

Sistema de regeneración *in vitro* de híbridos venezolanos de sorgo granífero [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]

in vitro regeneration system of Venezuelan hybrids of grain sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]

Rafael FERNÁNDEZ DA SILVA

Laboratorio de Biotecnología Aplicada, Departamento de Biología, Facultad Experimental de Ciencias y Tecnología, Universidad de Carabobo. Valencia, estado Carabobo, Venezuela. E-mail: rfernandez2@uc.edu.ve

Recibido: 30/04/2011 Fin de primer arbitraje: 18/03/2012 Primera revisión recibida: 04/04/2012
Fin de segundo arbitraje: 18/04/2012 Segunda revisión recibida: 25/04/2012 Aceptado: 01/06/2012

RESUMEN

El sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] es uno de los cereales más relevantes en la elaboración de alimentos concentrados para cerdos y gallinas. Por ello, es importante obtener nuevas cultivares de características agrónomicamente importantes a través de técnicas biotecnológicas, por lo cual se debe contar con un sistema de regeneración *in vitro*, el cual fue el objetivo de este trabajo. Como explantes se utilizaron semillas maduras de los híbridos de sorgo Chaguaramas III y VII. El medio fue MS, con diferentes hormonas (2,4-D, ANA y K, BA o TDZ). El sistema fue de dos etapas: I. Inducción de callo y II. Regeneración (sin 2,4-D). Se obtuvieron callos morfológicamente distintos: no-embriogénicos, con raíces, con brotes o combinaciones de estos. La mayor frecuencia embriogénica se encontró en medios con 3 mg.L⁻¹ de 2,4-D + ANA y 1 mg.L⁻¹ de K o BA, mientras que la frecuencia regenerativa fue mayor con BA. Al incrementar la concentración de BA se favoreció la organogénesis en detrimento de la embriogénesis somática, observándose brotes vitrificados. La regeneración fue por vía indirecta: organogénesis y embriogénesis somática de origen unicelular y multicelular. Al utilizar BA y TDZ, se regeneraron plantas y brotes con deformaciones foliares no permanentes, así como plantas albinas. La respuesta fue marcadamente varietal, tanto en la etapa de inducción como de regeneración.

Palabras clave: *Sorghum bicolor*, 2,4-D, K, BA, embriogénesis somática

ABSTRACT

The sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] is the one of the most important food sources for animals, such as pigs and chickens. Due to this aspect it would be important to obtain an effective *in vitro* regeneration system in order to obtain new cultivars with desirable agronomical characteristics. The aim of this research was to obtain an efficient regeneration system. Mature seeds of the sorghum hybrids Chaguaramas III and VII were cultured in the MS medium supplemented with several hormones (2,4-D, NAA and K, BA or TDZ). Two steps were involved in the regeneration process: I. Callus induction and II. Plant regeneration (in absence of 2,4-D). Calli showing different morphologies were obtained: non embryogenic, embryogenic, with roots, buds or combined of these. The embryogenic frequency was greater with 3 mg.L⁻¹ of 2,4-D + ANA and 1 mg.L⁻¹ of K, whereas the regenerative frequency was greater with BA. When increasing the BA concentration, the organogenesis was favored as indicated by vitrified buds, while the somatic embryogenesis was inhibited. The regeneration occurred by indirect organogenesis or/and somatic embryogenesis, and the origin of the later was unicellular and multicellular. When using BA and TDZ, plants and buds showed non permanent foliar deformations, as well as albino plants. The induction, regeneration and oxidation process varied according to the cultivar.

Key words: *Sorghum bicolor*, 2,4-D, K, BA, somatic embryogenesis

INTRODUCCIÓN

El sorgo es uno de los cereales de mayor importancia económica en el mundo, cuyo origen y domesticación se dio en el noreste de África (Etiopía y Egipto) para el año 3000 A. C. (Harlan, 1971), extendiéndose su cultivo a regiones cercanas al Mar Negro, Grecia, Europa Oriental, Asia menor, India y China aproximadamente en el año 300 D.C (De Wet y

Huckabay, 1967). Posteriormente, es llevado al continente americano a través de barcos dedicados al comercio de esclavos negros, en el siglo XVIII, y a Venezuela, fue introducido a principios del siglo XX (Guzmán, 1988) a mediados de ese siglo, Universidades venezolanas como la Universidad Central de Venezuela y la Universidad del Zulia, el Centro de Investigaciones Agropecuarias (CENIAP, hoy INIA) y la empresa privada (Monaca y Protinal) trabajaron en conjunto,

evaluando genotipos foráneos y obteniendo cultivares venezolanos adaptados a suelos del país (Mendoza, 1993). El sorgo pertenece a la familia Poaceae, género *Sorghum*, siendo la más emblemática especie cultivada el *Sorghum bicolor* (L) Moench, debido a que sus granos son empleados en la fabricación de alimentos concentrados, tanto para el consumo humano como animal (Guzmán, 1988).

El aumento de la población mundial en el presente siglo, plantea la necesidad del establecimiento de programas de mejoramiento genético en cereales como el sorgo, para lograr satisfacer la demanda poblacional de alimentos en el mundo, incluyendo a Venezuela. En tal sentido, se requiere obtener cultivares altamente productivos en condiciones de estrés biótico y/o abiótico, con una alta calidad nutricional. En este sentido, en Venezuela, esencialmente es la calidad del suelo el principal inconveniente que presenta el cultivo del sorgo, lo cual puede ser resuelto obteniendo nuevos cultivares a través del cultivo de tejidos y/o ingeniería genética. Así, en sorgo se han descrito eficientes protocolos de regeneración *in vitro* (Maqbool *et al.*, 2001), estables genéticamente (Mythili *et al.*, 2001), los cuales se han establecido a partir de diferentes explantes: embriones sexuales inmaduros (Gamborg *et al.*, 1977; Thomas *et al.*, 1977; El'Konin y Pakhomova, 2000; Oldach *et al.*, 2001; Pola *et al.*, 2007), embriones sexuales maduros (Hendre *et al.*, 1975), semillas maduras (Guo y Liang, 1993), inflorescencias inmaduras (George y Eapen, 1988), secciones del vástago (Masteller y Holden, 1970), hojas (Wernicke *et al.*, 1982; Pola y Mani, 2006), ápices (Seethrama *et al.*, 2000), anteras (Kumaravadivel y Rangasamy, 1994) y simples capas celulares de hipocotilo (Baskaran *et al.*, 2005).

Asimismo, a través de la variación somaclonal se obtienen nuevos cultivares agroecológicamente deseados (Maralappanavar *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2010), particularmente que presenten resistencia tanto al estrés abiótico como biótico. Así tenemos plantas tolerantes al estrés salino (Bhaskaran *et al.*, 1983; Ketchum *et al.*, 1987), a la acidez del suelo (Miller *et al.*, 1992), al estrés hídrico (Smith *et al.*, 1985; Ketchum *et al.*, 1987) y resistentes al gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*) (Isenhour *et al.*, 1991). Por otra parte, han sido pocos los trabajos publicados en comparación a otros cereales, en la obtención de plantas transgénicas, ya que su transformación genética es difícil y en pocos casos la regeneración fue exitosa (Zhu *et al.*, 1998), no obstante, recientemente se ha logrado éxito en ello, tanto con medios de transformación

directos como indirectos (Girijashankar y Swathisree, 2009). Así entre varios reportes, se lograron regenerar plantas transgénicas resistentes al herbicida basta (gen *bar*) mediante biobalística (Casas *et al.*, 1993; Tadesse *et al.*, 2003; Liu y Godwin, 2012) o con *Agrobacterium tumefaciens* (Lu *et al.*, 2009), con el gen de la quitinasa (Zhu *et al.*, 1998) y resistentes al insecto *Chilo partellus* (gen *CryIAC*) (Girijashankar *et al.*, 2007), evaluándose siempre la estabilidad de los transgenes en las plantas regeneradas (Emani *et al.*, 2002).

