

Fisiología vegetal

Artículo de investigación científica y tecnológica

Efecto de la desinfección, el desarrollo foliar y las fitohormonas en la inducción de callos de *Simarouba amara* Aubl.

Effect of disinfection, leaf development and phytohormones on callus induction of *Simarouba amara* Aubl.

 Jorge Arturo Mori-Vásquez¹  Nadia Masaya Panduro-Tenazoa^{2,3*}
 Vanessa Jhasmin Muñoz Fernandez¹  Mao Augusto Herrera-Saavedra¹  Nathalia de Setta⁴
 Glêyce de Oliveira Ferreira⁴  Ayda Guisella Avalos-Díaz²  Antony Cristhian Gonzales-Alvarado^{1,4}

¹ Facultad de Ciencias Forestales y Ambientales, Universidad Nacional de Ucayali, Ucayali, Perú.

² Facultad de Ingeniería y Ciencias Ambientales, Universidad Nacional Intercultural de la Amazonia, Ucayali, Perú.

³ Instituto Universitario de Innovación Ciencia y Tecnología, Puno, Perú.

⁴ Centro de Ciências Naturais e Humanas, Universidade Federal do ABC, São Bernardo do Campo, São Paulo, Brasil.

*Autor de correspondencia: Nadia Masaya Panduro-Tenazoa. Carretera a San José 0,63 km - Yarinacocha, Facultad de Ingeniería y Ciencias Ambientales, Departamento Académico de Ingeniería Agroforestal Acuicola, Universidad Nacional Intercultural de la Amazonia, Ucayali, Perú. nmpandurot@unia.edu.pe

Recibido: 30 de diciembre de 2023

Aprobado: 19 de noviembre de 2024

Publicado: 26 de diciembre de 2024

Resumen: La desinfección e inducción de callos en especies forestales es esencial para mejorar la producción genética. A pesar de que existen múltiples métodos, su aplicación en plantas forestales requiere de más investigación. Por lo anterior, este estudio se centró en estudiar el efecto de la desinfección, el desarrollo foliar y las fitohormonas en la inducción de callos de *Simarouba amara*. El estudio se estructuró en dos experimentos, en el primero se evaluó la eficacia de la desinfección de folíolos mediante un diseño completamente al azar, con tres tratamientos de hipoclorito de sodio (0 %, 0,25 % y 0,5 %); mientras que el segundo experimento, centrado en la inducción de callos, se desarrolló bajo un diseño factorial 3 × 6, que incluyó tres estados de desarrollo foliar (joven, intermedio y maduro) y seis combinaciones de fitohormonas (BAP, TDZ, 2,4-D, BAP+TDZ, BAP+2,4-D y TDZ+2,4-D, todas a 1 mg/l). Los principales resultados demostraron que 0,25 % de hipoclorito de sodio logró un 88,9 % de asepsia, con el menor porcentaje de oxidación (17 %). Además, se observó que las combinaciones de BAP+2,4-D y TDZ+2,4-D promovieron una mayor formación de callos, un incremento del área del calo y una producción de materia fresca y seca, especialmente en segmentos del estado del desarrollo foliar intermedio. Finalmente, este estudio subraya la importancia de ajustar el desinfectante y las fitohormonas según el estado del desarrollo foliar, para tener éxito en la inducción de callos en *Simarouba amara*.

Palabras clave: cultivo *in vitro*, hoja, desinfección, callogénesis, auxina, citoquinina, *Simarouba*.

Abstract: Disinfection and callus induction in forest species is essential to improve genetic production. Although multiple methods exist, their application in forest plants requires further research. Therefore, this study focused on the effect of disinfection, leaf development and phytohormones on callus induction in *Simarouba amara*. The study was structured in two experiments. In the first experiment, the efficacy of leaflet disinfection was evaluated using a completely randomized design with three sodium hypochlorite treatments (0 %, 0.25 % and 0.5 %). The second experiment, focused on callus induction, was developed under a 3 x 6 factorial design, which included three stages of leaf development (young, intermediate and mature) and six combinations of phytohormones (BAP, TDZ, 2,4-D, BAP+TDZ, BAP+2,4-D, TDZ+2,4-D, all at 1 mg/L). The main results showed that 0.25 % sodium hypochlorite achieved 88.9 % asepsis, with a lower percentage of oxidation (17 %). It was observed that, combinations of BAP+2,4-D and TDZ+2,4-D promoted higher callus formation, increased callus area and fresh and dry matter production, especially in segments of intermediate leaf development stage. This study highlights the importance of adjusting disinfectant and phytohormones according to leaf development stage for successful callus induction in *Simarouba amara*.

Keywords: *in vitro* culture, leaves, disinfection, callogenesis, auxins, cytokinins, *Simarouba*.

Para citar este artículo: Mori-Vásquez, J. A., Panduro-Tenazoa, N. M., Muñoz Fernandez, V. J., Herrera-Saavedra, M. A., de Setta, N., Ferreira, G. O., Avalos-Díaz, A. G., & Gonzales-Alvarado, A. C. (2024). Efecto de la desinfección, el desarrollo foliar y las fitohormonas en la inducción de callos de *Simarouba amara* Aubl. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 25(3), e3662. https://doi.org/10.21930/rcta.vol25_num3_art:3662



Introducción

Simarouba amara Aubl. es una especie del ecosistema amazónico, perteneciente a la familia Simaroubaceae (IUCN, 2023) y fue descrita por primera vez en Guayana Francesa en 1775 por Aublet (1775). Según la Global Biodiversity Information Facility (2023), la especie tiene una amplia distribución en bosques neotropicales y sabanas de América del Sur y América Central (Hardesty et al., 2005). De naturaleza dioica (Devecchi & Pirani, 2016), *S. amara* puede crecer hasta 35 m de altura y 125 cm de diámetro (Hardesty et al., 2005).

Desde el año 2020, su demanda ha aumentado (Amorim Santos et al., 2022) debido a las características físicas y mecánicas de su madera (Martins Souza et al., 2020), siendo adecuada para diversas industrias (Rodríguez et al., 2000). La especie prospera en suelos arenosos limosos (León, 2004) con fertilidad de moderada a alta, mientras que muestra tasas de supervivencia más bajas en suelos de baja fertilidad (Moura Lima et al., 2018); sin embargo, existe escasez de material reproductivo de alta calidad para la producción de plantas (Revilla Chávez et al., 2021).

En la actualidad, la especie se reproduce a partir de semillas (Fonseca e Cruz et al., 2006), lo que plantea desafíos para lograr la segregación de características genéticas deseadas (Chen et al., 2016). Además, las semillas tienen una estacionalidad y un corto periodo de viabilidad (Amorim Santos et al., 2022), siendo recalcitrantes (León, 2004). A pesar de la creciente demanda de *S. amara*, existe investigación limitada sobre sus métodos de propagación (Amorim Santos et al., 2022) y los estudios existentes han dado resultados inconsistentes, donde algunos sugieren que la especie es difícil de propagar (Proebsting & Reihs, 1991), mientras que otros lograron el enraizamiento exitoso de sus segmentos nodales (Soudre et al., 2010). Esto abre una oportunidad de utilizar nuevas técnicas biotecnológicas que ofrecen alternativas prometedoras, como la inducción de callos, que consiste en el proceso de desdiferenciación (deformación) y división celular acelerada (callo) (Rodríguez Beraud et al., 2014), técnicas que podrían auxiliar y optimizar la producción eficiente de mejora genética en futuros programas de reforestación.

La biotecnología permite la producción a gran escala, en un corto periodo y espacio limitado de plantas (Honda et al., 2001; Roberts & Kolewe, 2010), como se ha demostrado con otras especies arbóreas, pudiendo mencionar a *Guaizuma crinita* (Gonzales-Alvarado et al., 2022) y *Eucalyptus grandis* (Hoffmann et al., 2022). La inducción de callos depende de varios factores, como el tipo de medio de cultivo (Kothari et al., 2010; Salem et al., 2022), las fitohormonas (auxinas y citocininas), así como la concentración y combinación de las mismas (Rashmi & Trivedi, 2014; Shekhawat & Manokari, 2016; Wu et al., 2021), y las características específicas del explante (tipo de tejidos, estado de desarrollo) (Chung et al., 2007; Kareem et al., 2016), donde todas estas variables influyen en el éxito de la inducción. Por otra parte, en este proceso se presentan diversos problemas como contaminación, oxidación, inhibición celular, entre otros (Bramhanapalli et al., 2017; Shen et al., 2018).

La desinfección del explante es fundamental para esterilizar cualquier tipo de tejido (Aguilera-Arango et al., 2021) y como desinfectantes se utilizan: peróxido de hidrógeno (H_2O_2), cloruro de mercurio ($HgCl_2$), hipoclorito de sodio ($NaClO$), entre otros (Gu et al., 2022). El $NaClO$ es considerado como uno de los mejores desinfectantes por ser soluble en agua (Boyette et al.,

1993) y económicamente accesible (Purohit et al., 2011), además que su función principal es inhibir agentes contaminantes (Arbeláez et al., 2016; Teixeira da Silva et al., 2016; Hesami et al., 2018). Incluso, se han demostrado efectos positivos en la obtención de explantes asépticos en muchas especies vegetales utilizando diferentes concentraciones de NaClO (Teixeira da Silva et al., 2016; Hesami et al., 2019), aunque se deben controlar los niveles de concentración para evitar estrés oxidativo según el tipo de tejido (Alharbi et al., 2022). Así, en explantes foliares se utilizan menores concentraciones porque son tejidos blandos (Cai et al., 2013), mientras que en explantes más lignificados, las concentraciones aumentan llegando hasta un 10 % de NaClO (Hou et al., 2006). En el caso de *S. amara* se carece de información sobre el tipo de concentraciones y tipo de tejido a esterilizar, por lo que esta investigación explora las concentraciones menores a 1 % de NaClO para la desinfección de segmentos con estado del desarrollo foliar intermedio.

En la revisión de la literatura, se encontró que existen múltiples estudios publicados sobre la inducción de callos con diferentes fitohormonas y combinaciones, así como la utilización de diversos tejidos como cotiledones (Lozzi et al., 2018), hipocótilos (Morovatti et al., 2021; Rodríguez Beraud et al., 2014) y folíolos (Gándara-Ledezma et al., 2023; Hernández-Amasifuen et al., 2021). En las investigaciones que utilizan folíolos para la inducción de callos, la información sobre el mejor estado acerca del desarrollo del tejido foliar (si es joven, intermedio o maduro) no ha sido claramente explicada (Lavanya et al., 2016; Morán Bajaña et al., 2022; Bustamante et al., 2022; Hernández-Amasifuen et al., 2021; Nugraheni et al., 2023) y esta carencia de información sobre el estado del desarrollo foliar deja muchas preguntas sin responder, abre posibilidades para realizar múltiples investigaciones y permite plantear la siguiente hipótesis: si diferentes fitohormonas y combinaciones de estas, así como los estados de desarrollo foliar, pueden influir en la eficacia del proceso de inducción de callos. Con respecto a la especie *S. amara*, no existe literatura científica sobre la inducción de callos, y hasta ahora solo se tiene registro de otra especie del mismo género, conocida como *S. glauca* DC (Lavanya et al., 2016). Al considerar la realidad de esta especie, este estudio tuvo como objetivo determinar el efecto de la desinfección, el desarrollo foliar y las fitohormonas en la inducción de callos en *S. amara*.

