

## Regeneración *in vitro* de híbridos de nochebuena vía organogénesis\*

### *In vitro* regeneration of poinsettia hybrids via organogenesis

Sandra Eloísa Rangel-Estrada<sup>1§</sup>, Jaime Canul-Ku<sup>1</sup>, Felipe de Jesús Osuna-Canizalez<sup>1</sup>, Faustino García-Perez<sup>1</sup>, Pilar del Rosario-Montes<sup>2</sup>, Ángel Santiago Baltazar Vences Hernández<sup>2</sup> y Eleodoro Hernández-Meneses<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Campo Experimental Zacatepec-INIFAP. Carretera Zacatepec-Galeana, Zacatepec, Morelos, km 0.5. 62780. Tel: 734 3430230. Ext. 132. (canul.jaime@inifap.gob.mx; osuna.felipe@inifap.gob.mx; garcia.faustino@inifap.gob.mx). <sup>2</sup>Ingeniería Bioquímica-Instituto Tecnológico de Zacatepec. <sup>3</sup>Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Postgrado en Recursos Genéticos y Productividad-Fisiología Vegetal. (doromeneses@colpos.mx). <sup>§</sup>Autora para correspondencia: rangel.sandra@inifap.gob.mx.

## Resumen

La nochebuena (*Euphorbia pulcherrima* Willd. ex Klotzsch) es una planta ornamental nativa de México apreciada por la vistosidad de sus brácteas y ampliamente cultivada en muchos países. A nivel mundial se le considera un ícono de la navidad. Las diferentes técnicas del cultivo de tejidos vegetales *in vitro* han contribuido a los programas de mejoramiento genético de diversos cultivos y otras especies. En esta investigación se desarrolló un protocolo para la propagación *in vitro* de los híbridos de nochebuena 'Zacatepec 10' y 'Zacatepec 48' del Programa de Mejoramiento Genético de Plantas Ornamentales del INIFAP del Campo Experimental, Zacatepec. La inducción de la organogénesis se logró mediante la activación de yemas axilares de segmentos nodales obtenidos de plantas madre de dos meses de edad. La incubación de los explantes en medio de cultivo MS (1962) suplementado con 8.8 µM de BA durante ocho semanas indujo la activación de la yema axilar y 3.9 nuevos brotes en el híbrido 'Zacatepec 10' y 2.5 en 'Zacatepec 48' con tamaño promedio de 1.02 cm. La multiplicación de brotes fue efectiva con 4.4 µM de BA combinada con 2.2 µM de CIN adicionada con 0.5 µM de AIA, pero se incrementó sustancialmente con 0.23 µM de TDZ; 12.1 brotes en Zacatepec 10' y 11.6 en 'Zacatepec 48' después de ocho semanas de cultivo. En el enraizamiento se obtuvieron en

## Abstract

Poinsettia (*Euphorbia pulcherrima* Willd. ex Klotzsch) is an ornamental plant native of Mexico prized for their striking bracts and widely cultivated in many countries. Globally it is considered an icon of Christmas. The different *in vitro* plant tissue culture techniques have contributed to the genetic improvement of various crops and other species. In this study a protocol for *in vitro* propagation of poinsettia hybrids 'Zacatepec 10' and 'Zacatepec 48' from the Ornamental Plant Breeding program of INIFAP, from the experimental field of Zacatepec was developed. The induction of organogenesis was achieved through the activation of axillary buds from nodal segments obtained from mother plants two months old. Incubation of explants in MS medium (1962) supplemented with 8.8 µM BA for eight weeks, induced the activation of axillary bud and 3.9 new hybrid shoots in 'Zacatepec 10' and 2.5 in 'Zacatepec 48' with average size 1.02 cm. Shoot multiplication was effective with 4.4 µM BA combined with 2.2 µM CIN added with 0.5 µM of AIA, but increased substantially with 0.23 µM TDZ; 12.1 shoots in Zacatepec 10' and 11.6 in 'Zacatepec 48' after eight weeks of culture. In rooting were obtained on average 5.8 roots of 5.9 cm length in culture medium with half salt concentration added with

\* Recibido: abril de 2015  
Aceptado: julio de 2015

promedio 5.8 raíces de 5.9 cm de longitud en el medio de cultivo a la mitad de concentración de sales adicionado con 5.6  $\mu\text{M}$  de AIA después de seis semanas. La aclimatación de 85% de las plantas de los dos híbridos se logró en mezcla de turba y perlita (1:1) después de seis semanas de plantadas. Este protocolo se aplicará para la propagación clonal de nuevos híbridos de nochebuena que han sido generados en México y que se necesitan multiplicar, porque la propagación convencional limita la cantidad de nuevas plantas y de algunos se disponen de escasos especímenes.

**Palabras clave:** *Euphorbia pulcherrima*, micropropagación, mejoramiento genético, segmentos nodales.

## Introducción

La nochebuena (*Euphorbia pulcherrima* Willd. ex Klotzsch) es una especie ornamental originaria de México y, a nivel mundial, es considerada el símbolo de la Navidad (Taylor *et al.*, 2011). Es un cultivo de temporada y en México en el año 2013 fue la principal especie ornamental cultivada, con más de 15 millones de plantas; su valor fue de 416 millones de pesos que representó 6.7% del valor de venta total de las ornamentales. Se cultiva en siete estados y Morelos fue el principal productor con 5.9 millones de plantas (40% de la producción nacional) (SIAP, 2014). En México se ofertan cada año más de 100 variedades de nochebuena con el distintivo común que todas han sido generadas en el extranjero. Algunas de ellas permanecen varios años en el mercado y otras no logran consolidarse en el gusto de los consumidores. Destacan las variedades Freedom<sup>®</sup>, Prestige<sup>®</sup>, Supjibi<sup>®</sup>, entre otras (García *et al.*, 2013).

En respuesta a esta dependencia tecnológica de material vegetativo, es de primordial importancia disponer de variedades mexicanas de nochebuena que ofrezcan nuevas características en color, tamaño y forma de bráctea, así como larga vida en maceta. Las nuevas variedades nacionales permitirán a los productores aumentar la rentabilidad del cultivo, diversificar la producción, ampliar las áreas de producción, competir con las variedades extranjeras, reducir costos de producción y evitar fuga de divisas por pago de regalías.

El mejoramiento genético de una especie es un proceso de plazo largo. La Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales (UPOV) indica que se requieren aproximadamente de 10 a 15 años para liberar una nueva variedad. Sin embargo, este plazo es factible de reducirlo si se

5.6  $\mu\text{M}$  AIA after six weeks. Acclimatization of 85% of the plants of the two hybrids was achieved with a mix of peat and perlite (1: 1) after six weeks of planting. This protocol will be implemented for clonal propagation of new poinsettia hybrids that have been generated in Mexico and need to multiply, because conventional propagation limits the amount of new plants and some have few specimens.

**Keywords:** *Euphorbia pulcherrima*, genetic improvement, micropropagation, Nodal segments.

## Introduction

Poinsettia (*Euphorbia pulcherrima* Willd. ex Klotzsch) is an ornamental species native to Mexico and worldwide, is considered a symbol of Christmas (Taylor *et al.*, 2011). Is a growing season and in Mexico in 2013 was the main ornamental species grown, with more than 15 million plants; its value was 416 million pesos which represented 6.7% of the value of total sales for ornamental. It is grown in seven states and Morelos was the largest producer with 5.9 million plants (40% of national production) (SIAP, 2014). In Mexico are offered each year more than 100 poinsettia varieties with the common distinctive that all have been generated abroad. Some of them remain several years on the market and others fail to consolidate in consumer tastes. Freedom<sup>®</sup>, Prestige<sup>®</sup> and Supjibi<sup>®</sup>, highlight among others varieties (García *et al.*, 2013).

In response to this technological dependence on plant material, it is of paramount importance to count with Mexican poinsettia varieties that offer new features in color, size and shape of bract and long pot life. The new national varieties allow farmers to increase crop yield, diversifying production, expanding production areas, compete with foreign varieties, reduce production costs and avoid capital loss by royalty payments.

Genetic breeding of a species is a long term process. The International Union for the Protection of New Varieties of Plants (UPOV) indicates that it takes approximately 10-15 years to release a new variety. However, this period is likely to be reduced if some *in vitro* plant tissue culture techniques are applied, inducing and exploiting the genetic variability such as anther culture for haploid plant production, somatic hybridization, protoplast cultivation, *in vitro* selection,

aplican algunas de las técnicas del cultivo de tejidos vegetales *in vitro* donde se induzca y explote la variabilidad genética como por ejemplo el cultivo de anteras para producción de plantas haploides, la hibridación somática, el cultivo de protoplastos, la selección *in vitro*, entre otras (Srivastava *et al.*, 2013). Además, otras técnicas, como el cultivo de meristemos, permiten obtener plantas genéticamente idénticas a la planta madre, libres de enfermedades y en grandes cantidades (Tigerstedt y Niskanen, 2002; George y Debergh, 2008).

