

Influencia de la luz en la generación de callos y el cultivo *in vitro* de plantas

Magali Ruíz-Rivas¹
Catarino Eduardo Téllez-Valerio¹
Marcelino Martínez-Núñez¹
Pedro Fernando Vera-Hernández¹
Esperanza Martínez-Romero²
Flor de Fátima Rosas-Cárdenas^{1§}

¹Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada-Instituto Politécnico Nacional. Ex-Hacienda San Juan Molino Carretera Estatal Tecuexcomac-Tepetitla km 1.5, Tlaxcala, México. CP. 90700. (mruizr1402@alumno.ipn.mx; ctellezv1800@alumno.ipn.mx; mmartinezn1202@alumno.ipn.mx; pverah1300@alumno.ipn.mx); ²Centro de Ciencias Genómicas México-Campus Morelos-Universidad Nacional Autónoma de México. Av. Universidad s/n Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, México. CP. 62210. (esperanzaeriksson@yahoo.com.mx).

§Autora para correspondencia: frosasc@ipn.mx.

Resumen

Los sistemas de cultivo *in vitro* son importantes en el área de la biotecnología vegetal. Se ha observado que algunos factores, incluyendo a la luz, afectan el desarrollo de los tejidos en condiciones de cultivo *in vitro*. El objetivo de este trabajo es conocer el efecto de la intensidad lumínica en el desarrollo de tejidos a partir de semillas bajo condiciones de cultivo *in vitro* para la generación de plántulas y callos, con la finalidad de favorecer los tiempos y la regeneración de especies de interés agronómico para su aprovechamiento integral. En este trabajo, se probaron diferentes intensidades lumínicas, se lograron obtener plántulas con callos, demostrando que la intensidad de la luz influye en el tipo y desarrollo de estructuras desdiferenciadas y que este efecto varía inter e intraespecie. Mediante la regeneración de tejidos vegetales de las plántulas, se encontró que los brotes de meristemos apicales son el tipo de explante más eficiente para la regeneración clonal de plantas de tabaco y tomate. Este estudio es el primero en presentar el efecto de la intensidad de la luz sobre semillas para la producción de plántulas y callos en diferentes especies vegetales, incluida una combinación de diferentes tejidos y explantes que podrían utilizarse para la obtención de diferentes estructuras vegetales con fines biotecnológicos.

Palabras clave: callogénesis, intensidades de luz, organogénesis.

Recibido: enero de 2022
Aceptado: mayo de 2022

Introducción

El campo de investigación para la inducción de callos y regeneración de especies vegetales en condiciones *in vitro* se ha ido desarrollando a lo largo de los años debido al aumento en su demanda por el área de la biotecnología aplicada. En este momento, la industria se ha enfocado en técnicas de micropropagación *in vitro* para la multiplicación de plantas de variedades élite superiores o con características deseables específicas en gran escala (Kumar y Reddy, 2011). El cultivo *in vitro* de plantas representa una herramienta útil para la propagación y la conservación del acervo genético, la obtención de plantas axénicas y estructuras desdiferenciadas, así como para la transformación genética de plantas (Rajewski *et al.*, 2019).

Varios estudios se han centrado en la regeneración de plantas usando hojas (Rahman *et al.*, 2010; Khuong *et al.*, 2013; Verma *et al.*, 2016), epicótilos (Pal *et al.*, 2013), hipocótilos (Le *et al.*, 1998; Yaacob *et al.*, 2012; Gajdošová *et al.*, 2013; Pal *et al.*, 2013), cotiledones (Bhatia *et al.*, 2004), meristemos apicales (Scotton *et al.*, 2013; Jamous y Abu-Qaoud, 2015), protoplastos (Ganapathi *et al.*, 2004) y tallos (Arya *et al.*, 1993; Bennici *et al.*, 1997; Kumar y Dube 1997). Asimismo, el uso de callos friables, es el primer paso hacia la producción de metabolitos de forma *in vitro* (Gourguillon *et al.*, 2018), su uso como biorreactores (Shibasaki *et al.*, 1991; Ganapathi *et al.*, 2004; Espinosa-Leal *et al.*, 2018), entre otros.

Al ser el cultivo *in vitro* un sistema cerrado, existen factores externos que influyen en el desarrollo de los tejidos vegetales, ejemplo de ello es la luz; la cual es una señal que reciben los fotorreceptores para regular el crecimiento, el desarrollo, la diferenciación y el metabolismo de las plantas (Wang *et al.*, 2001; Ouyang *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2020). La respuesta se ve afectada por mecanismos moleculares que incluyen factores de transcripción (Casal *et al.*, 2004), fitocromos (Lau y Deng, 2010; Bian *et al.*, 2015; Galvão y Fankhauser, 2015) y fotoreceptores (Casal *et al.*, 2004; Nhut *et al.*, 2015).

