



## PROYECTO DE TRABAJO DE DIPLOMA

Para Optar por el Título de Ingeniero Agrónomo

**Título:** Formación de callos en *Sorghum bicolor* (L.) Moench en las variedades cubanas CIAP 2 E-95 y CIAP 132R

**Diplomante:** Sabino Miguel Tejeda González

**TUTOR(s) :**

MsC.Silvio de Jesus Martinez Medina.

Dt C. Rafael Gómez Kosky

Cienfuegos

2012.

PENSAMIENTO.

---

SI ELIMINAMOS LO IMPOSIBLE, SEGURAMENTE  
EN LO QUE QUEDA HALLAREMOS LA  
SOLUCION.

CHERLOCH HOLMES

## DEDICATORIA

---

A mis Hijas

A mis Padres

A mi Esposa.

## AGRADECIMIENTOS.

-A MI TUTOR.

-A MI ESPOSA.

-A MIS HIJAS.

-A MIS PADRES.

-A MIS COMPAÑEROS DE ESTUDIOS.

-A MIS COMPAÑEROS DE TRABAJO.

-A MIS PROFESORES

-A LOS COMPAÑEROS DE LA BIOFABRICA DE CIENFUEGOS

-A TODOS LO QUE DE UNA FORMA U OTRA ME  
AYUDARON EN EL DESARROLLO DE MI INVESTIGACION.

MUCHAS GRACIAS.

## RESUMEN

---

Un protocolo eficiente de regeneración de plantas es requisito indispensable para desarrollar programas de mejoramiento mediante la transformación genética de plantas. El presente trabajo se desarrolló con el objetivo de formar callos en Sorgo variedades CIAP 2-E-95 y CIAP 132R. Como material vegetal se utilizaron plantas regeneradas *in vitro* vía organogénesis directa. Se cortaron segmentos del cilindro central de las vainas de las hojas de 0.5 cm de longitud y 0.3 cm de diámetro, se colocaron en el medio de cultivo semisólido con las sales MS, vitaminas Heinz, mio-inositol ( $100 \text{ mg l}^{-1}$ ), sacarosa ( $30 \text{ g l}^{-1}$ ), agar ( $8.0 \text{ g l}^{-1}$ ) y pH 5.7. Se estudiaron para la inducción de callos cuatro concentraciones de 2,4-D ( $0,2, 4,6 \text{ mg l}^{-1}$ ). Se evaluó el porcentaje de formación de callos y la aparición de compuestos fenólicos. Para reducir o eliminar los compuestos fenólicos se empleó como antioxidante el ácido ascórbico en cuatro concentraciones de ( $0,20,50,80 \text{ mg l}^{-1}$ ). Se cuantificó el número de explantes necrosados y la presencia de pigmentos oscuros en el medio de cultivo. Las sales MS con  $4,0$  y  $6.0 \text{ mg l}^{-1}$  de 2,4-D elevaron el porcentaje de inducción de callos hasta un 40 y 50 % en la variedades CIAP 2-E-95 y CIAP 132R respectivamente. Con la adición del ácido ascórbico al medio de cultivo en concentraciones de 20 y  $50 \text{ mg l}^{-1}$  se estimuló la formación de callos en las dos variedades. Este antioxidante aumentó el porcentaje de formación de callo, redujo la necrosis de los explantes y la emisión de pigmentos oscuros al medio de cultivo. Se observaron dos tipos de callos, unos compactos con superficies lisas y brillantes y otros blandos de coloración oscura. El sorgo se mostró como genotipo dependiente en su respuesta al 2,4-D y al ácido ascórbico para la formación de callo.

## INDICE.

INDICE	PAGINAS
I- Introducción	1
II- Revisión Bibliográfica	5
2.1 El <i>Sorgo</i> . Generalidades	5
2.1.1 Origen y distribución.	5
2.1.2 Ubicación taxonómica y descripción	6
2.1.3 Importancia económica y producción mundial del <i>Sorgo</i>	6
2.2 Características de las variedades CIAP 2 E-95 Y CIAP 132-R.	7
2.2.1 Propagación por cultivo <i>in vitro</i>	7
2.3 Embriogénesis somática	8
2.3.1 Origen de la embriogénesis somática	8
2.3.2 Características de la embriogénesis somática	8
2.3.3 Inducción de la embriogénesis somática	9
2.3.4 Factores que intervienen en el desarrollo de la embriogénesis	10
2.3.5 Influencia del genotipo	10
2.3.6 Reguladores del crecimiento	12
2.3.7 Condiciones de cultivo	12
2.3.8 Tipo y estado fisiológico del explante	13
2.4 Etapas de la embriogénesis somática	14
2.4.1 Inducción y formación de embriones somáticos	14
2.4.2 Proliferación de embriones somáticos	16
2.4.3 Maduración de embriones somáticos	17
2.4.4 Germinación y conversión de embriones somáticos	19
III- Materiales y Métodos	21
3.1. Efecto del 2,4-D sobre la formación de callos	21
3.2. Efecto de diferentes segmentos del brote <i>in vitro</i> sobre la formación de callo	22
3.3. Efecto del ácido ascórbico sobre la formación de callos	23
VI- RESULTADO Y DISCUSIÓN	24
4.1. Efecto del 2,4-D sobre la formación de callos	24
4.2. Efecto de diferentes segmentos del cilindro central de la vaina del brote <i>in vitro</i> sobre la formación de callos.	27
4.3 Efecto del ácido ascórbico sobre la formación de callos	29
V- Conclusiones	33
VI- Recomendaciones.	34

## 1- INTRODUCCIÓN

El sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) es una planta de metabolismo C-4 con alta eficiencia fotosintética, que se adapta bien a un entorno agroecológico cálido y seco en el que es difícil de cultivar otros cereales. Los sorgos (*Sorghum* spp.) agrupan unas 20 especies, oriundas de las regiones tropicales y subtropicales de África oriental.

Este cultivo tiene un empleo muy variado en la alimentación animal y humana. Como alimento animal se utiliza en la nutrición porcina, ganadera y aves de corral. Además se emplea como fibra y es un excelente recurso para la producción de alcohol (biocombustibles), por su alto contenido de azúcar. Su cultivo se ha generalizado, ocupa el quinto lugar entre todos los cereales y es la sexta especie más sembrada en el mundo. Según la Organización Mundial para la Alimentación (FAO) en todo el mundo se cultivan 45 millones de hectáreas de sorgo. Durante el ciclo agrícola 2010- 2011, su producción mundial ascendió a 63,53 millones de toneladas, de las cuales el 51% se utilizó como ingrediente para elaboración de alimento para el ganado, el 49% restante para la alimentación humana y su uso como materia prima en procesos industriales. Las variedades de sorgo de grano rojo CIAP 2 E-95 y CIAP 132R han sido evaluadas en campo y se encuentran en fase de generalización. Estas fueron liberadas y se generalizan en todo el país. Poseen adaptación tropical, tolerancia a enfermedades foliares, resistencia a sequía y se son aptas para la alimentación animal. Se caracteriza por su alto contenido de taninos. El alto contenido de taninos determina que la calidad y cantidad de la proteína del grano sea baja, así como la composición de aminoácidos (Jaramillo *et al.*, 1991).

Existen una serie de características como la baja calidad y cantidad de proteínas, ataque de aves y enfermedades que limitan su uso. Por esta razón se necesita de un programa de mejoramiento genético de estas variedades, que por métodos tradicionales se encuentra limitado por los largos períodos de selección, la complejidad de este carácter a mejorar y la influencia del medio ambiente. El uso de la biotecnología y específicamente la transformación genética facilita el mejoramiento de la calidad de la proteína del grano.

Además, la biotecnología asistida por marcadores moleculares acelera los procesos de selección y disminuyen los costos en el manejo de grandes poblaciones de plantas.

Para desarrollar exitosamente un programa de mejoramiento mediante transformación genética es necesario un eficiente y reproducible protocolo de regeneración de plantas. En sorgo se ha podido regenerar plantas mediante la organogénesis y embriogénesis somática. Los primeros trabajos para la regeneración de plantas vía embriogénesis somática en sorgo fueron realizados por Tomas *et al.*, (1977) y Gambor *et al.*, (1977). Por el proceso de la embriogénesis somática se pueden transformar embriones cigóticos inmaduros, regenerar plantas a partir de ellos y multiplicar de estas últimas.

En sorgo, para la regeneración de plantas a partir de callos se han usado varios tipos de explantes como son: inflorescencia inmadura, yemas apicales, embriones inmaduros, embriones maduros. Sin embargo, con ninguna de estas fuentes de explantes para la formación de callos se ha logrado una alta frecuencia de inducción y regeneración de plantas.

