

ESTABLECIMIENTO *in vitro* DE PASCUITA (*Euphorbia leucocephala* Lotsy) E INDUCCIÓN DE CALLOS Y TALLOS BAJO DIFERENTES COLORES DE LUZ LED

In vitro ESTABLISHMENT OF PASCUITA (*Euphorbia leucocephala* Lotsy) AND CALLUS AND SHOOT INDUCTION UNDER DIFFERENT LED LIGHT COLORS

Colinas-León, María Teresa; Carlos de Jesús Morales-Becerril; Ramón Marcos Soto-Hernández; Natanael Magaña-Lira; María Teresa Martínez-Damián y José Luis Rodríguez-de la O

ESTABLECIMIENTO *in vitro* DE PASCUITA (*Euphorbia leucocephala* Lotsy) E INDUCCIÓN DE CALLOS Y TALLOS BAJO DIFERENTES COLORES DE LUZ LED
In vitro ESTABLISHMENT OF PASCUITA (*Euphorbia leucocephala* Lotsy) AND CALLUS AND SHOOT INDUCTION UNDER DIFFERENT LED LIGHT COLORS



Establecimiento *in vitro* de pasquita (*Euphorbia leucocephala* Lotsy) e inducción de callos y tallos bajo diferentes colores de luz led

In vitro establishment of pasquita (*Euphorbia leucocephala* Lotsy) and callus and shoot induction under different led light colors

Colinas-León, María Teresa;
Carlos de Jesús Morales-Becerril;
Ramón Marcos Soto-Hernández;
Natanael Magaña-Lira;
María Teresa Martínez-Damián
y José Luis Rodríguez-de la O

ESTABLECIMIENTO *in vitro*
DE PASCUITA (*Euphorbia*
leucocephala Lotsy) E
INDUCCIÓN DE CALLOS Y
TALLOS BAJO
DIFERENTES COLORES DE
LUZ LED

In vitro ESTABLISHMENT
OF PASCUITA (*Euphorbia*
leucocephala Lotsy) AND
CALLUS AND SHOOT
INDUCTION UNDER
DIFFERENT LED LIGHT
COLORS

POLIBOTÁNICA

Instituto Politécnico Nacional

Núm. 56: 181-195. Julio 2024

DOI:

10.18387/polibotanica.58.13

María Teresa Beryl Colinas y León <https://orcid.org/0000-0003-2617-5928>

Carlos de Jesús Morales-Becerril

Autor de correspondencia: carlos_morales.becerril@hotmail.com

<https://orcid.org/0000-0003-0125-6457>

Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo,
Texcoco, Estado de México

Ramón Marcos Soto-Hernández <https://orcid.org/0000-0001-8577-7991>

Área de Botánica, Colegio de Posgraduados. Montecillo,
Texcoco, Estado de México, México

Natanael Magaña-Lira <https://orcid.org/0000-0003-4940-5060>

María Teresa Martínez-Damián <https://orcid.org/0000-0002-7204-2133>

José Luis Rodríguez-de la O <https://orcid.org/0000-0002-2331-9984>

Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo,
Texcoco, Estado de México, México

RESUMEN: La pasquita (*Euphorbia leucocephala* Lotsy) es una planta con uso ornamental durante la temporada navideña. La nula existencia de variedades agronómicas y protocolos de reproducción vegetativa eficientes son retos asociados a esta especie. La generación de un protocolo de reproducción *in vitro* por organogénesis indirecta representa un primer paso para abordar ambos retos. El objetivo del presente trabajo fue determinar el tipo de explante y agente antioxidante adecuado para establecer a la pasquita *in vitro*, así como evaluar tres colores de luz LED y diferentes combinaciones de benciladenina (BA) y ácido indol-3-acético (AIA) sobre la formación de callos y posterior generación de tallos. En una primera fase se probó el uso de fragmentos foliares y fragmentos de nudo como propágulos y carbón activado (1 g L^{-1}) y polivinilpirrolidona (PVP, 300 mg L^{-1}) como agentes antioxidantes para establecer a la pasquita *in vitro*. En una segunda fase se probó el efecto de 9 y 12 μM de BA en combinación con 5, 8 y 11 μM de AIA agregados al medio de cultivo (WPM) y luz LED blanca, roja y azul ($10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ y 16 h fotoperiodo), sobre la generación de callos y posterior formación de tallos en fragmentos de nudos de pasquita. Los resultados mostraron que es posible establecer a la pasquita *in vitro* utilizando como explante fragmentos de nudos y PVP como agente antioxidante; así mismo, es posible generar callos bajo todos los tratamientos evaluados, siendo bajo luz roja donde el proceso se da más rápido (100% al día 16, bajo otros colores hasta el día 23) y donde se observó 100% de callos con formación de tallos; el número y longitud de los tallos estuvo en función de las interacciones entre los tratamientos hormonales y luminosos. Es posible generar callos con cualquiera de los tratamientos hormonales y luminosos evaluados; la luz roja acelera la formación de callos y tallos adventicios de pasquita con características deseables. **Palabras clave:** *Euphorbia leucocephala*, cultivo *in vitro*, organogénesis indirecta, iluminación LED.

ABSTRACT: Pasquita (*Euphorbia leucocephala* Lotsy) is a plant commonly used for ornamental purposes during the Christmas season. The lack of agronomic varieties and efficient vegetative reproduction protocols pose challenges for this species. The development of an *in vitro* reproduction protocol through indirect

organogenesis represents a first step in addressing both challenges. The objective of this study was to determine the suitable type of explant and antioxidant agent for *in vitro* establishment of pascuíta, as well as to evaluate three LED light colors and different combinations of benzyladenine (BA) and indole-3-acetic acid (IAA) on callus formation and subsequent shoot generation. In the first phase, the use of leaf fragments and node fragments as explants, along with activated charcoal (1 g L^{-1}) and polyvinylpyrrolidone (PVP, 300 mg L^{-1}) as antioxidant agents, was tested for *in vitro* establishment of pascuíta. In the second phase, the effect of 9 and $12 \text{ }\mu\text{M}$ BA in combination with 5, 8, and $11 \text{ }\mu\text{M}$ IAA added to the culture medium (WPM) and white, red, and blue LED light ($10 \text{ }\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ and 16 h photoperiod) were tested on callus generation and subsequent shoot formation in pascuíta node fragments. Results showed that it is possible to establish pascuíta *in vitro* using node fragments as explants and PVP as an antioxidant agent. Additionally, callus formation was observed under all evaluated treatments, with the fastest process occurring under red light (100% by day 16, compared to day 23 under other colors), and 100% of calli showing shoot formation under red light. The number and length of shoots depended on the interactions between hormonal and light treatments. Callus formation with desirable characteristics and subsequent shoot formation can be achieved with any of the evaluated hormonal and light treatments; red light accelerates callus and adventitious shoot formation in pascuíta.

Key words: *Euphorbia leucocephala*, *in vitro* culture, indirect organogenesis, LED lighting.

INTRODUCCIÓN

La pascuíta (*Euphorbia leucocephala* Lotsy) es una especie vegetal arbustiva originaria de México y Centroamérica, utilizada como ornamental en la temporada navideña. Se propaga principalmente por esquejes y semillas. Su reproducción en masa por diferentes técnicas de micropropagación no está reportada y solo existe un antecedente en la literatura científica que proporciona información sobre el establecimiento exitoso y posterior enraizamiento de esquejes apicales de pascuíta *in vitro* (Martínez-Villegas *et al.*, 2015). La nula existencia de variedades comerciales de esta especie es uno de los grandes problemas para los productores y una oportunidad para la investigación en mejoramiento genético. Diversas técnicas de transformación y generación de mutaciones pueden ser aplicadas sobre callos *in vitro* en programas de mejoramiento genético. Lo anterior deja clara la necesidad de generar una metodología para el establecimiento *in vitro* y la formación de callos de pascuíta, como un primer paso para abordar parte de los retos asociados a la producción agronómica de esta especie.