El efecto que tiene la luz sobre la inducción de callos ha sido estudiado en plantas como *Brassica napus* ($40.5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (Afshari *et al.*, 2011), *Cistanche deserticola* ($46.5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (Ouyang *et al.*, 2003), *Cymbidium orchid* ($45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (Huan y Tanaka 2004), *Panax vietnamensis* ($20\text{-}25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (Nhut *et al.*, 2015) y *Allium hirtifolium* ($40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (Nasrin *et al.*, 2017).

Se ha mostrado que la intensidad de la luz y la calidad espectral influyen en el crecimiento de callos (Ouyang *et al.*, 2003; Bian *et al.*, 2015). No obstante, se tiene poca información del efecto que tiene una alta intensidad lumínica (mayor a $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Aunado a ello, las fuentes de luz LED han sido recomendadas para regular los ambientes lumínicos en el cultivo de plantas bajo ambientes controlados debido a que brindan una óptima integración espectral (Wheeler, 2008; Bian *et al.*, 2015; Yu *et al.*, 2020).

Por lo anterior, es de gran interés determinar el efecto de la intensidad lumínica en la generación de plántulas y callos de importancia comercial y agrícola. Por tal motivo, el objetivo de este estudio fue analizar el efecto de diferentes intensidades de luz en semillas para la generación de callos y plántulas en tres especies vegetales, así como el aprovechamiento de plántulas para la obtención de explantes para la regeneración vegetal y formación de clones.

Material y métodos

Material vegetal

Amaranthus hypochondriacus variedad Gabriela (donada por el Instituto Tecnológico del Altiplano de Tlaxcala, Tlaxcala, México), *Amaranthus hypochondriacus* variedad CIBA-2 (obtenida en el Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada del Instituto Politécnico Nacional), *Nicotiana tabacum* (donada por CINVESTAV, Irapuato, México) y *Solanum lycopersicum* de uso comercial (Vita® variedad *Lycopersicon esculentum*, Francia) fueron utilizadas en este estudio. Las semillas se esterilizaron sumergiéndolas en una solución compuesta por 20 ml de agua destilada estéril y 60 μ l de detergente (Axion Tricloro®) en un tubo cónico de 50 ml, el cual se agitó en vortex durante 5 min. Luego, se lavaron cuatro veces con etanol al 70%, intercalando lavados con agua estéril. Posteriormente, las semillas se agitaron en vortex durante 2 min con solución de hipoclorito de sodio al 1% y se lavaron cinco veces con agua destilada estéril.

Preparación de medios

Medio Murashige y Skoog (MS) (M5519, Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) con 30 g L⁻¹ de sacarosa (Meyer, CAT 2240, México) solidificado con 2 g L⁻¹ de phytigel (Sigma-Aldrich 5519, Saint Louis, EE. UU.) Fue usado como medio basal. Con este medio basal se formuló el medio para la generación de callos y plántulas (medio NB) y se complementó con 3 mg L⁻¹ (13.2 μ mol) de N6-benciladenina (BA) y 0.2 mg L⁻¹ (1.08 μ mol) de ácido naftaleno acético (NAA). El medio utilizado para la elongación de brotes a partir de los explantes (medio SE) se formuló con el medio basal suplementado con 5 mg L⁻¹ (5.8 μ mol) de GA. El medio utilizado para la elongación de raíces (medio RO) fue el medio basal suplementado con 2 mg L⁻¹ (5.7 μ M) de IAA y 1 ml L⁻¹ de solución de Nitsch. El pH del medio se ajustó a pH 5.8 utilizando NaOH 0.1 N y se esterilizó durante 20 min a 120 °C y 10.8 kPa.

Condiciones de cultivo e inducción de callos

Trece semillas se colocaron en cada frasco magenta que contenían 35 ml de medio NB. Los frascos se expusieron a 40.5 μ mol m⁻² s⁻¹ (3 000 luxes), 108 μ mol m⁻² s⁻¹ (8 000 luxes) o 162 μ mol m⁻² s⁻¹ (12 000 luxes), se incubaron a 30 \pm 3 °C, 40 \pm 3% de humedad relativa y un fotoperíodo de 16 h luz/8 h oscuridad. Lámparas de luz LED fría (JWJ, Ciudad de México, México) proporcionaron la intensidad de luz. Todos los tratamientos se realizaron por triplicado, cada réplica contenía trece semillas o explantes por recipiente de cultivo. Se analizó la aparición de callos en la zona radical de las plántulas a partir de los 20 días pos siembra en medio NB. Se monitoreó el peso, número y tipo de callos generados en los diferentes tratamientos.

Se contaron los callos generados en seis frascos para cada tratamiento y se determinó el promedio. Los callos se separaron del medio NB y se enjuagaron con agua para eliminar el fitagel, antes de secarse brevemente con toallas de papel esterilizadas. Posteriormente, los callos se pesaron en una balanza semianalítica (Velab, Ciudad de México, México). Se consideraron algunos parámetros como la coloración, opacidad, consistencia del tejido y presencia de brotes para evaluar el tipo de callo. Para la consistencia del tejido se determinó si era friable o compacto. La morfología del callo se analizó mediante un microscopio estereoscópico Zeiss Stemi 508, con cámara Zeiss Axiocam ERC 5s Rev 2.0, esto se visualizó con el software ZEN lite (Zeiss, Jena, Alemania).