Materiales y métodos

Área experimental y origen de material vegetal

El experimento fue conducido en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Meristemos, de la Universidad Nacional de Ucayali, ubicada en la carretera Federico Basadre, km. 6200, en la ciudad de Pucallpa, distrito de Calleria, provincia de Coronel Portillo, departamento de Ucayali, Perú.

El material vegetal utilizado provino de una plántula saludable de *S. amara* (brinjal), de 10 meses de edad, cultivada en maceta, con una altura de 60 cm y un diámetro de 14 mm. En el experimento de desinfección se emplearon segmentos foliares con estado de desarrollo intermedio, con 4-6 semanas de crecimiento (figura 1B), mientras que en el experimento de inducción de callos se utilizaron segmentos foliares de diferentes estados de desarrollo: jóvenes, intermedios y maduros, correspondientes a 2-4, 4-6 y 6-10 semanas de crecimiento,

respectivamente. Las características específicas de cada estado se detallan en la figura 1 (figuras 1A, 1B y 1C).

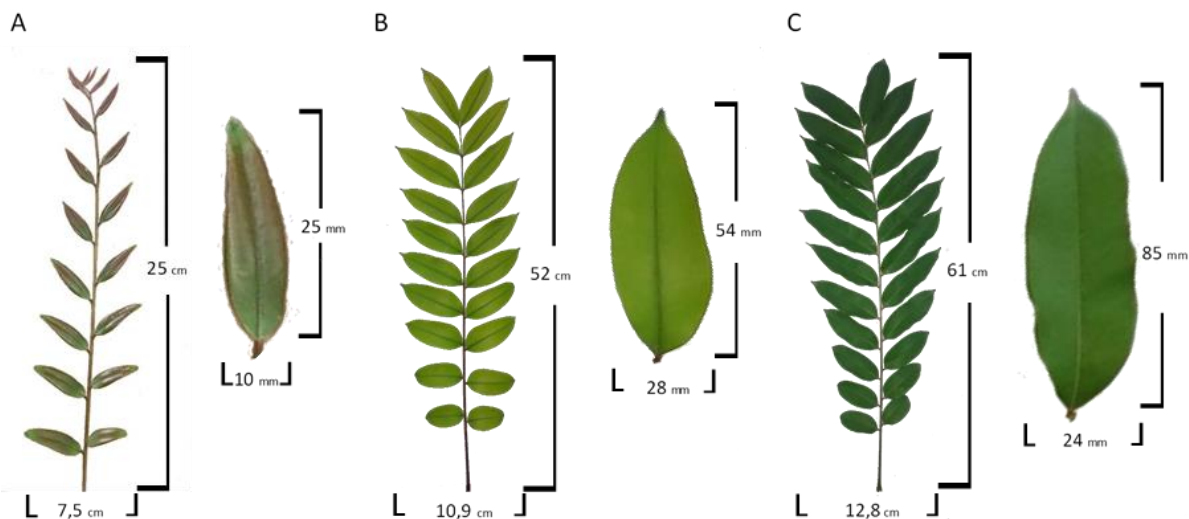


Figura 1. Características morfológicas de hojas y folíolos

Notas aclaratorias: A: hoja y folíolo joven, B: hoja y folíolo intermedio y C: hoja y folíolo maduro.

Fuente: Elaboración propia

Experimento 1: desinfección de folíolos

Para el primer experimento, los folíolos recolectados fueron sometidos a una pre-desinfección, utilizando 20 ml/l de jabón líquido Aval®, seguido de un enjuague con agua corriente durante 30 minutos. Para prevenir la oxidación, se añadió 0,5 % de ácido ascórbico y, posteriormente, los folíolos fueron lavados tres veces y divididos en tres grupos para la desinfección con hipoclorito de sodio (NaClO). En el primer tratamiento (T1) no se aplicó desinfectante; en el segundo tratamiento (T2), los folíolos se sumergieron en alcohol de 70° durante un minuto, se retiró el alcohol y se sumergió en NaClO a 0,25 %, luego se enjuagaron cuatro veces con agua destilada esterilizada; y en el tercer tratamiento (T3), se replicó la metodología de desinfección, variando solo la concentración de NaClO a 0,5 %.

En este experimento se utilizó el protocolo desarrollado por Iiyama y Cardoso (2021) y Gonzales-Alvarado et al. (2022) como medio de cultivo base, que consiste en la formulación de Murashige y Skoog (MS) (1962), con una concentración reducida a la mitad de macronutrientes (MS^{1/2}), 2,5 % de sacarosa, 0,1 g/l de inositol y pH ajustado a 5,7. Después del ajuste del pH, se adicionaron 6,6 g/l de agar PhytoTech® y se vertieron 25 ml del medio de cultivo en frascos de vidrio de 8 cm de altura y 7 cm de diámetro de boca, según el tratamiento. Estos frascos se esterilizaron en autoclave a 121 °C y a 1,1 atm durante 25 minutos.

Como explantes, se emplearon segmentos foliares de aproximadamente 1 cm², los cuales fueron introducidos en los frascos que contenían 25 ml de medio de cultivo. Luego, estos frascos se

situaron en una sala de crecimiento con un fotoperiodo establecido en 12 horas, temperatura de $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ y humedad constante de 75 %.

Las variables analizadas fueron: porcentaje de contaminación (CO), asepsia (AS), presencia de hongos (PHO), presencia de bacterias (PBA), explantes con oxidación (OX) y explantes con fenoles (FE). Las observaciones se realizaron cada semana durante un mes.

Experimento 2: inducción de callos

En este experimento se desinfectaron folíolos jóvenes, intermedios y maduros, empleando el T2 del experimento 1 (0,25 % de NaClO), por la eficiencia observada.

Como medio base, se replicó el protocolo utilizado en el experimento 1 y se añadieron fitohormonas, según se detalla en la tabla 1. Para el volumen del medio de cultivo y la esterilización de este, se utilizó el procedimiento mencionado en el experimento 1.

Tabla 1. Tratamientos de inducción de callos

		Factor B					
		BAP	TDZ	2,4-D	BAP+TDZ	BAP+2,4-D	TDZ+2,4-D
Factor A	Joven	T1	T2	T3	T4	T5	T6
	Intermedio	T7	T8	T9	T10	T11	T12
	Maduro	T13	T14	T15	T16	T17	T18

Notas aclaratorias: factor A: estado del desarrollo foliar y factor B: fitohormona (1 mg/l de cada fitohormona).

Fuente: Elaboración propia

Como explantes, se utilizaron segmentos de diferentes estados de desarrollo foliar (figura 1) y luego fueron situados en condiciones de fotoperiodo, temperatura y humedad, como lo detalla el experimento 1.

Las variables evaluadas fueron: porcentaje de deformación de folíolo (DF), OX, callogénesis (Ca), área de callo (mm^2) (HC), materia fresca (MF) y materia seca (MS). Adicionalmente, se analizaron las características fisicoquímicas del medio de cultivo, como pH final y diferencia de conductividad eléctrica (CE).

Para cuantificar la DF que era producto de los tratamientos, se contrastó con folíolos representativos de la especie en estudio que no tenían alteración fisiológica alguna. Para el análisis de MF y MS de los callos obtenidos en los tratamientos destacados, se utilizó una balanza analítica (AE ADAN[®]) con precisión de 0,1 mg y, posteriormente, los callos fueron colocados en una estufa (TOMOS ODHG-9076^{a®}) a $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 72 horas y nuevamente pesados en una balanza analítica.

En cuanto al análisis de pH final y la diferencia de CE (mS/cm) de los medios de cultivo, se recopilaban los datos de pH y CE iniciales de los medios de cultivos autoclavados. Después del

periodo de desarrollo *in vitro*, los medios de cultivo fueron separados de los explantes y enseguida congelados a temperatura de -20°C por 24 horas, con la finalidad de romper la estructura del agar y liberar los componentes solubles para un análisis de mayor precisión, luego de descongelados, se midieron los pH y CE finales. El pH se midió con un pH-metro de mesa (ADWA AD1030®) y la CE con un conductímetro portátil de marca TDS&EC Meter (HOLD®). Para calcular la diferencia de CE, se utilizaron los datos de CE inicial y final.

Tratamientos, diseño estadístico y procesamiento de datos

El experimento 1 de desinfección de folíolos se llevó a cabo mediante un diseño completamente al azar (DCA), con tres tratamientos (0 %, 0,25 % y 0,5 % de NaClO).

El experimento 2 de inducción de callos se desarrolló bajo un esquema factorial de 3 (estado del desarrollo foliar: joven, intermedio y maduro) $\times$ 6 (combinaciones de fitohormonas: BAP (6-bencilaminopurina), TDZ (thidiazuron), 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxyacético), BAP+TDZ, BAP+2,4-D, TDZ+2,4-D, todas con 1 mg/l), teniendo como resultado 18 tratamientos, tal como se muestra en la tabla 1.

Cada experimento contó con 18 réplicas técnicas, siendo la unidad experimental un frasco que contenía tres segmentos foliares (54 segmentos foliares en total por los tres tratamientos).

La colecta de datos del experimento 1 se realizó cada siete días por el periodo de un mes; mientras que el experimento 2 cada quince días por un periodo de cinco meses. Los datos fueron sometidos a un análisis de varianza (ANVA) y comparación de medias mediante la prueba Duncan a 5 % de significancia; adicionalmente, se realizó un análisis de correlación y de componentes principales (PCA, según sus siglas en inglés) entre todas las variables del experimento de inducción de callos (DF, OX, Ca, HC, MF, MS, pH y CE). La correlación se realizó usando el coeficiente de correlación de Spearman, a un nivel de probabilidad del 5 %, a partir de las medias. Para realizar estos análisis, se utilizó el *software* R Studio (Github, s. f.) y los datos recopilados de las variables DF, OX y Ca fueron tratados en porcentajes, de acuerdo con las frecuencias analizadas.