La formación de callos *in vitro* de cualquier especie vegetal involucra la posibilidad de generar variaciones somaclonales en ese tejido y en aquellos formados a partir del mismo (Duta-Cornescu *et al.*, 2023). Cuando se desea propagar una especie ornamental (como es el caso de la pascuíta) por organogénesis indirecta, la presencia de variaciones somaclonales puede representar un problema, especialmente aquellas que se expresan en el fenotipo, pues lo que se desea en dichos casos, es la generación de plántulas idénticas a la planta madre. Estas variaciones pueden ser también utilizadas durante el mejoramiento genético, especialmente para la generación de nuevos genotipos (Duta-Cornescu *et al.*, 2023) y como en el caso de la pascuíta, para la generación de nuevas variedades. Si bien, el objetivo del presente trabajo no involucra la promoción o detección de estas variaciones, son un factor importante para considerar durante el establecimiento *in vitro* de cualquier especie.

El establecimiento de tejidos vegetales *in vitro* es afectado por múltiples factores como el medio de cultivo, reguladores de crecimiento, tipo de explantes y ambiente del cuarto de incubación. Diversas especies del género *Euphorbia* y la familia Euphorbiaceae se han cultivado *in vitro* previamente, existiendo protocolos de micropropagación para nochebuena (*Euphorbia pulcherrima*) (D'Onofrio & Morini, 2001; Perera & Trader, 2010), *Euphorbia helioscópica* (Aljibouri *et al.*, 2014) y *Jatropha curcas* (Daud *et al.*, 2013). El medio de cultivo MS es el más utilizado en la micropropagación de especies de esta familia; sin embargo, se ha reportado que esquejes de pascuíta se adaptan mejor al medio WPM sin presencia de CaCl_2 (Martínez-Villegas *et al.*, 2015).

La generación de callos está fuertemente influenciada por la adición de reguladores del crecimiento al medio de cultivo (Ikeuchi *et al.*, 2013). De manera general se conoce que el balance entre auxinas y citoquininas estimula las reacciones necesarias para la generación de callos, tallos o raíces de un explante *in vitro* (Ikeuchi *et al.*, 2013). Las auxinas sintéticas más utilizadas para promover la formación de callos son el ácido indol-3-acético (AIA) ácido indol-3-butírico (AIB) y el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D); y respecto a citoquininas, las más empleadas son la benciladenina (BA), cinetina y zeatina. En nochebuena “Prestige Red”, la adición de 4 μM de AIA con 8, 10 o 12 μM de BA mostró ser óptima para la generación de callos (Perera & Trader, 2010); para las variedades Agelika, Dorothee y Regina lo fue la adición al medio de 1 μM de 4-CPA (ácido 4-clorofenoxiacético) y 0.9 μM de BA (D’Onofrio & Morini, 2001); mientras que en *E. helioscopia* el uso de 1 mg L^{-1} de BA y 0.8 mg L^{-1} de 2,4-D generó buenos resultados para el mismo objetivo (Aljibouri *et al.*, 2014).

El estado fisiológico de los tejidos empleados y sus niveles hormonales endógenos son de vital importancia para la desdiferenciación celular y la formación de callos (Mostafa *et al.*, 2020). Se sabe que en los meristemos se encuentra un grupo de células no diferenciadas que usualmente permiten una generación óptima de callos (Sobańska *et al.*, 2023); sin embargo, de acuerdo con la teoría de la totipotencia celular, no solo las células meristemáticas son capaces de generar callos (Mostafa *et al.*, 2020). Respecto a especies de la familia Euphorbiaceae, se ha logrado inducir la formación de callos a partir de fragmentos foliares en nochebuena (Pickens *et al.*, 2005), *Euphorbia hirta* (Amos Samkumar *et al.*, 2019) y *Croton urucurana* (Lima *et al.*, 2008); mientras que a partir de meristemos apicales (ápices) o axilares (nudos o fragmentos de nudos) la formación de callos se ha reportado en nochebuena (Perera & Trader, 2010), *Phyllanthus urinaria* (Catapan *et al.*, 2002), *E. helioscopia*, *Euphorbia peplus*, *Euphorbia granulata* y *E. hirta* (Aljibouri *et al.*, 2014).

Entre los factores ambientales que influyen sobre el establecimiento de plantas *in vitro*, la calidad de la luz es de los más importantes (Cavallaro *et al.*, 2022). A través de los fotorreceptores las plantas responden a la intensidad luminosa, longitud de onda y fotoperiodo, desencadenando procesos que controlan la bioquímica, fisiología y morfología vegetal. Si bien es común que en micropropagación se utilice luz blanca para el mantenimiento de las plantas *in vitro*, varias investigaciones han demostrado que la luz roja y la azul pueden desencadenar múltiples reacciones fisiológicas que permiten acelerar o hacer eficientes varios de los procesos necesarios para lograr la regeneración vegetal (Daud *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2017; Pawłowska *et al.*, 2018; Yu *et al.*, 2019). Sobre nochebuena se ha reportado que la luz roja favorece la formación de callos en comparación con la luz azul y blanca (D’Onofrio & Morini, 2001), efecto que ha sido observado también en otras especies (Adil *et al.*, 2019; Budiarto, 2010; Younas *et al.*, 2018; Yu *et al.*, 2019), por lo que se puede atribuir que dicha respuesta se debe a que este color de luz favorece un balance hormonal adecuado para la formación de callos (Yu *et al.*, 2019).

Pruebas realizadas previo al establecimiento del presente trabajo mostraron altos porcentajes de necrosamiento en fragmentos de hojas de pascuíta establecidos *in vitro* bajo el medio WPM sin CaCl_2 , lo que dejó clara la necesidad de probar el uso de antioxidantes y otro tipo de propágulo para lograr establecer a la pascuíta *in vitro*.

Por lo anterior, el presente trabajo tuvo como objetivo determinar el tipo de explante y agente antioxidante adecuado para establecer a la pascuíta *in vitro*, así como evaluar tres colores de luz LED y diferentes combinaciones de benciladenina (BA) con ácido indol-3-acético (AIA) sobre la formación de callos y posterior generación de tallos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación, manejo de explantes y medio de cultivo

El experimento se llevó a cabo en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo (UACH). Se utilizaron plantas madre de *E. leucocephala* de un año de edad cultivadas bajo invernadero en la UACH.

Se fertilizaron una vez por semana con una solución del fertilizante Ultrasol® Multipropósito a 1 mg L^{-1} . Para el saneamiento de las plantas se utilizó INTERMICIN 500® (Estreptomocina, Oxitetraciclina y Sulfato tribásico de cobre) a 1 g L^{-1} aplicado al riego a las cuatro y dos semanas previas a la obtención de los explantes. Dado que previo a la obtención de los explantes (4 de noviembre) iniciaron los días cortos, las plantas madre se trataban diariamente con 4 horas de luz adicional (8:00 PM – 12:00 AM) utilizando luz blanca fría (PHILIPS® EcoHome LEDBulb 12MX) a $85 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ para evitar la floración.