En el Campo Experimental Zacatepec, del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), se lleva a cabo el mejoramiento genético en nochebuena. A partir de colectas de material vegetativo y semillas a nivel nacional se creó un banco de germoplasma y se estableció un programa de mejoramiento genético. Se han generado híbridos que sobresalen por características específicas de vigor, porte, número de nudos y tamaño, color y forma de las brácteas (Canul *et al.*, 2012).

La meta principal de la generación de nuevas variedades es ponerlas a disposición de los productores del sector ornamental. Sin embargo, antes de liberarlas se debe efectuar la evaluación agronómica en ambientes contrastantes hasta que se alcance uniformidad y estabilidad, ya que las zonas productoras de esta ornamental en México se ubican en condiciones ambientales diversas; para ello es necesario propagar estos genotipos avanzados y contar con plantas en cantidades suficientes. Es aquí, donde el cultivo de tejidos vegetales resulta útil mediante la micropropagación, ya que es una de las aplicaciones prácticas que más ha contribuido al mejoramiento genético de especies cultivadas, en peligro de extinción o élites (Thorpe, 2012). Además, es la aplicación que más beneficios ha aportado a la horticultura ornamental en el mundo, principalmente porque ha favorecido la propagación comercial a gran escala y la rápida introducción al mercado de especies y variedades de plantas novedosas (Neumann *et al.*, 2009).

Nataraja *et al.* (1973) y Nataraja (1975) fueron los primeros en trabajar con la propagación *in vitro* de nochebuena; en ambos trabajos se logró la germinación de semillas en medio de cultivo de White (White, 1943) sin hormonas y a partir de las plántulas se indujo la formación de nuevas yemas de brotes que se regeneraron en plantas. Estos estudios sentaron las bases del cultivo de tejidos en esta ornamental hasta llegar a la transformación genética (Smith *et al.*, 1997; Clarke *et al.*, 2008).

among others (Srivastava *et al.*, 2013). In addition, other techniques such as meristem culture, allow to obtain genetically identical plants to mother plant, disease-free and in large quantities (Tigerstedt and Niskanen, 2002; George and Debergh, 2008).

In the Experimental Field Zacatepec, from the National Institute of Forestry, Agriculture and Livestock (INIFAP), takes place the genetic breeding of Poinsettia. From collections of plant material and seeds; at national level it was created a germplasm bank and established a genetic breeding program. Outstanding hybrids have been generated for specific characteristics of vigor, size, nodes and size number, color and shape of bracts (Canul *et al.*, 2012).

The main goal of the generating new varieties is to make them available to producers of the ornamental sector. However, before releasing them should be carried out an agronomic assessment in contrasting environments until uniformity and stability is reached, since this Ornamental producing areas in Mexico are located in different environmental conditions; for this is necessary to propagate these advanced genotypes and to count with sufficient plants. It is here where plant tissue is useful through micropropagation because it is one of the most practical applications that have contributed to genetic improvement of cultured species, endangered or elites (Thorpe, 2012). Moreover, it is the application that most benefits has contributed to ornamental horticulture in the world, mainly because it has favored commercial propagation on a large scale and rapid market introduction of species and novel plants varieties (Neumann *et al.*, 2009).

Nataraja *et al.* (1973) and Nataraja (1975) were the first to work with *in vitro* propagation of poinsettia; in both studies seed germination was achieved in White culture medium (White, 1943) without hormones and from seedling the formation of new shoot tips was induced that were regenerated into plants. These studies formed the basis of tissue culture in ornamental up to genetic transformation (Smith *et al.*, 1997; Clarke *et al.*, 2008).

While poinsettia propagation is appropriate from cuttings, in the process of obtaining new hybrids, is necessary to develop a scheme for *in vitro* cloning where the amount

Si bien, la propagación de la nochebuena es apropiada a partir de esquejes, en el proceso de obtención de nuevos híbridos es necesario desarrollar un esquema para la clonación *in vitro* donde se pueda incrementar la cantidad de plantas homogéneas, sobre todo de genotipos donde sólo se dispone de pocos especímenes y la cantidad de plantas obtenidas por el método convencional es limitada. Es por ello, que para combinar el mejoramiento genético con las técnicas de cultivo de tejidos vegetales *in vitro* es necesario generar un protocolo de propagación clonal específico para cada genotipo de nochebuena. Todo esto con el propósito de incrementar las tasas de multiplicación obtenidas con esquemas convencionales de propagación de plantas. Con base en estos antecedentes, la presente investigación se planteó como objetivo desarrollar un sistema para la propagación *in vitro* de dos híbridos avanzados de nochebuena, vía organogénesis a partir de segmentos nodales.

## Materiales y métodos

### Material vegetal y fuente de explante

Se utilizaron plantas de los híbridos ‘Zacatepec 10’ y ‘Zacatepec 48’, que fueron generados por cruzamiento en el ciclo de cultivo 2010 y seleccionados con base en caracteres morfológicos de interés ornamental en los años 2011 y 2012 en el INIFAP - Campo Experimental Zacatepec, Morelos. Estos híbridos se caracterizan por sus brácteas de color rojo, altura de plantas de 62 cm, 23 nudos y buena ramificación (Canul *et al.*, 2013). Las plantas madre se mantuvieron en condiciones semi-hidropónicas bajo malla sombra y para el manejo agronómico se siguieron las recomendaciones de García *et al.* (2013). Los explantes fueron los cinco segmentos nodales, contados del ápice hacia la base del tallo, de 5 a 10 mm de longitud.

### Medio de cultivo y condiciones de incubación

El medio de cultivo básico usado fue el de Murashige y Skoog (MS, 1962) con las sales inorgánicas completas, suplementado con sacarosa (30 g L<sup>-1</sup>), mio-inositol (100 mg L<sup>-1</sup>), tiamina (1 mg L<sup>-1</sup>) y solidificado con agar Merck® (7 g L<sup>-1</sup>). El pH se ajustó a 5.7 con NaOH o HCl 1N y la esterilización se hizo en autoclave vertical (Felisa® modelo FE405) a 121 °C y 1.5 kg cm<sup>-2</sup> de presión por 20 min. Los cultivos se incubaron a 25 ± 2 °C en fotoperiodo de 16 horas e intensidad luminosa de 45 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>.

of homogenous plants can be increased, especially where only a few specimens are available and the number of plants obtained by the conventional method is limited. That is why, to combine genetic improvement with *in vitro* plant tissue culture techniques, is necessary to generate specific clonal propagation protocol for each poinsettia genotype. All this in order to increase multiplication rates obtained with conventional plant breeding schemes. Based on this background, the present research was to develop a system for *in vitro* propagation of two advanced poinsettia hybrids, via organogenesis from nodal segments.

## Material and methods

### Plant material and explant source

Plant material used for the study were 'Zacatepec 10' and 'Zacatepec 48', which were generated by crossing in 2010 and selected based on morphological characters of ornamental interest in 2011 and 2012 at INIFAP in the Experimental Field Zacatepec, Morelos. These hybrids are characterized by red bracts, plant height of 62 cm, 23 nodes and good branching (Canul *et al.*, 2013). Mother plants were kept in semi-hydroponic conditions under shade and following crop management recommendations by García *et al.* (2013). Explants were five nodal segments, counted from apex to the base of stem, of 5 to 10 mm length.

### Culture medium and incubation conditions

The basic culture medium was Murashige and Skoog (MS, 1962) with complete inorganic salts, supplemented with sucrose (30 g L<sup>-1</sup>), myo-inositol (100 mg L<sup>-1</sup>), and thiamine (1 mg L<sup>-1</sup>), solidified with agar Merck® (7 g L<sup>-1</sup>). pH was adjusted to 5.7 with 1N NaOH or HCl and the sterilization with vertical autoclave (Felisa® model FE405) at 121 °C and 1.5 kg cm<sup>-2</sup> pressure for 20 min. The cultures were incubated at 25 ± 2 °C in 16 hours photoperiod and light intensity 45 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>.