Como se ha visto en la actualidad, la biotecnología es la piedra angular del desarrollo de nuevos cultivares de plantas, y para ello es determinante el establecimiento de un sistema de regeneración *in vitro* eficiente, que asegure la obtención de plantas con las características genéticas deseadas. Por lo cual, este trabajo tuvo como objetivo fundamental la caracterización de un sistema de regeneración por cultivo de tejidos para dos híbridos venezolanos de sorgo granífero.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se emplearon como explantes, semillas maduras sin descascarar de dos híbridos venezolanos: Chaguaramas III y Chaguaramas VII de *Sorghum bicolor* (Sorgo granífero), donados por (FUSAGRI; Cagua, Edo Aragua, Venezuela). El protocolo de desinfección fue el siguiente: primero se lavaron con agua destilada estéril y jabón líquido (15 min) en agitación continua, luego con alcohol isopropílico al 70% (5 min), seguido de cloro comercial (Hipoclorito de Sodio al 5%) sin diluir más Tween 20 (2 gotas/10 mL) por 30 min; después se realizaron 6 cambios (3 min c/u) con agua destilada estéril. Seguidamente, se sembraron *in vitro*, en los diferentes medios de cultivo, siguiendo el protocolo de dos etapas (inducción y regeneración) establecido para el cultivo del sorgo (Gamborg *et al.*, 1977; George y Eapen, 1988; Guo y Liang, 1993). En la etapa I (4-8 semanas), se indujo la formación del callo, utilizando medios con 2,4-D sólo o combinado con otra auxina (ANA) y/o citoquininas (K, BA, TDZ), mientras que para la etapa II se regeneraron plantas y/o brotes a partir de callos con capacidad regenerativa (caulogénicos y embriogénicos) inducidos en la fase I, utilizando medios sin 2,4-D, con una auxina (0,5 mg.L⁻¹ de ANA) y una citoquinina (0,5 mg.L⁻¹ de K, BA o TDZ).

Los medios de cultivo, contenían las sales de Murashige y Skoog (1962), 2 mg.L⁻¹ de glicina, 1 mg.L⁻¹ de tiamina-HCl y 0,5 mg.L⁻¹ de piridoxina-HCl

(Zhuang y Jia, 1983) y sacarosa al 3%. Las auxinas utilizadas fueron: 2, 3 y 4 mg.L⁻¹ de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D); 1 mg.L⁻¹ de ácido naftaleno-acético (ANA) y las citoquininas: 1, 3 y 5 mg.L⁻¹ de 6-Furfurylaminopurina (K) o 6-Benzilaminopurina (BA) y 0,1-1 mg.L⁻¹ de Tidiazuron (TDZ). Se ajustó el pH a 5,8 y se solidificó con Agar Powder (0,8 %), y se esterilizó a 15 lb y 121°C (15 min). Los cultivos se mantuvieron a luz continua y a 30°C.

Se utilizaron 30 semillas por tratamiento (una semilla por tubo con tapón de algodón y gasa), colocando la zona embrional en contacto con el medio (Gamborg *et al.*, 1977; Thomas *et al.*, 1977; Dunstan *et al.*, 1978, 1979). En la etapa de inducción (4 semanas), se evaluaron los distintos medios, posteriormente se procedió a aislar los callos con características regenerativas, subcultivándose en los mismos medios de inducción para aumentar la masa del callo. La elevada producción de compuestos polifenólicos (oxidación) que presentaban los callos, determinó repiques cada 2 ó 3 semanas, ya que el acortamiento del tiempo de cultivo en los mismos, es la manera más efectiva de controlar la oxidación (Guo y Liang, 1993). La etapa de regeneración consistió en repicar callos a medios sin 2,4-D suplementados con otras hormonas (0,5 mg.L⁻¹ de ANA y 0,5 mg.L⁻¹ de K, BA, TDZ y sin hormonas), con la finalidad de lograr diferenciación de plantas (Nabors *et al.*, 1983; Ketchum *et al.*, 1987).

Después de cada etapa de cultivo, se calcularon las frecuencias de inducción de callo total (T), callo embriogénico (E), callo no embriogénico (NE) y callo rizogénico (R), y la frecuencia de regeneración, tanto de brotes como de plantas, empleando las formulas planteadas por Zaidi *et al.* (2006) tal como se indican a continuación:

$$\begin{aligned} \text{Frecuencia de callo T} &= \frac{\# \text{ callos}}{\# \text{ semillas sembradas}} \times 100 \\ \text{Frecuencia de callo E} &= \frac{\# \text{ callos E}}{\# \text{ semillas sembradas}} \times 100 \\ \text{Frecuencia de callo NE} &= \frac{\# \text{ callos NE}}{\# \text{ semillas sembradas}} \times 100 \\ \text{Frecuencia de callo R} &= \frac{\# \text{ callos R}}{\# \text{ semillas sembradas}} \times 100 \\ \text{Frecuencia de callo BR} &= \frac{\# \text{ callos BR}}{\# \text{ semillas sembradas}} \times 100 \end{aligned}$$

$$\text{Frecuencia de regeneración} = \frac{\# \text{ callos regenerados}}{\# \text{ callos regenerativos cultivados}} \times 100$$

Para el estudio histológico del proceso regenerativo, se tomaron trozos de los distintos callos, con el fin de determinar el origen de las plantas, analizando su morfología y anatomía. Estos fueron fijados en alcohol isopropílico al 70% y cortados a mano alzada, tiñéndolos con azul de toluidina y azul de metileno (1:1), realizando montajes semipermanentes (Johansen, 1940). Los registros fotográficos fueron tomados con la lupa Leika DFC 280 y un microscopio de luz Leika DM 1000 en el Laboratorio de Biotecnología Aplicada (LBA). Los análisis estadísticos de los procesos de inducción y regeneración, se basaron en la aplicación del modelo lineal aditivo, junto con el Análisis de Varianza (ANOVA) mediante el programa estadístico Statistic v 17.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La mayoría de los investigadores en el cultivo *in vitro* de cereales, utilizan el 2,4-D como única hormona en la etapa de inducción (Bannikova y Barabanova, 1990), no obstante, en sorgo son pocos los que emplean esa auxina como única hormona en dicho medio (Dunstan *et al.*, 1979; Bhaskaran *et al.*, 1983; Cai y Butler, 1990), formándose callo de 1 a 10 mg.L⁻¹ de 2,4-D (Brar *et al.*, 1980). Así en este trabajo, se observó el desarrollo de callo a los 10 días de iniciado el cultivo, formándose callos no embriogénico (NE), embriogénico (E) y rizogénico (R) al emplear 2,4-D sólo o combinado con otra auxina (ANA), incrementándose la frecuencia de callo rizogénico (20-32%) al aumentar la concentración de auxinas en el medio (2-4 mg.L⁻¹ de 2,4-D + 1 mg.L⁻¹ de ANA), mientras que al utilizar medios suplementados con citoquinina (K, BA o TDZ) se desarrolló otro tipo de callo, el caulogénico (con brotes: 9-42%), además de una mayor frecuencia de callo embriogénico (20-51%), en particular en los medios de cultivo con 2-3 mg.L⁻¹ de 2,4-D + 1 mg.L⁻¹ de ANA + 1 mg.L⁻¹ de K o BA (Tabla 1). En este sentido, la formación de raíces ó brotes en los callos depende de la relación auxina/citoquinina en el medio (Skoog, 1970), así se induce rizogénesis en presencia elevada de AIA o ANA (Davis y Kidd, 1980), mientras que al combinar 2,4-D con auxinas o citoquininas, se favorece la formación de callos con capacidad regenerativa con brotes o embriones (Gamborg *et al.*, 1977; Ma *et al.*, 1987), en particular al utilizar K y BA (El'Konin y Pakhomova, 2000; Oldach *et al.*, 2001; Baskaran y Jayabalan, 2005).

Al incrementar la concentración de citoquininas (K o BA) en el medio de inducción (2-3 mg.L⁻¹ de 2,4-D + 1 mg.L⁻¹ de ANA) a 3 y 5 mg.L⁻¹, se evidenció una mayor frecuencia de callo caulogénico (15-42%), siendo mayor el desarrollo de este tipo de callo con BA, no formándose callo embriogénico a 3 y 5 mg.L⁻¹ de K, mientras que con BA, disminuye el desarrollo de ese tipo de callo (17-43%) a 3 mg.L⁻¹ BA, y no se desarrolla a 5 mg.L⁻¹ de la misma, y para TDZ a 0,1 mg.L⁻¹, la frecuencia de callos embriogénicos (27-30%) y con brotes (3-10%) fue menor (Tabla 1). Estos resultados son similares a los indicados por diversos investigadores (Trejo Tapia *et al.*, 2002; Lacroix *et al.*, 2003; Gairi y Rashid, 2004; Sharma *et al.*, 2004)

quienes señalan que al incrementar la concentración de citoquininas se favorece la organogénesis en detrimento de la embriogénesis, en particular al emplear BA, que favorece la formación de callos caulogénicos o con brotes.