Generación de brotes a partir de explantes de plántulas

Veinte días después de la siembra, se utilizaron las plántulas obtenidas en cultivo *in vitro* para obtener explantes para ensayos de organogénesis y micropropagación clonal. Se utilizaron segmentos de 5 y 10 mm de cotiledones con pecíolos y brotes de meristemas apicales (BMA), respectivamente. Un promedio de 12 explantes con polaridad axial fueron colocados en frascos con medio NB y expuestos a una intensidad luminosa de $54 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ por un fotoperíodo de 16 h luz/8 h oscuridad, a $22 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$ y humedad relativa de $44 \pm 3\%$. Después de 15 días en medio NB, los brotes generados se transfirieron a medio SE. Una vez generadas las raíces, las plántulas se colocaron en el medio RO. Posteriormente, las plantas fueron aclimatadas a condiciones de invernadero.

Generación, mantenimiento y aclimatación de plantas a condiciones de invernadero

Veinte días después de la siembra en medio NB a $108 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, $30 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$ y humedad relativa de $40 \pm 3\%$, las plántulas se transfirieron a medio SE o RO y se monitorearon durante 40 a 50 días en condiciones *in vitro*. Las plantas regeneradas se colocaron en macetas de plástico o bolsas negras que contenían 1.6 L de sustrato estéril LM-GPS Lambert® con 7 g L^{-1} de osmocote. Las plantas se cultivaron en condiciones de invernadero a $28 \pm 10 \text{ }^\circ\text{C}$. Se cubrieron con una bolsa de plástico transparente para su aclimatación. Después de tres días, se retiraron las bolsas. Cada tercer día se aplicó riego hasta concluir su ciclo de vida y se recolectaron semillas para su posterior propagación.

Análisis estadístico

Los experimentos tuvieron un diseño completamente al azar. Los datos se analizaron con Anova utilizando el software Statistical Analysis Software System (SAS) (SAS Institute, Cary, NC, EE. UU.). Las diferencias en las medias de los tratamientos se compararon mediante la Prueba de Duncan (GLM), se adoptó un valor de p menor o igual a 0.05 como indicador de significación estadística.

Resultados y discusión

Efecto de la intensidad de la luz en la germinación de semillas y generación de callos

Las semillas en medio NB de las tres especies fueron sometidas a tres diferentes intensidades de luz (40.5 , 108 y $162 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), la germinación ocurrió después de cuatro, siete y nueve días para amaranto, tomate y tabaco, respectivamente. El porcentaje de germinación fue 100% en amaranto, 92% en tabaco y 90% en tomate. Se observó la generación de plántulas con callos bajo las diferentes intensidades de luz (Figura 1). Las especies de tomate y tabaco generaron callos bajo las diferentes intensidades de luz. En el caso de la variedad Gabriela de amaranto, la generación de callos se observó a 108 y $162 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; sin embargo, en la variedad CIBA-2 no se generaron callos (Figura 1). En general, el tamaño del callo y la robustez de las plántulas fueron proporcionales a la intensidad de la luz (Figura 1).

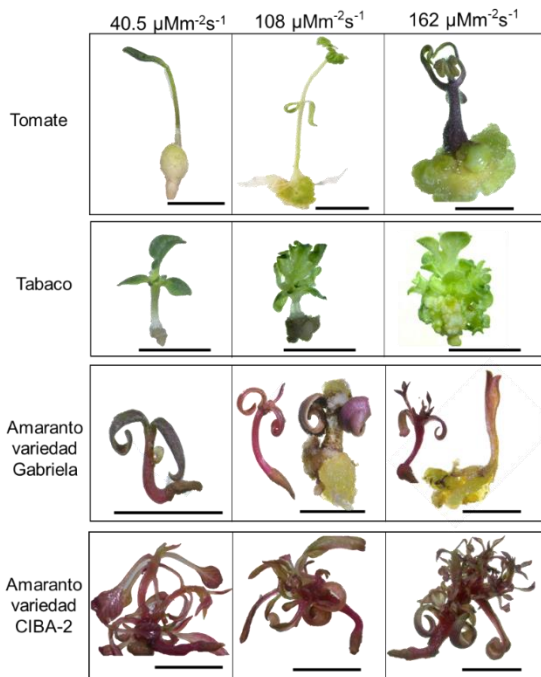


Figura 1. Efecto de la intensidad de la luz en la generación de callos y plántulas para diferentes especies de plantas. Estructuras generadas en medio NB después de 15 días pos siembra bajo diferentes condiciones de intensidad de luz. La barra de escala corresponde a 1 cm.

