- Sugimura, Y; Salvaña, M. 1988. Induction and growth of callus derived from rachilla explants of young inflorescences of coconut palm. Canadian Journal of Botany 67: 272-274.
- Tabiyeh, D; Bernard, F; Shacker, H. 2006. Investigation of glutathione, salicylic acid and GA₃ effects on browning in *pistacia vera* shoot tips culture. Acta Horticulturae 726: 201-204.
- Tang, W; Harris, L; Outhavong, V; Newton, R. 2004. Antioxidants enhance *in vitro* plant regeneration by inhibiting the accumulation of peroxidase in Virginia pine (*Pinus virginiana* Mill.). Plant Cell Reports 22: 871-877.
- Tang, W; Newton, R. 2004. Increase of polyphenol oxidase and decrease of polyamines correlate with tissue browning in Virginia pine (*Pinus virginiana* Mill.). Plant Science 167: 621-628.
- Teixeira, J; Sondahl, N; Kirby, E. 1993. Somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of oil palm. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 34: 227-233.
- Thomas, P; Ravindra, M. 1997. Shoot tip culture in mango: influence of medium, genotype, explant factor, season and decontamination treatments on phenolic exudation, explant survival and axenic culture establishment. Journal of Horticultural Science 72: 713-722.
- Tisserat, T; Foster, G; De Manson, D. 1979. Plantlet production *in vitro* from *Phoenix dactylifera* L. Date Growers' Institute Reports 54: 19-23.
- Titov, S; Bhowmik, S; Mandal, A; Alam, M; Uddin, S. 2006. Control of phenolic compound secretion and effect of growth regulators for organ formation from *Musa* spp. cv. Kanthali floral bud explants. American Journal of Biochemistry and Biotechnology 2: 97-104.
- Traumann, I; Visser, J. 1989. Development of a liquid flow-through system to inhibit browning in callus culture of guayule (*Porthenium argentatum* Gray). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 16: 39-46.
- Trottier, M; Collin, J; Comeau, A. 1993. Comparison of media for their aptitude in wheat anther culture. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 35: 59-67.
- Tulecke, W; Mcgranahan, G; Ahmadi, H. 1988. Regeneration by somatic embryogenesis of triploid plants from endosperm of walnut, *Juglans regia* L. cv. Manregian. Plant Cell Reports 7: 301-304.
- Turrens, J. 2003. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. Journal of Physiology 552: 335-344.
- Uddin, SN; Titov, S. 2007. Somatic embryogenesis of *Musa* sp. cv. Kanthali using floral bud explants. Journal of Plant Sciences 2: 35-44.
- Uosukainen, M. 1987. Establishment of cultures without preconditioning. Acta Horticulturae 212: 60.
- Upadhyay, A; Parthasarathy, U; Seema, G; Karun, A; Parthasarathy, V. 1999. Effect of antioxidants on oil palm leaf *in vitro*. Indian Journal of Horticultural 56: 149-154.
- Utino, S; Fernandes, I; Chaves, L. 2001. Crescimento e oxidação de explantes de bananeira prata (*Musa aab*) *in vitro*. iv. concentrações de sais, ácidos ascórbicos e frequência de subcultivos. Revista brasileira de fruticultura 23: 409-412.
- Valderrama, R; Corpas, F; Carreras, A; Fernández-Ocaña, A; Chaki, M; Luque, F; Gómez-Rodríguez, M; Colmenero-varea, P; Del Río, L; Barroso, J. 2007. Nitrosative stress in plants. FEBS Letters 581: 453-461.
- Van Le, B; Nghieng Thao, D; Gendy, C; Vidal, J; Tran Thanh Van, K. 1997. Somatic embryogenesis on Thin Cell Layers of a C₄ species, *Digitaria sanguinalis* (L.) Scop. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 49: 201-208.

- Van Staden, J; Fennell, C; Taylor, N. 2006. Plant stress *in vitro*: the role of phytohormones. *Acta Horticulturae* 725: 55-62.
- Vasar, V. 2004. Application of antioxidants in rooting of *Prunus avium* L. microshoots. *Acta Universitatis Latviensis, Biology* 676: 251-256.
- Vatanpour-Azghandi, A; Villiers, T; Ghorbani, A; Tajabadi, A. 2002. The microscopy of tissue decolouration and browning problem in pistachio callus cultures. *Acta Horticulturae* 591: 377-388.
- Villalobos, I; Arias, O. 1987. Inducción y multiplicación de callos *in vitro* en tres cultivares comerciales de caña de azúcar (*Saccharum* spp). *Agronomía costarricense* 11: 39-44.
- Walkey, D. 1972. Production of apple plantlets from axillary bud meristems. *Canadian Journal of Plant Science* 52: 1085-1087.
- Wang, P; Huang, L. 1976. Beneficial effects of activated charcoal on plant tissue and organ cultures. *In vitro* 12: 260-262.
- Watad, A; Ben-Jaacov, J; Cohen, S; Tal, E; Solomon, H. 1992. *In vitro* establishment of *Protea obtusifolia*. *Acta Horticulturae* 316: 59-62.
- Weinstein, L; Robbins, W; Perkins, H. 1951. Chelating agents and plant nutrition. *Science* 120: 41-43.
- Wetmore, R; Morel, G. 1949. Phenol oxidase as problem in organ culture and auxin diffusion studies of horsetails and ferns. *American Journal of Botany* 36: 830.
- Yadav, U; Lal, M; Jaiswal, V. 1990. *In vitro* micropropagation of the tropical fruit tree *Syzygium cumini* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 21: 87-92.
- Zavaleta-Mancera, H; López-Delgado, H; Loza-Tavera, H; Mora-Herrera, M; Trevilla-García, C; Vargas-Suárez, M; Ougham, H. 2007. Cytokinin promotes catalase and ascorbate peroxidase activities and preserves the chloroplast integrity during dark-senescence. *Journal of Plant Physiology* 164: 1572-1582.
- Zepeda, C; Sagawa, Y. 1981. *In vitro* propagation of pineapple. *HortScience* 16:495.
- Zhong, L; Shihua, D; Jin, K; Shaoqing, L; Yangsheng, L; Yingguo, Z. 2007. A single genetic locus in chromosome 1 controls conditional browning during the induction of calli from mature seeds of *Oryza sativa* ssp. *Indica*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 89: 237-245.
- Ziv, M. 1983. The stimulatory effect of liquid induction medium on shoot proliferation of *Ruscus hypophyllum* L. *Scientia Horticulturae* 19: 387-394.
- Ziv, M; Halevy, A. 1983. Control of oxidative browning and *in vitro* propagation of *Strelitzia reginae*. *HortScience* 18: 434-436.