De tal manera, que los resultados encontrados en ambos híbridos de sorgo, determinan que la combinación de 2,4-D con otra auxina (ANA) y citoquininas (K y BA, TDZ), favorece el desarrollo de callos con capacidad regenerativa (caulogénico y embriogénico), con una mayor frecuencia embriogénica al emplear 3 mg.L⁻¹ de 2,4-D + 1 mg.L⁻¹ ANA + 1 mg.L⁻¹ K o BA en particular para el híbrido

Tabla 1. Frecuencias de inducción de callo en dos híbridos de sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] Chaguaramas III y Chaguaramas VII.

M	Hormonas (mg.L ⁻¹)			Frecuencias									
	2,4-D	ANA	Cito	Total		E		NE		R		Br	
				III	VII	III	VII	III	VII	III	VII	III	VII
I1	2			82	43	-	-	72	38	11	5	-	-
I2	3	-		76	44	15	11	40	24	21	9	-	-
I3	4			75	40	-	-	53	28	22	12	-	-
I4	2		-	70	40	-	-	50	29	20	11	-	-
I5	3	1		30	32	-	-	-	17	30	15	-	-
I6	4			27	30	-	-	-	7	32	23	-	-
I7	2			100	50	26	-	54	37	9	7	9	6
I8	3		1 K	76	46	50	23	9	11	8	6	11	6
I9	4			75	45	51	-	9	34	9	6	11	5
I10	2			73	27	-	-	49	12	4	5	20	10
I11	3	1	3 K	76	26	-	-	55	13	6	4	15	9
I12	4			74	32	-	-	51	18	5	4	18	10
I13	2			65	25	-	-	38	10	-	-	27	15
I14	3	1	5 K	63	26	-	-	33	12	-	-	30	14
I15	4			62	24	-	-	34	9	-	-	28	15
I16	2			84	24	32	10	27	3	3	1	22	10
I17	3	1	1 BA	83	27	45	-	19	14	2	2	17	12
I18	4			77	30	20	-	37	18	2	1	24	11
I19	2			76	25	43	12	3	3	-	-	30	10
I20	3	1	3 BA	95	30	29	-	31	15	-	-	35	15
I21	4			60	32	21	-	11	14	-	-	32	18
I22	2			55	30	-	-	16	10	-	-	39	20
I23	3	1	5 BA	51	29	-	-	9	7	-	-	42	22
I24	4			53	30	-	-	13	9	-	-	40	21
I25	2			89	24	27	-	52	20	-	-	10	4
I26	3	1	0.1 TDZ	81	47	30	-	43	43	-	-	8	4
I27	4			88	45	-	-	79	42	-	-	9	3
I28	2			50	48	-	-	50	48	-	-	-	-
I29	3	1	1 TDZ	60	52	-	-	60	52	-	-	-	-
I30	4			58	39	-	-	58	39	-	-	-	-

M: medio de cultivo; cito: Citoquinina; III: Híbrido Chaguaramas III; VII: Híbrido Chaguaramas VII; E: callo embriogénico; NE: callo no embriogénico; R: callo rizogénico; Br: callo con brotes

Chaguaramas III. En este sentido, se ratifica lo descrito por los investigadores que han trabajado con sorgo, que en la etapa de inducción suelen utilizar varios inductores, en particular la combinación de 2,4-D con K (Strogonov *et al.*, 1968; Boyes y Vasil, 1984; Smith *et al.*, 1985; Mackinnon *et al.*, 1987; Bhaskaran y Smith, 1988; Wei y Xu, 1990; Zhao *et al.*, 2010), 2,4-D y agua de coco (Davis y Kidd, 1980), 2,4-D y Zeatina (Gamborg *et al.*, 1977; Ma *et al.*, 1987), o 2,4-D con Zeatina y K (Guo y Liang, 1993).

En este estudio, la combinación de reguladores de crecimiento determinó la aparición de callos con distintas características morfo-anatómicas; no-embriogénico (NE), embriogénico (E), rizogénico (R), caulogénicos o con brotes (Br), con embriones y raíces (ER), con brotes y raíces (BrR) y con embriones, brotes y raíces (EBrR). Determinándose que el origen de los brotes y las raíces, ocurrió por organogénesis indirecta y el de las plantas por embriogénesis somática indirecta (Figura 1a-f). El callo se desarrolló de la zona

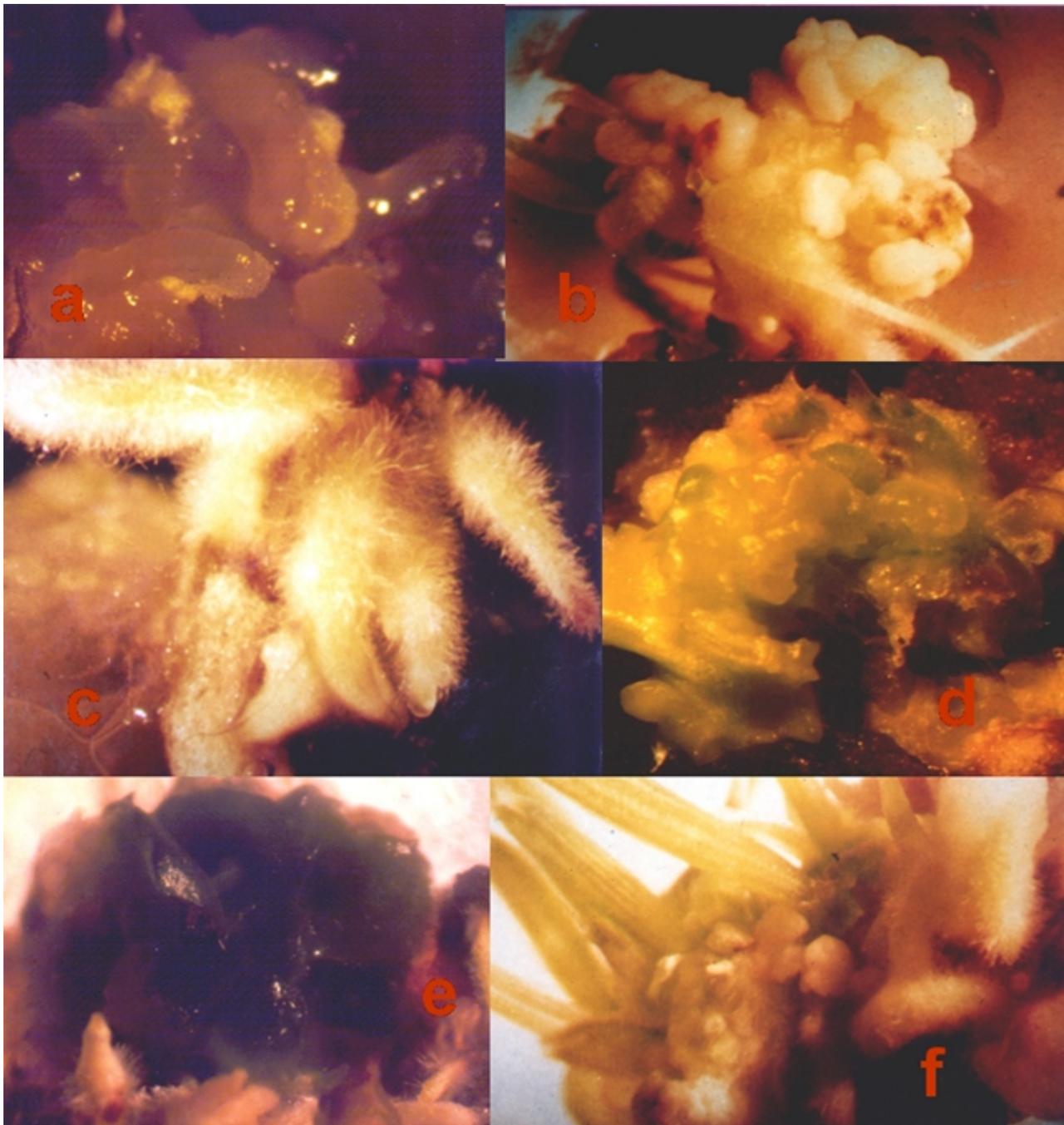


Figura 1. Callos obtenidos en sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] a. No-embriogénico. b. Embriogénico. c. Rizogénico. d. Con brotes. e. Con brotes y raíces. f. Con embriones, brotes y raíces. (Aumento 40X).

embrional de la semilla, específicamente del escutelo, tal como lo indican algunos investigadores (Thomas *et al.*, 1977; Dunstan *et al.*, 1978, 1979). Los tipos fundamentales de callo encontrados para el sorgo en este estudio fueron NE y E, distinguiéndose también callos organogénicos (con brotes y/o raíces). Estos callos ya han sido descritos en *Sorghum* por diversos autores (Thomas *et al.*, 1977; Dunstan *et al.*, 1978; 1979; Ketchum *et al.*, 1987; Cai y Butler, 1990; El'Konin y Pakhomova, 2000), así como en otros cereales (Nabors *et al.*, 1983; Vasil, 1987). Estas diferentes combinaciones de callos en sorgo,

representan una amplia heterogeneidad morfológica, que puede estar relacionada con la capacidad regenerativa, tal como ocurre en *Oryza sativa*, al caracterizar 33 tipos distintos de callos diferentes (Kucherenko, 1993).