En este trabajo, tabaco exhibió el mayor número de callos con $108 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, seguido de tomate (Cuadro 1). En amaranto, detectamos comportamientos diferentes entre las dos variedades (Figura 1), similar a lo reportado con fitohormonas (Bennici *et al.*, 1997). El promedio en el peso de callos más grande se generó en tomate a $162 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Cuadro 1). En tomate y tabaco el peso del callo fue proporcional a la intensidad de la luz. Asimismo, los callos mostraron diferentes tonalidades en el color, los callos de tomate mostraron una coloración blanca opaca a 45 y $108 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y una coloración verde a $162 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Los callos de tabaco exhibieron una coloración blanca con brotes verdes, y los callos de la variedad Gabriela de amaranto mostraron una coloración amarillo-marrón (Figura 2a). Este último hallazgo es similar al reportado por Yaacob *et al.* (2012); Comia-Yebbron *et al.* (2017); debido a la presencia de betacianinas (Yaacob *et al.*, 2012; Comia-Yebbron *et al.*, 2017).

Se considera el número y peso de callos de tomate y amaranto 15 días pos siembra. Los valores medios dentro de una columna seguida de la misma letra no son significativamente diferentes por la prueba de rango múltiple de Duncan ($p \leq 0.05$). a) los valores representan las medias ($\pm\text{SD}$) de tres experimentos independientes, se utilizaron seis matraces para cada tratamiento y se determinó el promedio; b) la letra mayúscula representa el efecto en cada especie a diferentes intensidades de luz; y c) la letra minúscula representa el efecto entre especies a diferentes intensidades de luz.

Cuadro 1. Efecto de la intensidad de la luz sobre el peso y el número de callos generados a partir de semillas germinadas en medio NB.

Especies	Callos	Intensidad de luz ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)		
		40.5	108	162
Tomate	Número de callos	8.5 \pm 2 Ce	11.8 \pm 0.75 Ab	10 \pm 0 Bc
	Peso de los callos (g)	0.33 \pm 0.14 Cf	0.72 \pm 0.07 Bb	0.89 \pm 0.12 Aa
Tabaco	Número de callos	1.16 \pm 0.75 Cg	12.2 \pm 0.75 Aa	10 \pm 0 Bc
	Peso de los callos (g)	0.06 \pm 0.02 Ch	0.14 \pm 0.06 Bg	0.41 \pm 0.07 Ad
Amaranto variedad Gabriela	Número de callos	0 Ch	9.5 \pm 1.87 Ad	6.66 \pm 1.2 Bf
	Peso de los callos (g)	0 Ci	0.47 \pm 0.1 Ac	0.38 \pm 0.04 Be
Amaranto variedad CIBA-2	Número de callos	0 Ah	0 Ah	0 Ah
	Peso de los callos (g)	0 Ah	0 Ah	0 Ah

Se identificaron callos friables, compactos y con brotes. Se agruparon los callos totales de cada especie para identificar el porcentaje del tipo de callo. En tomate y amaranto (variedad Gabriela) predominaron los callos de tipo compacto y friable, mientras que en tabaco los callos con brotes (Figura 2a). En tomate 51% fueron callos friables (a 162 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y 47% fueron callos compactos (a 40.5 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). En tabaco 55% fueron callos con brotes. Para amaranto variedad Gabriela 76% de los callos fueron compactos a 108 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura 2b). El porcentaje de callos con brotes para los cultivos de amaranto variedad Gabriela y tomate fue muy bajo (1.7 y 5.3%, respectivamente) (Figura 2b).

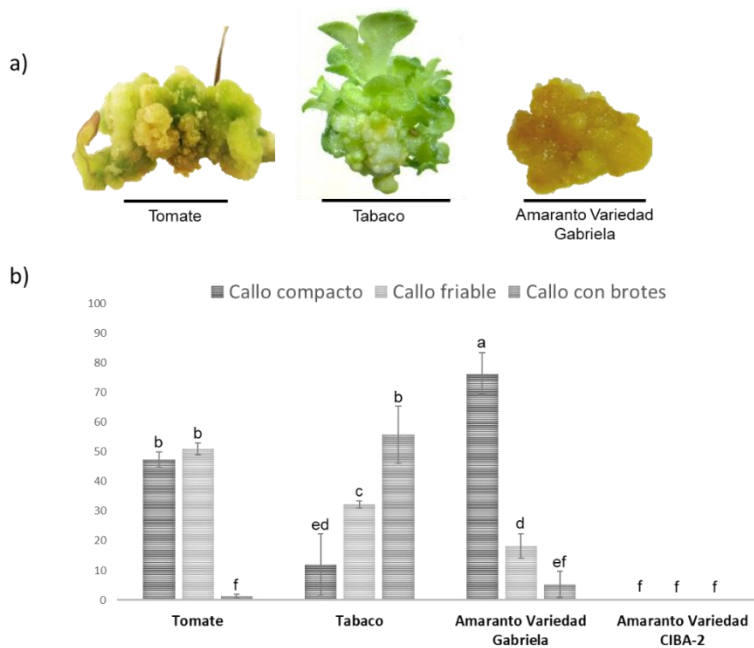


Figura 2. Callos generados en medio NB bajo diferentes condiciones de luz para tomate, tabaco y amaranto. a) tipo de callo generado a partir de tomate, tabaco y amaranto; y b) porcentaje de tipos de callos generados. La barra de escala corresponde a 1 cm.