El presente trabajo se realizó en dos fases (descritas en los siguientes apartados), en ambas, los explantes se obtuvieron del antepenúltimo verticilo formado en ramas de las plantas madre (figura 1); durante el transporte del invernadero al laboratorio, estas estructuras estuvieron sumergidas en una solución antioxidante (150 mg L^{-1} de ácido cítrico más 100 mg L^{-1} de ácido ascórbico). El método de desinfección consistió en lavado con jabón y agua corriente adicionado con 5 gotas de Tween® por 10 min, posteriormente lavado con solución de FUNLATE 50® (benomilo) a 1 g L^{-1} e INTERMICIN 500® (estreptomocina, oxitetraciclina y cobre) a 2 g L^{-1} por 10 min en agitación constante y finalmente lavado con hipoclorito de sodio comercial al 10 % por 5 min; ya dentro de la campana de flujo laminar se enjuagaron una sola vez con agua destilada y para su posterior manejo permanecieron en solución antioxidante (150 mg L^{-1} de ácido cítrico más 100 mg L^{-1} de ácido ascórbico).

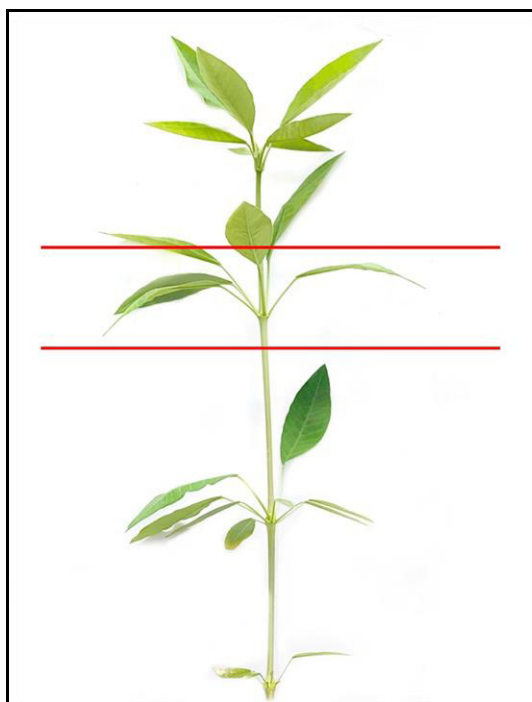


Figura 1. Zona de las ramas de pascuíta de donde se obtuvieron los explantes.
Figure 1. Zone of the Pascuíta's branches from which the explants were taken.

En ambas fases del trabajo se utilizó el medio de cultivo WPM (Woody Plant Medium) modificado por Martínez-Villegas *et al.* (2015), cuya composición es: NH_4NO_3 , 400 mg L^{-1} ; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 695 mg L^{-1} ; MgSO_4 , 370 mg L^{-1} ; KH_2PO_4 , 170 mg L^{-1} ; $\text{Na}_2 \text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 37.2 mg L^{-1} ; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 27.8 mg L^{-1} ; H_3BO_3 , 6.2 mg L^{-1} ; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 22.3 mg L^{-1} ; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 8.6 mg L^{-1} ; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.25 mg L^{-1} ; y $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.25 mg L^{-1} . Se adicionó también 3 % de sacarosa, 100 mg L^{-1} de mio-inositol y 0.4 mg L^{-1} de tiamina-HCl; el pH se ajustó a 5.7 y se agregó 0.7 % de agar (Sigma-Aldrich). El medio se colocó en tubos de ensayo, aproximadamente 20 mL de medio en cada uno.

Iluminación

En ambas fases de trabajo los tubos de ensayo se establecieron dentro de cajas de aislamiento luminoso, de $60 \times 40 \times 35 \text{ cm}$ de largo, ancho y alto, respectivamente, estas estaban forradas con papel aluminio para promover una iluminación homogénea. Como fuentes luminosas se

utilizaron paneles con 100 módulos de LED 5630 (TUNIX® LA-CCH50505) de 1.5 W, de colores rojo, blanco y azul establecidos en un área de 9 x 30 cm en la parte central de la tapa superior de la caja. La iluminación se mantuvo a $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (medido a la base de la caja de aislamiento) y 16 h de fotoperiodo. Las características espectrales de cada fuente de iluminación se muestran en la Tabla 1 y fueron medidas con un espectroradiómetro Apogee® modelo StellarNet PS-300.

Tabla 1. Características espectrales de las fuentes luminosas.

Table 1. Spectral characteristics of the light sources.

	Blanco	Rojo	Azul
Densidad de flujo de fotones ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	10	10	10
Longitud de máxima emisión (nm)	447.5, 547.5	556.5	451
UV (300-400 nm)	1.40%	4.87%	6.98%
Azul (400-500 nm)	30.62%	2.58%	85.44%
Verde (500-600 nm)	47.87%	4.60%	2.89%
Rojo (600-700 nm)	18.17%	83.35%	2.14%
Rojo lejano (700-800 nm)	1.94%	4.60%	2.55%
Proporción Azul/Rojo	1.68	0.03	39.85

Fase 1. Explante y agente antioxidante

En esta primera fase buscó determinar el tipo de explante y agente antioxidante adecuado para establecer a la pascuíta *in vitro*. Se diseñó un experimento factorial donde se probaron dos tipos de propágulos: fracción central de la hoja (1 cm^2 aproximadamente, figura 2c) establecida con la superficie abaxial hacia el medio de cultivo y una cuarta parte de un nudo desprovisto de hojas y peciolo (figura 2b); y dos antioxidantes: polivinilpirrolidona (PVP, adicionada al medio a 300 mg L^{-1}) y carbón activado (adicionado al medio a 1 g L^{-1}). Cada una de las combinaciones generó un tratamiento y cada tratamiento tuvo dieciocho repeticiones que se establecieron bajo los tres colores de luz LED, seis por cada color. La unidad experimental fue un tubo de ensayo con el tratamiento respectivo. A los diez días se contabilizó el porcentaje de necrosamiento en cada tratamiento, sin considerar aquellas unidades experimentales que se hubieran contaminado.

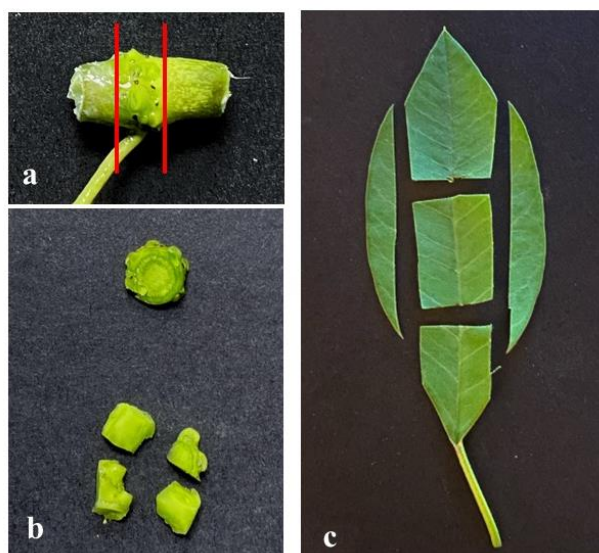


Figura 2. Explantes probados para establecer a la pascuíta *in vitro*. a) Zona del nudo de donde se tomaron los explantes. b) Nudo entero y nudo fraccionado en cuatro partes. c) La parte central de la hoja se utilizó como el segundo explante probado.

Figure 2. Explants tested for *in vitro* establishment of Pascuíta. a) Node zone from which the explants were taken. b) Whole node and node divided into four parts. c) The central part of the leaf was used as the second tested explant.

Las unidades experimentales sin necrosamiento o contaminación se mantuvieron en observación por 60 días, con la finalidad de detectar si formaban callo.