Los callos no-embriogénicos son friables, de color amarillo (Figura 1a) e histológicamente su superficie estaba constituida por células pequeñas de forma alargada o irregular, que al realizar el montaje se dispersaban en el campo (Figura 2a). Por otra parte, los callos embriogénicos son compactos, de superficie

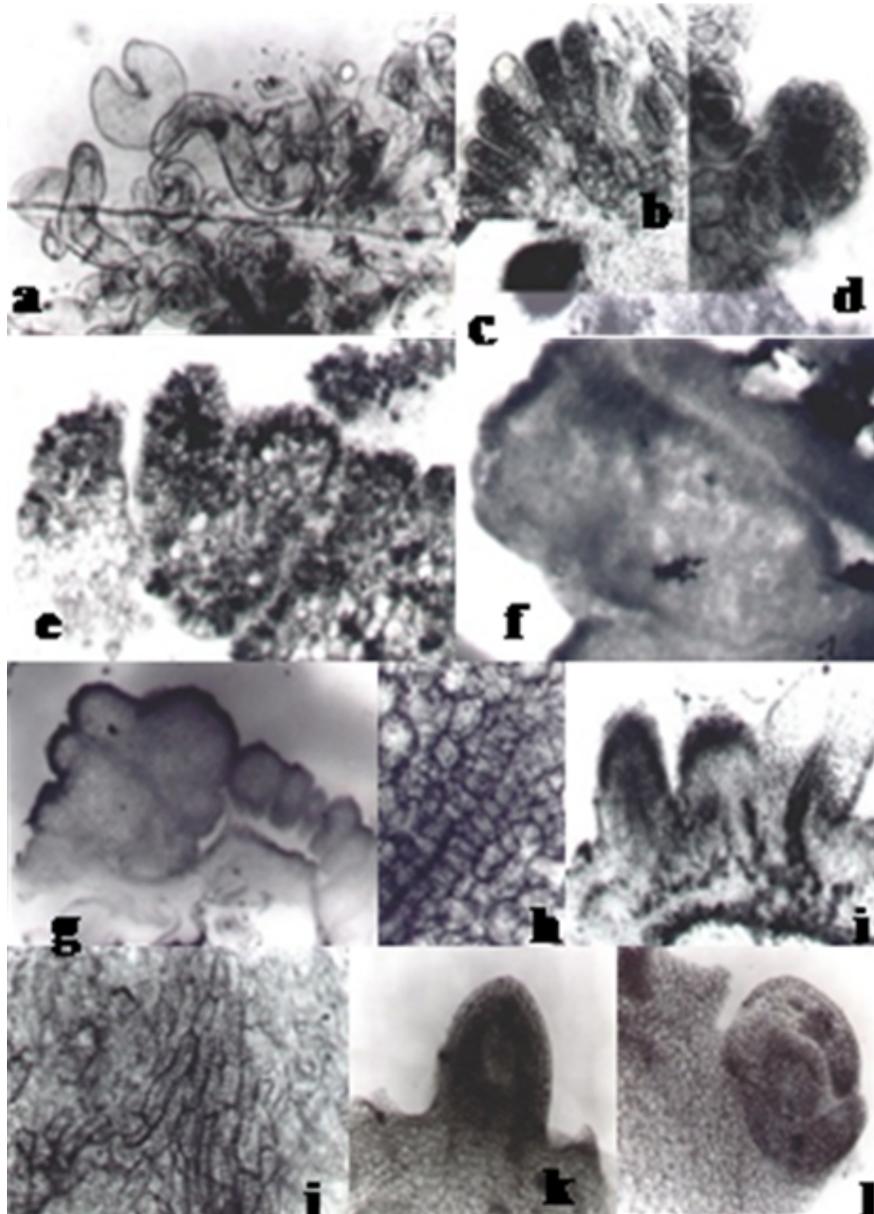


Figura 2. Anatomía del callo en sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] a. Células no-embriogénicas. b. Células embriogénicas. c-d. Embrión de estadio temprano e. Grupo de embriones en mayor desarrollo f. Embrión unido por un pie al tejido g. Cuerpo multiembrional h. Zona de abscisión i. Raíces en formación j. Vasos xilemáticos. K. Brote. I. Brote delimitado por una epidermis. (Aumento 400X).

nodular y de color blanco-crema (Figura 1b), anatómicamente estuvieron constituidos por células de diferente forma, grandes al centro y pequeñas hacia la periferia, presentando una mayor concentración de gránulos de almidón en estas últimas. Asimismo, el callo estaba bordeado por una capa uniseriada de células de forma tabular, que se asemejaba a una epidermis (Figura 2b), a partir de la cual se diferencian los embrioides en diferentes etapas de desarrollo, individuales (Figura 2c-d) o formando una masa multiembriogénica (Figura 2e). En el primer caso, se observó su unión a la masa embrional, mediante un pie o prolongación (Figura 2f), mientras que en el segundo, se determinó que el cuerpo multiembriónico presentaba una doble epidermis (Figura 2g), que asemeja una zona de abscisión, que suponemos es por donde se separan los embriones en etapas más avanzadas de desarrollo (Figura 2h).

Con respecto a los callos rizogénicos, estos eran compactos y de color amarillo, cuya superficie en gran parte, estaba conformada por raíces alargadas, densamente cubiertas por pelos radiculares (Figura 1c), anatómicamente estaba constituido por células de forma irregular, grandes hacia el centro del callo y pequeñas hacia su periferia. Adicionalmente, este tipo de callo presentaba en su superficie, unas estructuras globulares o papilares, que luego de realizado el estudio histológico se identificaron como raíces en formación (Figura 2i). Asimismo, era característico de este callo, la presencia de numerosos vasos xilemáticos de paredes engrosadas reticularmente, tanto hacia la parte interna como periférica del mismo, siendo menores en tamaño en esta última (Figura 2j).

Por último, los callos caulogénicos o con brotes eran compactos y de color verde (Figura 1d), observándose anatómicamente que estaban constituidos por células de forma irregular, grandes al centro y pequeñas hacia la parte superficial, bordeadas por una capa uniseriada de células cuadrangulares, similar a una epidermis, donde se observaron unas protuberancias de forma papilar y/o alargada (Figura 2k-l). Los brotes en diferentes estados de desarrollo, estaban conectados a la masa del callo por hileras de vasos xilemáticos cuyas paredes presentaban un engrosamiento helicoidal.

Las dos vías regenerativas por las cuales se pueden obtener plantas *in vitro* son la organogénesis y la embriogénesis somática (Vasil, 1987). En sorgo, los investigadores no indican de manera clara cuál de las dos rutas ocurre, limitándose a señalar la regeneración desde el punto de vista morfológico, describiendo la

formación de estructuras aparentemente embriogénicas y/o foliares, sin realizar estudios histológicos que indiquen de manera precisa cual proceso regenerativo está ocurriendo. Así, en secciones del vástago (Masteller y Holden, 1970) y con embriones sexuales inmaduros de *Sorghum bicolor* (Gamborg *et al.*, 1977), se describe que las plantas se originaron de estructuras foliares que presentaba el callo. Por otra parte, cultivando embriones sexuales maduros de *Sorghum caffrorum* (El'Konin *et al.*, 1986) e inflorescencias inmaduras de *Sorghum almun* (George y Eapen, 1988) se describen que las plantas se originaron de estructuras foliares y otras de naturaleza embriogénica. En este trabajo, se determinó mediante estudios anatómicos, que la regeneración ocurrió tanto por organogénesis como por embriogénesis somática. Así, con embriones sexuales inmaduros de *Sorghum bicolor*, mediante estudios de microscopía de luz y de microscopía electrónica de barrido, se encuentran los dos orígenes regenerativos (organogénesis y embriogénesis somática), predominando alguno de ellos en función del medio de inducción utilizado (Dunstan *et al.*, 1978; 1979).