La aparición de callos comenzó a observarse en todas las especies a los 15 días pos siembra (Figura 1), disminuyendo los tiempos establecidos en otros estudios en amaranto, donde los tiempos son de 30 a 40 días (Yaacob *et al.*, 2012; Comia-Yebbron *et al.*, 2017), 27 días en tomate (Bhatia *et al.*, 2004; Osman *et al.*, 2010; Jehan y Hassanein, 2013) y 21 días en tabaco (Shibasaki *et al.*, 1991; Ganapathi *et al.*, 2004), lo que a nivel industrial representaría una reducción de costos. Por otro lado, se observó una variación en el tamaño, peso, color y tipo de callos entre especies (Figura 2, Cuadro 1), sugiriendo que la intensidad de la luz es crucial en la inducción y el desarrollo del callo y su efecto dependerá de la especie, lo que podría estar asociada con el tipo y número de fotorreceptores de cada especie (Ouyang *et al.*, 2003; Bian *et al.*, 2015; Nhut *et al.*, 2015).

Ensayos de organogénesis y generación de clones

La presencia de brotes con hojas se observó en los explantes desde los nueve días en medio NB (Figura 3a). Los explantes de BMA fueron más efectivos que los cotiledones para la regeneración de plantas en las diferentes especies (Figura 3b). El mayor porcentaje en regeneración a partir de explantes de BMA se obtuvo en tabaco y tomate con 80% aproximadamente (Figura 3b), más alta que la reportada previamente (Bhatia *et al.*, 2004; Rahman *et al.*, 2010; Jamous y Abu-Qaoud, 2015). Aquí se obtuvo entre 15% (variedad CIBA-2) y 30% (variedad Gabriela) de regeneración de BMA en amaranto, superior a lo reportado previamente en hojas e hipocotilos de amaranto (Mnzava y Masam, 1985; Gajdošová *et al.*, 2013; Pal *et al.*, 2013). Nuestros resultados sugieren que los explantes de BMA son una excelente alternativa para la regeneración de plantas y su eficiencia depende de la especie. Además, se obtuvo una reducción en los tiempos de regeneración a partir de explantes, respecto a lo reportado en tomate y tabaco (Osman *et al.*, 2010; Rahman *et al.*, 2010).

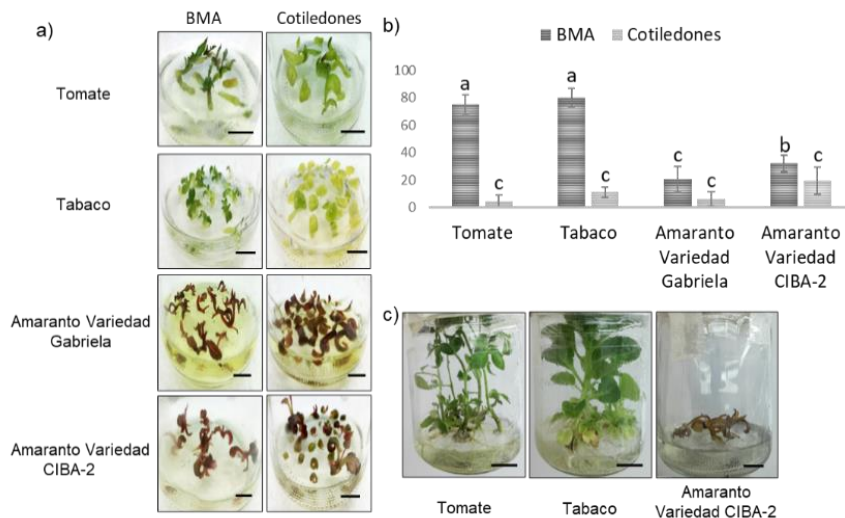


Figura 3. Regeneración de brotes y desarrollo de plantas. a) regeneración de brotes de explantes de BMAs y cotiledones en medio NB bajo una intensidad lumínica de $54 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$, 9 días después de colocación en medio NB; b) porcentaje de regeneración de brotes de BMA y cotiledones en cada especie después de 15 días en medio NB; y c) regeneración de brotes de BMA después de 15 días en medio RO. La barra de escala corresponde a 1 cm.

Generación de plantas en fase vegetativa o reproductiva en condiciones *in vitro*

Siete días después de la transferencia de los brotes clonales a medio SE, se observó la generación de raíces en tabaco y tomate. Para el amaranto, los brotes iniciaron un proceso de oxidación, lo que limitó la generación de raíces. Las plántulas que se transfirieron a medio RO mostraron hojas y raíces verdaderas en tabaco y tomate (Figura 3c), logrando 100% de aclimatación en sustrato (Figura 4).