### Establishment of aseptic culture

The explants were washed with commercial detergent (Roma®) for 5 min and rinsed with tap water; six rinses with sterile distilled water were made and dipped in fungicide

## Establecimiento del cultivo aséptico

Los explantes se lavaron con detergente comercial (Roma®) por 5 min y se enjuagaron con agua de la llave; se hicieron seis enjuagues con agua destilada esterilizada y se sumergieron en solución fungicida de Captán (4 g L<sup>-1</sup>) durante 15 min en agitación continua. Nuevamente se aplicaron seis enjuagues con agua destilada esterilizada y se sumergieron en alcohol al 70% durante 1 min. Después de otros seis enjuagues con agua destilada esterilizada se sometieron a tratamientos con hipoclorito de sodio (NaOCl, Cloralex®, 20% v/v) durante 15, 20 y 25 min. A cada tratamiento se le adicionaron 10 gotas de surfactante (Tween® 20). Se evaluaron plantas madre de dos y seis meses de edad y los explantes se sembraron en frascos de 45 mL de capacidad con 15 mL de medio de cultivo conservando la polaridad. A las tres semanas se contabilizó la tasa de supervivencia (%), ennegrecimiento del explante (%) y los porcentajes de contaminación por hongos y bacterias. El experimento se condujo en un diseño completamente al azar con arreglo factorial 3 x 2; tres tiempos de inmersión en NaOCl y dos edades de planta madre.

## Inducción de brotes

Los segmentos nodales de los dos híbridos se incubaron en medio básico MS (1962) suplementado con dosis equimolares de benciladenina (BA) y cinetina (CIN) (2.2; 4.4 y 8.8 µM) y sin hormonas (testigo). Se usaron frascos de 90 mL de capacidad con 30 mL de medio de cultivo. A las ocho semanas de cultivo se cuantificó la brotación (porcentaje de explantes con brotes), número de brotes por explante y longitud de brote (cm). Los subcultivos a medio fresco se hicieron a las cuatro semanas.

## Multiplicación de brotes

Brotes de 1-1.5 cm de longitud de ambos híbridos se transfirieron a medio MS (1962) adicionado con cuatro combinaciones de BA y CIN (2.2+2.2; 2.2+4.4; 4.4+2.2 y 4.4+4.4 µM) y cuatro dosis de thidiazuron (TDZ, 0.23; 0.46; 0.69 y 0.91 µM). A cada tratamiento se le agregó 0.5 µM de ácido indol acético (AIA). Los subcultivos a medio fresco se hicieron a las cuatro semanas. A las ocho semanas de cultivo se cuantificaron el número de brotes por explante y la longitud del brote (cm).

## Alargamiento de plantas y enraizamiento

Brotes de 3 a 4 cm de longitud de los dos híbridos se cultivaron en medio básico MS (1962) a la mitad de concentración de sales suplementado con dos dosis de AIA (2.8 y 5.6 µM) y sin

Captan solution (4 g L<sup>-1</sup>) for 15 min under continuous stirring. Again six rinses with sterile distilled water were applied and immersed in 70% alcohol for 1 min. After six more washes with sterile distilled water were subjected to treatments with sodium hypochlorite (NaOCl, Cloralex®, 20% v/v) for 15, 20 and 25 min. Each treatment added 10 drops of surfactant (Tween 20). Mother plants of two and six months of age were evaluated and the explants were seeded in flasks 45 mL capacity with 15 mL of culture medium preserving polarity. Three weeks later survival rate (%), blackening of explant (%) and the percentage of contamination by fungi and bacteria was recorded. The experiment was conducted in a completely randomized design with a factorial arrangement 3 x 2; three immersion times in NaOCl and two ages of mother plant.

## Shoot induction

Nodal segments of the two hybrids were incubated in MS basic medium (1962) supplemented with equimolar doses of benzyladenine (BA) and kinetin (CIN) (2.2; 4.4 and 8.8 µM) and without hormone (control). Bottles of 90 mL capacity with 30 mL of culture medium were used. At eight weeks of culture, sprouting (percentage of explants with buds), number of shoots per explant and shoot length (cm) was measured. Subcultures were made at four weeks.

## Shoot multiplication

Shoots of 1-1.5 cm length of both hybrids were transferred to MS medium (1962) supplemented with four combinations of BA and CIN (2.2 + 2.2; 2.2 + 4.4; 4.4 + 2.2 and 4.4 + 4.4 µM) and four doses of thidiazuron (TDZ, 0.23; 0.46; 0.69 and 0.91 µM). Each treatment was added 0.5 µM of indole acetic acid (AIA). Subcultures were made at four weeks. At eight weeks of culture the number of shoots per explant and shoot length (cm) were measured.

## Plant elongation and rooting

Shoots of 3 to 4 cm length of the two hybrids were grown on MS basic medium (1962) to half salt concentration supplemented with two doses of IAA (2.8 and 5.6 µM) and without hormone (control). Flasks of 250 mL capacity with 50 mL of culture medium were used. After six weeks rooting percentage, root number, root length (cm) and plant height (cm) was measured.

hormonas (testigo). Se usaron frascos de 250 mL de capacidad con 50 mL de medio de cultivo. Después de seis semanas se cuantificó el porcentaje de enraizamiento, número y longitud de raíces (cm), así como altura de planta (cm).

### **Aclimatación**

Plantas de 5-7 cm de altura de ambos híbridos se extrajeron de los frascos y las raíces se lavaron para retirar residuos del medio de cultivo. Se plantaron en macetas de poliestireno de 175 mL de capacidad con tres sustratos artificiales constituidos por turba (100%), perlita (100%) y la mezcla turba + perlita (1:1). Se colocaron en charola de plástico con cubierta transparente durante 25 días en invernadero con riegos semanales de la fórmula 15-2-25 (Peters®), recomendada para el enraizamiento de esquejes (Cabrera *et al.*, 2006). Después de una semana se levantó un extremo de la cubierta plástica y a la siguiente el otro, para reducir la humedad relativa y favorecer la aclimatación (Castellanos *et al.*, 2010). A las cuatro semanas se retiró totalmente la cubierta plástica y dos semanas después se cuantificaron la tasa de supervivencia (%); el número de hojas y la altura de planta (cm).

### **Análisis estadístico**

Todos los experimentos tuvieron un diseño completamente al azar con 10 repeticiones por tratamiento. La unidad experimental fue un explante por frasco o planta por maceta. El análisis de varianza de los datos obtenidos en los experimentos se hizo para cada híbrido y variable con el paquete de análisis estadístico SAS (SAS Institute, 2003) y la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ) se usó para comparar las medias.

## **Resultados y discusión**

### **Establecimiento del cultivo aséptico**

La edad de la planta madre y la interacción con el tiempo de inmersión en NaOCl, fueron los factores que afectaron la supervivencia de los explantes en ambos híbridos ( $p \leq 0.05$ ). Las mayores tasas de supervivencia se obtuvieron en explantes disecados de plantas de dos meses de edad; en promedio fue de 56% en 'Zacatepec 10' y 46% en 'Zacatepec 48'. En plantas de seis meses los porcentajes fueron de 30 y 10%, respectivamente. En la interacción, la supervivencia fue mejor cuando se combinaron explantes de plantas de dos meses de edad y tiempo de inmersión en NaOCl de 20 min en los dos genotipos (Figura 1).

### **Acclimatization**

Plants of 5-7 cm from both hybrids were removed from the flasks and the roots were washed to remove debris from the culture medium; then planted in polystyrene pots of 175 mL capacity with three artificial substrates made of peat (100%), perlite (100%) and mix of peat + perlite (1:1). These were placed in a plastic tray with transmother cover for 25 days in a greenhouse with weekly watering with the formula 15-2-25 (Peters®), recommended for rooting of cuttings (Cabrera *et al.*, 2006). After a week an end of the plastic cover was lift and on the next the other, to reduce relative humidity and promote acclimatization (Castellanos *et al.*, 2010). At four weeks the plastic cover was removed and two weeks later the survival rate (%), number of leaves and plant height (cm) were measured.

### **Statistical analysis**

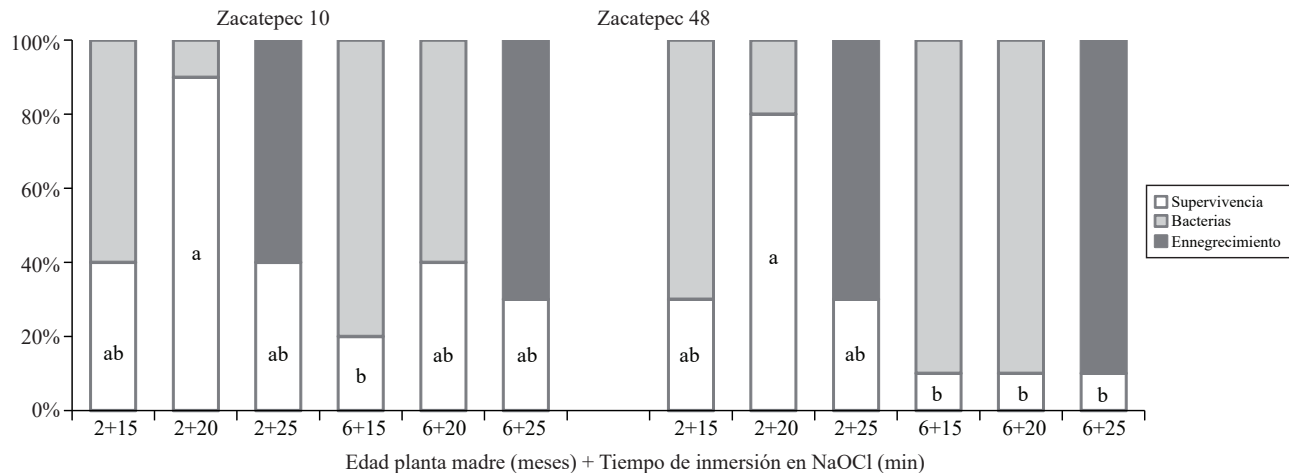
All experiments had a completely randomized design with 10 replications per treatment. The experimental unit was one explant per flask or plant per pot. The analysis of variance from data obtained in the experiments was made for each hybrid and variable with the statistical analysis package SAS (SAS Institute, 2003) and to compare means Tukey test ( $p \leq 0.05$ ).