Se describen en la literatura científica una serie de limitantes de esta técnica del cultivo de tejidos relacionados con la inconsistente producción de callos con estructuras embriogénicas, especialmente a partir de explantes en avanzado estado de madurez en su desarrollo, lo que hacen largos los períodos de regeneración (MacKinnon *et al.*, 1986).

Se ha demostrado que a partir de callos con estructuras embriogénicas en especies monocotiledóneas son más difíciles de regenerar plantas que en las dicotiledóneas. Según Maheshwari *et al.* (2006) el sorgo es caracterizado dentro de las Poaceas como la especie de planta más difícil de manipular por cultivo de tejidos, es por ello, se ha considerado recalcitrante.

La regeneración vía embriogénesis somática depende del genotipo. En la mayoría de las especies el comportamiento de diferentes tipos de explantes depende de la edad del explante y la concentración de auxina en el medio de cultivo. Sin embargo, en el sorgo esta respuesta morfogenética no ha sido caracterizada en la mayoría de los trabajos publicados (Kishore *et al.*, 2006).

La baja eficiencia de formación de callos con estructuras embriogénicas según Jogeswar *et al.*(2007) ha sido reflejada en varios artículos científicos; así como la influencia del genotipo en la producción de callos y en la regeneración de plantas *in vitro*. Estos aspectos corroboran la necesidad de caracterizar cada genotipo y de un mejor ajuste de los protocolos de regeneración.

El principal problema descrito en los diferentes protocolos de regeneración en sorgo es la formación y presencia de compuestos fenólicos que pueden perjudicar la formación de los callos y la regeneración de plantas (Nguen *et al.*, 2007)

La literatura científica expone el uso del cultivo de tejidos como una herramienta para el mejoramiento genético de la mayoría de los cereales. Su uso se ha visto limitado por el hecho de que la regeneración de plantas a partir de varios explantes es de baja frecuencia y poca duración. Además, plantearon la necesidad de técnicas eficientes para obtener un gran número de plántulas, los que constituyen requisitos para la aplicación de la tecnología de transformación en el mejoramiento genético de este cultivo (MacKinnon *et al.*,1986).

.Aunque existen protocolos de regeneración de plantas vía embriogénesis somática en *Sorghum bicolor* (L) Moench, estos poseen baja eficiencia de para la formación de callos con estructuras embriogénicas, regeneración de plantas y son genotipos dependientes. Es por esto que se necesita establecer un protocolo de regeneración de plantas vía embriogénesis somática en las variedades cubanas CIAP 2 E-95 y CIAP 132R. Esto contribuirá al desarrollo de estrategias de mejoramiento genético del cultivo mediante transformación genética.

## HIPÓTESIS

La determinación del tipo de explante, concentraciones de 2,4-D y la concentración de ácido ascórbico, permitirán la formación de callos con estructuras embriogénicas en las variedades cubanas de sorgo [*Sorghum bicolor*, (L.) Moench.] CIAP 2- E 95. Y CIAP 132-R.

Objetivo general:

- Lograr la formación de callos en *Sorghum bicolor* (L.) Moench. en las variedades cubanas CIAP 2 E-95 y CIAP 132R a partir de segmentos de plantas *in vitro*.

Objetivos específicos:

- 1- Determinar las concentraciones de 2,4-D para la formación de callos en sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench en las variedades cubanas CIAP 2 E-95 y CIAP 132R.
- 2- Determinar las concentraciones de ácido ascórbico para reducir la formación de pigmentos oscuros durante la inducción de callos.
- 3- Definir la influencia de diferentes segmentos del cilindro central de la vaina de las hojas sobre la formación de callos.

## REVISION BIBLIOGRAFICA.

### 2.1 El *Sorgo*. Generalidades

Los *sorgos* (*Sorghum* spp.) son un género botánico de unas 20 especies de Poaceae oriundas de las regiones tropicales y subtropicales de África oriental. Se cultivan en su zona de origen, Europa, América y Asia como cereal para consumo humano, animal, en la producción de forrajes, y para la elaboración de bebidas alcohólicas. Su resistencia a la sequía y el calor lo hace un cultivo importante en regiones áridas, y es uno de los cultivos alimentarios más importantes del mundo.

El sorgo tropical (*Sorghum bicolor* L. Moench) es una de estas especies que presenta buena adaptabilidad y rendimientos aceptables, por lo que se le ha denominado “el cereal del siglo XXI”. A nivel mundial, a principio de los sesenta una gran producción de sorgo se empleaba directamente en la alimentación humana; mientras que en la actualidad la utilización de sorgo para el consumo animal se ha duplicado. En Cuba también es muy utilizado en la Agricultura Urbana como barreras para evitar la incidencia de plagas (Rodríguez *et al.* 2006). Al tratarse de un alimento carente de gluten, representa una opción nutritiva para las personas celíacas. Posee propiedades antidiarreicas, ó astringentes, y homeostáticas.

#### 2.1.1 Origen y distribución

Los primeros informes muestran que el sorgo existió en India en el siglo I d. C. Las esculturas que lo describen se hallaron en ruinas asirias de 700 años a. C. Sin embargo, el sorgo quizás sea originario de África Central (Etiopía o Sudán), pues es allí donde se encuentra la mayor diversidad. Esta disminuye hacia el norte de África y Asia. Existen, sin embargo, ciertas evidencias de que surgió en forma independiente tanto en África como en la India.

El sorgo como cultivo doméstico llegó a Europa aproximadamente en el año 60 d. C. pero nunca se extendió mucho en este continente. Se introdujo la planta por primera vez en América en el siglo XVIII. Las primeras semillas probablemente se llevaron al hemisferio Occidental en barcos de esclavos procedentes de África. Se considera que muchas especies distintas se cultivan de forma esporádica en países de América, y que los sorgos actuales son híbridos de esas introducciones o de mutantes que han aparecido. (Sasaki y Antonio 2009)

## 2.1.2 Ubicación taxonómica y descripción

### La clasificación taxonómica del sorgo

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Liliopsida
Orden	Poales
Familia	Poaceae
Sub-Familia	Panicoideae
Tribu	Andropogoneae
Genero	<i>Surghum</i> <i>Moench.</i>

### Descripción del Género

El sorgo se conoce con varios nombres: mijo grande y maíz de guinea en África occidental, kafir en África austral, duro en el Sudán, mtama en África oriental, iowar en la India y kaoliang en China (Duke, 1983).

Se le denominó sorgo por la capacidad de crecer hasta alcanzar una altura elevada; el nombre procede del latín *surgere*.

### 2.1.3 Importancia económica y producción mundial del Sorgo

Este cultivo tiene un empleo muy variado en la alimentación animal y humana. Se utiliza en la alimentación porcina, ganadera, aves de corral, así como materia prima en las industrias almidónelas y alcoholeras (Bennet, 2000).

Su cultivo se ha generalizado, ocupando el quinto lugar entre todos los cereales y la sexta cosecha más sembrada en el mundo detrás del trigo, arroz, maíz, soya y cebada (Gnansounou *et al.* 2005). Según la FAO en todo el mundo se cultivan más de 45 millones de ha, con una producción mundial en el ciclo agrícola 2007-2008 de 63.53 millones de toneladas, cifra superior en 6.90 millones de toneladas a la registrada en el año anterior. Las estimaciones de producción para el ciclo 2010-2011 son de 63.79 millones de toneladas, unos 4 millones de toneladas más que lo producido en la campaña 2009- 2010. Se estima que el 51% de la producción se utiliza como ingrediente para elaboración del alimento para el ganado, el 49% restante para la alimentación humana y su uso como materia

prima en procesos industriales(Saucedo 2008).

## 2.2 Características de las variedades CIAP 2 E-95 Y CIAP 132-R

Las variedades CIAP 2 E-95 y CIAP 132R fueron donadas por la UNAM (Universidad Nacional Autónoma de Monte Rey) e introducidas en Cuba en 1990. Estas son producto de un ensayo de variedades, probada en más de 5 países de América Latina. El grupo de mejoramiento genético, producción de semillas, de granos y cultivos industriales, perteneciente al Centro de Investigaciones Agropecuarias (CIAP) de la Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Cuba, después de varios años de trabajo (1992-1995) y mediante la evaluación de campo y fase de extensión y generalización las recomienda y libera. Poseen adaptación tropical, son aptas para la alimentación animal. Poseen características agronómicas deseables, presenta alto potencial de rendimiento agrícola (Perez *et al.*,2010).