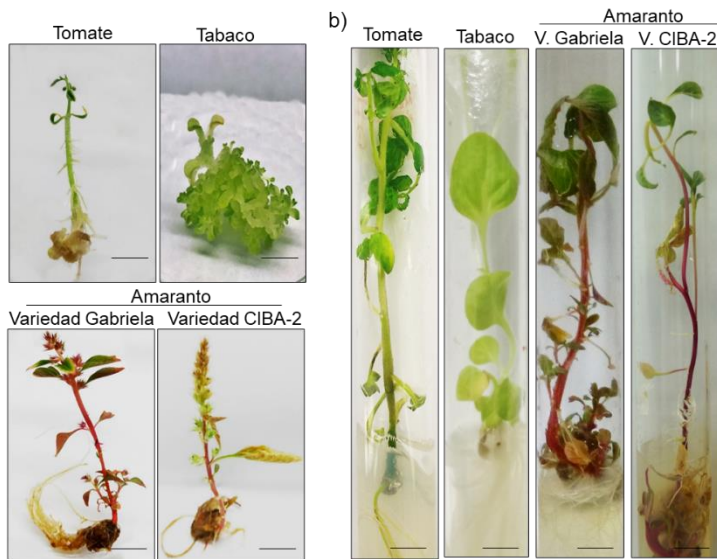


Figura 4. Plantas generadas en condiciones de cultivo *in vitro* a $108 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. a) estructuras generadas en medio NB a los 90 días; y b) plantas en medio RO después de 50 días. Barra de escala 1 cm.

Obtención de callos, plántulas y plantas adultas en el mismo sistema

Las estructuras generadas en cultivo *in vitro* de las diferentes especies utilizando diferentes tejidos y medios de cultivo se resumen en la Figura 5. La germinación de semillas en medio NB bajo diferentes intensidades de luz permitió la generación de plántulas con callos al mismo tiempo, a excepción de la variedad CIBA-2. Las plántulas de 20 días posteriores a la siembra transferidas SE o RO alcanzaron la etapa vegetativa o reproductiva después de 90 días (Figura 4b, 5). Simultáneamente, se monitorearon las plántulas con callo en medio NB a los 90 días pos-siembra. Para el tabaco se logró obtener callos con brotes y callos friables, lo que permitió obtener callos de hasta cuatro centímetros sin mostrar signos de oxidación.

Para el amaranto se obtuvieron plantas pequeñas, pero que completaron su ciclo de vida, siendo el primer trabajo en demostrar que es posible concluir el ciclo de vida del amaranto en un sistema *in vitro*, lo que lleva a la producción de anteras asépticas que pueden ser utilizadas para la generación de células haploides. En resumen, este trabajo destaca la posibilidad de generar callos, plántulas o plantas adultas en un mismo sistema; tales partes podrían ser ampliamente utilizadas para diversas aplicaciones biotecnológicas; por ejemplo, para obtener plantas transgénicas o cultivos en suspensión para la introducción de moléculas de interés comercial, propagar tejidos, obtener clones, obtener anteras estériles para manipulación genética e incluso generar plantas haploides.

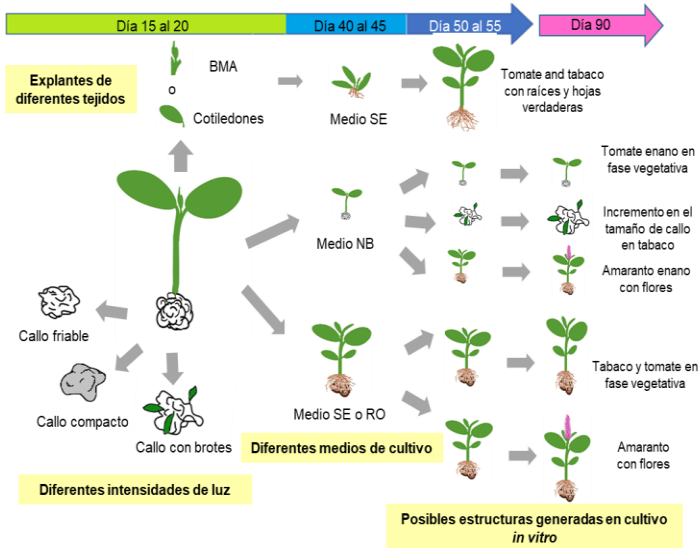


Figura 5. Resumen de sistemas de cultivo de semillas y explantes de interés agronómico con diferentes intensidades de luz y medios de cultivo. Se representan las estructuras generadas utilizando diferentes tejidos, intensidades de luz y medios para tabaco, tomate y amaranto.

Conclusiones

Este estudio es el primero en demostrar que la intensidad de la luz afecta el desarrollo y tipo de callo y este efecto varía dentro y entre especies. La combinación de especies, medios e intensidad lumínica permiten obtener diferentes tipos de callos, plántulas y plantas en fase vegetativa y reproductiva, que da la posibilidad de generar estos tejidos en un sistema de cultivo *in vitro* y que podrían ser utilizadas con fines biotecnológicos. Por último, el reducido tiempo de cultivo y el uso mínimo de medios de cultivo para la generación de estructuras como plantas axénicas o callos, sugiere podría proponerse como un protocolo simple para el cultivo *in vitro* de plántulas con callos.