## **Results and discussion**

### **Establishment of aseptic culture**

Age of mother plant and the interaction with immersion time in NaOCl were the factors affecting explant survival in both hybrids ( $p \leq 0.05$ ). The highest survival rates were obtained in dissected explants from two months plants; on average was 56% in 'Zacatepec 10' and 46% in 'Zacatepec 48'. In plants six months old the percentages were 30 and 10%, respectively. In the interaction, survival was better when combining plant explants of two months and immersion time in NaOCl of 20 min in both genotypes (Figure 1).

The differences in survival of dissected explants in two and six month old plants were mainly due to the presence of internal bacteria that competed with the explant for nutrients and inhibited their growth. In two months plants the presence of latex was low; while in six months was abundant. As in other euphorbias, latex limits the establishment of aseptic culture and in some cases it is necessary to dissect only the



**Figura 1. Respuesta de la edad de la planta madre y tiempo de inmersión en NaOCl en el cultivo aséptico de segmentos nodales de los híbridos de nochebuena ‘Zacatepec 10’ y ‘Zacatepec 48’.**

**Figure 1. Response of mother plant age and immersion time in NaOCl in aseptic culture of nodal segments from poinsettia hybrids ‘Zacatepec 10’ and ‘Zacatepec 48’.**

Las diferencias en la supervivencia de explantes disecados de plantas de dos y seis meses de edad se debieron principalmente a la presencia de bacterias internas que compitieron con el explante por los nutrientes e inhibieron su crecimiento. En plantas de dos meses la presencia de látex fue baja; mientras que, en las de seis meses fue abundante. Como sucede en otras euforbiáceas, el látex limita el establecimiento del cultivo aséptico y en algunos casos es necesario disecar únicamente los meristemas (Airò *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2008; Kondamudi *et al.*, 2009); probablemente la causa de la contaminación interna se deba a que el látex enmascara las bacterias y no hagan efecto los agentes desinfectantes.

Respecto a los tiempos de inmersión de los explantes, el NaOCl resultó poco efectivo para la desinfección superficial en ambos híbridos cuando se sumergieron por 15 minutos; la contaminación causada por bacterias impidió el crecimiento de los explantes. En contraste, con 25 minutos de inmersión los explantes no presentaron contaminación por bacterias, pero la baja tasa de supervivencia lograda fue resultado de la posible toxicidad del NaOCl que ocasionó la muerte de los explantes. El establecimiento del cultivo aséptico es el primer paso en la propagación *in vitro*, ya que los explantes se transfieren de condiciones *in vivo* a un ambiente de cultivo libre de microorganismos. El cultivo aséptico se considera satisfactorio si sobrevive una cantidad adecuada de explantes sin contaminación y se inicia el crecimiento (George y Debergh, 2008).

Si bien los tejidos vegetales se pueden desinfectar con diferentes agentes químicos (hipoclorito de calcio, cloruro de mercurio, plata coloidal estable, entre otros), el NaOCl

meristem (Airò *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2008; Kondamudi *et al.*, 2009); probably the reason of internal contamination is due to latex masks bacteria and disinfectants have no effect.

Regarding to immersion time of the explants, NaOCl was ineffective for surface disinfection in both hybrids when immersed for 15 minutes; contamination caused by bacteria prevented growth of explants. In contrast, with 25 minutes of immersion explants showed no contamination by bacteria, but the low survival rate was the result of the possible toxicity of NaOCl that killed explants. The establishment of aseptic culture is the first step in the *in vitro* propagation, as explants were transferred from *in vivo* conditions to a culture environment free of microorganisms. Aseptic culture is considered satisfactory if adequate amounts of uncontaminated explants survive and growth starts (George and Debergh, 2008).

While plant tissues can be disinfected with different chemicals (calcium hypochlorite, mercuric chloride, stable colloidal silver, etc.), NaOCl is considered the most effective. This compound has a strong oxidizing property that it becomes highly reactive with amino acids, nucleic acids, amines and amides (Smith, 2013). The concentration of NaOCl used in this research was the result of several preliminary experiments and leaned on reports of previous work carried out with commercial varieties of poinsettia (Pickens *et al.*, 2005; Castellanos *et al.*, 2010; Perera and Trader, 2010). It was also taken into account the fragility of nodal explants of poinsettia because these are soft tissues that can easily perish when these doses and exposure times are exceeded.

se considera de los más efectivos. Este compuesto tiene una fuerte propiedad oxidante que lo vuelve altamente reactivo con aminoácidos, ácidos nucleicos, aminas y amidas (Smith, 2013). La concentración de NaOCl utilizada en esta investigación fue resultado de varios experimentos preliminares y se apoyó en reportes de trabajos previos efectuados con variedades comerciales de nochebuena (Pickens *et al.*, 2005; Castellanos *et al.*, 2010; Perera y Trader, 2010). También se tomó en cuenta la fragilidad de los explantes nodales de nochebuena porque son tejidos suaves que fácilmente pueden perecer cuando se superan estas dosis y tiempos de exposición.

Diversos trabajos sobre la propagación *in vitro* de nochebuena (Pickens *et al.*, 2005; Castellanos *et al.*, 2008, 2010; Perera y Trader, 2010) sugieren que el establecimiento del cultivo aséptico es factible sólo con lavado de los explantes con detergente e inmersiones en alcohol al 70% (1 min) y NaOCl 20% (15-20 min). Sin embargo, en ensayos preliminares con los híbridos 'Zacatepec 10' y 'Zacatepec 48' la aplicación de estos métodos fueron poco eficientes para controlar la contaminación, sobre todo la causada por hongos. Por ello, en los tratamientos de desinfección de los explantes del presente estudio se incluyó la inmersión en el fungicida Captán (4 g L<sup>-1</sup>) previo al tratamiento de desinfección superficial con NaOCl.

### Inducción de brotes

El número de brotes producidos por explante y la longitud de los brotes fueron afectados por la concentración de citocininas en ambos híbridos ( $p \leq 0.05$ ). En todos los tratamientos se indujeron brotes por lo que la brotación fue de 100%. La mayor cantidad de brotes se obtuvo con 8.8  $\mu\text{M}$  de BA; en contraste, la mayor longitud de brote se logró cuando el BA y la CIN se omitieron del medio de cultivo (Cuadro 1).

### Cuadro 1. Efecto de la benciladenina (BA) y cinetina (CIN) en la inducción de brotes en segmentos nodales de nochebuena cultivados en medio MS (1962) después de ocho semanas de cultivo.

Table 1. Effect of benzyladenine (BA) and kinetin (CIN) in shoot induction on poinsettia nodal segments cultivated on MS medium (1962) after eight weeks of culture.

BA ( $\mu\text{M}$ )	CIN ( $\mu\text{M}$ )	'Zacatepec 10'			'Zacatepec 48'				
		Brotos por explante (Núm.)	Longitud brote (cm)		Brotos por explante (Núm.)	Longitud brote (cm)			
—	—	1.0	c	3.17	a	1.0	d	2.64	a
2.2	—	2.3	bc	1.12	b	1.6	cd	1.07	b
4.4	—	3.1	ab	0.83	bc	2.4	ab	0.77	bc
8.8	—	3.9	a	0.46	c	2.5	a	0.39	c
—	2.2	1.8	bc	1.01	b	1.3	cd	1.02	b
—	4.4	2.1	bc	0.81	bc	1.7	bcd	0.79	bc
—	8.8	2.8	ab	0.58	c	1.9	abc	0.56	c

Medias con distinta letra en una columna son estadísticamente diferentes (Tukey,  $p \leq 0.05$ ).