### 2.2.1 Propagación por cultivo *in vitro*

El uso de la biotecnología y específicamente la transformación genética facilita el mejoramiento de la calidad de la proteína del grano (Zhao *et al.*, 2000). Además la biotecnología asistida por marcadores moleculares acelera los procesos de selección y disminuye los costos en el manejo de grandes poblaciones de plantas (Chadrakanth *et al.*, 2002).

Para desarrollar exitosamente un programa de mejoramiento mediante transformación genética es necesario un eficiente y reproducible protocolo de regeneración de plantas (Gendy *et al.*, 1995). En sorgo se ha podido regenerar plantas mediante la organogénesis y embriogénesis somática. Los primeros trabajos para la regeneración de plantas vía embriogénesis somática en sorgo fueron realizados por Tomas *et al.*, (1977) y Gambor *et al.*, (1977).

En sorgo para la regeneración de plantas a partir de callos se han usado varios tipos de explantes como son: inflorescencia inmaduras (Jogeswar *et al.*, 2007), yemas apicales (Maheswari *et al.*, 2006 ), embriones inmaduros (Gupta *et al.*, 2006), embriones maduros (Zhao *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2010). Sin embargo, con ninguna de estas fuentes de explantes para la formación de callos se ha logrado una alta frecuencia de inducción y regeneración de plantas. En la literatura científica se describen una serie de limitantes del cultivo de tejidos relacionados

con la formación de callos con estructuras embriogénicas, especialmente a partir de explantes en estado avanzado de madurez en su desarrollo, lo que hacen largos los períodos de regeneración (MacKinnon *et al.*, 1986).

Se ha descrito que la regeneración de Plantas a partir de callos con estructuras embriogénicas es más difícil en especies monocotiledonias que en dicotiledóneas. El sorgo ha sido caracterizado dentro de las Poaceas como la especie de planta más difícil de manipular por cultivo de tejidos. Por ello, se ha considerado recalcitrante (Gupta *et al.*, 2006); (Kisore *et al.*, 2006), (Maheshwari *et al.*, 2006).

### 2.3 Embriogénesis somática

La embriogénesis somática es la formación de un embrión a partir de una célula, sin necesidad de la fusión de gametos (Tisserat *et al.*, 1979). En la naturaleza este fenómeno artificial es conocido como una forma de apomixis llamada embrionía adventicia. Fue descrita por (Strasburg, 1978), aunque fueron Reinert *et al.* (1958) quienes por vez primera la describieron. Según Haccius (1978) esta tiene un origen unicelular en algunos cultivos, sin embargo existen criterios que señalan que todos los embriones no pueden tener un origen unicelular por lo que se plantea el origen pluricelular (Williams y Maseswaran, 1986).

#### 2.3.1 Origen de la embriogénesis somática

Las primeras investigaciones de la embriogénesis somática fueron realizadas por Reinert (1958) y Steward *et al.* (1958). en zanahoria (*Daucus carota* L.). La inducción del crecimiento embriogénico parece ocurrir mediante los embriones somáticos que se puedan formar directamente sobre la superficie de un tejido organizado como una hoja, segmento de tallo, embrión cigótico, protoplastos, microsporas (es decir, implica la existencia de células somáticas predeterminadas que necesitan las condiciones permisibles para expresarse).

#### 2.3.2 Características de la embriogénesis somática

Entre las características más distintivas del embrión somático según Escalant y Teissant (1989) se encuentran su autonomía frente al tejido generador (protegido generalmente por una epidermis). Histológicamente se plantea que no tiene conexión vascular con el tejido que le dio origen, por lo que pueden ser separados fácilmente de este. Presenta una estructura bipolar. Además presenta bandas procambiales entre los ápices.

### 2.3.3 Inducción de la embriogénesis somática

Dentro de una planta todas las células somáticas contienen la información genética necesaria para formar una planta completa y funcional. La expresión temporal y espacial de los genes es generalmente regulada para permitir la diferenciación de varios sistemas de órganos, así como el desarrollo de una planta (Gómez, 1998). Según Sharp *et al.* (1984). La inducción de la embriogénesis somática consiste en la terminación del patrón de expresión de los genes presentes en el tejido del explante, los cuales son reemplazados con un programa de expresión de genes o gen de la embriogénesis de aquellas células del tejido del explante, que pudieran dar lugar a embriones somáticos.

Al igual que ocurre con los embriones cigóticos, los embriones somáticos inactivos pueden ser inducidos, por lo tanto, un largo plazo de almacenamiento es posible. A pesar del gran potencial que ofrece la embriogénesis somática esta posee un grupo de limitaciones en primer lugar el desarrollo de embriones somáticos tiende a ser no- sincrónico (Zimmerman, 1993). Por lo tanto los embriones de todas las etapas pueden estar presentes en el proceso. Sin embargo, Fujimura y Komamine, (1979) demostraron que el desarrollo de embriones somáticos en la zanahoria podría ser sincronizado por agrupamientos de agregados celulares de similar tamaño y la densidad del cultivo en suspensión con el tamizado y la centrifugación en gradientes de densidad.

Aunque la sincronización de los embriones somáticos puede ser lograda con el uso de estas estrategias, parece que el porcentaje de embriones somáticos regenerados se ve afectado por el tamaño de los agregados celulares en gradientes de densidad. A pesar de este fenómeno, la embriogénesis somática seguiría siendo un sistema de propagación más eficiente que la micropropagación convencional. Por ejemplo, la tasa de formación de un embrión somático de plátano en suspensión, donde se puede obtener más de 100.000 de embriones somáticos por ml de células sedimentadas (Cote *et al.*, 1996).

#### 2.3.4 Factores que intervienen en el desarrollo de la embriogénesis somática

En *Sorghum bicolor*, la capacidad de producir embriones somáticos y su diferenciación en las plántulas verdes en el transcurso de la embriogénesis somática se encontró que era muy influenciada por muchos factores, tales como el genotipo, órgano / explante del cual se deriva, el estado fisiológico del explante, su tamaño y los reguladores de crecimiento vegetal utilizado en el medio de cultivo, las orientaciones del explante sobre el medio de cultivo, (Sudhakar *et al.*, 2007).

En la literatura científica consultada este cereal se categoriza como una de las especies monocotiledónea más difícil para manipular en el cultivo de tejido y la regeneración de plantas (Gao *et al.*, 2005; Kishore *et al.*, 2006; Maheswari *et al.*, 2006). Los factores que más influyen de forma negativa en la regeneración de planta de Sorgo vía embriogénesis somática son: el genotipo., la producción de compuestos fenólicos.

#### 2.3.5 Influencia del genotipo

La baja eficiencia de formación de callos con estructuras embriogénicas ha sido reflejada en varios artículos científicos; así como la influencia del genotipo en la producción de callos y en la regeneración de plantas *in vitro* (Ma *et al.*, 1987; Keappler y Pederson, 1997; Jogeswar *et al.*, 2007). Estos aspectos corroboran la necesidad de estudiar cada genotipo y un mejor ajuste de los protocolos de regeneración. Keappler y Pederson, (1997) con el objetivo de identificar callos con capacidad embriogénica observaron entre los 40 genotipos estudiados una baja eficiencia de regeneración, pues solo 12 producían callos con capacidad embriogénica. La capacidad de regeneración de 11 genotipos de sorgo que crecían en medio de cultivo MS, con citoquininas (Zeatina y 6-Bencilaminopurina) fue estudiada por Hagio (2002). Ellos encontraron que solo dos genotipos presentaron alta frecuencia de inducción y regeneración.

##### Medio de cultivo

El medio de cultivo más extensamente utilizado para la embriogénesis somática de especies ornamentales monocotiledóneas, ha sido el propuesto por Murashige y Skoog (1962) (MS). El nitrógeno inorgánico representa una fuente fácilmente

asimilable que puede ser significativa en el mantenimiento del crecimiento de las células en cultivo a veces cuando los mecanismos de asimilación de nitrato y amonio no son completamente operativos (Samoylov *et al.*, (1998). Estos mismos autores, determinaron que son cuatro los factores que afectan la formación de embriones somáticos en cultivos embriogénicos: el contenido de carbohidratos, la presión osmótica, el contenido de nitrógeno total y el índice amonio:nitrato en el medio de cultivo. De igual forma, Zaidi *et al.* (2000) mencionan que el nitrógeno en el medio de cultivo es importante, cualitativa y cuantitativamente en la inducción de la embriogénesis somática. Por otra parte, Mashayekhi (2000) señaló que el requerimiento de nitrógeno reducido en la inducción de los embriones somáticos se debe a que estos carecen de la nitrato reductasa, la cual reduce el nitrato a nitrito. Mientras Malinowski y Filipecki (2002) refieren que el establecimiento de un cultivo depende de varios factores, los cuales pueden ser modificados al variar algunos componentes del medio de cultivo como son los reguladores del crecimiento, las sales minerales como el calcio y el hierro, los azúcares y las vitaminas como la Tiamina (B1), Cianocobalamina (B12) y Tocoferol (E).