Resultados y discusión

Efecto de concentración de NaClO en la desinfección de segmentos foliares

De los resultados obtenidos en la desinfección vegetal de folíolos (segmento intermedio), estos fueron significativos para CO, AS, PHO, PBA y OX, mientras que, para FE no fueron significativos. Con respecto al CO, se determinó que la ausencia de NaClO incrementó considerablemente la contaminación (100 %), mientras que los folíolos sumergidos en NaClO, independientemente de la concentración de 0,25 % a 0,5 %, permitieron obtener un 88,9 % de segmentos foliares en condiciones asépticas. Resultados semejantes reportaron Ramírez-Villalobos et al. (2002), quienes determinaron que la ausencia de NaClO incrementaba la contaminación, asimismo, la concentración de 0,5 % de NaClO inhibió contaminantes en la especie de *Annona muricata*. Por

otra parte, en el presente estudio se observó contaminación por hongos, bacterias y fenoles. Los resultados se pueden observar en la tabla 2.

Tabla 2. Efecto de la concentración de NaClO en la desinfección de folíolos de *S. amara*

Tratamientos	CO	AS	PHO	PBA	OX	FE
% de NaClO	%	%	%	%	%	%
T1 = 0	100 ^A	0 ^B	94,4 ^A	50 ^A	-	-
T2 = 0,25	11,1 ^B	88,9 ^A	11,1 ^B	0 ^B	17 ^B	17 ^A
T3 = 0,5	11,1 ^B	88,9 ^A	5,6 ^B	5,6 ^B	50 ^A	22 ^A

n = 18 réplicas técnicas

Notas aclaratorias: CO: contaminación, AS: asepsia, PHO: presencia de hongos, PHB: presencia de bacterias, OX: oxidación y FE: fenoles. Medias con letras mayúsculas diferentes muestran diferencias significativas, según la prueba de Duncan $P \leq 0,05$.

Fuente: Elaboración propia

Los resultados de este estudio mostraron que el uso de NaClO en concentraciones de 0,25 % y 0,5 % para la desinfección de segmentos foliares en estado intermedio, permitió obtener un 88,9 % de explantes asépticos; sin embargo, el NaClO al 0,5 % no garantizó una menor oxidación de los explantes, ya que posee una acción citotóxica. Resultados semejantes fueron obtenidos por Salazar Mercado y Maldonado Bayona (2020), quienes obtuvieron citotoxicidad en la planta *Lens culinaris*.

La oxidación es un problema común (Jaskani et al., 2008), más aún para plantas leñosas (Azofeifa-Delgado, 2008). En la variable de oxidación se observó que, a mayor concentración de NaClO, la oxidación se incrementaba significativamente, de un 17 % a un 50 %; mientras que, en la liberación de FE no se encontró una diferencia significativa. Resultados similares fueron obtenidos por Alves Dos Santos et al. (2010), quienes reportaron que mayores concentraciones de NaClO provocaron oxidación en explantes de *Bactris gasipaes*. De manera análoga, Hernández-Amasifuen et al. (2021) observaron oxidación en segmentos de *Prunus persica* L. expuestos a NaClO. En contraste, Carbonell et al. (2022) no registraron oxidación en explantes de *Leptochloa crinita* tratados con esta sustancia. En el presente estudio, se evidenció que con T2 a 0,25 % de NaClO se obtuvo una menor oxidación y, en consecuencia, con este tratamiento se logró un mayor número de explantes vivos, pudiéndose utilizar en futuras investigaciones y evitándose de este modo la presencia de explantes con oxidación que causaban necrosis absoluta en los tejidos vegetales (Tabiyeh et al., 2006).

Efecto de fitohormonas y estado del desarrollo foliar en la inducción de callos

El presente estudio investigó el efecto de tres tipos de fitohormonas (BAP, TDZ y 2,4-D), aplicadas individualmente y combinadas entre ellas, así como el estado del desarrollo foliar (joven, intermedio y maduro) en la inducción de callos. El efecto de las fitohormonas, el estado del desarrollo foliar y la interacción de los factores fueron significativos para DF, OX, Ca y HC, tal como se observa en la tabla 3.

Además, el mayor porcentaje de DF (100 %), perteneciente a segmentos de desarrollo joven, fue con T5 y T6, mientras que en segmentos intermedios fue con T8 y T11. No existiendo diferencias significativas en segmentos maduros (tabla 3).

Tabla 3. Efecto de diferentes fitohormonas y estado del desarrollo foliar en la inducción de callos *in vitro* de *S. amara*, en un periodo de cinco meses

Estado del desarrollo foliar (1 cm²)	Fitohormona (1 mg/l)					
	BAP	TDZ	2,4-D	BAP+TDZ	BAP+2,4-D	TDZ+2,4-D
Deformación de foliolo (DF) (%)*						
Joven	T1 = 11 ^{B:B}	T2 = 0 ^{B:B}	T3 = 0 ^{B:B}	T4 = 89 ^{A:A}	T5 = 100 ^{A:A}	T6 = 100 ^{A:A}
Intermedio	T7 = 89 ^{A:A}	T8 = 100 ^{A:A}	T9 = 67 ^{B:A}	T10 = 0 ^{C:B}	T11 = 100 ^{A:A}	T12 = 89 ^{A:A}
Maduro	T13 = 0 ^{A:B}	T14 = 0 ^{A:B}	T15 = 0 ^{A:B}	T16 = 0 ^{A:B}	T17 = 11 ^{A:B}	T18 = 17 ^{A:B}
Oxidación (OX) (%)						
Joven	94,44 ^{A:A}	100 ^{A:A}	100 ^{A:A}	50 ^{B:A}	0 ^{C:C}	0 ^{C:C}
Intermedio	55,56 ^{B:B}	50 ^{B:B}	61,11 ^{B:B}	100 ^{A:B}	22,22 ^{C:B}	33,33 ^{C:B}
Maduro	100 ^{A:A}	100 ^{A:A}	100 ^{A:A}	100 ^{A:A}	100 ^{A:A}	100 ^{A:A}
Callogénesis (Ca) (%)						
Joven	11 ^{BC:A}	0 ^{C:A}	0 ^{C:A}	17 ^{B:A}	100 ^{A:A}	100 ^{A:A}
Intermedio	0 ^{C:A}	0 ^{C:A}	0 ^{C:A}	0 ^{C:A}	56 ^{B:B}	72 ^{A:B}
Maduro	0 ^{B:A}	0 ^{B:A}	0 ^{B:A}	0 ^{B:A}	11 ^{AB:C}	22 ^{A:C}
Área de callo (HC) (mm²)						
Joven	1,50 ^{C:A}	0 ^{C:A}	0 ^{C:A}	2,11 ^{C:A}	40,83 ^{B:B}	68,61 ^{A:B}
Intermedio	0 ^{B:A}	0 ^{B:A}	0 ^{B:A}	0 ^{B:A}	89,78 ^{A:A}	102,94 ^{A:A}
Maduro	0 ^{A:A}	0 ^{A:A}	0 ^{A:A}	0 ^{A:A}	0,17 ^{A:C}	0,17 ^{A:C}
Joven	T4 = 9,20 ^{B:A}		T5 = 108,51 ^{B:B}		T6 = 280,17 ^{A:A}	
Intermedio	T10 = 0 ^{B:A}		T11 = 311,98 ^{A:A}		T12 = 403,40 ^{A:A}	
Maduro	T13 = 0 ^{A:A}		T17 = 0,73 ^{A:B}		T18 = 0,73 ^{A:B}	
	Materia seca de callo (mg)					
Joven	0,43 ^{B:A}		8,45 ^{AB:B}		19,10 ^{A:B}	
Intermedio	0 ^{B:A}		26,68 ^{A:A}		38,16 ^{A:A}	
Maduro	0 ^{A:A}		0,25 ^{A:B}		0,25 ^{A:C}	

Notas aclaratorias: *Datos recopilados en 30 días, los datos presentados son la media de 18 réplicas técnicas por tratamiento. Medias con letras mayúsculas diferentes muestran diferencias significativas, según la prueba de Duncan $P \leq 0,05$. La letra o letras izquierdas separadas por dos puntos corresponden al factor fitohormonas, mientras que la letra o letras derechas indican el factor de estado de desarrollo foliar.

Fuente: Elaboración propia

El establecimiento de un protocolo es un paso clave para futuros programas de propagación y mejoramiento genético de fenotipos con características genéticas deseadas. La formación y

proliferación celular (callos) posterior a la fase de dediferenciación celular (deformación), depende principalmente del suministro exógeno de auxinas, así como del tipo y la concentración de esta (Naik et al., 2017). Mientras que para los autores Gonzales-Alvarado et al. (2022) y Mohd Din et al. (2016), la utilización de auxinas y citocininas en el mismo medio de cultivo favorecen el desarrollo de formación de callos, así como la producción de brotes, y según Kumlay y Ercisli (2015), el uso de citocininas afecta directamente el proceso de dediferenciación, resultando en la disminución de la lignificación de la pared celular, facilitando el cambio morfológico (deformación) y el aumento del crecimiento celular (callo); asimismo, en la presente investigación se demostró que la asociación del factor fitohormonas, específicamente BAP+2,4-D y TDZ+2,4-D, promovieron la deformación de folíolos, independientemente del estado de desarrollo del tejido inoculado, por lo que se podría inferir que la asociación de las citocininas potencia la deformación de los folíolos. Mientras que para el segmento maduro no se observó una diferencia significativa para el factor fitohormonas, en consecuencia, no sufrieron cambios (tabla 3).

Resultados semejantes fueron reportados en otros estudios para segmentos del estado de desarrollo maduro que no formaron callos en las especies de *Triticum aestivum* (Miroshnichenko et al., 2011) y *Eucalyptus camaldulensis* (Zhang et al., 2022). Esto se atribuyó a que los segmentos maduros presentaron mayores células diferenciadas, una pared celular lignificada, una menor tasa de metabolismo y una menor sensibilidad a fitohormonas (George et al., 2008), ocasionando tasas de absorción diferenciadas, por lo que se puede inferir que necesitarían de mayores concentraciones de citocininas para que se pueda ablandar la pared celular, se logre la división celular y, por lo tanto, la formación de callos.

Adicionalmente, los resultados de oxidación demostraron que existen diferentes grados de oxidación en cada tratamiento y que T5 y T6 tuvieron un 0 % de oxidación, así como los segmentos maduros se oxidaron, independientemente de la exposición a las fitohormonas (tabla 3, figura 2). Según los autores Gratão et al. (2005), Bertoni Pompeu et al. (2008) y Tang y Newton (2004), cuando las células del explante entraban en contacto con el medio de cultivo, estas iniciaron un proceso de estrés o senescencia, dando como resultado la muerte celular; asimismo, el corte en pequeños segmentos causó la oxidación (Tabiyeh et al., 2006; Van Staden et al., 2006), visualizándose el oscurecimiento del explante inoculado (figura 2). Por otra parte, para Payghamzadeh y Kazemitabar (2011), la presencia de auxinas (2,4-D) en el medio de cultivo promovió una mayor oxidación y muerte celular, lo cual difiere de esta investigación, ya que en el medio de cultivo con citocininas de TDZ y BAP, se observó oxidación, independientemente del estado de desarrollo foliar. Como se mencionó, en T5 y T6 no se observó oxidación, resultados opuestos a T5 reportaron Mc-Caughey-Espinoza, Ayala-Astorgo et al. (2020) en *Krameria erecta* Willd, obteniendo un 28,7 % de oxidación foliar en exposición con BAP+2,4-D de 1 mg/l. En futuros ensayos, se recomienda la utilización de alguna sustancia que ayude a controlar la oxidación de los explantes, como, por ejemplo: ácido ascórbico, ácido cítrico, carbón activado, EDTA, L- cisteína o nitrato de plata, como fue reportado por Buenrostro-Nava et al. (2017) y Martínez Oviedo (2024).