Several works on *in vitro* propagation of poinsettia (Pickens *et al.*, 2005; Castellanos *et al.*, 2008, 2010; Perera and Trader, 2010) suggest that the establishment of aseptic culture is feasible only by washing explants with detergent and immersion in 70% alcohol (1 min) and 20% NaOCl (15-20 min). However, in preliminary tests with 'Zacatepec 10' and 'Zacatepec 48' the application of these methods were inefficient to control contamination, especially that caused by fungi. Therefore, in disinfecting treatments for explants in this study included immersion in fungicide Captan (4 g L<sup>-1</sup>) as pre-treatment of surface disinfection with NaOCl.

### Shoot induction

The number of shoots produced by explant and shoot length were affected by the concentration of cytokinins in both hybrids ( $p \leq 0.05$ ). In all treatments shoots were induced because sprouting was 100%. The highest amount of shoots was obtained with 8.8  $\mu\text{M}$  BA; in contrast, the highest length of shoot was achieved when BA and CIN were omitted from the culture medium (Table 1).

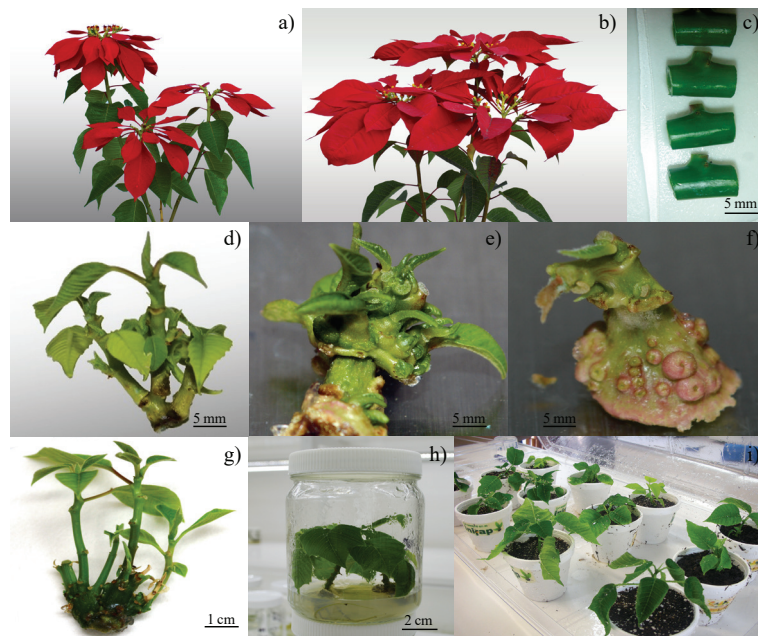
Lengthening of pre-existing shoot and production of new buds in explants were induced by BA and CIN, but inhibited length thereof. The average size of shoots in both hybrids was 1.03 cm. Shoots generated with the culture medium without hormone were the longest and mainly due to the lengthening of pre-existing axillary bud. Despite obtaining the highest amount of shoots with 8.8  $\mu\text{M}$  BA, these were rosette and in subsequent subcultures blackened. Instead, the number of shoots obtained with doses 4.4  $\mu\text{M}$  BA and 8.8  $\mu\text{M}$  CIN were statistically similar and after subcultures lengthened and continued to grow. Therefore, these hormone doses were taken as optimal in the induction of new shoots (Figure 2).



El alargamiento de la yema pre-existente y la producción de nuevos brotes en los explantes fueron inducidos por el BA y la CIN, pero inhibieron la longitud de los mismos. El tamaño promedio de los brotes en ambos híbridos fue de 1.03 cm. Los brotes generados con el medio de cultivo sin hormona fueron los más largos y principalmente se debió al alargamiento de la yema axilar pre-existente. A pesar de obtenerse la mayor cantidad de brotes con 8.8  $\mu\text{M}$  de BA, éstos se arrojaron y en los subcultivos posteriores se ennegrecieron. En cambio, la cantidad de brotes obtenidos con las dosis de 4.4  $\mu\text{M}$  de BA y 8.8  $\mu\text{M}$  de CIN resultaron estadísticamente similares y después de los subcultivos se alargaron y continuaron su crecimiento. Por ello, estas dosis hormonales se tomaron como las óptimas en la inducción de nuevos brotes (Figura 2).

The results obtained in the stage of shoot induction with 4.4  $\mu\text{M}$  BA and 8.8  $\mu\text{M}$  CIN differ from those obtained in commercial varieties and confirms that not all plants respond equally to *in vitro* propagation, even when working with varieties within the same species (Bhojwani and Dantu, 2013).

In this research, the induction of new shoots was achieved with BA and CIN added separately to the culture medium. BA efficiency has already been reported on *in vitro* propagation of poinsettia, but not on CIN. In Winter Rose® variety, Pickens *et al.* (2005) achieved the induction by growing apexes in culture medium supplemented with various doses of BA (from 1.8 to 6.6  $\mu\text{M}$ ) in combination with 2.8  $\mu\text{M}$  AIA; with these hormone doses obtained 2.5 buds per



**Figura 2. Organogénesis *in vitro* de híbridos de nochebuena. (a) Planta de 'Zacatepec 10'; (b) 'Zacatepec 48'; (c) Segmentos nodales; (d) Inducción de brotes en 'Zacatepec 48' con 4.4  $\mu\text{M}$  de BA después de ocho semanas de cultivo; (e) Multiplicación de brotes en 'Zacatepec 10' con 0.23  $\mu\text{M}$  de TDZ; (f) 'Zacatepec con 0.46  $\mu\text{M}$  de TDZ; (g) Multiplicación de brotes en 'Zacatepec 10' con 4.4  $\mu\text{M}$  de BA, 2.2  $\mu\text{M}$  de CIN y 0.5  $\mu\text{M}$  de AIA, después ocho semanas de cultivo; (h) Enraizamiento de plantas regeneradas de 'Zacatepec 10' con 5.6  $\mu\text{M}$  de AIA; y (i) Aclimatación de plantas regeneradas de 'Zacatepec 48' en turba+perlita (1:1).**

**Figure 2. *in vitro* organogenesis of poinsettia hybrids. (A) 'Zacatepec 10'; (B) 'Zacatepec 48'; (C) nodal segments; (D) shoots induction in 'Zacatepec 48' with 4.4  $\mu\text{M}$  BA after eight weeks of culture; (E) shoots multiplication in 'Zacatepec 10' with 0.23  $\mu\text{M}$  TDZ; (F) 'Zacatepec with 0.46  $\mu\text{M}$  TDZ; (G) shoots multiplication in 'Zacatepec 10' with 4.4  $\mu\text{M}$  BA, 2.2  $\mu\text{M}$  CIN and 0.5  $\mu\text{M}$  AIA, after eight weeks of cultivation; (H) Rooting of regenerated plants 'Zacatepec 10' with 5.6  $\mu\text{M}$  AIA; and (i) acclimatization of regenerated plants 'Zacatepec 48' in peat + perlite (1:1).**

Los resultados obtenidos en la etapa de inducción de brotes con 4.4  $\mu\text{M}$  de BA y 8.8  $\mu\text{M}$  de CIN difieren de los obtenidos en variedades comerciales y confirman que no todas las

explant. Also on yellow bracts poinsettia, Castellanos *et al.* (2010) achieved on average the induction of five buds with 4.4  $\mu\text{M}$  BA in combination 0.5  $\mu\text{M}$  ANA.

plantas responden igual a la propagación *in vitro*, aunque se trabaje con variedades dentro de la misma especie (Bhojwani y Dantu, 2013).

En esta investigación, la inducción de nuevos brotes se logró con BA y CIN adicionadas de forma separada al medio de cultivo. La eficiencia del BA ya se ha reportado en la propagación *in vitro* de nochebuena, pero no la de la CIN. En la variedad Winter Rose<sup>®</sup>, Pickens *et al.* (2005) lograron la inducción mediante el cultivo de ápices en medio de cultivo suplementado con varias dosis de BA (desde 1.8 hasta 6.6  $\mu\text{M}$ ) en combinación con 2.8  $\mu\text{M}$  de AIA; con estas dosis hormonales obtuvieron 2.5 brotes por explante. También en nochebuena de brácteas amarillas, Castellanos *et al.* (2010) lograron la inducción de cinco brotes en promedio con 4.4  $\mu\text{M}$  de BA en combinación de 0.5  $\mu\text{M}$  de ANA.

Por su parte, la CIN ya se había probado en la germinación de semillas de nochebuena, con nula efectividad, (Nataraja *et al.*, 1973) y en la multiplicación efectiva de brotes combinada con el BA (Roy y Jinnah, 2001) pero no en la inducción de nuevos brotes. A pesar de ser una de las citocininas más comúnmente usadas en el cultivo de tejidos vegetales (Gaba, 2005), en nochebuena no se había precisado su eficacia. Por ello, los resultados obtenidos constituyen el primer aporte sobre la efectividad de la cinetina para inducir la brotación de yemas pre-existentes en segmentos nodales de nochebuena y la formación de nuevos brotes.