La adición de aminoácido al medio de cultivo como la L-asparagina, L-prolina y L-glutamina y serina ( $1000 \text{ mg l}^{-1}$ ) contribuye a mejorar la formación de callos embriogénicos y la regeneración en sorgo a partir de embriones cigóticos inmaduros.

(Pola *et al.*, 2007).

Una de las razones para la exigencia de nitrógeno en la inducción de embriones Somáticos puede ser la falta de la enzima nitrato reductasa en los embriones jóvenes que es la encargada de reducir el nitrato a nitrito (Monnier, 1990).

El nitrógeno orgánico se corresponde con una fuente de nitrógeno fácil de incorporar que puede ser importante en apoyar el crecimiento de células en cultivo en que los mecanismos de asimilación de nitrato y amonio no están funcionando completamente. La adición de aminoácido al medios de cultivo con el objetivo de incrementar la eficiencia del cultivo de tejidos en los cereales ha sido descrita por O'Kennedy *et al.* (2004).y Asad *et al.* (2009) refirió la regeneración eficiente mediante la inclusión de aminoácidos en el medio de regeneración de la caña de azúcar.

### 2.3.6 Reguladores del crecimiento

El 2, 4-D es el regulador de crecimiento más utilizado para la formación de callos en *sorghum*, generalmente se emplea en bajos niveles para la inducción de callo (Hagio, 1994). Manjula *et al.*, (2000) y Bi *et al.* (2007) informaron que los cereales en general requieren 2,4-D para iniciar los cultivos de callos sin embargo concentraciones altas de este regulador de crecimiento han afectado la formación de callos embriogénicos (Lu *et al.*, 1983). Una tendencia similar fue observada por Sudhakar *et al.*, (2007) quienes encontraron que  $2 \text{ mg l}^{-1}$  fue la concentración óptima para obtener una alta frecuencia de callos embriogénicos y que la combinación de auxinas con citoquininas, estimularon la formación de callos embriogénicos.

Una característica distintiva de la formación de callos en los cereales y las Poaceas es la formación de dos tipos diferentes de callos, Los callos embriogénicos y no embriogénicos difieren notablemente en su potencial regenerativo. Los callos embriogénicos se diferencian en una fase muy temprana formando embriones somáticos, mientras que los no embriogénicos tienen crecimiento lento. Gupta *et al.* (2006) sugieren complementar los medios de inducción de callos con fuertes citoquininas como la kinetina.

La tasa de asimilación de los callos embriogénicos depende de la concentración de auxina. Las altas concentraciones de auxinas en el medio de inducción de callos pueden ser desfavorables para acelerar el crecimiento de los callos embriogénicos. La respuesta del cultivo a las concentraciones de auxinas está influenciada por el genotipo (Caí y Butler 1990).

### 2.3.7 Condiciones de cultivo

La inducción de callos y la regeneración de plantas en sorgo mejoran su eficiencia usando como explantes embriones cigóticos inmaduros. Por medio de las condiciones de cultivo adecuadas, como la selección de genotipos, tamaño del explante, medio de cultivo, la concentración de sus componentes, así como otros factores ambientales como la temperatura y la intensidad de la luz han mejorado la

inducción de callos embriogénicos y la frecuencia de regeneración (Sudhakar *et al.*,2007)

### 2.3.8 Tipo y estado fisiológico del explante.

Se ha descrito, en sorgo bicolor la capacidad de producir embriones somáticos y la diferenciación de estos en plantas es conocido que esta vía de regeneración está influenciada por el órgano donante del explante, su tamaño y estado fisiológico. En la regeneración de plantas de sorgo a partir de callos se han usado varios tipos de explantes como son: inflorescencia inmaduras (Jogeswar *et al.*, 2007), yemas apicales (Maheswari *et al.*, 2006 ), embriones cigóticos inmaduros (Gupta *et al.*, 2006), embriones cigóticos maduros (Zhao *et al.*,2008), (Zhao *et al.*,2010), Sin embargo, con ninguna de estas fuentes de explantes para la formación de callos se ha logrado una alta frecuencia de inducción y regeneración de plantas.

La respuesta de los diferentes tipos de explantes a la regeneración de plantas vía embriogénesis somática en la mayoría de las especies depende de la edad del explante y la concentración de auxina; sin embargo en el sorgo esta respuesta morfogenética no ha sido caracterizada en la mayoría de los trabajos La influencia del nitrógeno y el fósforo en la inducción de callos embriogénicos, obtenidos a partir de embriones cigóticos inmaduros e inflorescencias jóvenes han sido estudiadas para diferentes especies de sorgo bicolor. (Elkonin y Pakhomova, 2000). Estos autores encontraron en algunos genotipos un aumento de la inducción y crecimiento de los callos embriogénicos y sus habilidades de regeneración.

Los embriones cogóticos inmaduros e inflorescencias inmaduras han sido frecuentemente utilizados como fuente de explante en cultivos *in vitro* y la transformación genética de sorgo (Hagio, 2002; Jogeswar *et al.*, 2007; Gurel *et al.*, 2009), pero por lo general es difícil para obtener materiales durante todo el año y en las etapas adecuadas para el cultivo de tejidos. No ocurre así con la disponibilidad y abundancia de las semillas maduras. Sin embargo, las semillas maduras se consideran difíciles de establecer en el cultivo de tejidos, debido a los riesgos de contaminación por microorganismos. Zhao *et al.* (2008) utilizó semillas de sorgo dulce 'Cowley' y 'M81E "como explantes para investigar la inducción de callos y regeneración de las plantas y se encontró que el callo formado a partir de

las semillas podría regenerarse en plántulas y que los componentes de los medios de cultivo son importantes para la inducción de callos y regeneración de plantas

#### 2.4 Etapas de la embriogénesis somática

La embriogénesis somática es un sistema ideal para estudiar los procesos de diferenciación a partir de una célula simple hasta la formación de una planta, así como también los mecanismos de la expresión de la totipotencia en las células vegetales (Komamine *et al.*, 2005). Von Arnold *et al.* (2002) menciona que el desarrollo de un sistema experimental para la regeneración de plantas vía embriogénesis somática incluye las siguientes etapas: Inducción y formación de embriones somáticos, desarrollo de embriones somáticos, proliferación de embriones somáticos, maduración de embriones somáticos, germinación y conversión en plantas.

##### 2.4.1 Inducción y formación de embriones somáticos

La primera etapa en el procedimiento de cultivo involucra la inducción de células competentes para formar estructuras proembriogénicas que directa o indirectamente forman embriones somáticos. Komamine *et al.* (2005) trabajando con suspensiones celulares en zanahoria (*Daucus carota* L.) observaron los eventos descritos por Fujimura y Komamine (1980) en esta especie y mencionaron que existen cuatro etapas en la embriogénesis somática. Las etapas 0, 1, 2 y 3 que pueden ser reconocidas desde los estados tempranos de la embriogénesis.

Durante la etapa 0, la célula competente aislada por continuas divisiones forma los agregados celulares embriogénicos (estado 1), en presencia de auxina en el medio de cultivo. En esta fase, los agregados de células formados a partir de células aisladas ganan la habilidad para desarrollar embriones cuando la auxina es eliminada del medio de cultivo y da lugar al estado 1 de agregados celulares anteriormente señalado.

La etapa 1 es inducida por la transferencia de los agregados celulares en estado 1 al medio de cultivo libre de auxina. Durante la etapa 1, la proliferación de los agregados es relativamente lenta y aparentemente sin diferenciación durante los tres días después de transferidos a medio de cultivo sin auxina. Después de la etapa 1 ocurre una rápida división a los tres o cuatro días de cultivo [polarización

de la síntesis del ácido desoxirribonucleico (ADN)] en ciertas partes del agregado celular dando lugar a la formación del embrión somático en etapa globular. Esta etapa es designada como etapa 2, donde el tiempo de división de una célula es de solamente 6,3 horas en relación con la fase 1 donde es de 51 horas y de 36 horas en la etapa 3. En esta etapa ocurre una rápida división celular en ciertas partes del agregado celular debido a la polarización de la síntesis de ADN, lo que da lugar al embrión globular y su suspensor en la zona que no ocurrió división. En la etapa final, etapa 3, hay un continuo desarrollo del embrión a las etapas de corazón y torpedo.