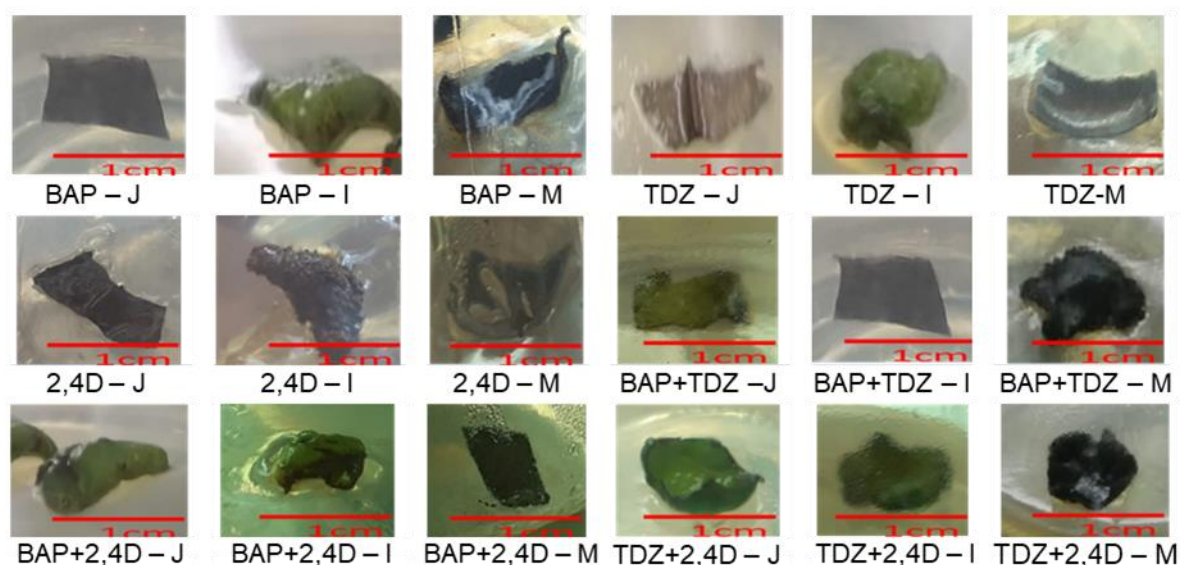


Figura 2. Deformación y oxidación de diferentes estados de desarrollo de foliolos de *S. amara* bajo el efecto de diferentes fitohormonas

Notas aclaratorias: J: tejido joven, I: tejido intermedio y M: tejido maduro.

Fuente: Elaboración propia

Los resultados de la variable Ca demostraron un máximo porcentaje de callos (100 %) en T5 y T6 (tabla 3), debido al equilibrio estimulador de citocininas y auxinas (Lee & Huang, 2014), lo que afectó el ciclo celular de la planta y su capacidad de morfogénesis (Jones et al., 2010), como ilustra la figura 3. Resultados similares reportaron Corredor Lara et al. (2022) para la especie *Senna alata* L. (73,3 % de callo) con explantes expuestos a TDZ+2,4-D de 1 mg/l y 26,67 % para *Caesalpinia ferrea* Mart., con TDZ+2,4-D de 1 mg/l y 5 mg/l (Da Silva et al., 2018). Por otra parte, Kumar et al. (2018), Liu et al. (2018), Qin et al. (2017) y Rodríguez Beraud et al. (2014) reportaron, respectivamente, 60 %; 45,95 %; 73 % y 80 % de callos, a partir de segmentos jóvenes de foliolos de *Ugni molinae*, *Tagetes* sp., *Solanum torvum* y *Miniature roses*, en combinación de BAP+2,4-D a 1 mg/l; mientras que, para el segmento maduro, apenas un 11 % y un 22 %, con las fitohormonas mencionadas. Gomes-Copeland et al. (2017) reportaron la inhibición de callos en tratamientos con ausencia de 2,4-D, debido a su efecto fitotóxico (dos Santos Silva et al., 2013). En el caso del presente estudio se evidenció que el uso individual de la citocinina BAP indujo un 11 % de callo (T1) en tejido joven; asimismo, en el segmento joven, los autores Alves Dos Santos et al. (2010) reportaron un 100 % de callos con 1 mg/l de BAP. Resultados opuestos reportó Ronquillo López (2005) en segmentos foliares de *Sansevieria trifasciata*, obteniendo un 0 % de callos con 1 mg/l de BAP. También, en el presente estudio, se observó un 17 % de callos en T4 (segmento joven expuesto a BAP+TDZ). Por otra parte, para los autores Raikar et al. (2024) y Zhou et al. (2023), los callos friables presentaron apariencia seca, coloración amarillo-blancuecina, fueron compactos y pudieron producir embriones, coincidiendo con nuestros resultados, según se muestra en la figura 3 (callos de color crema clara y oscura, correspondiente a callos friables).

En relación con el HC, se determinó que la mayor superficie en HC (102,94; 89,78 mm²/callo) (tabla 3) fue obtenido de segmentos intermedios con la adición de BAP+2,4-D y TDZ+2,4-D, (T11 y T12), respectivamente, no difiriendo estadísticamente entre estos tratamientos aplicados. Para el factor “estado del desarrollo foliar joven”, se observó una mayor superficie (68,61 mm²/callo) en T6; mientras que en el factor “estado del desarrollo foliar maduro”, apenas se obtuvo 0,17 mm²/callo en T17 y T18. Todos los datos de superficie de callo obtenidos en esta investigación fueron superiores a los obtenidos por Mc-Caughey-Espinoza, Ayala-Astorgo et al. (2020) y Mc-Caughey-Espinoza, Reyes-Olivas et al. (2020), quienes reportaron 0,56 y 6,35 mm²/callo en *Krameria erecta* Willd y *Bursera laxiflora* S. Watson, respectivamente, con la fitohormona ácido indol-3-butírico (AIB) a 1 mg/l.

El proceso de inducción de callos es una etapa crucial para generar material vegetal que sirva como base en investigaciones relacionadas con la regeneración celular. Este proceso puede aplicarse en estudios de rediferenciación celular, permitiendo obtener plantas completas regeneradas a partir de células desdiferenciadas. Al desarrollar callos, se sientan las bases para optimizar técnicas de propagación y regeneración vegetal, esenciales para estudios avanzados y en la mejora de protocolos en biotecnología vegetal.

Dentro del estudio de inducción de callos, existen muchos reportes en diferentes especies, de las cuales pocos evalúan las variables de MF y MS, por el temor de perder muestras inducidas y tiempo, puesto que los explantes provenientes de especies leñosas son difíciles de inducir a callogénesis a partir de hojas; así como también que el tiempo para su formación es muy amplio; por ejemplo, en esta investigación se necesitaron cinco meses para la producción de callos. En las variables de MF y MS se observó que, en el segmento intermedio, se generó más MF y MS (403,4 mg MF/callos en T1 y 311,98 mg MF/callos en T2 y 38,16 mg MS/callos en T1 y 26,68 mg MS/callos en T12), independientemente de los dos grupos de fitohormonas, no difiriendo estadísticamente entre estas medias. Resultados similares reportaron Hadke et al. (2008) para la especie de *S. glauca* D. C., especie del mismo género que *S. amara*, reportando 0,226 mg MF/callos y 0,020 mg MS/callos con las fitohormonas BAP+2,4-D, ambas de 1 mg/l para un periodo de 30 días. Se debe mencionar que los resultados de *S. amara* se obtuvieron en cinco meses. Asimismo, las variables de MF y MS mostraron una fuerte correlación (1***) (figura 4), lo cual coincide con lo reportado por Bello-Bello et al. (2016), Gupta y Jatothu (2013) y Sarropoulou et al. (2022).

Características fisicoquímicas del medio de cultivo

Para las variables pH final y diferencia de CE, se evaluaron dos tratamientos sobresalientes (joven e intermedio) del factor estado de desarrollo foliar y tratamientos (BAP+TDZ, BAP+2,4-D y TDZ+2,4-D) en ambas combinaciones de 1 mg/l por fitohormona, cuyos resultados se visualizan en la tabla 4. El efecto de las fitohormonas, el estado del desarrollo foliar y la interacción de los factores fueron significativos para todas las variables.

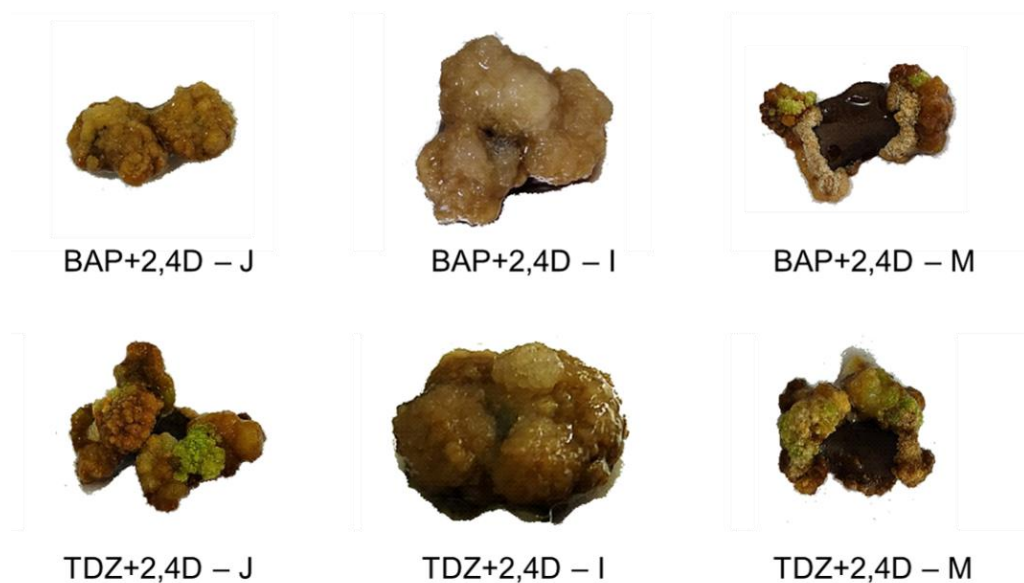


Figura 3. Formación de callos a partir de segmentos foliares

Notas aclaratorias: I: tejido intermedio, J: tejido joven y M: tejido maduro.