Para el análisis estadístico en esta primera fase se utilizó una prueba de Friedman ($P \leq 0.05$) para detectar diferencias en el porcentaje de necrosamiento entre los diferentes tratamientos. Se utilizó el programa estadístico SAS® System versión 9.0.

Fase 2: BA/AIA y tipo de luz en la inducción de callos y tallos adventicios

Una vez obtenidos los resultados de necrosamiento del experimento anterior se estableció la segunda fase, cuyo objetivo era inducir la formación de callos y posteriormente tallos. Utilizando fragmentos de nudo como propágulos y PVP como antioxidante (300 mg L^{-1}) se diseñó un experimento factorial donde se probaron tres colores de luz LED (blanco, rojo y azul, $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ y 16 h de fotoperiodo) y dos concentraciones de benciladenina (BA, 9.0 y $12.0 \mu\text{M}$) en combinación con tres concentraciones de ácido indol-3-acético (AIA, 5, 8 y $11 \mu\text{M}$). La combinación de los factores generó 18 tratamientos, se establecieron cinco repeticiones por cada uno. La unidad experimental consistió en un tubo de ensayo con el tratamiento respectivo.

Se evaluó la formación de callos a los 10, 16 y 23 días de establecido el experimento, registrando como positivo la formación de callo en al menos 50% de la superficie del explante. El porcentaje de unidades experimentales con callos formados por tratamiento se calculó sin considerar aquellos tubos en que hubiera contaminación o necrosamiento de explantes. El tamaño de los callos se registró considerando una escala empírica utilizando cruces, donde +: callos pequeños ($< 0.5 \text{ cm}$), ++: callos medianos ($0.5\text{-}1.0 \text{ cm}$) y +++: callos grandes ($> 1.0 \text{ cm}$). Los callos se mantuvieron bajo los tratamientos luminosos respectivos y se contabilizó el porcentaje de unidades experimentales con tallos presentes por tratamiento a los días 59, 72 y 90 después de establecido el experimento.

A los 90 días de establecido el experimento se contabilizó el número de tallos y la longitud promedio de los tallos en cada unidad experimental. Para obtener las medias de estas variables en cada tratamiento, no se tomaron en cuenta aquellos casos en que aun con presencia de callos, no hubiera tallos formados.

Se realizaron pruebas de Kruskal-Wallis ($P \leq 0.05$) para detectar el efecto del color de luz y las combinaciones de los tratamientos hormonales sobre el porcentaje de callos y tallos adventicios formados. Para las variables número de tallos y longitud de tallos formados, se aplicó análisis de varianza (ANAVA) y prueba de comparación de medias de Duncan ($P \leq 0.05$). Se utilizó el programa estadístico SAS® System versión 9.0.

RESULTADOS

Fase 1. Explante y agente antioxidante

En todo el experimento solo se observó una unidad experimental contaminada (bacteria no identificada), lo que corresponde a 1.38 % del total. Se detectaron diferencias significativas (Friedman, $P \leq 0.05$) para las combinaciones entre tipo de propágulo y antioxidante utilizado. No se observaron diferencias estadísticas significativas ($P \leq 0.05$) en el porcentaje de necrosamiento debidas al tipo de antioxidante cuando se utilizaban fragmentos de hoja como propágulo (Tabla 2), sin embargo, cuando se utilizaron fragmentos de nudos, la adición de PVP al medio mostró una reducción significativa ($P \leq 0.05$) del necrosamiento en comparación con la adición de carbón activado.

Tabla 2. Efecto de dos antioxidantes adicionados al medio de cultivo sobre el necrosamiento de dos tipos de propágulos de pascuíta evaluado a los diez días.

Table 2. Effect of two antioxidants added to the culture medium on the necrosis of two types of pascuíta propagules evaluated at ten days.

Explante	Antioxidante	Necrosamiento (%) ± DE
Fragmento de hoja	Polivinilpirrolidona	72.33 ± 20.76 a*
	Carbón activado	77.67 ± 9.24 a
Fragmento de nudo	Polivinilpirrolidona	5.67 ± 8.0 c
	Carbón activado	27.67 ± 7.54 b

*Medias seguidas de la misma letra no difieren estadísticamente (Friedman, $P \leq 0.05$). DE: desviación estándar.

*Means followed by the same letter do not differ statistically (Friedman, $P \leq 0.05$). SD: standard deviation.

Posterior a la toma de datos, se conservó el experimento para observar su evolución. En ningún caso se observó formación de callo u órganos adventicios, dejando clara la necesidad de adicionar reguladores del crecimiento para la generación de estas estructuras. En los explantes de hoja hubo necrosamiento en el 50 % a los 35 días, mientras que más del 50 % de los explantes de fragmento de nudo permanecieron sin necrosamiento hasta el final de las observaciones (60 días).

Fase 2: BA/AIA y tipo de luz en la inducción de callos y tallos adventicios

El análisis estadístico mostró que únicamente el efecto del color de luz fue significativo (Kruskal-Wallis, $P = 0.047$) sobre el porcentaje de unidades experimentales con callo formado al día 10. Para los días 16 y 23 no se observaron efectos significativos ($P \leq 0.05$) del color de luz LED aplicado o de los tratamientos hormonales.

La formación de callos de pascuíta inició durante la primera semana. A los diez días de establecido el experimento el mayor porcentaje de unidades experimentales con callo presente se registró bajo luz roja (Tabla 3), sin presentar diferencia estadística (Kruskal-Wallis, $P \leq 0.05$) al porcentaje registrado bajo luz blanca. El menor porcentaje de formación de callos se observó bajo luz azul. Para el día 16, el tratamiento con luz roja había alcanzado el 100 % de unidades experimentales con callo formado. Para el día 23 todas las unidades experimentales tenían callos formados.

Tabla 3. Formación de callos de pascuíta bajo diferentes colores de luz LED

Table 3. Callus formation of Pascuíta under different LED light colors

Color de luz	Unidades experimentales con callo (%)		
	Día 10 (± DE)	Día 16 (± DE)	Día 23 (± DE)
Blanco	84.17 ± 18.35 a*	95.83 ± 9.32	100 ± 0
Rojo	93.33 ± 9.43 a	100 ± 0	100 ± 0
Azul	64.17 ± 18.35 b	88.33 ± 11.79	100 ± 0

*Porcentajes seguidos de letras iguales, no difieren estadísticamente (Kruskal-Wallis, $P \leq 0.05$). DE.: desviación estándar.

*Percentages followed by the same letters do not differ statistically (Kruskal-Wallis, $P \leq 0.05$). SD: standard deviation.

Respecto al tamaño de los callos, los más grandes se presentaron bajo luz roja y blanca (Tabla 4), aunque el tamaño varió en función del tratamiento hormonal.

Tabla 4. Tamaño de callos de pascuíta formados bajo diferentes colores de luz LED y tratamientos hormonales.
Table 4. Size of pascuíta calli formed under different LED light colors and hormonal treatments.

Tratamiento hormonal		Color de luz		
BA (μM)	AIA (μM)	Blanco	Rojo	Azul
9	5	++	++	+
	8	++	++	+
	11	+++	++	++
12	5	++	+++	+
	8	+++	+++	++
	11	++	+++	+

+: callos pequeños (< 0.5 cm), ++: callos medianos (0.5-1.0 cm), +++: callos grandes (> 1.0 cm). n=5. el número de cruces en la Tabla representa la moda en cada tratamiento.

+: small calli (< 0.5 cm), ++: medium-sized calli (0.5-1.0 cm), +++: large calli (> 1.0 cm). n=5. The number of crosses in the table represents the mode in each treatment.