Fujimura y Komamine (1980) mencionaron que para las especies monocotiledóneas existen las etapas 0, 1 y 2; pero la 3 no, pues no se diferencian a etapas de corazón y torpedo, sino que el embrión globular sufre un proceso de transición (etapas escutelar y coleoptilar), en el cual se alarga hasta llegar a formarse el embrión somático maduro.

Los embriones somáticos se pueden formar indirectamente a partir de callos. En estos casos se necesita emplear un medio de cultivo complejo, incluyendo elementos adicionales para inducir la desdiferenciación y reiniciación de la división celular de las células diferenciadas antes que ellas expresen su competencia embriogénica (Féher *et al.*, 2003).

Las células embriogénicas se desarrollan cuando las condiciones experimentales permiten que éstas expresen su potencial. En general, ocurren cuando se reducen las cantidades de la relación auxina-citocinina o cuando hace falta más auxina. Esto puede demostrarse en sistemas *in vitro* donde las células somáticas vegetales pueden recuperar su totipotencia y formar embriones a través del desarrollo de la embriogénesis somática (Raghavan, 2000).

Autores como Souter y Lindsey, (2000) mencionaron que la etapa de formación y diferenciación de los embriones es crucial, aquí se determinan y especifican los patrones de polaridad del eje apical-basal para el desarrollo de los ápices caulinar y radicular del embrión somático.

En otras especies monocotiledóneas, como trigo (*Triticum aestivum* L.) obtuvieron un incremento en la formación de callo con estructuras embriogénicas (92,20%) cuando se sustituyó 10  $\mu$ M de 2,4-D por 1,0  $\mu$ M de (AIA) después de 22 días de

iniciado el cultivo. Por otra parte, Özgen y Birsin, (2002) en genotipos de avena (*Avena sativa* L.) indujeron la formación de callos en embriones cigóticos inmaduros (95,0%) y embriones cigóticos maduros (88,3%) con una concentración de 9,05  $\mu$ M de 2,4-D. Los mismos autores mencionaron que la respuesta estuvo fuertemente influenciada por el genotipo.

Por su parte, Ravishankar y McComb, (2002) observaron el desarrollo de los embriones somáticos en sándalo (*Santalum album* L.) cuando utilizaron una concentración de 4,5  $\mu$ M de tidiazurón [1-fenil-3-(1,2,3-tidiazol-5-il-urea] (TDZ) en un medio de cultivo MS con 3,0% de sacarosa, donde se obtuvieron un promedio de 14,23 embriones somáticos por explante.

Por otro lado, Nakano *et al.* (2004) en *Tricyrtis* spp., formaron callos con estructuras embriogénicas (61,4%) a partir de filamentos empleados como explantes que fueron cultivados sobre un medio de cultivo MS con la concentración de las sales al 50%. Al medio de cultivo le fue adicionado 4,5  $\mu$ M de 2,4-D y 0,45  $\mu$ M de Tidiazurón (TDZ). Los mismos autores, informaron que los callos fueron transferidos a un medio de cultivo libre de reguladores de crecimiento y allí, se inició el desarrollo de los embriones somáticos y la cantidad de los mismos varió de 50 hasta 500. Por otra parte, Komamine *et al.* (2005) indicaron que cuando las células somáticas expresan su potencial embriogénico y son cultivadas en un medio de cultivo libre de auxinas ellas se elongan y se diferencian, dando lugar a la siguiente fase.

#### 2.4.2 Proliferación de embriones somáticos

La habilidad de los cultivos embriogénicos de muchas especies de proliferar y multiplicarse indefinidamente constituye uno de los aspectos de la embriogénesis somática que permite su aplicación en la propagación masiva de plantas y en la transferencia de genes (Merkle *et al.*, 1997). El proceso de multiplicación ha recibido varios términos como embriogénesis somática secundaria, recurrente o repetitiva. La embriogénesis somática secundaria o repetitiva es el paso que permite un potencial multiplicativo para la propagación masiva clonar, producción de metabolitos, lípidos y proteínas (Puigderrajols *et al.*, 2001). En híbridos intraespecíficos de *A. andraeanum* después de ocho semanas de cultivo, se

observó el desarrollo de embriones somáticos secundarios sobre los embriones somáticos primarios formados (Kuehnle *et al.*, 1992).

Ravishankar y McComb, (2002) en una especie ornamental como el sándalo (*Santalum album* L.) lograron la producción de embriones somáticos secundarios a partir de embriones somáticos primarios (91,6%) cuando estos fueron subcultivados por un período de cuatro meses sobre un medio de cultivo de inducción con 6-bencilaminopurina (6-BAP) o TDZ. Cuando los embriones somáticos secundarios fueron separados de los embriones somáticos primarios y cultivados sobre medio de cultivo MS con o sin AIA (2,8-5,7  $\mu$ M) se formaron entre 15-20 embriones somáticos secundarios por embrión somático primario.

Por otra parte, Li *et al.* (2002) en rosa (*Rosa hybrida* L.) cultivares 'Carefree Beauty' y 'Gran Gala' y en *R. chinensis minima* cultivar 'Red Sunblaze', lograron la producción de embriones somáticos secundarios con una concentración de 3,9  $\mu$ M de ABA en el medio de cultivo. De la misma manera, la embriogénesis somática secundaria ha sido descrita en rosas (*Rosa hybrida* L.) cultivar 'Kardinal' por Kamo *et al.* (2005), quienes encontraron que el ácido abscísico (ABA) fue más efectivo para la inducción de embriones somáticos secundarios que 6-Benciladenina (BA) o TDZ. Los mismos autores señalan que, el TDZ es más efectivo que BA en la inducción de callos con estructuras embriogénicas, pero es menos efectivo en la inducción de la embriogénesis secundaria y en la germinación de los embriones somáticos.

#### 2.4.3 Maduración de embriones somáticos

La fase de maduración es el período en el desarrollo del embrión somático en el cual ocurre la expansión celular y la acumulación de sustancias de reserva y se adquiere tolerancia a la deshidratación (Raghavan, 2003). En esta fase el nitrógeno es fundamental en el medio de cultivo, siendo necesaria la adición de nitratos, amonio y aminoácidos. McKersie y Bowley, (1996) encontraron que al añadir prolina al medio de cultivo se favorece el número y el tamaño de los embriones somáticos de alfalfa (*Medicago sativa* L.) en etapas avanzadas, de desarrollo mientras que la glutamina y la arginina sólo incrementan el tamaño del embrión somático. De la misma forma, Perán-Quesada *et al.* (2004) refieren que la correcta acumulación de reservas conlleva a un incremento en la masa seca de

los embriones somáticos lo que indica una alta calidad en el vigor e influye positivamente en su posterior germinación.

Autores como Johnson *et al.* (1997) han enfatizado en que los carbohidratos juegan múltiples roles entre los cuales se incluyen el suministro de una fuente de carbono y energía, que causa un efecto osmótico y también influye en el proceso de maduración de los embriones somáticos por la regulación directa de la expresión génica. La adición de carbohidratos como la sacarosa en concentraciones que van de 30,0  $\text{gl}^{-1}$  a 60,0  $\text{gl}^{-1}$ , son esenciales en el medio de cultivo, lo que permite una maduración total y evita la germinación precoz del embrión somático (Merkle *et al.*, 1995).

En abeto blanco (*Picea glauca* [Moench.] Voss) y abeto negro (*Picea mariana* [Mill.] BSP) altas concentraciones de sacarosa en el medio de cultivo de maduración han mejorado la cantidad y el desarrollo de los embriones somáticos Sreedhar *et al.* (2002) en estudios realizados en alfalfa en un medio de cultivo DTP (Promoción de la Tolerancia a la Deshidratación) el cual contenía un medio basal SH (Schenk y Hildebrant, 1972), 50,0  $\text{gl}^{-1}$  de sacarosa y ABA (20,0  $\mu\text{M}$ ) encontraron que la germinación de los embriones somáticos fue mayor de 70,0% al añadir este regulador de crecimiento durante los tratamientos de deshidratación, lo cual sugiere que este juega un papel en el fenómeno de maduración bajo condiciones de humedad parcialmente reducidas. La adición de este regulador durante la fase de maduración del embrión somático promueve la acumulación de sustancias de reserva; esto, seguido de un apropiado tiempo de secado, puede lograr un mejor crecimiento y desarrollo del embrión somático. Sin embargo, en algunas especies no es necesaria la deshidratación para lograr una buena germinación (Hernández *et al.*, 2003).

Sánchez-Romero *et al.* (2002) en embriones cigóticos de aguacate (*Persea americana* Mill.) señalaron que las variaciones encontradas en el contenido de carbohidratos, indicaron el inicio de la fase de maduración mientras la acumulación de proteínas específicas marcó la terminación de este proceso y consecuentemente el logro de una madurez fisiológica, lo cual permite al embrión enfrentar el proceso de germinación.