Fuente: Elaboración propia

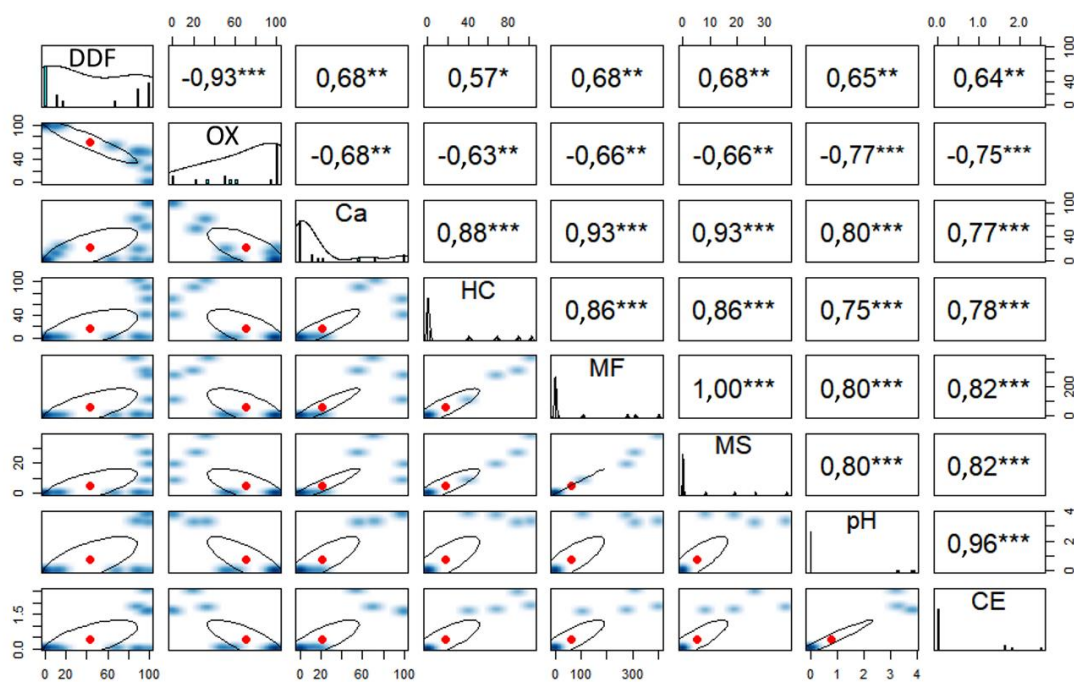


Figura 4. Plots de correlación de las variables analizadas para *S. amara*.

Notas aclaratorias: DF: deformación de foliolo, OX: oxidación, Ca: callogénesis, HC: área de callo, MF: materia fresca, MS: materia seca, pH: potencial de hidrógeno y CE: conductividad eléctrica.

Fuente: Elaboración propia

Tabla 4. Efecto de los tratamientos aplicados para la formación de callos de *S. amara*, en el pH final y diferencia de CE del medio de cultivo

Estado del desarrollo foliar	pH final**	
pH inicial*	4,89*	5,04*
Joven	3,88 ^{B:A}	3,78 ^{A:A}
Intermedio	3,24 ^{A:B}	3,32 ^{B:B}
CE (mS/cm)**		
Joven	1,64 ^{A:B}	1,64 ^{A:B}
Intermedio	2,53 ^{A:A}	1,81 ^{B:A}

Notas aclaratorias: *pH inicial, **los datos presentados son media de seis réplicas técnicas por tratamiento, además, medias con letras mayúsculas diferentes muestran diferencias significativas según la prueba de Duncan $P \leq 0,05$. La letra izquierda separada por dos puntos corresponde al factor de fitohormonas, mientras que la letra derecha indica el factor estado de desarrollo foliar. Fuente: Elaboración propia

Las evaluaciones del pH final y la variación de la CE (tabla 4) son escasas, porque muchos investigadores no se enfocan en cuantificar el comportamiento de los nutrientes absorbidos por diferentes explantes inoculados en el medio de cultivo. Además, el pH en el medio de cultivo afecta directamente al explante por la disponibilidad de nutrientes (Teixeira Nicoloso et al., 2008), por lo que se pudo determinar la disminución del pH final a lo largo del tiempo para los segmentos jóvenes (3,88 y 3,78) e intermedios (3,24 y 3,32) para las combinaciones BAP+2,4-D y TDZ+2,4-D, ambos con 1 mg/l, respectivamente, en comparación del pH inicial (4,89 y 5,04) de las mismas combinaciones mencionadas. Resultados semejantes fueron reportados por Cardoso y Petit Imthurn (2018), quienes encontraron una disminución del pH final en *Gerbera jamesonii* a lo largo del tiempo. Se evidenció también que los valores más bajos de pH (3,24-3,32) se obtuvieron en segmentos intermedios con BAP+2,4-D y TDZ+2,4-D, esto estuvo relacionado con el estado del desarrollo foliar, porque las células de hojas intermedias presentaron mayores tasas de intercambio de nutrientes y agua, afectando el balance iónico y, en consecuencia, el pH (Meychik et al., 2021).

La CE es un indicador crucial del desarrollo y la calidad de los callos, porque a mayor concentración, los explantes presentaron un mayor desarrollo, debido a la concentración de iones y solutos en el medio de cultivo (Argentel Martínez et al., 2017), mientras que a menor concentración se puede inducir estrés nutricional y suprimir el crecimiento y la calidad (Ding et al., 2018). La diferencia de CE (CE inicial - CE final) es un indicador de consumo por parte de las células en crecimiento, donde los iones y los solutos en el medio de cultivo disminuyen porque son absorbidos por las células. En este estudio se encontró que el segmento intermedio que estuvo en contacto con BAP+2,4-D presentó los valores más altos (2,53 mS/cm) (tabla 4), demostrando que, a mayor producción de MF de callo, existe una mayor diferencia de CE, resultados semejantes también fueron reportados por Cheema et al. (2002) y Pérez-Vásquez et al. (2021) en *Basmati rice* y *Capsicum annuum*, respectivamente.

Por otro lado, Argentel Martínez et al. (2017) afirmaron que existe una correlación entre el desarrollo *in vitro* y las variaciones en la CE, además, en el caso *S. amara* se evidenció que sí existe

correlación de CE con otras variables (HC, MF, MS, pH y CE) (figura 4). Resultados semejantes fueron reportados por Byrne et al. (2000), quienes encontraron existencia de correlación entre el CE y pH en *Musculus longissimus*.

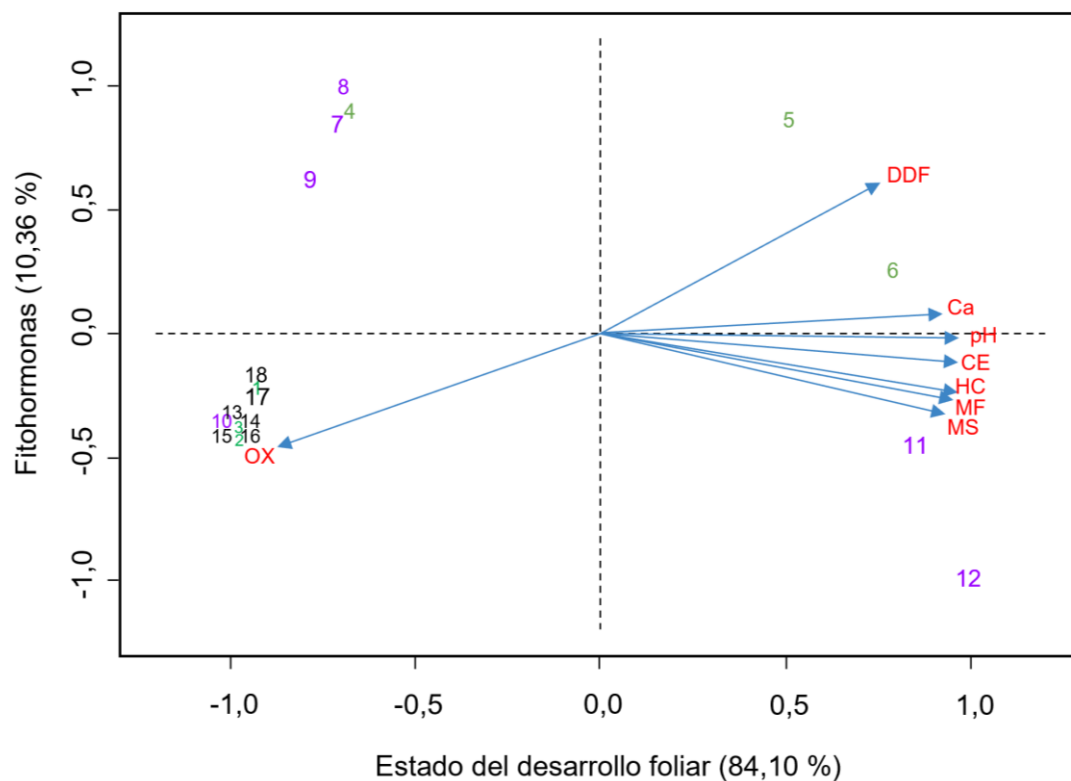


Figura 5. Análisis de componentes principales de los factores fitohormonas y estado del desarrollo foliar en el cultivo *in vitro* de *S. amara*

Notas aclaratorias: los números de color verde representan el segmento joven, los números de color morado el segmento intermedio y los números de color negro los del segmento maduro. Los números consecutivos 1-6, 7-12 y 13-18 representan las fitohormonas (BAP, TDZ, 2,4-D, BAP+TDZ, BAP+2,4-D, TDZ+2,4-D).

Fuente: Elaboración propia

Además, el análisis de *PCA* permitió identificar que Ca, HC, MF y MS están altamente correlacionados con las combinaciones de BAP+2,4-D y TDZ+2,4-D, intercalado con el tipo de segmento joven e intermedio. Resultados semejantes fueron reportados por Gonzales-Alvarado & Cardoso (2024), quienes encontraron correlaciones de las variables MF, MS y desarrollo del explante en el *PCA*, con la utilización de la fitohormona BAP. Además, en el estudio actual, en el análisis del componente de fitohormonas (*PC1*, según las siglas en inglés para componente principal 1) y de desarrollo foliar (*PC2*, según las siglas en inglés para componente principal 2) se explicó la variabilidad de los datos con 10,36 % y 84,1 %, respectivamente (figura 5). Hasta donde se sabe, la presente investigación es la primera en añadir el análisis de las características fisicoquímicas de los medios de cultivo en *S. amara*, lo cual da un soporte ideal para visualizar el comportamiento de los parámetros fisicoquímicos, como pH y CE del medio de cultivo.

Asimismo, verificar el comportamiento fisicoquímico garantiza la optimización de la producción de callos friables para futuras investigaciones, como embriogénesis somática, células en suspensión y rediferenciación celular para formar una planta completa.