En este trabajo se constató, que el desarrollo organogénico *in vitro* de los brotes en los callos, ocurre a partir de protuberancias originadas en la periferia del mismo, tal como lo señala Hicks (1994). Así se ha descrito en *Sorghum bicolor*, que los brotes y las raíces proliferan en el callo compacto de color blanco-crema (Dunstan *et al.*, 1978), sin embargo, se observó que estos órganos no proliferaron en este tipo de callo, sino en el callo NE, el cual era de color amarillo y friable, tal como se ha descrito en semillas de *Pennisetum typhoides* (Nabors *et al.*, 1983). Finalmente, las características señaladas con respecto al callo embriogénico, y su relación con el proceso de embriogénesis somática, ya han sido caracterizados en *Sorghum bicolor* por distintos investigadores (Dunstan *et al.*, 1978, 1979; Wernicke *et al.*, 1982), bajo tales circunstancias se pueden observar grupos de células embriogénicas aisladas periféricamente del callo, embriones de diferente nivel de desarrollo y las masas proembriónicas o cuerpos multiembrionales.

Por otra parte, la dilucidación del origen de los embriones somáticos (unicelular ó multicelular), es un problema ampliamente discutido, ya que los mismos pueden originarse directamente de simples células embriogénicas, las cuales generalmente están ubicadas en la periferia del callo, originándose de un complejo multicelular, o pueden presentarse las dos vías. En general, se distinguen los embriones de origen

unicelular, por verse unidos al tejido parental por un pie, mientras en los de origen multicelular, los embriones no están unidos por un pie a la masa de callo (Willians y Maheswaran, 1986; Quiroz Figueroa *et al.*, 2006). Asimismo, se plantea que los embrioides que se escinden del complejo multiembrional son de origen unicelular, ya que éstos se forman por la segmentación de simples células (escisión poliembrional) (Haccius, 1978); sin embargo, el origen de los embrioides, es todavía controversial (Bannikova y Barabanova, 1990). En el estudio anatómico se observó que algunos embriones somáticos se encontraban unidos por un pie a la masa proembrionaria, mientras que en otros no se observó el pie, sugiriendo que el origen de los mismos es tanto unicelular como multicelular. Otros investigadores (Dunstan *et al.*, 1978; 1979) plantearon un origen unicelular, no obstante, mencionaron que algunos de los embriones observados se originaron de más de una célula. Aunado a ello, en los estudios histológicos de nuestro trabajo, constatamos que los embriones están unidos a una masa de callo, destacándose una zona de abscisión, por la cual probablemente se separan los mismos, aspecto que no ha sido reportado previamente.

Con respecto a la etapa de diferenciación de plantas, la regeneración de las mismas ocurrió en medios sin 2,4-D suplementados con ANA (0,5 mg.L⁻¹) y una citoquinina (0,5 mg.L⁻¹ de K, BA o TDZ), pero fue nula al utilizar los medios sin hormonas (Tabla 2), regenerándose plantas verdes y plantas albinas, no siendo viables estas últimas (Figura 3a-b). Estos resultados corroboran lo indicado por distintos autores, que en dicha etapa por norma general se logra la diferenciándose de brotes y/o plantas, eliminando el 2,4-D del medio (Wernicke y Brettell, 1980; Bhaskaran *et al.*, 1983), o combinando hormonas como K (Wernicke y Brettell, 1980; Zhao *et al.*, 2010), sulfato de adenina o BA (Dunstan *et al.*, 1979; Zhao *et al.*, 2010), reduciendo la concentración de las sales del medio a la mitad o disminuyendo la concentración de sacarosa y ANA para favorecer el enraizamiento

(Boyes y Vasil, 1984). Adicionalmente, mediante la frecuencia regenerativa, se observó nuevamente una distinción varietal, que fue mayor (87%) al utilizar 0,5 mg.L⁻¹ ANA + 0,5 mg.L⁻¹ de BA para el híbrido Chaguaramas III, por otra parte, la diferenciación de plantas albinas se evidenció en medios con BA y TDZ (Tabla 2). Así en este trabajo al encontrar que el mayor número de plantas regeneradas se obtuvo al utilizar la citoquinina BA en el medio, se ratifican los resultados descritos en *Sorghum bicolor* por diversos autores (El'Konin y Pakhomova, 2000; Oldach *et al.*, 2001; Pola *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2010).

Por otra parte, en general las plantas obtenidas desde el punto de vista morfológico eran normales, excepto las regeneradas en el medio con TDZ, que presentaban hojas filiformes fuertemente onduladas, características que desaparecieron cuando las plantas se pasaron a tierra. Después de tres meses de dicha transferencia, muchas de ellas presentaron baja altura, reducción en la longitud de los entrenudos (con respecto a la planta madre) y no florecieron, sugiriendo que las mismas presentaron una lenta velocidad de crecimiento (Figura 3c). Sin embargo, se regeneraron algunas plantas del híbrido Chaguaramas III, con una altura, grosor de tallo y largo de la panícula, similares a los de la planta madre, pero el número de semillas por panícula fue inferior a la misma (Figura 3d).

El albinismo y la baja altura de las plantas, son señaladas como variaciones somaclonales en cultivares de *Sorghum bicolor* (Ma *et al.*, 1987; Cai *et al.*, 1990), así como la altura y el número de semillas por planta (Bhaskaran *et al.*, 1987; Smith y Bhaskaran, 1988). Estas anomalías, podrían ser el resultado de cambios en el número ó en la estructura cromosómica (Larkin y Scowcroft, 1981), no obstante, algunos autores que trabajaron con un híbrido F₁ de sorgo, sugieren, que en ese caso, las variaciones observadas fueron consecuencia de la segregación del híbrido (Dunstan *et al.*, 1979).

Tabla 2. Frecuencias de regeneración de plantas en dos híbridos de sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] Chaguaramas III y Chaguaramas VII.

M	Hormonas (mg.L ⁻¹)				Frecuencias					
	ANA	K	BA	TDZ	Plantas		Albinismo		Oxidación	
					III	VII	III	VII	III	VII
R1	0.5	0.5	-	-	74	-	-	-	50	100
R2	0.5	-	0.5	-	87	-	10	-	40	100
R3	0.5	-	-	0.5	26	21	26	-	60	100
R4	-	-	-	-	-	-	-	-	70	100

M: medio de cultivo; III: Híbrido Chaguaramas III; VII: Híbrido Chaguaramas VII

El albinismo es un problema serio en gramíneas, especialmente en cereales, y sus causas no están claras, pudiendo atribuirse a la temperatura del cultivo, al genotipo (Chu, 1982), a mutaciones en genes relacionados a la síntesis de componentes de los cloroplastos y a la fragmentación de los cromosomas

(Caredda *et al.*, 2004), siendo esta última referida a la presencia de elevadas concentraciones de auxina en el medio, que inducen divisiones celulares anómalas, las cuales han sido observadas en cultivos de polen de diferentes géneros (Caredda *et al.*, 2004; Hoque y Mansfield, 2004). En este experimento, los callos