De la misma forma, Perán-Quesada *et al.* (2004) en aguacate (*Persea americana* Mill.) cv. Anaheim, observaron que con una concentración de 60,0  $\text{gl}^{-1}$  de sacarosa en el medio de cultivo se incrementó el porcentaje y el número de embriones somáticos que germinaron.

#### 2.4.4 Germinación y conversión de embriones somáticos.

La acumulación de productos de reserva para la germinación del embrión somático juega un papel esencial, suministrando compuestos que serán utilizados hasta que las plántulas alcancen su desarrollo autotrófico y puedan sobrevivir (Sánchez-Romero *et al.*, 2002).

Según, Söndahl *et al.* (1991) y Dupuis *et al.* (1999) el término germinación se refiere al crecimiento del meristemo del ápice caulinar y el meristemo del ápice radicular de los embriones somáticos en condiciones *in vitro* y puede ser considerada germinación total si el crecimiento del ápice caulinar y radicular se producen simultáneamente o parcial si el embrión somático solo emite ápice caulinar o ápice radicular.

La adición de citoquininas en el medio de cultivo según Merkle *et al.* (1995) es importante para estimular la germinación, estas contrarrestan el efecto provocado por las auxinas durante la formación y la multiplicación de los embriones somáticos. En ocasiones, al colocar los embriones somáticos directamente de las condiciones de maduración a germinación no se han alcanzado resultados esperados en cuanto a la germinación de los mismos.

En la primera fase de la germinación ocurre la hidrólisis de las proteínas a aminoácidos, los cuales son transportados e incorporados al embrión somático para su desarrollo. Estos aminoácidos son empleados en los procesos de síntesis enzimática durante el crecimiento del embrión somático (Garin *et al.* (2000). Algunos autores, sugieren el empleo de tratamientos con temperaturas frías, desecación y aplicaciones de ácido giberélico durante la fase de maduración para mejorar la germinación de los embriones somáticos (Das *et al.*, 2002). Se ha informado que la germinación y la regeneración en plantas a partir de embriones somáticos es baja en muchas especies, debido a las anomalías estructurales que pueden presentar los embriones somáticos durante su desarrollo (Lee *et al.*, 2002).

En especies ornamentales monocotiledónea según Ravishankar y McComb, (2002) la germinación de los embriones somáticos ocurrió después de seis semanas sobre un medio de cultivo MS con la concentración de las sales al 50% y la adición de 2,8µM de ácido giberélico (AG<sub>3</sub>). Los embriones somáticos que no fueron cortados del embrión cigóticos original antes de ser transferidos al medio de cultivo de germinación presentaron una parte del hipocotilo más elongada sin una formación bien definida de la radícula.

Nakano *et al.* (2004) evaluaron diferentes genotipos de *Tricyrtis* spp. (*Liliaceae*) y promovieron la germinación de los embriones somáticos cuando estos fueron sub cultivados sobre un medio de cultivo libre de reguladores de crecimiento. Las plantas fueron aclimatizadas y exitosamente trasplantadas a condiciones *ex vitro* en el invernadero.

Según, Stasolla y Yeung (2003) señalan que conversión se refiere al crecimiento de un ápice caulinar funcional y un sistema radicular, proceso a través del cual se producen plántulas viables. Por otra parte, Shihe *et al.* (2005) mencionan que conversión se refiere a la supervivencia y desarrollo de las plantas producidas *in vitro* a partir de embriones somáticos pero en condiciones ambientales o *ex vitro* que presentan una etapa de desarrollo autotrófico. En el glosario de la Organización para la Alimentación (FAO), se refiere a conversión como el desarrollo de una planta a partir de un embrión somático (FAO, 2006).

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se realizó en la Biofábrica perteneciente al Ministerio de la Agricultura de la provincia de Cienfuegos, durante el período comprendido entre enero de 2011 a marzo de 2012.

#### *Procedimientos generales*

Los medios de cultivo utilizados se especifican en cada experimento. Se dosificaron 30 ml de medio de cultivo en frascos de vidrio con un volumen total de 250 ml. El pH fue ajustado antes de la esterilización a 5,8 con soluciones de NaOH y HCl (0,1N). Como agente gelificante se utilizó el agar<sup>®</sup>(Sigma) a razón de 8,0 g l<sup>-1</sup>. La esterilización se realizó en autoclave a una temperatura de 121 °C y 1,2 kg.cm<sup>-2</sup> de presión, durante 20 min. Todos los experimentos se realizaron bajo condiciones de oscuridad constante y a una temperatura de 28±2 °C.

#### Procesamiento estadístico.

Fue utilizado un diseño experimental completamente aleatorizado y se emplearon 20 réplicas en cada experimento con cinco muestras en cada una de ellas. Los datos fueron procesados estadísticamente, mediante el paquete estadístico SPSS versión 16. Para la comparación de las medias se utilizó la *prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis/Mann Whitney* para  $p < 0,05$ , con previa comprobación de la distribución normal y homogeneidad de varianzas.

#### 3.1. Efecto del 2,4-D sobre la formación de callos.

Con el objetivo de determinar las concentración de 2,4-D para la formación de callos de sorgo en las variedades cubanas CIAP 2 E-95 y CIAP 132R. Se emplearon diferentes concentraciones de 2,4-D [0(Control), 2, 4 y 6 mg l<sup>-1</sup>] fueron adicionadas al medio de cultivo con las sales propuestas por Murashige y Skoog (1962) (MS), 100,0 mg l<sup>-1</sup> de mio-inositol y las vitaminas MS modificadas.

Se utilizaron como explante inicial brotes *in vitro*, en fase de multiplicación. Se eliminó la base del brote *in vitro* (1.0 – 2.0 cm) y se tomó el cilindro de la vaina de las hojas aproximadamente de 0.5 cm de largo más próximo a la base del brote. (Figura 1).

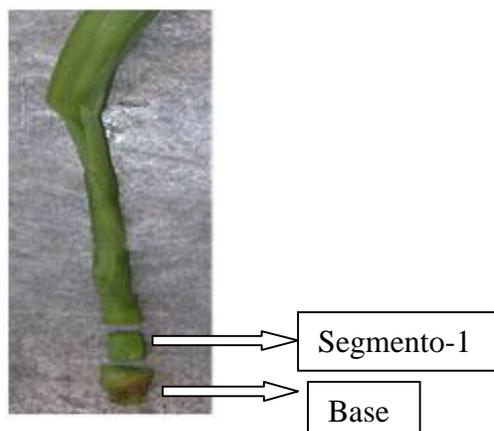


Figura 1. Segmentos del cilindro de la vaina de las hojas del brote *in vitro* de *Sorghum bicolor* (L) Moench variedades CIAP 2- E- 95 y CIAP 132R empleados como explantes para evaluar el efecto del 2,4-D sobre la formación de callos.

Fueron evaluados los siguientes aspectos a los 45 días de cultivo:

- Formación de callos.
- Oxidación fenólica.

### 3.2. Efecto de diferentes segmentos del brote *in vitro* sobre la formación de callo.

Tuvo como objetivo determinar el efecto de diferentes segmentos del brote *in vitro* sobre la formación de callo. Se emplearon como medio de cultivo la mejor variante del acápite anterior para cada variedad y se seleccionaran brotes *in vitro* de más de 0.3 mm de diámetro y 0,5 cm de longitud, cuyas vainas de las hojas fueron cortadas en tres segmentos, con la base de la planta como se muestran en la figura 1.

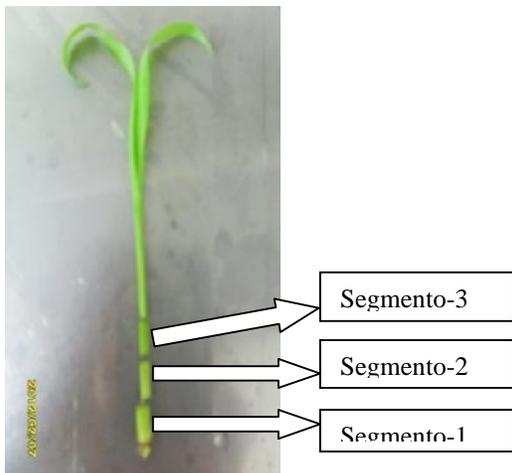


Figura 2. Diferentes segmentos del cilindro de la vaina de las hojas de plantas *in vitro* de *Sorghum bicolor* (L) Moench variedades CIAP 2- E- 95 y CIAP 132 R empleados como explante en la formación de callos.