Conclusiones

Se determinó que de un 0,25 % de NaClO, aplicado durante 10 minutos, se obtiene un 88,9 % de asepsia y con el menor porcentaje de oxidación (17 %) en folíolos de *S. amara*.

Las combinaciones de BAP+2,4-D y TDZ+2,4-D en segmentos de estado de desarrollo foliar intermedio permitieron la inducción de formación de callos, asimismo, permitieron un mayor incremento de HC y producción de MF y MS.

Además, este estudio destacó la importancia de la concentración adecuada del desinfectante NaClO y el uso estratégico de fitohormonas en función del estado de desarrollo foliar, para optimizar la inducción de callos en *S. amara*. Estos hallazgos tienen implicancias importantes para futuras investigaciones biotecnológicas, ya que servirán de base para estudios en inducción de embriogénesis somática indirecta, organogénesis indirecta, rizogénesis, aislamiento de protoplastos, entre otros temas, y que se usarán para la propagación, el mejoramiento genético y la conservación de esta especie.

Agradecimientos

Agradecemos a los colaboradores que participaron en las fases de campo y gabinete, contribuyendo significativamente al desarrollo de esta investigación. Finalmente, reconocemos las valiosas sugerencias de los revisores anónimos que permitieron mejorar sustancialmente el manuscrito.

Contribución de los autores

Antony Cristhian Gonzales-Alvarado: conceptualización, curación de datos, análisis formal, investigación, metodología, administración de proyectos, supervisión, validación, visualización, redacción del borrador original, revisión y edición; Mao Augusto Herrera-Saavedra: curación de datos, investigación y metodología; Vanessa Jhasmin Muñoz Fernandez: curación de datos, investigación y metodología; Nathalia de Setta: análisis formal; Jorge Arturo Mori-Vásquez: adquisición de fondos, administración de proyectos, supervisión, redacción, revisión y edición; Nathalia de Setta: validación; Glêyce de Oliveira Ferreira: validación; Ayda Guisella Avalos-Díaz: visualización; Nadia Masaya Panduro-Tenazoa: visualización, redacción, revisión y edición.

Implicaciones éticas

Todos los autores declaran que el trabajo se encuentra en un estado de desarrollo en el que no presenta implicaciones éticas, ni se han violado principios éticos.

Conflicto de interés

Los autores manifiestan que no existen conflictos de interés en este estudio.

Financiación

La presente investigación fue financiada por el Fondo de Desarrollo Socioeconómico de Camisea (Focam) de la Universidad Nacional de Ucayali, mediante el proyecto aprobado por Resolución N.º 990-2022-UNU-CU-R, titulado “Aplicación de herramientas biotecnológicas para determinar la variabilidad genética y respuesta al cambio climático a través del desarrollo inicial de clones de especies forestales amazónicas, *Simarouba amara* (marupa) y *Dipteryx odorata* (shihuahuaco), en la región Ucayali, Perú”.

Referencias

- Aguilera-Arango, G. A., Puentes-Díaz, C. L., & Rodríguez-Henao, E. (2021). Disinfection methods for the *in vitro* establishment of two varieties of cassava for agroindustrial use. *Revista de Investigación e Innovación Agropecuaria y de Recursos Naturales*, 8(3), 21-30. <https://doi.org/10.53287/kdux7546xv19l>
- Alharbi, K., Al-Osaimi, A. A., & Alghamdi, B. A. (2022). Sodium chloride (NaCl)-induced physiological alteration and oxidative stress generation in *Pisum sativum* (L.): a toxicity assessment. *ACS Omega*, 7(24), 20819-20832. <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c01427>
- Alves Dos Santos, M. R., Rodrigues Ferreira, M. G., De Oliveira Correia, A., & Félix Da Rocha, J. (2010). *In vitro* establishment and callogenesis in shoot tips of Peach Palm. *Revista Caatinga*, 23(1), 40-44. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=237117582007>
- Amorim Santos, J. P., Oliveira de Souza, M., Santos Souza, J., Ramos da Silva, R., & Reis Mendonça, A. V. (2022). Production time and container size for *Simarouba amara* Aubl. seedlings. *Floresta e Ambiente*, 29(3), e20220030. <https://doi.org/10.1590/2179-8087-FLORAM-2022-0030>
- Arbeláez, L. M., Montoya, J. L., & Saavedra, S. A. (2016). Assessment protocols for the establishment and disinfection *in vitro* meristem of Banana *Musa* spp. *Vitae*, 23(1), 391-395. <https://www.proquest.com/docview/1783661064?sourcetype=Scholarly%20Journals>
- Argente Martínez, L., Fonseca Reyna, I., Garatuza Payán, J., Yépez González, E., & González Aguilera, J. (2017). Effect of salinity on calli of wheat varieties during *in vitro* culture.

- Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 8(3), 477-488.
<https://doi.org/10.29312/remexca.v8i3.25>
- Aublet, F. (1775). Histoire des plantes de la Guiane Française. Londres e Paris: Pierre-François Didot. *Botanicus*, 2, 860-861. <http://www.botanicus.org/page/361614>
- Azofeifa-Delgado, Á. (2008). Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. *Agronomía Mesoamericana*, 20(1), 153-175.
<https://doi.org/10.15517/am.v20i1.4990>
- Bello-Bello, J. J., Martínez-Estrada, E., Caamal-Velázquez, J. H., & Morales-Ramos, V. (2016). Effect of LED light quality on *in vitro* shoot proliferation and growth of vanilla (*Vanilla planifolia* Andrews). *African Journal of Biotechnology*, 15(8), 272-277.
<https://doi.org/10.5897/AJB2015.14662>
- Bertoni Pompeu, G., Lupino Gratão, P., Vitorello, V. A., & Antunes Azevedo, R. (2008). Antioxidant isoenzyme responses to nickel-induced stress in tobacco cell suspension culture. *Scientia Agrícola*, 65(5), 548-552. <https://doi.org/10.1590/S0103-90162008000500015>
- Boyette, M. D., Ritchie, D. F., Carballo, S. J., Blankenship, S. M., & Sanders, D. C. (1993). Chlorination and postharvest disease control. *HortTechnology*, 3(4), 395-400.
<https://doi.org/10.21273/HORTTECH.3.4.395>
- Bramhanapalli, M., Thogatabalija, L., & Gudipalli, P. (2017). Efficient *in vitro* plant regeneration from seedling-derived explants and genetic stability analysis of regenerated plants of *Simarouba glauca* DC. by RAPD and ISSR markers. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 53(1), 50-63. <https://doi.org/10.1007/s11627-016-9795-0>
- Buenrostro-Nava, M. T., Adaame-Gómez, N. L., Guzmán-González, S., Osuna-Castro, J. A., & Manzo-Sánchez, G. (2017). Efecto de antioxidación en la inducción de callo embriogénico en dos genotipos de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.). *Biotecnología y sustentabilidad*, 2(1), 100-106.
<https://revistas.uaz.edu.mx/index.php/biotecnologiaysust/article/view/218>
- Bustamante, K., Rocha, P., Sharry, S., Guerra, M., & Niella, F. (2022). Organogénesis directa e indirecta a partir de segmentos nodales, hojas y raíces de *Eugenia involucrata* DC. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 121(2), 102. <https://doi.org/10.24215/16699513e102>
- Byrne, C. E., Troy, D. J., & Buckley, D. J. (2000). Postmortem changes in muscle electrical properties of bovine *M. longissimus dorsi* and their relationship to meat quality attributes and pH fall. *Meat Science*, 54(1), 23-34. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(99\)00055-8](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(99)00055-8)
- Cai, W., Weng, X., Wang, J., Wen, X., & Chen, Q. (2013). Callus Induction and Differentiation of *Melaleuca bracteata* F. Muell. leaves. *Journal of Zhangzhou Normal University*, 2, 65-69.
https://qikan.cqvip.com/Qikan/Article/Detail?id=46802258&from=Qikan_Article_Detail
- Carbonell, X. R., Verdes, P. E., & Leporati, J. L. (2022). Evaluación preliminar de la callogénesis y organogénesis *in vitro* *Leptochloa crinita* (lag.) p. m. Peterson & n. snow. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 24(1), 19-26. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v24n1.99374>
- Cardoso, J. C., & Petit Imthurn, A. C. (2018). Esterilização química do meio de cultura para o cultivo *in vitro* de gérbera utilizando dióxido de cloro (ClO₂). *Ornamental horticulture*, 24(3), 218-224. <http://dx.doi.org/10.14295/oh.v24i3.1222>
- Cheema, A. A., Saleem, M. Y., & Awan, M. A. (2002). *In vitro* techniques for the selection of Basmati rice mutants better adapted to saline environments. En: Maluszynski, M., &

- Kasha, K. J. (Eds.) *Mutations, in vitro and molecular techniques for environmentally sustainable crop improvement*. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-015-9996-2_16
- Chen, B., Li, J., Zhang, J., Fan, H., Wu, L., & Li, Q. (2016). Improvement of the tissue culture technique for *Melaleuca alternifolia*. *Journal of Forestry Research*, 27(6), 1265-1269. <https://doi.org/10.1007/s11676-016-0301-7>
- Chung, H. H., Chen, J. T., & Chang, W. C. (2007). Plant regeneration through direct somatic embryogenesis from leaf explants of *Dendrobium*. *Biologia Plantarum*, 51(2), 346-350. <https://doi.org/10.1007/s10535-007-0069-x>
- Corredor Lara, E. Y., Imakawa, A. M., da Silva, D., & Barbosa Sampaio, P. T. (2022). *In vitro* callus induction from different explants of *Senna alata* (L.) Robx. (FABACEAE). *Advances In Forestry Science Cuiabá*, 9(1), 1653-1660. <https://doi.org/10.34062/afs.v9i1.12928>
- Da Silva, D., Imakawa, A. M., Souza Bruno, F. M., & Barbosa Sampaio, P. T. (2018). Indução de calos friáveis em explantes foliares e segmentos nodais de pau-ferro (*Caesalpinia ferrea*). *Revista de Ciências Agrárias*, 41(4), 1044-1050. <https://doi.org/10.19084/RCA17311>
- Devecchi, M. F., & Pirani, J. R. (2016). *Flora of the cangas of the Serra dos Carajás, Pará, Brazil: Simaroubaceae*. *Rodriguésia*, 67(5), 1471-1476. <https://doi.org/10.1590/2175-7860201667551>
- Ding, X., Jiang, Y., Zhao, H., Guo, D., He, L., Liu, F., Zhou, Q., Nandwani, D., Hui, D., & Yu, J. (2018). Electrical conductivity of nutrient solution influenced photosynthesis, quality, and antioxidant enzyme activity of pakchoi (*Brassica campestris* L. ssp. *Chinensis*) in a hydroponic system. *PLoS ONE*, 13(8), e0202090. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202090>
- dos Santos Silva, T., Ferreira Nepomuceno, C., dos Santos Borges, B. P., Matos Alvim, B. F., & Ferreira de Santana, J. R. (2013). *In vitro* multiplication of *Caesalpinia pyramidalis* (Leguminosae). *Sitientibus série Ciências Biológicas*, 13, 2-6. <https://doi.org/10.13102/scb320>
- Fonseca e Cruz, C. A., Nogueira de Paiva, H., & Amadio Guerrero, C. R. (2006). Efeito da adubação nitrogenada na produção de mudas de sete-cacas (*Samanea inopinata* (Harms) Ducke). *Revista Árvore*, 30(4), 537-546. <https://doi.org/10.1590/S0100-67622006000400006>
- Gándara-Ledezma, V., Tíneo-García, L., Rodríguez-de la O, J. L., Castro-Espinoza, L., Ruiz-Cruz, S., Márquez-Cervantes, A., & Gutierrez Coronado, M. A. (2023). Desinfección de folíolos de nogal pecanero adulto *Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch. (Juglandaceae) e inducción de callogénesis *in vitro*. *POLIBOTÁNICA*, 55(28). <https://doi.org/10.18387/polibotanica.55.9>
- George, E. F., Hall, M. A., & De Klerk, G. J. (2008). *Plant propagation by tissue culture*. (tercera edición). Springer.
- Global Biodiversity Information Facility. (2023). GBIF Backbone Taxonomy. *Checklist dataset*. <https://doi.org/10.15468/39omei>
- Github. (s. f.). *quillt*. Github. <https://github.com/rstudio/quillt>
- Gomes-Copeland, K. K. P., Lédo, A. S., Juceni, P. D., de Araújo, A. G., & de Almeida, F. T. C. (2017). *In vitro* callogenesis of *Poincianella pyramidalis* (catingueira). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 27(4), 525-528. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2016.12.005>