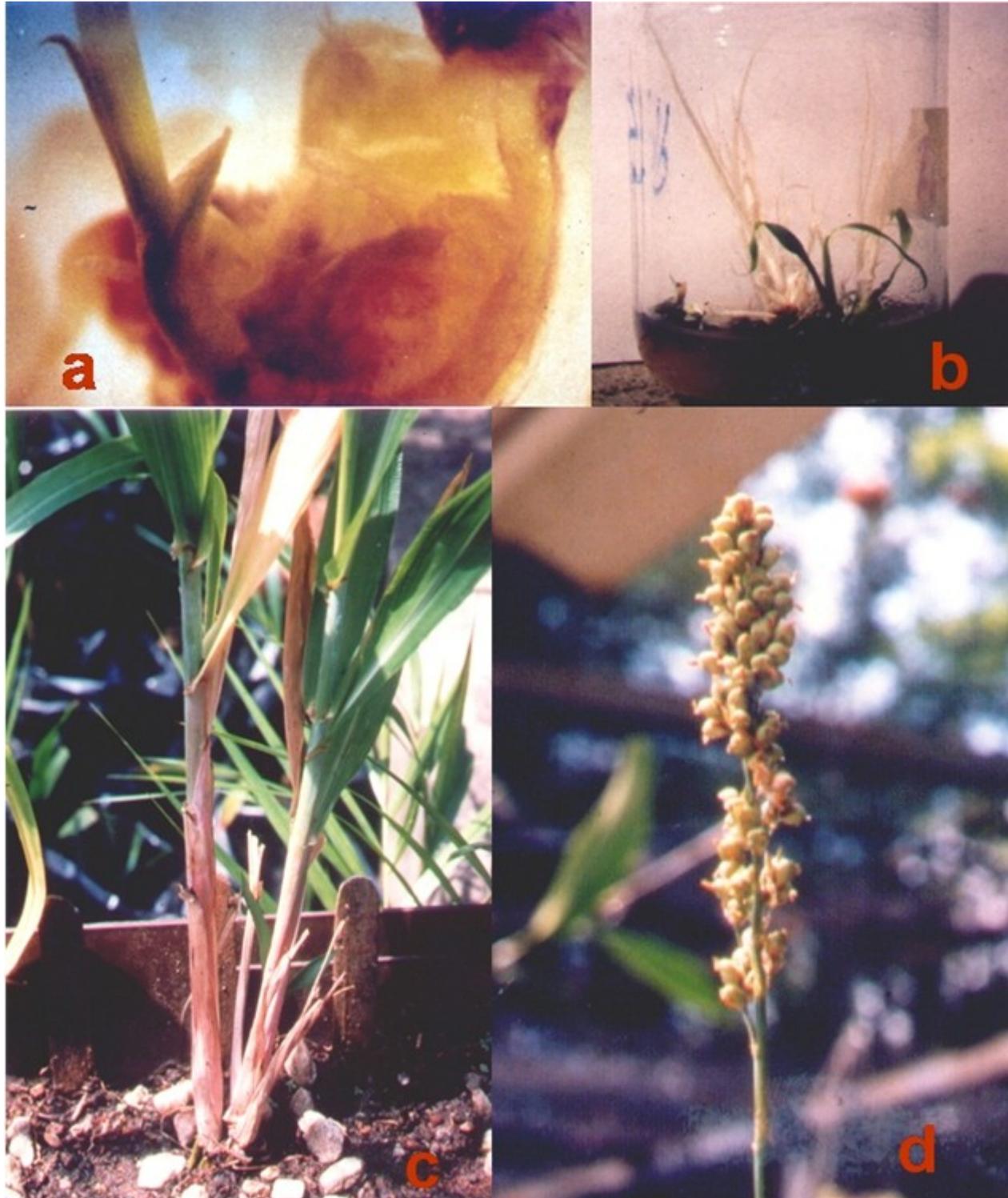


Figura 3. Regeneración de plantas de sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. a. Planta diferenciada en vástago y raíz. b. Planta albina. c. Planta de tallo corto d. Espiga con pocas semillas.

incubados en medios de regeneración con BA y TDZ, fueron los que produjeron plantas albinas (Tabla 2), resultados concordantes a los descritos en inflorescencias inmaduras de *Sorghum almum* (George y Eapen, 1988) y de *Avena sativa* (Kiviharju *et al.*, 2000), así como en anteras de *Sorghum bicolor* (Kumaravadivel y Rangasamy, 1994), donde se plantea que el BA en los medios de regeneración favorece la aparición de las plantas albinas.

Otro aspecto encontrado en el cultivo, fue la aparición de brotes vitrificados, en medios suplementados con altas concentraciones de BA y TDZ. La vitrificación constituye un problema en el cultivo *in vitro*, tanto en especies arbóreas como herbáceas y se ha asociado a elevados niveles de citoquininas en el medio (Whitehouse *et al.*, 2002), reportándose en cultivos de *Prunus* con altas concentraciones de BA (Vardja y Vardja, 2001; Texeira *et al.*, 2004) y en *Nicotiana tabacum* en medios con BA o TDZ (Gill y Saxena, 1993). Finalmente, otro aspecto descrito en este estudio fue la desaparición de las anomalías foliares (filiformes y fuertemente onduladas), luego de la transferencia de las plantas a tierra. Esta variación morfológica reversible, inducida por la citoquinina TDZ también ha sido señalada por Lu (1993).

Finalmente, la producción de compuestos polifenólicos (CP) en cultivos *in vitro* de *Sorghum* es usualmente mencionado por los investigadores. En este experimento, los CP aparecieron después de 3-4 semanas de iniciado el cultivo, evidenciándose su excreción al medio, al tornarse éste de color púrpura, debido a reacciones oxidativas. Todos los tipos de callo, en particular el embriogénico y el caulogénico producen CP, ya que su síntesis parece estar relacionada al tipo y concentración de hormonas. En el sistema de *Sorghum*, el 2,4-D muestra una gran capacidad de promover la producción de CP. Altas concentraciones de CP son perjudiciales para el desarrollo del callo, por lo cual, para evitar la muerte del mismo se debe subcultivar cada 2-3 semanas, y así evitar que las reacciones oxidativas influyan en la pérdida de los cultivos. No obstante, la presencia de CP no afecta la capacidad regenerativa del callo, al menos en su etapa inicial (George y Eapen, 1990; Lusardi y Lupotto, 1990; Hagio, 1994). Al parecer las reacciones oxidativas relacionadas a la producción de los CP, dependen de la presencia, concentración y combinación de las hormonas, y se minimizan en oscuridad, pero esta condición inhibe los procesos regenerativos de plantas o brotes (Taniguchi *et al.*, 2002; Baskaran y Jayabalan, 2005). Adicionalmente, la oxidación

depende de las características fenotípicas del cultivar, tales como el color de la cubierta seminal, donde el color más oscuro está relacionado a fuertes eventos oxidativos (Guo y Liang, 1993). En este sentido, el híbrido Chaguaramas VII con un color más oscuro de la cubierta de la semilla presentó la mayor frecuencia oxidativa (Tabla 2). Finalmente, es importante indicar que la respuesta morfogénica tanto en la fase de inducción como de regeneración dependió del híbrido (Tablas 1 y 2), tal como han señalado números investigadores (Guo y Liang, 1993; Pola *et al.*, 2008; Arulselvi y Krishnaveni, 2009), resaltándose que el híbrido Chaguaramas III respondió mejor, en particular en la etapa de regeneración.

CONCLUSIONES

La producción de callo fue inducida en presencia de una auxina, el 2,4-D combinado con otra auxina (ANA) y/o citoquininas (K, BA, TDZ), favoreciendo la formación de diferentes tipos de callo. Los brotes y las raíces se originaron por organogénesis indirecta y el de las plantas por embriogénesis somática indirecta, siendo el origen de los embriones somáticos tanto unicelular como multicelular.

Al elevar la concentración de citoquininas, en particular de BA, se favoreció la organogénesis en detrimento a la embriogénesis somática, apareciendo brotes vitrificados y plantas albinas. El Tidiazuron (TDZ) indujo la organogénesis y la embriogénesis somática, favoreciendo la formación de brotes con malformaciones foliares.

Las respuestas *in vitro*, así como la oxidación en ambas etapas del cultivo fueron varietales, destacándose el híbrido Chaguaramas III, debido a que presentó la mayor capacidad regenerativa y la menor oxidación.

AGRADECIMIENTOS

A Darío Boscán de FUSAGRI (Cagua, Edo Aragua, Venezuela) por el suministro de las semillas de sorgo de los híbridos empleadas en este trabajo. Asimismo al personal asistente del Laboratorio de Biotecnología Aplicada (LBA) del Departamento de Biología de la Universidad de Carabobo (Naguanagua-Edo. Carabobo) por el apoyo en el estudio morfológico y anatómico en esta investigación.