También se ha reportado la eficiencia del BA combinado con auxinas (AIA y ANA) en la inducción de brotes de nochebuena; sin embargo, también pueden inducir callos y representar un inconveniente cuando se desea la propagación clonal en esta ornamental. Perera y Trader (2010) reportaron que el cultivo de ápices de brote y yemas axilares de la variedad Prestige<sup>®</sup> Red con 4  $\mu\text{M}$  de AIA y dosis de BA (4 - 12  $\mu\text{M}$ ) indujo la formación de callos en la base de los explantes. Si bien estos callos pudieran ser útiles cuando se desea la organogénesis indirecta, embriogénesis somática o inducir variabilidad genética, en esta investigación se descartó el uso de auxinas porque el objetivo fue la obtención de plantas idénticas a la planta madre.

### **Multiplicación de brotes**

En esta etapa, la citocinina afectó el número de brotes producidos por explante en ambos híbridos. En los dos híbridos, el TDZ favoreció la multiplicación de brotes mientras los valores altos de longitud de los mismos fueron promovidos

Meanwhile, CIN has already been tested in seed germination of poinsettia, with no effectiveness, (Nataraja *et al.*, 1973) and effective multiplication of shoots combined with BA (Roy and Jinnah, 2001) but not in the induction of new buds. Despite being one of the most commonly used cytokinins in plant tissue culture (Gaba, 2005), on poinsettia had not been clarified its effectiveness. Therefore, the results represent the first contribution on the effectiveness of kinetin to induce sprouting from pre-existing buds on nodal segments from poinsettia and formation of new buds.

It has also been reported the efficiency of BA combined with auxin (AIA and ANA) on shoot induction of poinsettia; however, it can also induce calluses and represent a inconvenient when clonal propagation is desired in this ornamental. Perera and Trader (2010) reported that the culture of apexes from shoots and axillary buds of Red Prestige<sup>®</sup> with 4  $\mu\text{M}$  AIA and BA dose (4-12  $\mu\text{M}$ ) induced callus formation at the base of explants. While these calluses could be useful when indirect organogenesis, somatic embryogenesis or induce genetic variability is desired, in this study the use of auxin was discarded because the objective was to obtain identical plants to mother plant.

### **Shoot multiplication**

At this stage, cytokinin affected the number of shoots produced by explant in both hybrids. In both hybrids, TDZ favors shoot multiplication while the high values of length thereof were promoted with combination doses of BA and CIN ( $p \leq 0.05$ ). Most shoots were obtained with 0.46  $\mu\text{M}$  TDZ in both genotypes; 16.3 shoots in 'Zacatepec 10' and 14.4 in 'Zacatepec 48'. However, many of these shoots took on the appearance of rosettes and when subcultured to medium without hormones became brown and did not proeperate. However, shoots from 0.23  $\mu\text{M}$  TDZ continued their growth to elongate. Yet, the values obtained with this dose were 2.9 times superior to the highest amount of shoots obtained on the best BA and CIN dose (4.4 + 2.2  $\mu\text{M}$ ) in 'Zacatepec 10' and 2.6 times that achieved in 'Zacatepec 48'. The amount of shoots decreased as TDZ dose increased and this was because most of the explants formed callus (70%). In contrast, the combination of 4.4  $\mu\text{M}$  BA and 2.2  $\mu\text{M}$  CIN favored larger buds with 3.61 cm in 'Zacatepec 10' and 3.85 cm in 'Zacatepec 48' (Table 2, Figure 2).

A point that highlights on existing *in vitro* propagation protocols of poinsettia is the absence as such as a multiplication stage, since the same conditions are used in

con las dosis combinadas de BA y CIN ( $p \leq 0.05$ ). La mayor cantidad de brotes se obtuvo con  $0.46 \mu\text{M}$  de TDZ en ambos genotipos; 16.3 brotes en 'Zacatepec 10' y 14.4 en 'Zacatepec 48'. Sin embargo, muchos de estos brotes tomaron la apariencia de rosetas y cuando se subcultivaron a medio sin hormonas se tornaron de color café y no prosperaron. En cambio, los brotes procedentes de  $0.23 \mu\text{M}$  de TDZ continuaron su crecimiento hasta alargarse. Aun así, los valores obtenidos con esta dosis fueron 2.9 veces superior a la mayor cantidad de brotes obtenida en la mejor dosis de BA y CIN ( $4.4 + 2.2 \mu\text{M}$ ) en el híbrido 'Zacatepec 10' y 2.6 veces la alcanzada en 'Zacatepec 48'. La cantidad de brotes disminuyó conforme se incrementó la dosis de TDZ y ello se debió a que la mayoría de los explantes formaron callos (70%). En contraste, la combinación de  $4.4 \mu\text{M}$  de BA y  $2.2 \mu\text{M}$  de CIN favoreció el mayor tamaño de los brotes con 3.61 cm en 'Zacatepec 10' y 3.85 cm en 'Zacatepec 48' (Cuadro 2, Figura 2).

Un aspecto que resalta en los protocolos de propagación *in vitro* de nochebuena existentes es la ausencia como tal de una etapa de multiplicación, ya que se aplican las mismas condiciones usadas en la fase de inducción (Pickens *et al.*, 2005; Castellanos *et al.*, 2010; Perera y Trader, 2010). La efectividad del TDZ en la multiplicación de brotes es una nueva aportación para la propagación *in vitro* de nochebuena y su aplicación superó el efecto combinado del BA y la CIN. La morfogénesis *in vitro* depende en gran medida del balance de auxinas y citocininas, por lo que se emplean en la proliferación de brotes (Gaba, 2005).

Los resultados en la multiplicación de brotes de los híbridos de nochebuena 'Zacatepec' 10 y 'Zacatepec 48' mostraron la efectividad de la combinación de BA y CIN adicionada con auxina ( $0.5 \mu\text{M}$  de AIA) como se ha reportado en la literatura (Roy y Jinnah, 2001). Sin embargo, también se demostró que el TDZ superó la acción del BA y CIN y que este aspecto puede ser útil en la multiplicación de brotes si se usa en dosis adecuadas, ya que es una citocinina cuya acción en la morfogénesis *in vitro* es efectiva cuando se emplea en concentraciones bajas del orden de 0.01 a  $0.4 \mu\text{M}$  (Lu, 1993). La única evaluación del TDZ reportada en nochebuena se hizo en la etapa de inducción de brotes, donde ninguna de las concentraciones probadas (2.3 - 23  $\mu\text{M}$ ) fue efectiva para la formación de nuevos brotes (Pickens *et al.*, 2005). Estas dosis de TDZ superan al menos en 10 veces las probadas en el presente estudio y es probable que hayan resultado tóxicas para el explante y sea la causa de la nula respuesta obtenida.

the induction phase (Pickens *et al.*, 2005; Castellanos *et al.*, 2010; and Trader Perera, 2010). The effectiveness of TDZ on shoot multiplication is a new contribution to *in vitro* propagation of poinsettia and their application exceeded the combined effect of BA and CIN. *In vitro* morphogenesis largely depends on the balance of auxins and cytokinins, which are used in shoot proliferation (Gaba, 2005).

The results in shoot multiplication of poinsettia hybrid 'Zacatepec 10' and 'Zacatepec 48' showed the effectiveness of the combination BA and CIN added with auxin ( $0.5 \mu\text{M}$  AIA) as reported in literature (Roy and Jinnah, 2001). However, it was also proven that TDZ exceeded the action of BA and CIN and that this aspect may be useful in shoot multiplication when used in appropriate doses, as it is a cytokinin whose action on *in vitro* morphogenesis is effective when it is used in low concentrations in the range of 0.01 to  $0.4 \mu\text{M}$  (Lu, 1993). The only evaluation of TDZ reported on poinsettia was made in shoot induction stage, where none of the tested concentrations (2.3 - 23  $\mu\text{M}$ ) was effective for the formation of new shoots (Pickens *et al.*, 2005). These TDZ doses exceed at least 10 times those tested in this study and are likely to be toxic to the explant and the cause of the lack of response obtained.