- Gonzales-Alvarado, A. C., Mori-Vasquez, J. A., Tuisima Coral, L. L., & Revilla Chávez, J. M. (2022). Influencia de la desinfección, medios de cultivo y fitohormonas en el desarrollo morfogénico *in vitro* de germoplasma de *Guazuma crinita* Mart. *Folia Amazónica*, 31(1), 57-70. <https://doi.org/10.24841/fa.v31i1.572>
- Gonzales-Alvarado, A. C., & Cardoso, J. C. (2024). Development, chlorophyll content, and nutrient accumulation in *in vitro* shoots of *Melaleuca alternifolia* under light wavelengths and 6-BAP. *Plants*, 13(20), 2842. <https://doi.org/10.3390/plants13202842>
- Gratão, P. L., Polle, A., Lea, P. J., & Azevedo, R. A. (2005). Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. *Functional Plant Biology*, 32(6), 481-494. <https://doi.org/10.1071/FP05016>
- Gu, M., Li, Y., Jiang, H., Zhang, S., Que, Q., Chen, X., & Zhou, W. (2022). Efficient *in vitro* sterilization and propagation from stem segment explants of *Cnidioscolus aconitifolius* (Mill.) IM. Johnston, a multipurpose woody plant. *Plants*, 11(15), 1937. <https://doi.org/10.3390/plants11151937>
- Gupta, S. D., & Jatothu, B. (2013). Fundamentals and applications of light-emitting diodes (LEDs) in *in vitro* plant growth and morphogenesis. *Plant Biotechnology Reports*, 7(3), 211-220. <https://doi.org/10.1007/s11816-013-0277-0>
- Hadke, S. P., Deshmukh, A. G., Dudhare, M. S., & Vaidya, E. R. (2008). Callus induction in *Simarouba glauca* D.C. *Asian Journal of Bio Science*, 3(1), 1-4. <https://www.i-scholar.in/index.php/Ajbs/article/view/164176>
- Hardesty, B. D., Dick, C. W., Kremer, A., Hubbell, S., & Bermingham, E. (2005). Spatial genetic structure of *Simarouba amara* Aubl. (Simaroubaceae), a dioecious, animal-dispersed Neotropical tree, on Barro Colorado Island, Panama. *Heredity*, 95(4), 290-297. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800714>
- Hernández-Amasifuen, A. D., Cortez-Lázaro, A. A., Argüelles-Curaca, A., & Díaz-Pillasca, H. B. (2021). Callogénesis *in vitro* de durazno (*Prunus persica* L.) var. Huayco rojo a partir de explantes foliares. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 23(1), e2032. https://doi.org/10.21930/rcta.vol23_num1_art:2032
- Hesami, M., Naderi, R., & Yoosefzadeh-Najafabadi, M. (2018). Optimizing sterilization conditions and growth regulator effects on *in vitro* shoot regeneration through direct organogenesis in *Chenopodium quinoa*. *BioTechnologia*, 99(1), 49-57. <https://doi.org/10.5114/bta.2018.73561>
- Hesami, M., Naderi, R., & Tohidfar, M. (2019). Modeling and optimizing *in vitro* sterilization of *Chrysanthemum* via multilayer perceptron-non-dominated sorting genetic algorithm-II (MLP-NSGAI). *Frontiers in Plant Science*, 10, 282. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00282>
- Hoffmann, L. T., Bittencourt, R., Sperlich, C. L., & Grott, I. T. (2022). *Germinação in vitro de Raulinoa echinata* R. S. Cowan (Rutaceae): sementes e embriões zigóticos. *Ciência Florestal*, 32(3), 1187-1204. <https://doi.org/10.5902/1980509837874>
- Honda, H., Lui, C., & Kobayashi, T. (2001). Large-scale plant micropropagation. En: Zhong, J. J., Byun, S. Y., Cho, G. H., Choi, J. W., Haigh, J. R., Honda, H., James, E., Kijne, J. W., Kim, D. I., Kobayashi, T., Lee, J. M., Kino-Oka, M., Linden, J. C., Liu, C., Memelink, J., Mirjalili, N., Nagatome, H., Taya, M., Phisaphalong, M., Heijden, R., & Verpoorte, R. (Eds.). *Plant Cells, Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 72, 157-182. https://doi.org/10.1007/3-540-45302-4_6

- Hou, P., Zhang, S., Yang, L., Xu, Y., Tang, L., Wang, S., Tan, H., & Chen, F. (2006). Callus induction from *Jatropha curcas* endosperm and elimination of microbial contamination in culture. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 12(2), 264-268. https://www.researchgate.net/publication/283863105_Callus_induction_from_Jatropha_curcas_endosperm_and_elimination_of_microbial_contamination_in_culture
- Iiyama, C. M., & Cardoso, J. C. (2021). Micropropagation of *Melaleuca alternifolia* by shoot proliferation from apical segments. *Trees*, 35(5), 1497-1509. <https://doi.org/10.1007/s00468-021-02131-w>
- IUCN. (2024). *The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2021-3*. IUCN. <https://www.iucnredlist.org>
- Jaskani, M. J., Abbas, H., Sultana, R., Khan, M. M., Qasim, M., & Iqar, K. (2008). Effect of growth hormones on micropropagation of *Vitis vinifera* L. CV. *Perlette*. *Pakistan Journal of Botany*, 40(1), 105-109. <http://142.54.178.187:9060/xmlui/handle/123456789/16978>
- Jones, B., Gunnerås, S. A., Petersson, S. V., Tarkowski, P., Graham, N., May, S., Dolezal, K., Sanberg, G., & Ljung, K. (2010). Cytokinin regulation of auxin synthesis in *Arabidopsis* involves a homeostatic feedback loop regulated via auxin and cytokinin signal transduction. *The Plant Cell*, 22(9), 2956-2969. <https://doi.org/10.1105%2Ftpc.110.074856>
- Kareem, A., Radhakrishnan, D., Sondhi, Y., Aiyaz, M., Roy M. V., Sugimoto, K., & Prasad, K. (2016). De novo assembly of plant body plan: a step ahead of Deadpool. *Regeneration*, 3(4), 182-197. <https://doi.org/10.1002/reg2.68>
- Kothari, S. L., Joshi, A., Kachhwaha, S., & Ochoa-Alejo, N. (2010). Chilli, peppers-A review on tissue culture and transgenesis. *Biotechnology Advances*, 28(1), 35-48. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.08.005>
- Kumar, R., Singh, K. P., Jain, P., Raju, D. V. S., Kumar, P., Bhatia, R., & Panwar, S. (2018). Influence of growth regulators on callus induction and plant regeneration from anthers of *Tagetes spp.* *Indian Journal of Agricultural Sciences*, 88(6), 970-977. <http://dx.doi.org/10.56093/ijas.v88i6.80656>
- Kumlay, A. M., & Ercisli, S. (2015). Callus induction, shoot proliferation and root regeneration of potato (*Solanum tuberosum* L.) stem node and leaf explants under long-day conditions. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 29(6), 1075-1084. <https://doi.org/10.1080/13102818.2015.1077685>
- Lavanya, A. R., Muthukumar, M., Muthukrishnan, S., Kumaresan, V., Kumar, T. S., Rao, A. S., & Rao, M. V. (2016). *In vitro* micropropagation of *Simarouba glauca* DC. *Indian Journal of Biotechnology*, 15(1), 107-111. <http://nopr.niscpr.res.in/handle/123456789/34524>
- Lee, S. T., & Huang, W. L. (2014). Osmotic stress stimulates shoot organogenesis in callus of rice (*Oryza sativa* L.) via auxin signaling and carbohydrate metabolism regulation. *Plant Growth Regulation*, 73(2), 193-204. <https://doi.org/10.1007/s10725-013-9880-x>
- León, B. (2004). Miradas botánicas y miradas forestales a los árboles y madera en la Amazonía peruana. *Revista Peruana de Biología*, 11(1), 113-114. http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1727-99332004000100017
- Liu, J., Feng, H., Ma, Y., Zhang, L., Han, H., & Huang, X. (2018). Effects of different plant hormones on callus induction and plant regeneration of miniature roses (*Rosa hybrida* L.).