LITERATURA CITADA

- Arulselvi, I. and S. Krishnaveni. 2009. Effect of hormones, explants and genotypes in *in vitro* culturing of sorghum. *J. Biochem. Tech.* 1 (4): 96-103.
- Bannikova, V. P. and E. A. Barabanova. 1990. Induction and histological characteristics of somatic embryogenesis in cereal tissue cultures. *Tsitologiya i Genetika* 24 (2): 61-68.
- Baskaran, P. and N. Jayabalan. 2005. *in vitro* plant regeneration and mass propagation system for *Sorghum bicolor* -a valuable major cereal crop. *J. Agricultural Technology* 1 (2): 345-363.
- Baskaran, P.; R. Rajeswari and N. Jayabalan. 2005. A simple approach to improve plant regeneration from callus culture of *Sorghum bicolor* for crop improvement. *J. Agricultural Technology* 1 (1): 179-192.
- Bhaskaran, S.; R. H. Smith and K. Schertz. 1983. Sodium chloride tolerant callus of *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *Z. Pflanzenphysiol.* 112: 459-463.
- Bhaskaran, S.; R. H. Smith, S. Paliwal and K. F. Schertz. 1987. Somaclonal variation from *Sorghum bicolor* (L.) Moench cell culture. *Plant Cell Tissue and Organ Cult.* 9:189-196.
- Brar, D. S.; S. Rambold, F. Constabel and O. L. Gamborg. 1980. Isolation, fusion and culture of *Sorghum* and corn protoplasts. *Z. Pflanzenphysiol.* 96: 269-275.
- Cai, T. and L. Butler. 1990. Plant regeneration from embryogenic callus initiated from immature inflorescences of several high-tannin sorghums. *Plant Cell Tissue and Organ Cult.* 20:101-110.
- Cai, T.; G. Ejeta, J. D. Axtell and L. G. Butler. 1990. Somaclonal variation in high tannin sorghums. *Theor. Appl. Genet.* 79: 737-747.
- Caredda S.; P. Devaux, R. I. Sangwan and C. Clement. 2004. Plastid ultrastructure and DNA related to albinism in androgenetic embryos of various barley (*Hordeum vulgare*) cultivars. *Plant Cell Tissue and Organ Cult.* 76: 35-43.
- Casas, A. M.; A. K. Kononowicz, U. B. Zehr, D. T. Tomes, J. D. Axtell, L. G. Butler, R. A. Bressan and P. M. Hasegawa. 1993. Transgenic sorghum plants via microprojectile bombardment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 11212-11216.
- Chu, C. C. 1982. Haploids in plant improvement. *In: Plant improvement and somatic cell genetics.* Academic Press, Inc. p.129-155.
- Davis, M. E. and G. H. Kidd. 1980. Optimization of *Sorghum* primary callus growth. *Z. Pflanzenphysiol.* 98: 79-82.
- De Wet, J. M. and J. P. Huckabay. 1967. The origin of *Sorghum bicolor*. II. Distribution and domestication. *Evolution* 21 (12): 787-802.
- Dunstan, D. I.; K. C. Short and E. Thomas. 1978. The anatomy of secondary morphogenesis in cultured scutellum tissues of *Sorghum bicolor*. *Protoplasma.* 97: 251-260.
- Dunstan, D. I.; K. C. Short, H. Dhaliwal and E. Thomas. 1979. Further studies on plantlet production from cultured tissues of *Sorghum bicolor*. *Protoplasma* 101: 355-361.
- EL'Konin, L. A. and N. V. Pakhomova. 2000. Influence of nitrogen and phosphorus on induction embryogenic callus of sorghum. *Plant Cell, Tissue and Organ Cult.* 61: 115-123.
- EL'Konin, L. A.; V. S. Tyrnov and A. G. Ishin. 1986. *Sorghum* somatic tissue culture: phytohormonal regulation of morphogenesis. *Soviet Plant Physiol.* 33 (3): 388-395.
- Emani, C.; G. Sunilkumar and K. S. Rathore. 2002. Transgene silencing and reactivation in *Sorghum*. *Plant Sci.* 162: 181-192.
- Gairi, A. and A. Rashid. 2004. TDZ-induced somatic embryogenesis in non-responsive caryopses of rice using a short treatment with 2,4-D. *Plant Cell, Tissue and Organ Cult.* 76: 29-33.
- Gamborg, O. L.; J. P. Shyluk, D. S. Brar and F. Constabel. 1977. Morphogenesis and plant regeneration from callus of immature embryos of *Sorghum*. *Plant Sci. Lett.* 10: 67-74.
- George, L. and S. Eapen. 1988. Plant regeneration by somatic embryogenesis from immature inflorescence cultures of *Sorghum almum*. *Ann. Bot.* 61: 589-591.

- Gill, R. and P. K. Saxena. 1993. Somatic embryogenesis in *Nicotiana tabacum* L.: induction by Thidiazuron of direct embryo differentiation from cultured leaf discs. *Plant Cell Rep.* 12: 154-159.
- Girijashankar, V.; K. K. Sharma, P. Balakrishna and N. Seetharama. 2007. Direct somatic embryogenesis and organogenesis pathway of plant regeneration can seldom occur simultaneously within the same explant of sorghum. *Journal of SAT Agricultural Research* 3 (1): 1-3.
- Girijashankar, V. and V. Swathisree. 2009. Genetic transformation of *Sorghum bicolor*. *Physiol. Mol. Biol. Plants* 15 (4): 287-302.
- Guo, J. and G. Liang. 1993. Callus induction and plant regeneration of cultivated and wild sorghums. *Cytologia* 58: 203-210.
- Guzman, J. 1988. El cultivo del sorgo. (2da.ed). Editorial Espande. Caracas, Venezuela. p. 19-33.
- Haccius, B. 1978. Question of unicellular origin of non-zygotic embryos in callus cultures. *Phytomorphology* 28: 74-81.
- Hagio, T. 1994. Varietal difference of plant regeneration from callus of sorghum mature seed. *Breeding Sci.* 44: 121-126.
- Harlan, J. 1971. Agricultural origins: Centers and Noncenters. *Science* 174 (10): 468-474.
- Hendre, R. R.; A. F. Mascarenhas, P. Meera and V. Jagannathan. 1975. Tissue cultures of maize, wheat, rice and sorghum: Part II- Growth and nutrition of callus cultures. *Indian J. Exp. Biol.* 13: 108-111.
- Hoque, E. and J. Mansfield. 2004. Effect of genotype and explant age on callus induction and subsequent plant regeneration from root-derived callus of Indica rice genotypes. *Plant Cell, Tiss. and Org. Cult.* 78: 217-223.
- Hicks, G. S. 1994. Shoot induction and organogenesis *in vitro*: a developmental perspective. *In Vitro Cell. and Develop. Biol.* 30 (1):10-15
- Isenhour, D. J.; R. R. Duncan, D. R. Miller, R.M. Waskom, G. E. Hanning, B. R. Wisemam and N. M. Nabors. 1991. Resistance to leaf-feeding by the fall Armyworm (Lepidoptera: Noctulidae) in tissue culture derived sorghums. *J. Eco. Entomology* 84: 680-684.
- Johansen, D. A. 1940. *Plant microtechnique*. McGraw-Will Publishing Company Bombay, New Delhi, India. 523 pp.
- Ketchum, J. L.; O. L. Gamborg, G. E. Hanning and M. W. Nabors. 1987. Tissue culture for crops project progress report. Colorado: Departament of Botany Colorado State University. p. 33-37.
- Kiviharju, E.; M. Puolimatka, A. Saastamoinen and E. Pehu. 2000. Extensión of anther cultura to several genotypes of cultivated oats. *Plant Cell Rep.* 19 (7): 674-679.
- Kucherenko, L. A. 1993. Morphological heterogeneity in rice callus tissues and their regenerative capacity. *Russian J. Plant Physiol.* 40 (5): 797-801.
- Kumaravadivel, N. and S. R. Ranangasamy. 1994. Plant regeneration from *Sorghum* anther cultures and field evaluation of progeny. *Plant Cell Rep.* 13: 286-290.
- Lacroix, B.; Y. Assoumou and R. Sangwan. 2003. Efficient *in vitro* direct shoot organogenesis and regeneration of fertile plants from embryos explants of Bambara groundnut (*Vigna subterranea* L. Verdc.). *Plant Cell Rep.* 21 (12): 1153-1158.
- Larkin, P. J. and A. Scowcroft. 1981. Somaclonal variation a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theor. Appl. Genet.* 60: 197-214.
- Liu, G. and Godwin, I. 2012. Highly efficient sorghum transformation. *Plant Cell Rep.* 31 (6): 999-1007.
- Lu, C. 1993. The use of thidiazuron in tissue culture. *In Vitro Cell and Develop. Biol.* 29 (4): 92-96.
- Lu, L.; X. Wu, X. Yin, J. Morrand, X. Chen, W. Folk and Z. Zhang. 2009. Development of marker-free transgenic sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] using standard binary vectors with *bar* as a selectable marker. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 99: 97-108.
- Lusardi, M. C. and E. Lupotto. 1990. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Sorghum* species. *Maydica* 35: 59-66.