- Segmento 1: Se tomó parte de la base de las plantas *in vitro* que contiene el meristemo vegetativo y un cilindro de la vaina de las hojas aproximadamente de 0.5 cm de longitud.
- Segmento 2: Por encima del segmento uno (segmento más próximo a la base de la planta) se tomó un cilindro de aproximadamente 0.5 cm de longitud.
- Segmento 3: Por encima del segmento dos (segmento que se encuentra por encima del segmento más próximo al base de la planta) se tomó un cilindro de aproximadamente 0.5 cm de longitud.

Fueron evaluados los siguientes aspectos a los 45 días de cultivo:

- Formación de callos.
- Oxidación fenólica.

### 3.3. Efecto del ácido ascórbico sobre la formación de callos.

Para reducir la oxidación fenólica durante a formación de callos, se adicionaron diferentes concentraciones [0(Control),30, 50 y 60 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup>] de ácido ascórbico al medio de cultivo. Se utilizó el mejor tratamiento del experimento anterior.

Fueron evaluados los siguientes aspectos a los 45 días de cultivo:

- Formación de callos.
- Oxidación fenólica.

#### 4- RESULTADO Y DISCUSIÓN.

##### 4.1. Efecto del 2,4-D sobre la formación de callos.

El inicio de la formación de callos a partir de Segmento 1 del cilindro de la vaina de las hojas de los brotes *in vitro* de 0.5 cm de largo al que se le elimina la base se observa los 21 días de cultivo. En las dos variedades estudiadas los callos fueron formados en los bordes de los explantes donde se realizó el corte. En todos los tratamientos evaluados se observó formación de callos y a los 45 días de cultivo estos habían cubierto la base del explante (Figura 3).

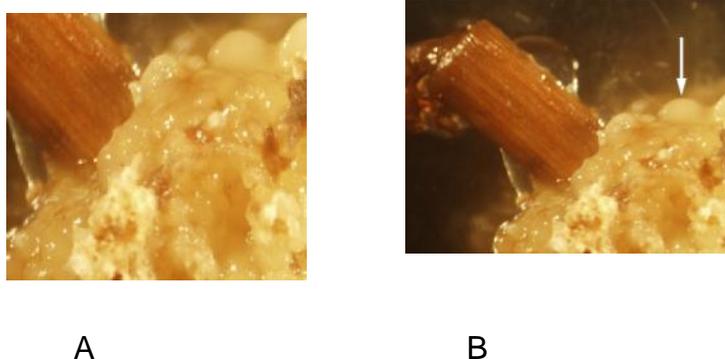


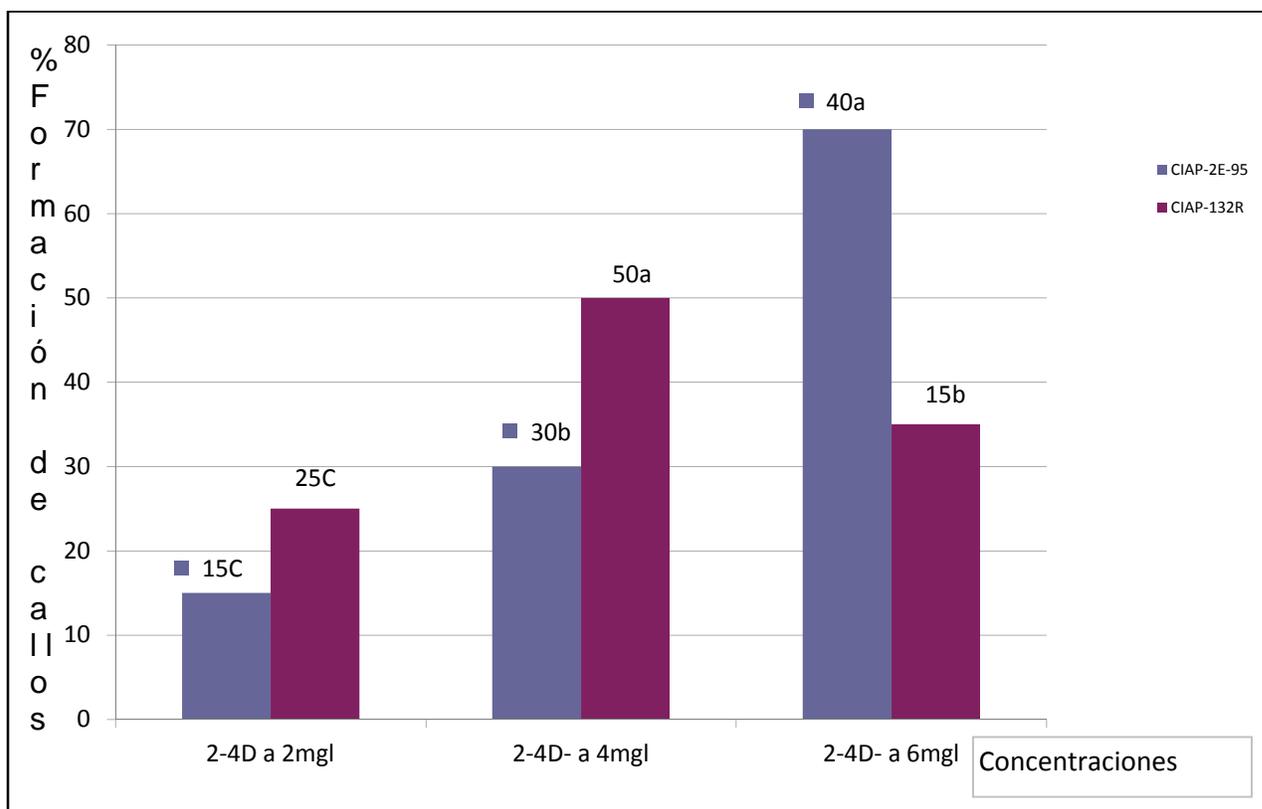
Figura 3. Callos formados a partir del cilindro de la vaina de las hojas de 0.5 cm de largo de *Sorghum bicolor* (L) Moench en medio de cultivo Murashige – Skoog (1962), con 6 y 4 mg l<sup>-1</sup> en las variedades CIAP 2-E 95 (A) y CIAP 132 R(B) a los 45 días del cultivo.

La frecuencia de inducción fue significativamente superior en el tratamiento con 6 mg l<sup>-1</sup> para la variedad CIAP- 2-E-95 y 4 mg l<sup>-1</sup> para la variedad CIAP 132 R respectivamente. En estos tratamientos se logró una alta frecuencia de inducción de callos con estructura semiembriogénica entre un 40 y 50 % en las dos variedades (Figura.4). Además se observó la presencia de pigmentos de color oscuro en el medio de cultivo, así como altos porcentaje de explantes necrosados y muertos.

Los resultados anteriores son similares a los logrados por Zhao *et al.* (2010) quienes emplearon 6 mg l<sup>-1</sup> de 2,4-D para la formación de callos en las variedades Yuantian No.1' y 4 mg l<sup>-1</sup> de 2,4-D para M81E'. Los callos inicialmente

presentaron en todos los tratamientos estudiados una coloración amarilla tenue en el primer subcultivo y con el transcurso de los cuatro subcultivos restante se tornaron de color amarillo más intenso. Sobre estos últimos callos se observaron estructuras de apariencia embriogénica. Características similares en la coloración y estructura de los callos fueron encontrados por Zhao *et al.* (2010) cuando emplearon como explantes iniciales embriones cigóticos para el desarrollo de un eficaz sistema de regeneración *in vitro* germinaron de dos cultivares de sorgo dulce. Las semillas germinaron primeramente en el medio de inducción de callo y después de 2 semanas se inició la formación de callos.

Los resultados en cuanto al efecto de la concentración de 2,4-D en el medio de cultivo MS, sobre la formación de callos a partir del cilindro de la vaina de las hojas de plantas *in vitro* de *Sorghum bicolor* (L) Moench variedades CIAP 2- E- 95 y CIAP 132- R son superiores en cuanto a la frecuencia de inducción de callos obtenidos por Sudhakar *et al.* (2008), lo cual está dado por la influencia del genotipo. Además difieren en cuanto a las concentraciones de 2,4-D pues estos autores obtienen la mayor frecuencia de inducción de callos con  $2 \text{ mg l}^{-1}$  en los genotipos IS3566, SPV475 y CSV112.