Las características de los callos no mostraron grandes diferencias (Figura 3). Bajo luz roja y con tratamiento hormonal de BA 9 μM y AIA 11 μM se observó la presencia de una tonalidad rosa en la superficie de los callos. Respecto al área del explante cubierta por callo, fue bajo luz azul donde se detectó menor crecimiento de este tipo de células.

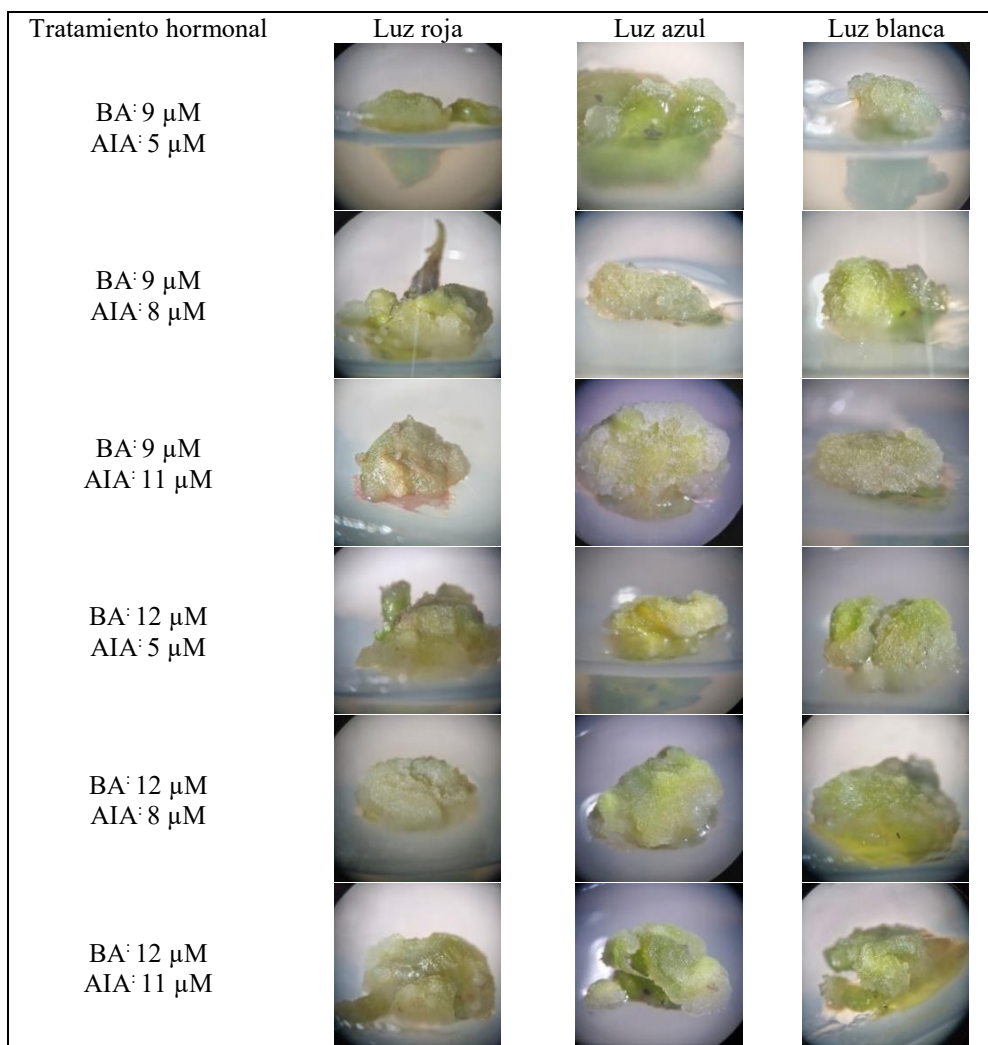


Figura 3. Callos de pascuíta formados bajo diferentes colores de luz LED y tratamientos hormonales. BA: benciladenina AIA: ácido indol-3-acético.

Figure 3. Pascuíta calli formed under different LED light colors and hormonal treatments. BA: benzyladenine AIA: indole-3-acetic acid.

La formación de tallos se observó en todos los tratamientos. Al día 59, solo los tratamientos hormonales fueron significativos estadísticamente (Kruskal-Wallis, $P = 0.039$) sobre el porcentaje de unidades experimentales con tallos. Para el día 72 solo se observó significancia para el factor color de luz ($P = 0.017$), mientras que para el día 90, ninguno de los factores evaluados fue significativo para esta variable. El análisis de varianza para el número y longitud de tallos mostró que para ambas variables hubo efectos significativos ($P \leq 0.05$) del color de luz aplicado, los tratamientos hormonales y la interacción de ambos.

La formación de tallos en función de los tratamientos hormonales para el día 59 fue máxima cuando se usaron $5 \mu\text{M}$ de AIA y disminuyó en función del aumento en la concentración de la auxina, independientemente de la concentración de BA en el medio (Tabla 5).

Tabla 5. Formación de tallos adventicios a partir de callos de pascuíta en función de diferentes tratamientos hormonales *in vitro*.

Table 5. Formation of adventitious shoots from pascuíta calli based on different *in vitro* hormonal treatments.

Tratamiento		Unidades experimentales con tallos (%)		
BA (μM)	AIA (μM)	Día 59 (\pm DE)	Día 72 (\pm DE)	Día 90 (\pm DE)
	5	83.33 \pm 11.79 a*	91.67 \pm 0	100 \pm 0
9	8	30.00 \pm 7.07 b	61.11 \pm 20.79	72.22 \pm 20.79
	11	23.33 \pm 2.36 c	58.33 \pm 31.18	66.67 \pm 31.18
12	5	83.33 \pm 11.79 a	91.67 \pm 11.79	100 \pm 0
	8	41.67 \pm 23.57 b	75.00 \pm 20.41	100 \pm 0
	11	28.33 \pm 20.95 c	50.00 \pm 20.41	83.33 \pm 23.57

*Porcentajes seguidos de letras iguales, no difieren estadísticamente (Kruskal-Wallis, $P \leq 0.05$). DE: desviación estándar.

*Percentages followed by the same letters do not differ statistically (Kruskal-Wallis, $P \leq 0.05$). SD: standard deviation.

En función de los tratamientos luminosos, al día 72 de iniciado el experimento se registró un mayor porcentaje de unidades experimentales con tallos adventicios formados bajo luz roja (Tabla 6), seguido por luz azul y blanca, estas últimas sin ser estadísticamente diferentes entre sí (Kruskal-Wallis, $P \leq 0.05$). Al día 90 no se detectaron diferencias entre los tratamientos, sin embargo, cabe resaltar al tratamiento con luz roja como el único donde el 100% de las unidades experimentales formaron tallos.

Tabla 6. Formación de tallos adventicios de pascuíta a partir de callos bajo diferentes colores de luz LED.

Table 6. Formation of pascuíta adventitious shoots from calli under different LED light colors.

Color de luz	Unidades experimentales con tallos (%)		
	Día 59 (\pm DE)	Día 72 (\pm DE)	Día 90 (\pm DE)
Blanco	54.17 \pm 33.59	66.67 \pm 23.57 b*	79.17 \pm 22.44
Rojo	45.00 \pm 22.17	95.83 \pm 9.32 a	100 \pm 0
Azul	45.83 \pm 30.33	51.39 \pm 23.77 b	81.94 \pm 28.22

*Porcentajes seguidos de letras iguales, no difieren estadísticamente (Kruskal-Wallis, $P \leq 0.05$). DE: desviación estándar.