### Plant elongation and rooting

The amount of roots produced by plant and length thereof was affected by AIA dose in both hybrids. Plant height was not significant ( $p \leq 0.05$ ). Rooting percentage was 100% in the three treatments, but the largest amount and root length was obtained with 2.8 and  $5.6 \mu\text{M}$  AIA (Table 3, Figure 2). Rooting is one of the crucial stages of *in vitro* propagation. Few species are capable of forming roots in the stages of shoot induction and shoot multiplication, facilitating plant rooting. In others, as noted in poinsettia hybrids is necessary to reduce the strength of the culture medium and add auxins to induce the formation of the root system (Bhojwani and Dantu, 2013). *In vitro* plants from 'Zacatepec 10' and 'Zacatepec 48' were able to produce roots with 50% reduction of salt concentration of the culture medium and the addition of AIA. On yellow poinsettia, rooting was also efficient with AIA, but in doses of  $22.8 \mu\text{M}$  (Castellanos *et al.*, 2010).

### Acclimatization

The survival rate, number of leaves and plant height were affected by the type of substrate in both hybrids ( $p \leq 0.05$ ). The highest rate was achieved with a mixture of peat and

**Cuadro 2. Efecto del thidiazuron (TDZ) y benciladenina (BA) combinada con cinetina (CIN) en la multiplicación de brotes de híbridos nochebuena cultivados en medio MS (1962) después de ocho semanas de cultivo.**

**Table 2. Effect of thidiazuron (TDZ) and benzyladenine (BA) combined with kinetin (CIN) on shoot multiplication of poinsettia hybrids grown in MS medium (1962) after eight weeks of culture.**

BA + CIN ( $\mu\text{M}$ )	TDZ ( $\mu\text{M}$ )	'Zacatepec 10'				'Zacatepec 48'			
		Brotes por explante (Núm.)		Longitud brote (cm)		Brotes por explante (Núm.)		Longitud brote (cm)	
2.2 + 2.2	-	1.9	e	2.68	ab	1.8	d	2.34	b
2.2 + 4.4	-	2.2	e	2.90	ab	2.4	d	2.68	b
4.4 + 2.2	-	4.1	cd	3.61	a	4.4	c	3.85	a
4.4 + 4.4	-	2.6	de	2.19	b	3.1	cd	2.29	b
-	0.23	12.1	b	0.64	c	11.6	b	0.59	c
-	0.46	16.3	a	0.34	c	14.4	a	0.31	c
-	0.69	4.5	c	0.28	c	4.1	c	0.24	c
-	0.91	2.2	e	0.24	c	1.6	d	0.18	c

Medias con distinta letra en una columna son estadísticamente diferentes (Tukey,  $p \leq 0.05$ ).

**Alargamiento de plantas y enraizamiento**

El número de raíces emitidas por planta y la longitud de las mismas fueron afectados por la dosis de AIA en ambos híbridos. La altura de planta no fue significativa ( $p \leq 0.05$ ). El porcentaje de enraizamiento fue de 100% en los tres tratamientos, pero la mayor cantidad y longitud de raíces se obtuvo con 2.8 y 5.6  $\mu\text{M}$  de AIA (Cuadro 3, Figura 2). El enraizamiento es una de las etapas cruciales en la propagación *in vitro*. Pocas especies son capaces de emitir raíces en las etapas de inducción y multiplicación de brotes, lo que facilita el enraizamiento de plantas. En otras, como se observó en los híbridos de nochebuena, es necesario reducir la fortaleza del medio de cultivo a la mitad y añadir auxinas, para inducir la formación del sistema radicular (Bhojwani y Dantu, 2013). Las plantas *in vitro* de los híbridos 'Zacatepec 10' y 'Zacatepec 48' fueron capaces de producir raíces con la reducción del 50% de la concentración de las sales del medio de cultivo y la adición de AIA. En nochebuena de pigmentación amarilla el enraizamiento también fue eficiente con AIA, pero en dosis de 22.8  $\mu\text{M}$  (Castellanos *et al.*, 2010).

perlite with 90% survival in 'Zacatepec 10' and 80% in 'Zacatepec 48' (Figure 2). The same mixture achieved the highest values on number of leaves and plant height (Table 4). Survival rates are acceptable; however ideally all plants survive; however, it is not always achieved because the species respond differently. Although in poinsettia production is feasible to use mixtures and substrates, these are recommended when transplanted into definitive pots, since, in rooting of cuttings is convenient to use perlite, coconut dust or peat among others (Ecke *et al.*, 2004). Peat and perlite mixture improves the physical properties of the substrate; it provides high porosity, good ventilation, high water holding capacity, low pH, health and stability (Maher *et al.*, 2008). Therefore, the mixture of peat with perlite or vermiculite is widely used in horticulture and acclimation of *in vitro* propagated plants (Benton, 2005; Bhojwani and Dantu, 2013).

This system of *in vitro* regeneration of poinsettia, via organogenesis from axillary buds of nodal segments, is one of the growing applications recommended for clonal

**Cuadro 3. Efecto del ácido indolacético (AIA) en el enraizamiento *in vitro* de plantas de híbridos nochebuena cultivados en medio MS (1962) después de seis semanas de cultivo.**

**Table 3. Effect of indole acetic acid (AIA) on *in vitro* rooting of poinsettia hybrids plants grown on MS medium (1962) after six weeks of culture.**

AIA ( $\mu\text{M}$ )	'Zacatepec 10'			'Zacatepec 48'		
	Altura planta (cm)	Raíces (Núm.)	Longitud raíces (cm)	Altura planta (cm)	Raíces (Núm.)	Longitud raíces (cm)
0	5.59	a	4.1	b	4.23	b
2.8	6.11	a	5.5	a	5.65	a
5.6	5.68	a	5.7	a	5.83	a

Medias con distinta letra en una columna son estadísticamente diferentes (Tukey,  $p \leq 0.05$ ).

## Aclimatación

El porcentaje de supervivencia, número de hojas y altura de planta fueron afectados por el tipo de sustrato en los dos híbridos ( $p \leq 0.05$ ). La mayor tasa se logró con la mezcla de turba y perlita con 90% de supervivencia en 'Zacatepec 10' y 80% en 'Zacatepec 48' (Figura 2). En esta misma mezcla se alcanzaron los mayores valores de número de hojas y altura de planta (Cuadro 4). Los porcentajes de supervivencia son aceptables; no obstante lo ideal es que sobrevivan todas las plantas. Sin embargo, no siempre se logra porque las especies responden de forma diferente. Aunque en la producción de nochebuena es factible usar mezclas y sustratos, éstos se recomiendan cuando se trasplantan a macetas definitivas, ya que en el enraizamiento de esquejes es conveniente usar perlita, polvillo de coco o turba, entre otros (Ecke *et al.*, 2004). La mezcla de perlita y turba mejora las propiedades físicas del sustrato; proporciona alta porosidad, buena aireación, alta capacidad de retención de agua, bajo pH, sanidad y estabilidad (Maher *et al.*, 2008). Por ello, la mezcla de turba con perlita o vermiculita es ampliamente en la horticultura y aclimatación de plantas propagadas *in vitro* (Benton, 2005; Bhojwani y Dantu, 2013).

propagation of elite species such as these new poinsettia hybrid. It is the first report of *in vitro* propagation of poinsettia that is inserted into a breeding program of an ornamental species in Mexico. This protocol will be integrated into the propagation of other valuable hybrids that are in the process of agronomic evaluation and could also be used to propagate other poinsettia varieties and euphorbias. It could also be applied in the production of *in vitro* plants for studies of indirect organogenesis, somatic embryogenesis, induced mutagenesis or genetic transformation.

## Conclusions

A protocol for *in vitro* propagation of plants from Mexican hybrids of poinsettia 'Zacatepec 10' and 'Zacatepec 48' was developed. Plant regeneration via organogenesis was from sprouting of pre-existing buds and the formation of new shoots in nodal segments dissected from mother plants two months old. Shoot induction was achieved with

### Cuadro 4. Respuesta de plantas de híbridos de nochebuena durante la aclimatación a condiciones de invernadero en diferentes sustratos.

Table 4. Response of hybrid plants of poinsettia during acclimatization to greenhouse conditions on different substrates.

Sustrato	'Zacatepec 10'			'Zacatepec 48'		
	Supervivencia (%)	Hojas (Núm.)	Altura planta (cm)	Supervivencia (%)	Hojas (Núm.)	Altura planta (cm)
Turba	50 b	7.2 c	7.46 c	50 ab	7.2 b	9.40 B
Perlita	60 ab	9.1 b	8.78 b	40 b	6.9 b	10.30 B
Turba/perlita	90 a	11.0 a	11.37 a	80 a	10.1 a	12.60 A

Medias con distinta letra en una columna son estadísticamente diferentes (Tukey,  $p \leq 0.05$ ).