- Ma, H.; M. Gu and G. H. Liang. 1987. Plant regeneration from cultured immature embryos of *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *Theor. Appl. Genet.* 73: 389-394.
- Maqbool, S. B.; P. Devi and M. B. Sticklen. 2001. Biotechnology: Genetic improvement of Sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 37: 504-515.
- Maralappanavar, M. S.; M.S. Kuruvinashetti and C. C. Harti. 2000. Regeneration, establishment and evaluation of somaclones in *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *Euphytica* 115: 173-180.
- Masteller, V. J. and D. J. Holden. 1970. The growth of and organ formatin from callus tissue of Sorghum. *Plant Physiol.* 45: 362-364.
- Mendoza, E. 1993. Breves comentarios sobre el sorgo en Venezuela. *En: Foro "Sorgo, la alternativa vigente", Caracas, Venezuela.* p. 1-3.
- Miller, D. R.; R. M. Waskom, R. R. Duncan, P. L. Chapman, M. A. Brick, G. E. Hanning, D. A. Timm and M. W. Nabors. 1992. Acid soil stress tolerance in tissue culture-derived Sorghum lines. *Crop Sci.* 32: 324-327.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and biomass whitt tobacco culture. *Plant Physiol.* 15: 473-497.
- Mythili, P. K.; V. D. Reddy and N. Seetharama. 2001. Regeneration and analysis of genetic variability in wild sorghum, *S. australiense* Garber and Snyder. *Cytologia* 66 (4); 341-348.
- Nabors, M. W.; J. W. Heyser, T. A. Dykes and K. J. Demott. 1983. Long-duration, high-frequency plant regeneration from cereal tissue cultures. *Planta* 157: 385-391.
- Oldach, K. H.; A. Morgenstern, S. Rother, M. Girgi, M. Kennedy and H. Lörz. 2001. Efficient *in vitro* plant regeneration from immature zygotic embryos of pearl millet [*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br] and *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *Plan. Cell Rep.* 20: 416-421.
- Pola, S. and S. Mani. 2006. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration in *Sorghum bicolor* (L.) Moench, from leaf segments. *Journal of Cell and Molecular Biology* 5: 99-107.
- Pola, S.; S. Mani and T. Ramana. 2007. Enhanced shoot regeneration in tissue culture studies of *Sorghum bicolor*. *International J. Plant Production* 2: 1-15.
- Pola, S.; S. Mani and T. Ramana. 2008. Plant tissue culture studies in *Sorghum bicolor*: immature embryo explants as the source material. *International J. Plant production* 2: 1-15.
- Pola, S.; S. Mani and T. Ramana. 2009. Long-term maintenance of callus cultures from immature embryo of *Sorghum bicolor*. *World Journal of Agricultural Sciences* 5 (4): 415-421.
- Quiroz Figueroa, F. R.; R. Rojas Herrera, R. M. Galaz Avalos and V. M. Loyola Vargas. 2006. Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 86: 285-301.
- Seetharama, N.; R. V. Sairam and T. S. Rani. 2000. Regeneration of Sorghum from shoot tip cultures and field performance of the progeny. *Plant Cell, Tiss. and Org. Cult.* 61: 169-173.
- Sharma, V.; R. Hansch, R. Mendel and J. A. Schulze. 2004. A highly efficient plant regeneration system through multiple shoot differentiation from commercial cultivars of barley (*Hordeum vulgare* L.) using meristematic shoot segments excised from germinated mature embryos. *Plant Cell Rep.* 23 (1-2): 9-16.
- Skoog, F. 1970. Aspects of growth factor interactions in morphogenesis of tobacco tissue cultures. *Colloques interationaux C. N. R. S.* 193: 115-135.
- Smith, R. H. and S. Bhaskaram. 1988. Sorghum cell culture: somaclonal variation/screening. *Iowa St. J. Res.* 62 (4): 571-585.
- Smith, R. H.; S. Bhaskaram and F. R. Miller. 1985. Screening for drought tolerance in *Sorghum* using cell culture. *In Vitro Cellular and Develop. Biol.* 21 (10): 541-545.
- Tadesse, Y. ; L. Sági, R. Swennen and M. Jacobs. 2003. Optimisation of transformation conditions and production of transgenic sorghum (*Sorghum*

- bicolor*) via microparticle bombardment. Plant Cell, Tissue and Organ Cult. 75 (1): 1-18.
- Taniguchi, S.; K. Uechi, R. Kato, H. Ito, T. Hatano, K. Yazaki and T. Yoshida. 2002. Accumulation of hydrolyzable tannins by *Aleurites fordii* callus cultura. Planta Med. 68: 1145-1146.
- Teixeira, P. ; A. Silva and J. P. Ducroquet. 2004. *In vitro* multiplication of *Prunus* spp. Rootstocks "Carelli". Rev. Bras. Frutic. 26 (2): 377-379.
- Thomas, E.; P. J. King and I. Potrykus. 1977. Shoot and embryo-like structure formation from cultured tissues of *Sorghum bicolor*. Naturwissenschaften 64 (11): 587.
- Trejo Tapia, G.; U. Maldonado Amaya, A. Jimenez Aparicio, M. Blanqueto Illesca, G. Salcedo Morales, B. Martínez Bonfil y A. De Jesús Sánchez. 2002. Efecto del tiempo de exposición a baja temperatura y de reguladores de crecimiento en la regeneración de plantas a partir de anteras de arroz *Oryza sativa* L. (cultivar Japónica H2005). Agrociencia 36: 441-449.
- Vardja, R. and T. Vardja. 2001. The effect of cytokinin type and concentration and the number of subcultures on the multiplication rate of some decorative plants. Proc. Estonian Acad. Sci. Biol. Ecol. 50 (1): 22-32.
- Whitehouse, A.; T. Marks and G. Edwards. 2002. Control of hyperhydricity in *Ecucalyptus* axillary shoot cultures grown in liquid medium. Plant Cell, Tiss. and Org. Cult. 71: 245-252.
- Vasil, I. K. 1987. Developing cell and tissue culture systems for the improvement of cereal and grass crops. J. Plant Physiol. 128: 193-218.
- Wernicke, W.; I. Potrykus and E. Thomas. 1982. Morphogenesis from cultured leaf tissue of *Sorghum bicolor*-The morphogenesis pathways. Protoplasma. 111: 53-62.
- Williams, E. G. and G. Maheswaran. 1986. Somatic embryogenesis: Factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. Ann. Bot. 57: 443-462.
- Zaidi, M. A.; M. Narayanan, R. Sardana, T. Taga, S. Postel, R. Johns, M. McNulty, J. Mao, E. Loit and I. Altosar. 2006. Optimizing tissue culture media for efficient transformation of different indica rice genotypes. Agronomy Research 4 (2): 563-575.
- Zhang, M.; H. Wang, Z. Dong, B. Qi, K. Xu and B. Liu. 2010. Tissue culture-induced variation at simple sequence repeats in sorghum (*Sorghum bicolor* L.) is genotype-dependent and associated with down-regulated expression of a mismatch repair gene, MLH3. Plant Cell Rep. 29: 51-59.
- Zhao, L.; S. Liu and S. Song. 2010. Optimization of callus induction and plant regeneration from germinating seeds of sweet sorghum (*Sorghum bicolor* Moench). African J. Biotechnology 9 (16): 2367-2374.
- Zhu, H.; S. Muthukrishna, S. Krishnaveni, G. Wild, J. M. Jeoung and G. H. Liang. 1998. Biolistic transformation of *Sorghum* using a rice chitinase gene. J. Genet. Breed. 52: 243-252.
- Zhuang, J. J. and X. Jia. 1983. Increasing differentiation frequencies in Wheat pollen callus. In: Cell And Tissue culture techniques for cereal crop improvement. Proceedings of a workshop. Responsores by Institute of Genetic Academic Sinica. Science press. 2: 453-459.