*Percentages followed by the same letters do not differ statistically (Kruskal-Wallis, $P \leq 0.05$). SD: standard deviation.

Si bien no se realizaron estudios histológicos para determinar el origen de los nuevos tallos, al día 72 se observó que estos se originaban en la superficie de los callos (Figura 4). Bajo luz roja en combinación con 9 μM de BA y 11 μM de AIA fue posible observar un elevado número de primordios de tallo sobre la superficie del callo (Figura 4B), muchos de ellos se desarrollaron y fueron cuantificados a los 90 días.

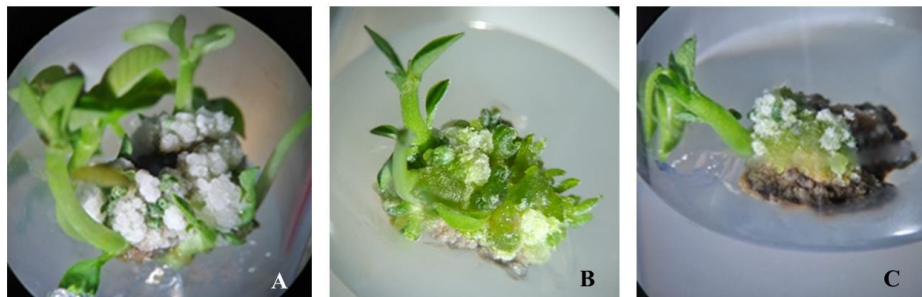


Figura 4. Tallos de pasquita formados *in vitro* bajo luz blanca (A), roja (B) y azul (C) en medio WPM adicionado con 9 μM de BA y 11 μM de AIA, a los 72 días del establecimiento.

Figure 4. *In vitro*-formed Pasquita shoots under white (A), red (b), and blue (c) light in WPM medium supplemented with 9 μM BA and 11 μM IAA, at 72 days after establishment.

El número y la longitud de los tallos adventicios formados estuvieron en función de las diferentes combinaciones entre el color de luz aplicado y el balance hormonal del medio. El mayor número de tallos se obtuvo bajo luz blanca en los tratamientos hormonales que contenían 5 μM de AIA y en luz roja con 9 μM de BA y 11 μM de AIA (Tabla 7). Respecto a la longitud de los tallos, los valores mayores se registraron bajo múltiples tratamientos hormonales en los colores rojo y azul.

Tabla 7. Número y longitud de tallos de pasquita formados a partir de callos bajo diferentes tratamientos hormonales y luminosos *in vitro*.

Table 7. Number and length of pasquita shoots formed from calli under different *in vitro* hormonal and light treatments.

Color de luz	BA (μM)	AIA (μM)	Número de tallos (\pm DE)	Longitud de tallos (cm) (\pm DE)
Blanco	9	5	4.00 \pm 0 a*	0.50 \pm 0.14 c
		8	1.00 \pm 0 f	0.70 \pm 0 bcd
		11	1.20 \pm 0.43 ef	0.76 \pm 0.49 bcd
	12	5	4.00 \pm 0 a	0.30 \pm 0.08 d
		8	2.75 \pm 0.43 bc	0.37 \pm 0.20 d
		11	1.00 \pm 0 f	0.85 \pm 0.15 bcd
Rojo	9	5	2.25 \pm 0.83 cde	0.89 \pm 0.11 bcd
		8	2.60 \pm 0.8 c	2.06 \pm 0.85 a
		11	3.67 \pm 0.47 ab	0.87 \pm 0.17 bcd
	12	5	2.80 \pm 0.4 bc	1.36 \pm 0.37 abc
		8	2.50 \pm 0.5 cd	1.41 \pm 0.39 ab
		11	2.50 \pm 0.5 cd	1.45 \pm 0.23 ab
Azul	9	5	2.75 \pm 0.43 bc	0.95 \pm 0.38 bcd
		8	1.00 \pm 0 f	1.45 \pm 0.05 ab
		11	1.00 \pm 0 f	0.90 \pm 0.1 bcd
	12	5	2.00 \pm 0 cdef	1.95 \pm 0.17 a
		8	1.33 \pm 0.47 ef	1.40 \pm 0.36 ab
		11	1.50 \pm 0.5 ef	0.45 \pm 0.05 d

*Medias seguidas por la misma letra, no son diferentes estadísticamente (Duncan, $P \leq 0.05$). AIA: ácido indol-3-acético. BA: benciladenina. DE: desviación estándar.

*Means followed by the same letter are not statistically different (Duncan, $P \leq 0.05$). AIA: Indole-3-acetic acid. BA: Benzyladenine. SD: Standard deviation.

DISCUSIÓN

Fase 1. Explante y agente antioxidante

Los resultados (Tabla 2) mostraron que el uso de fragmentos de nudos como propágulo y PVP como antioxidante, permiten el establecimiento de la pascuita *in vitro* con mínimo necrosamiento del tejido. El necrosamiento de explantes *in vitro* debe a múltiples factores, entre los que destacan la oxidación de algunos componentes celulares por la acción de radicales libres y la oxidación de compuestos fenólicos por la enzima polifenol oxidasa (Ahmad *et al.*, 2013). Se ha reportado también, que explantes con meristemos apicales o axilares son menos propensos a necrosarse (Azofeifa, 2009). En este sentido, la respuesta observada en el presente trabajo puede adjudicarse a que, en los fragmentos de nudos están presentes meristemos axilares, mientras que, los fragmentos de hoja no se encuentran en crecimiento activo. Así mismo, si bien no se ha reportado la composición fitoquímica de las hojas de pascuita, puede especularse que contienen compuestos altamente oxidables. Otra de las posibilidades por las que se observó un mayor necrosamiento en fragmentos de hoja pudiera ser que, durante la desinfección, las células de estos explantes están expuestas directamente a los agentes oxidantes utilizados y a la abrasión. Respecto al uso de antioxidantes se ha descrito al carbón activado y a la polivinilpirrolidona como absorbentes de compuestos fenólicos (Azofeifa, 2009), su eficiencia depende de la dosis, el genotipo y las características del tipo de explante sobre el que se utilicen (Amente & Chimdessa, 2021) en este trabajo, el uso de PVP a 300 mg L^{-1} agregado al medio de cultivo resultó ser más eficiente que 1 g L^{-1} de carbón activado para el control del necrosamiento de fragmentos de verticilos de pascuita *in vitro*.

Fase 2: BA/AIA y tipo de luz en la inducción de callos y tallos adventicios

La formación de callos que se presentó en todos los tratamientos hormonales (Figura 1) es un buen indicador del potencial de reproducción *in vitro* que tiene la pascuita. La mayor velocidad de formación de callos bajo luz roja seguida por la velocidad observada bajo luz azul (Tabla 3) está relacionada con los efectos de la calidad de la luz sobre el balance hormonal interno del propágulo. Una mayor formación de callos en proporción y tamaño en incubación con luz roja frente a otros colores de luz también se ha observado en nochebuena (D'Onofrio & Morini, 2001), anturio (Budiarto, 2010), algodón (Yu *et al.*, 2019), *Withania somnifera* (Adil *et al.*, 2019) y *Silybum marianum* (Younas *et al.*, 2018).