- Horticulture International Journal*, 2(4), 201-206.
<https://doi.org/10.15406/hij.2018.02.00053>
- Lozzi, A., Abdelwahd, R., Alami-Halimi, D., Mentag, R., & Abousalim, A. (2018). Optimización de un sistema de cultivo *in vitro* basado en cotiledonesmaduros para la inducción de callos embriogénicos en algarrobo (*Ceratonia siliqua* L.). *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 25(1), 71-84. <https://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2018.06.053>
- Martínez Oviedo, L. M., Mercado Leguía, K. J., Beltrán Herrera, J. D., & Ortega Macareno, L. C. (2024). Establecimiento *in vitro* y control de oxidación de segmentos nodales de *Arrabidaea chica* Verlot. *Temas Agrarios*, 29(1), 9-21. <https://doi.org/10.21897/zajivr412>
- Martins Souza, M., Bufalino, L., & Gouvêa Gomes, L. (2020). Wood characterization of Marupá (*Simarouba Amara* Aubl, Simaroubaceae) for use in the furniture industry. *Brazilian Journal of Development*, 6(12), 98163-98185. <https://doi.org/10.34117/bjdv6n12-347>
- Mc-Caughey-Espinoza, D., Ayala-Astorga, G., García-Baldenegro, C., Buitimea-Cantúa, N., Buitimea-Cantúa, G., & Ochoa-Meza, A. (2020). *In vitro* germination and induction of callus and root in *Bursera laxiflora* S. Watson. *Abanico Agroforestal*, 2, 1-14. <http://dx.doi.org/10.37114/abaagrof/2020.4>
- Mc-Caughey-Espinoza, D., Reyes-Olivas, Á., Ayala-Astorga, G., Lugo-García, G., Ochoa-Meza, A., & Pacheco-Olvera, A. (2020). Inducción *in vitro* de callogénesis y organogénesis en explantes de *Krameria erecta* Willd. *Abanico Agroforestal*, 2, 1-13. <http://dx.doi.org/10.37114/abaagrof/2020.5>
- Meychik, N., Nikolaeva, Y., & Kushunina, M. (2021). The significance of ion-exchange properties of plant root cell walls for nutrient and water uptake by plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 166, 140-147. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.05.048>
- Miroshnichenko, D. N., Poroshin, G. N., & Dolgov, S. V. (2011). Genetic transformation of wheat using mature seed tissues. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 47, 767-775. <https://doi.org/10.1134/S0003683811080096>
- Mohd Din, A. R. J., Ahmad, F. I., Wagiran, A., Samad, A. A., Rahmat, Z., & Sarmidi, M. R. (2016). Improvement of efficient *in vitro* regeneration potential of mature callus induced from Malaysian upland rice seed (*Oryza sativa* cv. Panderas). *Saudi Journal of Biological Sciences*, 23(1), S69-S77. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.10.022>
- Morán Bazaña, J. T., Santander Villao, M. O., Centanaro Quiroz, P. H., & Peña Haro, C. A. (2022). Obtención de callos embriogénicos a partir de explantes foliares y meristemáticos de pechiche (*Vitex gigantea*). *Pro Sciences: Revista de Producción, Ciencias e Investigación*, 6(42), 146-160. <https://doi.org/10.29018/issn.2588-1000vol6iss42.2022pp146-160>
- Morovatti, S., Zebajadi, A., Bahraminejad, S., & Nadjaphy, A. (2021). Effect of plant growth regulators on callogenesis and regeneration of *Hyssopus officinalis* in *In vitro* conditions. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 13(3), 187-204. <https://sid.ir/paper/958564/en>
- Moura Lima, E. M., Ribas Curcio, G., Bonnet, A., Uhlmann, A., & Palma, V. H. (2018). Crescimento inicial de espécies arbóreas nativas em solos degradados e com presença de plintita no Bioma Cerrado, Brasília - DF. *Nativa*, 6, 787-794. <http://dx.doi.org/10.31413/nativa.v6i0.6210>
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>

- Naik, N., Rout, P., Umakanta, N., Verma, R. L., Katara, J. L., Sahoo, K. K., Singh, O. N., & Samantaray, S. (2017). Development of doubled haploids from an elite *indica* rice hybrid (BS6444G) using anther culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 128, 679-689. <https://doi.org/10.1007/s11240-016-1149-4>
- Nugraheni, Y. M. M. A., Mansur, I., & Sulistiani, E. (2023). *In vitro* sterilization and callus induction from *Cananga odorata* forma genuina steenis explants. *IOP Conference Series Earth and Environmental Science*, 1192(1), 012017. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/1192/1/012017>
- Payghamzadeh, K., & Kazemitabar, S. K. (2011). *In vitro* propagation of walnut - a review. *African Journal of Biotechnology*, 10(3), 290-311. <https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/92211/81665>
- Pérez-Vásquez, E. L., Guacín-Delgado, J. M., Ramírez-Rodríguez, S. C., Sariñana-Aldaco, M. Á., Zapata Sinfuentes, G., & Zuñiga-Valenzuela, E. (2021). Conductividad eléctrica de la solución nutritiva efecto en el rendimiento y la calidad nutracéutica de pimiento morrón. *Revista Mexicana Ciencia Agrícola*, 11(7), 1669-1675. <https://doi.org/10.29312/remexca.v11i7.2409>
- Proebsting, W. M., & Reihs, M. A. (1991). Propagation of filberts by stem cutting. *Combined Proceedings International Plant Propagators' Society*, 41, 214-218. https://jap.ipps.org/uploads/docs/41_49.pdf
- Purohit, S. D., Teixeira da Silva, T., & Habibi, N. (2011). Current approaches for cheaper and better micropropagation technologies. *International Journal of Plant Developmental Biology*, 5(1), 1-36. https://www.researchgate.net/publication/283514474_Current_Approaches_for_Cheaper_and_Better_Micropropagation_Technologies
- Qin, Y. L., Shu, X. C., Zhuang, W. B., Peng, F., & Wang, Z. (2017). High efficiency callus induction and regeneration of *Solanum torvum* plants. *HortScience*, 52(12), 1755-1758. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI12232-17>
- Raikar, S. V., Isak, I., Patel, S., Newson, H. L., & Hill, S. J. (2024). Establishment of feijoa (*Acca sellowiana*) callus and cell suspension cultures and identification of arctigenin - a high value bioactive compound. *Frontiers in Plant Science*, 14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1281733>
- Ramírez-Villalobos, M., Urdaneta, A., & León de Sierralta, S. (2002). Establecimiento *in vitro* de explantes adultos del guanábano (*Annona muricata* L.) tratados con hipoclorito de sodio. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 19(1), 48-55. https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-78182002000100005
- Rashmi, R., & Trivedi, M. P. (2014). Effect of various growth hormone concentration and combination on callus induction, nature of callus and callogenic response of *Nerium odorum*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172(5), 2562-2570. <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0693-1>
- Revilla Chávez, J. M., Abanto-Rodríguez, C., Guerra Arévalo, W. F., García Soria, D., Guerra Arévalo, H., Domínguez Torrejón, G., & da Silva Carmo, I. L. G. (2021). Modelos alométricos para estimar el volumen de madera de *Guazuma crinita* en plantaciones forestales. *Scientia Agropecuaria*, 12(1), 25-31. <http://dx.doi.org/10.17268/sci.agropecu.2021.003>

- Roberts, S., & Kolewe, M. (2010). Plant natural products from cultured multipotent cells. *Nature Biotechnology*, 28, 1175-1176. <https://doi.org/10.1038/nbt1110-1175>
- Rodriguez, H., Geistlinger, J., Berlyn, G., Kahl, G., & Weising, K. (2000). Characterization of novel microsatellite loci isolated from the tropical dioecious tree *Simarouba amara*. *Molecular Ecology*, 9(4), 498-500. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.2000.00871-7.x>
- Rodríguez Beraud, M. M., Latsague Vidal, M. I., Chacón Fuentes, M. A., & Astorga Brevis, P. K. (2014). Inducción *in vitro* de callogénesis y organogénesis indirecta a partir de explantes de cotiledón, hipocótilo y hoja en *Ugni molinae*. *Bosque*, 35(1), 111-118. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-92002014000100011>
- Ronquillo López, M. G. (2005). *Inducción de callogénesis in vitro a partir de láminas foliares de Sansevieria trifasciata* (proyecto especial de graduación, Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, Honduras). Repositorio Zamorano. <https://bdigital.zamorano.edu/handle/11036/5260>
- Salazar Mercado, S. A., & Maldonado Bayona, H. A. (2020). Evaluation of the cytotoxic potential of sodium hypochlorite using meristematic root cells of *Lens culinaris* Med. *Science of The Total Environment*, 701, 134992. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134992>
- Salem, J., Hassanein, A., El-Wakil, D. A., & Loutfy, N. (2022). Interaction between growth regulators controls *in vitro* shoot multiplication in paulownia and selection of NaCl-tolerant variants. *Plants*, 11(4), 498. <https://doi.org/10.3390/plants11040498>
- Sarropoulou, V., Sperdoui, I., Adamakis, I. D., & Grigoriadou, K. (2022). The use of different LEDs wavelength and light intensities on *in vitro* proliferation of cherry rootstock: influence on photosynthetic pigments, photosystem II photochemistry and leaf anatomy. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 1, 1-22. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1789324/v1>
- Shekhawat, M. S., & Manokari, M. (2016). Impact of auxins on vegetative propagation through stem cuttings of *Couroupita guianensis* Aubl.: a conservation approach. *Scientifica*, 2016, 1-7. <https://doi.org/10.1155/2016/6587571>
- Shen, H. J., Chen, J. T., Chung, H. H., & Chang, W. C. (2018). Plant regeneration via direct somatic embryogenesis from leaf explants of *Tolunnia* Louise Elmore 'Elsa'. *Botanical Studies*, 59(4), 1-8. <https://doi.org/10.1186/s40529-018-0220-3>
- Soudre, M., Vidal, F., Mori, J., Guerra, H., Mesen, F., & Perez, F. (2010). Propagación vegetative de marupa (*Simarouba amara* Aubl.) mediante enraizamiento de estacas juveniles en propagador de subirrigación. *Folia Amazónica*, 19(1-2), 61-68. <https://doi.org/10.24841/fa.v19i1-2>
- Tabiyeh, D. T., 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. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2006.726.31>
- 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(3), 621-628. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2004.05.024>
- Teixeira da Silva, J. A., Kulus, D., Zhang, X., Zeng, S., Ma, G., & Piqueras, A. (2016). Disinfection of explants for saffron (*Crocus sativus*) tissue culture. *Environmental and Experimental Biology*, 14(4), 183-198. <http://doi.org/10.22364/eeb.14.25>
- Teixeira Nicoloso, F., Ferrão, G. E., & Castro, G. Y. (2008). Culture medium pH and growth of brazilian ginseng *in vitro* cultured plantlets. *Ciência Rural*, 38(7), 2059-2062. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782008000700043>

- Van Staden, J., Fennell, C. W., & Taylor, N. J. (2006). Plant stress in vitro: the role of phytohormones. *Acta Horticulturae*, 725, 55-62. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2006.725.2>
- Wu, W., Du, K., Kang, X., & Wei, H. (2021). The diverse roles of cytokinins in regulating leaf development. *Horticulture Research*, 8(1), 118. <https://doi.org/10.1038/s41438-021-00558-3>
- Zhang, Y., Li, J., Li, C., Che, S., Tang, Q., Xiao, Y., Zhong, L., Chen, Y., & Chen, B. (2022). Gene expression programs during callus development in tissue culture of two Eucalyptus species. *BMC Plant Biology*, 22, 1. <https://doi.org/10.1186/s12870-021-03391-x>
- Zhou, Y., Li, Q., Wang, Z., & Zhang, Y. (2023). High efficiency regeneration system from blueberry leaves and stems. *Life*, 13(1), 242. <https://doi.org/10.3390/life13010242>