Este sistema de regeneración *in vitro* de nochebuena, vía organogénesis a partir de yemas axilares de segmentos nodales, es una de las aplicaciones del cultivo de brotes recomendado para la propagación clonal de especies élites como lo son estos nuevos híbridos de nochebuena. Constituye el primer reporte de propagación *in vitro* de nochebuena que se inserta en un programa de mejoramiento genético de una especie ornamental en México. Este protocolo se integrará en la propagación de otros híbridos valiosos que se encuentran en proceso de evaluación agronómica y también podría utilizarse para propagar otras variedades de

MS medium (1962) supplemented with BA and multiplication was achieved with the same growth regulator combined with CIN and AIA, but improved substantially with TDZ. Regenerated plants produced roots when the concentration of the culture media components were reduced by half and added AIA. The highest survival and growth of acclimated plants was obtained in the mixture of peat + perlite (1:1 v/v).

*End of the English version*



nochebuena y euforbiáceas. Además, podría aplicarse en la obtención de plantas *in vitro* para estudios de organogénesis indirecta, embriogénesis somática, mutagénesis inducida o transformación genética.

## Conclusiones

Se desarrolló un protocolo para la propagación *in vitro* de plantas de los híbridos mexicanos de nochebuena ‘Zacatepec 10’ y ‘Zacatepec 48’. La regeneración de plantas fue vía organogénesis a partir de la brotación de yemas pre-existentes y la formación de nuevos brotes en segmentos nodales disecados de plantas madre de dos meses de edad. La inducción de brotes se logró con el medio de cultivo MS (1962) adicionado con BA y la multiplicación se alcanzó con el mismo regulador de crecimiento combinado con CIN y AIA, pero se mejoró sustancialmente con TDZ. Las plantas regeneradas produjeron raíces cuando se redujo a la mitad la concentración de los componentes del medio de cultivo y se adicionó AIA. La mayor supervivencia y crecimiento de plantas aclimatadas se obtuvo en la mezcla de turba + perlita (1:1 v/v).

## Agradecimientos

Al INIFAP, a través de los Fondos Fiscales 2013, por el financiamiento otorgado al proyecto ‘Generación de tecnologías para la propagación de nochebuena y cactáceas de importancia comercial’.

## Literatura citada

- Airò, M.; Zizzo, G. V. and Ruffoni, B. 2007. *In vitro* propagation of an *Euphorbia milii* hybrid. Acta Hort. 748:241-246.
- Benton, J. J. 2005. Hydroponics a practical guide for the soilless grower. 2<sup>nd</sup>. Ed. CRC PRESS. Boca Raton, Florida, USA. 409 p.
- Bhojwani, S. S. and Dantu, P. K. 2013. Plant tissue culture: an introductory text. Springer. India. 309 p.
- Cabrera, R. J.; Morán, M. F.; Torres, Q. R.; Pellón, B. A. y Granada, C. L. 2006. Producción de nochebuena *Euphorbia pulcherrima* Willd. ex Klotzsch en Morelos. Folleto Técnico No. 23. 20 p.
- Canul, K. J.; García, P. F.; Osuna, C. F. J. y Ramírez, R. S. 2012. Metodologías de mejoramiento genético aplicables en nochebuena. Folleto Técnico No. 64. 39 p.
- Canul, K. J.; García, P. F.; Osuna, C. F. J.; Ramírez, R. S.; Alia, T. I.; Vázquez, A. J.; Campos, B. E. y Portas, F. B. 2013. Genotipos de nochebuena obtenidos por hibridación. Folleto Técnico No. 72. 50 p.
- Castellanos, M.; Power, J. B. and Davey, M. R. 2008. Tissue culture technologies for micropropagation, *in vitro* regeneration and genetic improvement of poinsettia. Propagation of Ornamental Plants. 8:173-185.
- Castellanos, M.; Power J. B. and Davey, M. R. 2010. Micropropagation of poinsettia by organogenesis. In: Jain, S. M. and Ochatt, S. J. (Eds.). Protocols for *in vitro* propagation of ornamental plants, Methods in Molecular Biology. 589. Humana Press. 67-75 pp.
- Clarke, J. L.; Spetz, C.; Haugslie, S.; Xing, S.; Dees, M. W.; Moe R. and Blystad, D. 2008. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of poinsettia, *Euphorbia pulcherrima*, with virus-derived hairpin RNA constructs confers resistance to Poinsettia mosaic virus. Plant Cell Rep. 27:1027-1038.
- Ecke, P.; Faust, J. E.; Higgins, A. and Williams, J. 2004. The Ecke poinsettia manual. Ball Publishing. Batavia, Illinois. USA. 287 p.
- Gaba, V. P. 2005. Plant growth regulators in plant tissue culture and development. In: Trigiano, R. N. and Gray, D. J. (Eds.). Plant development and biotechnology. CRC Press. Boca Raton, FL. 87-99 pp.
- García, P. F.; Alia T. I.; Vargas, D. G.; Valdez, A. L.; Canul, K. J.; López, M. V.; Osuna, C. F. Colinas, L. M. y Ramírez, R. S. 2013. Comportamiento de variedades comerciales de nochebuena en Morelos. Folleto Técnico No. 74. 51 p.
- George, E. F. and Debergh, P. C. 2008. Micropropagation: Uses and methods. In: George, E. F. (Eds.). Plant propagation by tissue culture. 3<sup>rd</sup>. Ed. Springer, Netherlands. 29-64 pp.
- Kondamudi, R.; Murthy, K. S. R. and Pullaiah, T. 2009. Euphorbiaceae - a critical review on plant tissue culture. Tropical and Subtropical Agroecosystems 10:313-335.
- Lu, C. 1993. The use of thidiazuron in tissue culture. *In vitro* Cell. Dev. Biol. -Plant 29:92-96.
- Maher, M.; Prasad, M. and Raviv, M. 2008. Organic soilless media components. In: Raviv, M. and Lieth, L. (Eds.). Soilless culture: theory and practice. Elsevier. USA. 459-504 pp.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15: 473-493.
- Nataraja, K. 1975. Morphogenesis in embryonal callus of *Euphorbia pulcherrima in vitro*. Current Sci. 44:136-137.
- Nataraja, K.; Chennaveerajah, M. S. and Giridowda, P. 1973. *In vitro* production of shoot bud in *Euphorbia pulcherrima in vitro*. Current Sci. 42:577-578.
- Neumann, K. H.; Imani, J. and Kumar, A. 2009. Plant cell and tissue culture - a tool in biotechnology. Basics and application. Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag. 333 p.
- Perera, D. and Trader, B. W. 2010. Poinsettia ‘Prestige™ Red’ (*Euphorbia pulcherrima*) *in vitro* propagation. HortScience. 45:1126-1128.
- Pickens, K. A.; Cheng, Z. M. and Trigiano, R. N. 2005. Axillary bud proliferation of *Euphorbia pulcherrima* Winter Rose. *In vitro* Cell. Dev. Biol. Plant 41:770-774.
- Roy, S. K. and Jinnah, M. 2001. *In vitro* micropropagation of poinsettia (*Euphorbia pulcherrima* Willd.). Plant Tissue Culture. 11:133-140.
- Statistical Analysis System (SAS) Institute. 2003. SAS user’s guide. Statistics. Version 8. SAS Inst., Cary, NC. USA. Quality, and elemental removal. J. Environ. Qual. 19:749-756.

- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). (consultado septiembre, 2014). <http://www.siap.gob.mx/>.
- Smith, R. 2013. Plant tissue culture: techniques and experiments. 3<sup>rd</sup>. Ed. Academic Press. USA. 188 p.
- Srivastava, D. K.; Gambhir, G. and Sharma, P. 2013. Plant cell and tissue culture techniques in crop improvement. *In*: Panesar, P. S. and Marwaha, S. S. (Eds.). Biotechnology in agriculture and food processing. CRC Press. USA. 73-131 pp.
- Taylor, J. M.; Lopez, R. G.; Currey, C. J. and Janick, J. 2011. The poinsettia: History and transformation. *Chronica Horticulturae* 51:23-28.
- Thorpe, T. 2012. History of plant tissue culture. *In*: Loyola-Vargas, V. M. and Ochoa-Alejo, N. (Eds.). Plant Cell Culture Protocols. 3<sup>rd</sup>. Edition. Humana Press. Springer. USA. 9-27 pp.
- Tigerstedt, P. M. and Niskanen, A. 2002. Plant cell and tissue culture techniques used in plant breeding. *In*: Kirsi-Marja *et al.* (Eds.). Plant biotechnology and transgenic plants. CRC Press. USA. 719p.
- White, P. R. 1943. A handbook of plant tissue culture. The Jacques Cattell Press, Lancaster USA, 277 p.
- Xu, B.; Dai, W. and Chao, W. S. 2008. An efficient method for *in vitro* regeneration of leafy spurge (*Euphorbia esula* L.). *In vitro Cell. Dev. Biol. - Plant* 44:548-556.