Una posible explicación a los resultados observados considera que el nivel endógeno de AIA correlaciona con la formación y mantenimiento del callo (Centeno *et al.*, 1996), así mismo se ha reportado que varios reguladores del desarrollo de raíces laterales participan en la formación de callos en condiciones *in vitro* (Ikeuchi *et al.*, 2013). La luz roja promueve el incremento de la concentración interna de AIA de manera indirecta (Alallaq *et al.*, 2020), mientras que la luz azul promueve la sobreexpresión de genes relacionados con la síntesis de AIA y la formación de raíces (Gil *et al.*, 2021; Shen *et al.*, 2022), lo que explicaría un incremento interno de esta hormona en los propágulos bajo luz roja o azul en comparación con los establecidos bajo luz blanca y, por tanto, una mayor velocidad en la formación de callos. Esta teoría ha sido apoyada parcialmente por Yu *et al.* (2019) quienes bajo luz roja observaron una mayor formación de callos en algodón, acompañada de un incremento en el contenido interno de AIA y un balance AIA/ZA cercano a 0.5, sin embargo, bajo luz azul dicho balance se redujo considerablemente (aproximadamente 0.35) debido a una reducción en la concentración interna de AIA y no a un incremento en la concentración de zeatina.

Un patrón específico en la formación de tallos en función de la concentración hormonal en el medio, se observó al día 59 (Tabla 5); independientemente de la concentración de BA un incremento en la concentración de AIA redujo el porcentaje de unidades experimentales con tallos formados (Kruskal-Wallis, $P \leq 0.05$). Generalmente es aceptado que las respuestas

observadas *in vitro* están en función del balance hormonal en el medio de cultivo, es así como un balance que tiende hacia las auxinas promueve la formación de raíces, un balance neutro la formación de callos y un balance que tiende hacia las citoquininas promueve la formación de tallos (Ikeuchi *et al.*, 2013). Si bien a los días 72 y 90 el patrón no fue observado, la disminución de la concentración de AIA que favorece un balance hacia la BA explica los resultados observados al día 52.

Los efectos del color de la luz sobre el inicio en la formación de tallos pueden interpretarse por la influencia positiva de la luz roja sobre la acumulación de auxinas (Yu *et al.*, 2019) y de la luz azul sobre la acumulación de citoquininas (Kohler *et al.*, 1980), lo que explica mayor formación de tallos bajo luz azul en diferentes especies (Budiarto, 2010; Cybularz-Urban *et al.*, 2015; Dutta Gupta & Sahoo, 2015; Jeong & Sivanesan, 2018); sin embargo, en el presente trabajo se han encontrado resultados diferentes, ya que bajo luz roja se observó una mayor formación de nuevos tallos (Tabla 6). Una posible explicación es que el inicio de la formación de tallos adventicios fue disparado por la concentración de hormonas exógenas (Tabla 5) al día 59, dejando múltiples meristemas adventicios formados, pero sin desarrollarse lo suficiente para ser considerados como brotes; por efecto de la luz roja se promovió el alargamiento de dichos meristemas adventicios y fueron detectados al día 72.

El color de luz y tratamientos hormonales en combinación, produjeron los efectos observados sobre el número y longitud de tallos (Tabla 7). La formación de tallos adventicios se ha asociado a un balance hormonal que favorece a las citoquininas frente a las auxinas (Ikeuchi *et al.*, 2013), por lo que es común la adición únicamente de citoquininas a los medios de cultivo con la finalidad de promover la formación de tallos adventicios. En este trabajo, los tratamientos con 5 μM de AIA acompañados de 9 0 12 μM de BA favorecieron dicho balance; fue bajo luz blanca y azul donde se pudo detectar que estos tratamientos generaban un mayor número de tallos frente a los demás tratamientos hormonales. Bajo luz roja fue el tratamiento con 9 μM de BA y 11 μM de AIA en el que se obtuvo la media mayor, sin poder adjudicarse en este caso un efecto debido a un balance hormonal hacia las citoquininas adicionadas al medio.

La longitud de los tallos también estuvo en función de la interacción entre el color de luz y el tratamiento hormonal (Tabla 7). Una mayor longitud de tallos *in vitro* bajo luz roja frente a luz azul y blanca se ha reportado en *Ajuga multiflora* (Jeong & Sivanesan, 2018), *Rehmannia glutinosa* (Manivannan *et al.*, 2015), vid (Poudel *et al.*, 2008) y *Oncidium* (Chung *et al.*, 2010), dejando claro el papel de este color de luz sobre el alargamiento de tallos. Los resultados aquí mostrados presentan las medias más altas de longitud de tallos en tratamientos asociados a la luz roja, sin embargo, también bajo luz azul se registraron longitudes de tallos que no fueron diferentes estadísticamente ($P \leq 0.05$) a las observadas bajo luz roja, si bien esto puede resultar contradictorio, los efectos observados se adjudican a la baja intensidad luminosa utilizada en el presente trabajo.

CONCLUSIONES

El uso de fragmentos de nudos de pascuíta como propágulo y polivinilpirrolidona como antioxidante permiten establecer a la pascuíta en condiciones *in vitro* con un mínimo necrosamiento, así mismo, permiten generar callos bajo cualquiera de los tratamientos hormonales y luminosos evaluados. La mejor combinación de BA/AIA para la inducción de tallos fue 9 o 12 μM BA / 5 μM AIA. La luz roja acelera la formación de callos y mejora la obtención de tallos adventicios de pascuíta. Los resultados de la presente investigación representan un primer paso para la generación de un método de reproducción de la especie por cultivo *in vitro* y para la futura exploración de métodos para la generación de nuevas variedades de pascuíta.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Universidad Autónoma Chapingo por el financiamiento de este estudio.