Literatura citada

- Afshari, R. T.; Angoshtari, R. and Kalantari, S. 2011. Effects of light and different plant growth regulators on induction of callus growth in rapeseed (*Brassica napus* L.) genotypes. *Plant Omics J.* 4(2):6067. <https://doi.org/10.3316/informit.873216546192644>.
- Arya, I. D.; Chakravarty, T. N. and Sopory, S. K. 1993. Development of secondary inflorescences and *in vitro* plantlets from inflorescence cultures of *Amaranthus paniculatus*. *Plant Cell Reports.* 12(5):286–288. <https://doi.org/10.1007/BF00237137>.
- Bennici, A.; Grifoni, T.; Schiff, S. and Bovelli, R. 1997. Studies on callus growth and morphogenesis in several species and lines of *Amaranthus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 49(1):29-33. <https://doi.org/10.1023/A:1005882322044>.
- Bhatia, P.; Ashwath, N.; Senaratna, T. and Midmore, D. 2004. Tissue culture studies of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 78(1):1-21. <https://doi.org/10.1023/B:TICU.0000020430.08558.6e>.
- Bian, Z. H.; Yang, Q. C. and Liu, W. K. 2015. Effects of light quality on the accumulation of phytochemicals in vegetables produced in controlled environments: a review. *J. Sci. Food Agric.* 95(5):869-877. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6789>.

- Casal, J. J.; Fankhauser, C.; Coupland, G. and Blázquez, M. A. 2004. Signalling for developmental plasticity. *Trends in Plant Sci.* 9(6):309-314. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2004.04.007>.
- Chen, L. L.; Zhang, K.; Gong, X.; Wang, H. Y.; Gao, Y. H.; Wang, X. Q.; Zeng, Z. H. and Hu, Y. G. 2020. Effects of different LEDs light spectrum on the growth, leaf anatomy, and chloroplast ultrastructure of potato plantlets *in vitro* and minituber production after transplanting in the greenhouse. *J. Integrative Agric.* 19(1):108-119. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(19\)62633-X](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(19)62633-X).
- Comia-Yebbron, R.; Aspuria, E. T. and Bernardo, E. L. 2017. Callus induction in *Amaranthus tricolor* and *Amaranthus spinosus*. *J. Inter. Soc. Southeast Asian Agric. Sci.* 23(1):12-23.
- Espinosa-Leal, C. A.; Puente-Garza, C. A. and García-Lara, S. 2018. *In vitro* plant tissue culture: means for production of biological active compounds. *Planta.* 248(2018):1.18. <https://doi.org/10.1007/s00425-018-2910-1>.
- Gajdošová, A.; Libiaková, G.; Iliev, I. and Hricová, A. 2013. Adventitious shoots induction of *Amaranthus cruentus* L. *in vitro*. *Propagation of Ornamental Plants.* 13(1):33-49.
- Galvão, V. C. and Fankhauser C. 2015. Sensing the light environment in plants: photoreceptors and early signaling steps. *Current Opinion in Neurobiology.* 34:46-53. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2015.01.013>.
- Ganapathi, T. R.; Suprasanna, P.; Rao, P. S. and Bapat, V. A. 2004. Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) A model system for tissue culture interventions and genetic engineering. *Indian J. Biotechnol.* 3(2004):171-184.
- Gourguillon, L.; Rustenholz, C.; Lobstein, A. and Gondet, L. 2018. Callus induction and establishment of cell suspension cultures of the halophyte *Armeria maritima* (Mill.) Willd. *Sc. Hortic.* 233(2018):407-411. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.08.001>.
- Huan, L. and Tanaka, M. 2004. Effects of red and blue light-emitting diodes on callus induction, callus proliferation, and protocorm-like body formation from callus in *Cymbidium* orchid. *Environ. Control Biol.* 42(1):57-64. <https://doi.org/10.2525/ecb1963.42.57>.
- Jamous, F. and Abu-Qaoud, H. 2015. *In vitro* regeneration of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Plant Cell Biotechnol. Mol. Biol.* 16(3-4):181-190.
- Jehan, S. and Hassanein, A. 2013. Hormonal requirements trigger different organogenic pathways on tomato nodal explants. *Am. J. Plant Sci.* 4(11):2118-2125. <https://doi.org/10.4236/ajps.2013.411263>.
- Khuong, T. T. H.; Crété, P.; Robaglia, C. and Caffarri, S. 2013. Optimisation of tomato Micro-tom regeneration and selection on glufosinate/basta and dependency of gene silencing on transgene copy number. *Plant Cell Reports.* 32(9):1441-1454. <https://doi.org/10.1007/s00299-013-1456-8>.
- Kumar, N. and Reddy, M. P. 2011. *In vitro* plant propagation: a review. *J. Forest Sci.* 27(2):61-72.
- Kumar, P. and Dube, S. D. 1997. *In vitro* plant regeneration from shoot tips of *Amaranthus hypochondriacus*. *Indian J. Plant Physiol.* 2(2):142-144.
- Lau, O. S. and Deng, X. W. 2010. Plant hormone signaling lightens up: integrators of light and hormones. *Current Opinion in Plant Biol.* 13(5):571-577. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2010.07.001>.
- Le B.; Do, N. T.; Jeanneau, M.; Sadik, S.; Tu, S.; Vidal, J. and Van, K. T. T. 1998. Rapid plant regeneration of a C4 dicot species: *Amaranthus edulis*. *Plant Sci.* 132(1):45-54. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(97\)00262-8](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(97)00262-8).
- Mnzava, N. A. and Masam, A. M. 1985. Regeneration potential, leaf and seed yield of vegetable amaranth, (*Amaranthus cruentus* (L.)), as a function of initial topping heights. *Acta Hortic.* 9(153):151-160. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1985.153.20>.