LITERATURA CITADA

- Adil, M., Haider Abbasi, B., & ul Haq, I. (2019). Red light controlled callus morphogenetic patterns and secondary metabolites production in *Withania somnifera* L. *Biotechnology Reports*, 24. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00380>
- Ahmad, I., Hussain, T., Ashraf, I., Maryam, M. N., Rafay, M., & Iqbal Muhammad. (2013). Lethal effect of secondary metabolites on plant tissue culture. American-Eurasian Project is under review View project Local fruit and vegetable drying techniques to reduce malnutrition View project. *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.*, 13(4), 539–547. <https://doi.org/10.5829/idosi.aejaes.2013.13.04.1975>
- Alallaq, S., Ranjan, A., Brunoni, F., Novák, O., Lakehal, A., & Bellini, C. (2020). Red Light Controls Adventitious Root Regeneration by Modulating Hormone Homeostasis in *Picea abies* Seedlings. *Frontiers in Plant Science*, 11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.586140>
- Aljibouri, A. M., Yakoub Zokian, S. A., & Almusawi, A. H. (2014). Response of four medical plants of *Euphorbia* species in callus initiation *in vitro*. *Journal of Biotechnology Research Center*, 8(1), 66–71.
- Amente, G., & Chimdessa, E. (2021). Control of browning in plant tissue culture: A review. *Journal of Scientific Agriculture*, 5, 67–71. <https://doi.org/10.14393/BJ-v34n1a2018-36311>
- Amos Samkumar, R., Premnath, D., & David Paul Raj, R. S. (2019). Strategy for early callus induction and identification of anti-snake venom triterpenoids from plant extracts and suspension culture of *Euphorbia hirta* L. *3 Biotech*, 9(7). <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1790-9>
- Azofeifa, A. (2009). Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes *in vitro*. *Agronomía Mesoamericana*, 20(1), 153–175. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=43711514016>
- Budiarto, K. (2010). Spectral quality affects morphogenesis on anthurium plantlet during *in vitro* culture. *Agrivita volume*, 32(3), 234–240.
- Catapan, E., Luís, M., Da Silva, B., Moreno, N., & Viana, A. M. (2002). Micropropagation, callus and root culture of *Phyllanthus urinaria* (Euphorbiaceae). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 70, 301–309.
- Cavallaro, V., Pellegrino, A., Muleo, R., & Forgione, I. (2022). Light and Plant Growth Regulators on *in vitro* Proliferation. *Plants*, 11(7). <https://doi.org/10.3390/plants11070844>
- Centeno, M. L., Rodriguez, A., Feito, I., Fermindez, B., & Weiler, E. W. (1996). Relationship between endogenous auxin and cytokinin levels and morphogenic responses in *Actinidia deliciosa* tissue cultures. *Plant Cell Reports*, 16, 58–62.
- Chung, J. P., Huang, C. Y., & Dai, T. E. (2010). Spectral effects on embryogenesis and plantlet growth of *Oncidium* “Gower Ramsey”. *Scientia Horticulturae*, 124(4), 511–516. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2010.01.028>
- Cybularz-Urban, T., Hanus-Fajerska, E., & Bach, A. (2015). Callus induction and organogenesis *in vitro* of *Cattleya* from protocorms-like bodies (PLBs) under different light conditions. *Acta Sci. Pol. Hortorum Cultus*, 14(6), 29–38. www.acta.media.pl
- D’Onofrio, C., & Morini, S. (2001). Effect of light quality on *in vitro* production of callus explants of three Poinsettia cultivars. En *Acta Hort* (Vol. 560).
- Daud, N., Faizal, A., & Geelen, D. (2013). Adventitious rooting of *Jatropha curcas* L. is stimulated by phloroglucinol and by red LED light. *In vitro cellular and Developmental Biology - Plant*, 49(2), 183–190. <https://doi.org/10.1007/s11627-012-9486-4>
- Dutta Gupta, S., & Sahoo, T. K. (2015). Light emitting diode (LED)-induced alteration of oxidative events during *in vitro* shoot organogenesis of *Curculigo orchoides* Gaertn. *Acta Physiologiae Plantarum*, 37(11). <https://doi.org/10.1007/s11738-015-1990-9>
- Duta-Cornescu, G., Constantin, N., Pojoga, D. M., Nicuta, D., & Simon-Gruita, A. (2023). Somaclonal variation—Advantage or disadvantage in micropropagation of the medicinal plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(1), 838. <https://doi.org/10.3390/ijms24010838>
- Gil, C. S., Kwon, S. J., Jeong, H. Y., Lee, C., Lee, O. J., & Eom, S. H. (2021). Blue light upregulates auxin signaling and stimulates root formation in irregular rooting of rosemary cuttings. *Agronomy*, 11(9). <https://doi.org/10.3390/agronomy11091725>

Recibido:
30/enero/2024

Aceptado:
21/junio/2024

- Ikeuchi, M., Sugimoto, K., & Iwase, A. (2013). Plant callus: Mechanisms of induction and repression. *Plant Cell*, 25(9), 3159–3173. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.116053>
- Jeong, B. R., & Sivanesan, I. (2018). Impact of light quality and sucrose on adventitious shoot regeneration and bioactive compound accumulation in *Ajuga multiflora* Bunge. *Scientia Horticulturae*, 236, 222–228. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.03.056>
- Kohler, K.-H., Dsrfler, M., Gbring, H., & Moritz-Arndt, E. (1980). The Influence of Light on the Cytokinin Content of *Amaranthus* Seedlings. *biologia plantarum (PRAHA)*, 22(2), 128–134.
- Li, C. X., Xu, Z. G., Dong, R. Q., Chang, S. X., Wang, L. Z., Khalil-Ur-Rehman, M., & Tao, J. M. (2017). An RNA-seq analysis of grape plantlets grown *in vitro* reveals different responses to blue, green, red LED light, and white fluorescent light. *Frontiers in Plant Science*, 8(January). <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00078>
- Lima, E. C., Paiva, R., Cravo Nogueira, R., Pereira Soares, F., Bucsam Emrich, E., & Naves Silva, A. Á. (2008). Callus induction in leaf segments of *Croton urucurana* Baill. *Ciênc. agrotec.*, 32(1), 17–22.
- Manivannan, A., Soundararajan, P., Halimah, N., Ko, C. H., & Jeong, B. R. (2015). Blue LED light enhances growth, phytochemical contents, and antioxidant enzyme activities of *Rehmannia glutinosa* cultured *in vitro*. *Horticulture Environment and Biotechnology*, 56(1), 105–113. <https://doi.org/10.1007/s13580-015-0114-1>
- Martínez-Villegas, Y. M., Andrade-Rodríguez, M., Colinas-León, M. T., Villegas-Torres, Ó. G., Castillo-Gutiérrez, A., & Alia-Tejacal, I. (2015). Culture media inorganic salts effect on pascuíta (*Euphorbia leucocephala* Lotsy) growth. *Rev. Fitotec. Mex*, 38(4), 369–374.
- Mostafa, H. H. A., Wang, H., Song, J., & Li, X. (2020). Effects of genotypes and explants on garlic callus production and endogenous hormones. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61564-4>
- Pawłowska, B., Żupnik, M., Szewczyk-Taranek, B., & Cioć, M. (2018). Impact of LED light sources on morphogenesis and levels of photosynthetic pigments in *Gerbera jamesonii* grown *in vitro*. *Horticulture Environment and Biotechnology*, 59(1), 115–123. <https://doi.org/10.1007/s13580-018-0012-4>
- Perera, D., & Trader, B. W. (2010). Poinsettia “Prestige Red” (*Euphorbia pulcherrima*) *In Vitro* Propagation. *HortScience*, 45(7), 1126–1128. http://www.ecke.com/Search/Variety_Results.
- Pickens, K. A., Cheng, Z. M., & Trigiano, R. N. (2005). Axillary bud proliferation and organogenesis of *Euphorbia pulcherrima* Winter Rose. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 41(6), 770–774. <https://doi.org/10.1079/IVP2005706>
- Poudel, P. R., Kataoka, I., & Mochioka, R. (2008). Effect of red- and blue-light-emitting diodes on growth and morphogenesis of grapes. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 92(2), 147–153. <https://doi.org/10.1007/s11240-007-9317-1>
- Shen, Y., Fan, K., Wang, Y., Wang, H., Ding, S., Song, D., Shen, J., Li, H., Song, Y., Han, X., Qian, W., Ma, Q., & Ding, Z. (2022). Red and Blue Light Affect the Formation of Adventitious Roots of Tea Cuttings (*Camellia sinensis*) by Regulating Hormone Synthesis and Signal Transduction Pathways of Mature Leaves. *Frontiers in Plant Science*, 13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.943662>
- Sobańska, K., Jedryszek, P., Kern, C., Basińska-Barczak, A., Pniewski, T., & Long, S. P. (2023). An efficient indirect plant regeneration from shoot apical meristem (SAM) derived embryogenic callus of *Miscanthus × giganteus*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 47, 102576. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2022.102576>
- Younas, M., Drouet, S., Nadeem, M., Giglioli-Guivarc’h, N., Hano, C., & Abbasi, B. H. (2018). Differential accumulation of silymarin induced by exposure of *Silybum marianum* L. callus cultures to several spectres of monochromatic lights. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 184, 61–70. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2018.05.018>
- Yu, Y., Qin, W., Li, Y., Zhang, C., Wang, Y., Yang, Z., Ge, X., & Li, F. (2019). Red light promotes cotton embryogenic callus formation by influencing endogenous hormones, polyamines and antioxidative enzyme activities. *Plant Growth Regulation*, 87(2), 187–199. <https://doi.org/10.1007/s10725-018-0461-x>