- Nasrin, F.; Jaber, P.; Alireza, M. A. and Saeideh, A. S. 2017. Effects of explant type, growth regulators and light intensity on callus induction and plant regeneration in four ecotypes of persian shallot (*Allium hirtifolium*). *Sci. Hortic.* 218(2017):80-86. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.11.056>.
- Nhut, D. T.; Huy, N. P.; Tai, N. T.; Nam, N. B.; Luan, V. Q.; Hien, V. T.; Tung, H. T.; Vinh, B. T. and Luan, T. C. 2015. Light-emitting diodes and their potential in callus growth, plantlet development and saponin accumulation during somatic embryogenesis of *Panax vietnamensis* ha et grushv. *Biotechnol. Equip.* 29(2):299-308. <https://doi.org/10.1080/13102818.2014.1000210>.
- Osman, M. G.; Elhadi, E. A. and Khalafalla, M. M. 2010. Callus formation and organogenesis of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill, C. V. Omdurman) induced by thidiazuron. *Afr. J. Biotechnol.* 9(28):4407-4413. <https://doi.org/10.5897/AJB10.1516>.
- Ouyang, J.; Wang, X.; Zhao, B. and Wang, Y. 2003. Light intensity and spectral quality influencing the callus growth of *Cistanche deserticola* and biosynthesis of phenylethanoid glycosides. *Plant Sci.* 165(3):657-661. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(03\)00255-3](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(03)00255-3).
- Pal, A.; Swain, S. S.; Das, A. B.; Mukherjee, A. K. and Chand P. K. 2013. Stable germ line transformation of a leafy vegetable crop amaranth (*Amaranthus tricolor* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *In vitro Cell. Dev. Bio. Plant.* 49(2):114-128. <https://doi.org/10.1007/s11627-013-9489-9>.
- Rahman, M. A.; Alam, M. A.; Hossain, M. R.; Hossain, A. and Afroz, R. 2010. *In vitro* regeneration of popular tobacco varieties of Bangladesh from leaf disc. *Bangladesh J. Agric. Res.* 35(1):125-134. <https://doi.org/10.3329/bjar.v35i1.5873>.
- Rajewski, A. C.; Elkins, K. B.; Henry, A.; Eck, J. V. and Litt, A. 2019. *In vitro* plant regeneration and *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of *Datura stramonium* (Solanaceae). *Appl. Plant Sci.* 7(2):1-5. <https://doi.org/10.1002/aps3.1220>.
- Scotton, D. C.; Benedito, V. A.; B de Molfetta, J. and Rodrigues, Benedita, I. F. P. 2013. Response of root explants to *in vitro* cultivation of marketable garlic cultivars. *Hortic. Bras.* 31(1):80-85. <https://doi.org/10.1590/S0102-05362013000100013>.
- Shibasaki, N.; Hirose, K.; Yonemoto, T. and Tadaki, T. 1991. Suspension culture of *Nicotiana tabacum* cells in a rotary-drum bioreactor. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 53(4):359-363. <https://doi.org/10.1002/jctb.280530407>.
- Verma, S. K.; Das, A. K.; Cingoz, G. S.; Uslu, E. and Gurel, E. 2016. Influence of nutrient media on callus induction, somatic embryogenesis and plant regeneration in selected Turkish crocus species. *Biotechnology Reports.* 10(2016):66-74. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2016.03.006>.
- Wang, Y.; Zhang, H.; Zhao, B. and Yuan, X. 2001. Improved growth of *Artemisia annua* L hairy roots and artemisinin production under red light conditions. *Biotechnology Letters.* 23(2001):1971-1973. <https://doi.org/10.1023/A:1013786332363>.
- Wheeler, R. M. 2008. A historical background of plant lighting: an introduction to the workshop. *HortSci.* 43(7):1942-1943. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.43.7.1942>.
- Yaacob, J. S.; Hwei, L. C. and Taha, R. M. 2012. Pigment analysis and tissue culture of *Amaranthus cruentus* L. *Acta Hortic.* 958(2012):171-178. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2012.958.20>.
- Yu, L.; Song, C.; Sun, L.; Li, L.; Xu, Z. and Tang, C. 2020. Effects of light-emitting diodes on tissue culture plantlets and seedlings of rice (*Oryza sativa* L.). *J. Integrative Agric.* 19(7):1743-1754. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(19\)62793-0](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(19)62793-0).