*Medias con letras distintas difieren según prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis/Mann Whitney para  $p < 0,05$*

Figura 4. Efecto de diferentes concentraciones de 2,4-D en el medio de cultivo MS, sobre la formación de callos a partir del cilindro de la vaina de las hojas de plantas *in vitro* de *Sorghum bicolor* (L) Moench variedades CIAP 2- E- 95 y CIAP 132 R

Es conocido el papel que juega el tipo de regulador del crecimiento y el estrés en las señales de transducción y los mecanismos de histodiferenciación de los tejidos (Von Arnold *et al.*, 2002). Esto permite una reprogramación de la expresión génica, que resulta en una serie de divisiones celulares, que promueven la desdiferenciación celular e inducen el crecimiento de un callo desorganizado o polarizado (Raghavan, 2004).

La presencia de auxina en el medio de cultivo conduce a un incremento de la auxina endógena a nivel celular, lo cual induce y promueve el proceso de desdiferenciación celular. Esto se evidencia en la acidificación del medio de cultivo, la división temprana y tamaño de las células, lo cual conduce a la formación del callo.

En todas las especies citadas en la literatura científica consultada en las cuales pudieran ser obtenidos callos embriogénicos y no embriogénicos, se plantea que los niveles exógenos de 2,4-D durante el proceso de callogénesis son altos. Estos niveles son importantes en el establecimiento de un transporte de auxina inter e intracelular. Además, se ha observado que los callos que desarrollan posteriormente la embriogénesis somática, tienen altos niveles de 2,4-D libre con respecto a los callos no embriogénicos (Jiménez, 2001).

También son importantes en el proceso de formación de callos, el tipo de explante, la composición del medio de cultivo y esta respuesta varía para las diferentes especies de *Sorghum bicolor* (L) Moench. Por ejemplo, Suldakar Pola *et al.* (2009) cuando utilizaron como explantes embriones maduros en *Sorghum bicolor* genotipos IS 3566, SPV 475, CSV13, CSV15, CSV112, IS 348 en medio de cultivo con las sales MS lograron una eficiente inducción de callos y la subsiguiente regeneración de plantas. Estos autores también encontraron que la respuesta a diferentes concentraciones y combinación de reguladores de crecimiento dependen

del genotipo. La mejor respuesta se observó en el genotipo IS 3566 con una alta eficiencia a la inducción de callos con  $2\text{mg l}^{-1}$  2, 4,5-Trichlorophenoxyacetic acid (2,4,5-T). Los bajos niveles de 2,4-D han sido comúnmente usados como auxinas de en la inducción de callos en cereales (Hagio, 1994; Manjula *et al.*, 2000; Bi *et al.*, 2007).

Ante la respuesta diferente de las variedades en estudio al 2,4-D, estas se comportaron como genotipo dependiente. La respuesta de los diferentes tipos de explantes a la regeneración de plantas vía embriogénesis somática en la mayoría de las especies depende de la concentración de auxina; sin embargo en el sorgo esta respuesta morfogenética no ha sido caracterizada en la mayoría de los trabajos publicados (Gupta, 2006).

#### 4.2. Efecto de diferentes segmentos del cilindro central de la vaina del brote *in vitro* sobre la formación de callos

La formación de callos compactos, a partir de segmentos del cilindro de la vaina de las hojas de plantas *in vitro* de *Sorghum bicolor* (L) Moench en el medio de cultivo MS con 6 y  $4\text{mg l}^{-1}$  de 2,4-D en las variedades CIAP 2- E- 95 y CIAP 132R respectivamente, solo se logró con el empleo del segmento 1 más próximo a la base de la planta. En este segmento encontramos la zona de crecimiento de la planta con plena actividad de división celular. La frecuencia de inducción fue más alta en el tratamiento 1 para las dos variedades y no se formaron callos en los tratamientos 2 y 3. Se presentó baja presencia de pigmentos de color oscuro en el medio de cultivo con el empleo del segmento 1 en que se incluye parte de la base de las plantas *in vitro* que contiene el meristemo vegetativo y el cilindro de la vaina de las hojas aproximadamente de 0.5 cm de longitud (tabla 2). En los otros tratamientos los explantes se tornan necróticos y mueren, emitiendo una exudación fenólica al medio de cultivo.

Tabla 2. Efecto de diferentes segmentos del cilindro de la vaina de las hojas del brote *in vitro* sobre la formación de callos a partir de *Sorghum bicolor* (L) Moench en el medio de cultivo MS con 6 y  $4\text{mg l}^{-1}$  de 2,4-D CIAP 2-E-95 y CIAP 132- R respectivamente.

Segmento del cilindro de la vaina	Porcentaje de Formación de Callos	
	Variedad CIAP 2-E-95	Variedad CIAP 2-E-95
1	60.5 a	70.0 a
2	0	0
3	0	0

Medias con letras diferentes difieren según la prueba no paramétrica *Kruskal-Wallis/Mann Whitney* para  $p < 0,05$

En la literatura científica para el cultivo del sorgo no existen referencias del empleo de segmentos del cilindro de la vaina de las hojas de plantas *in vitro* para la formación de callos. Se aumentaron los porcentajes de formación de callos (60,5 70.0 %), para la variedades CIAP 2 E 95 y CIAP 123R con el empleo del segmento 1 del cilindro de la vaina de las hojas del brote *in vitro*. Estos resultados fueron inferiores a los obtenidos por Arulselvi y Krishnaveni (2009) quienes utilizaron como material inicial puntas apicales de 2-3 mm de tamaño a partir de las semillas germinadas y obtuvieron un alto porcentaje (62-84%) de inducción de callos. Estos autores encontraron al igual que en el presente trabajo que el porcentaje de formación de callos depende del genotipo, así como del tamaño y tipo de los explantes utilizados. También indicaron que los ápices de menos de 2 - 3 mm de tamaño no formaron callos, sino que se tornaron marrón y necroticos. Resultados similares se observaron al emplear los segmentos 2 y 3 que no formaron callos. Estos tomaron una coloración marrón y se necrosaron. Los ápices de tamaño de más de 3.2 mm no producen callos embriogénicos y se tornan transparente, viscoso y de color amarillento. El incremento de los porcentajes de formación de callos hasta 60.5 y 70 %, en las variedades CIAP 2 E 95 y CIAP 123R respectivamente, empleando el segmento 1 del cilindro de la vaina de las hojas del brote *in vitro*, son inferiores a los obtenidos por Freire (1998) en *Sacharum* sp. variedad Cuba 87-51, quien logró porcentajes de más

del 90 % formación de callos a partir de segmentos 1 de plantas *in vitro* de más 2.4 mm de grosor.

#### 4.3 Efecto del ácido ascórbico sobre la formación de callos.

La figura 5 muestra el efecto del ácido ascórbico en el medio de cultivo sobre la formación de callos. Con la adición de ácido ascórbico en concentraciones de 20 y 50 mg l<sup>-1</sup> al medio de cultivo anteriormente descrito para las variedades CIAP 132 R y CIAP 2E-95, no se observaron explantes necrosados, ni pigmentos de color oscuro-púrpura en el medio de cultivo (figura 5).



A

B

Figura 5. Efecto de la concentración del ácido ascórbico en el medio de cultivo MS, sobre la formación de callos a partir del cilindro de la vaina de las hojas del brote *in vitro* de *Sorghum bicolor* (L) Moench variedades CIAP 132R(A) y CIAP 2- E- 95 (B).

El ácido ascórbico es un agente reductor que puede reducir y de tal modo neutralizar reacciones del oxígeno, como el peróxido de hidrógeno (Coulter *et al.*, (2006).

La incorporación al medio de cultivo de 20 y 50 mg l<sup>-1</sup> de ácido ascórbico para las variedades CIAP 132R y CIAP 2- E- 95 respectivamente, permitió eliminar los pigmentos de color oscuro e incrementó el porcentaje de formación de callos con respecto a las demás concentraciones evaluadas incluyendo el control en ausencia de ácido ascórbico. El empleo del ácido ascórbico en las concentraciones antes mencionadas permitió un incremento del porcentaje de formación de callos hasta un 90 y 95 % para las variedades CIAP 2- E- 95 y CIAP 132R.

Tabla 1. Efecto del ácido ascórbico sobre la formación de callos en el medio de cultivo MS variedades CIAP 2- E- 95 y CIAP 132R

Concentración de Ácido ascórbico mg l <sup>-1</sup>	Porcentaje de Formación de Callos			
	Variedad CIAP 2-E-95		Variedad CIAP 132-R	
	Medias	Rango de medias	Medias	Rango de medias
0 Control	80.0	60.0b	70.0	22.10c
20	70.0	38.74 c	91.61	78.00 a
50	90.0	78.0 a	72.09	33.82 b
80	75.0	44.26 c	70.32	29.18 c

Medias con letras diferentes en una misma columna difieren según la prueba no paramétrica *Kruskal-Wallis/Mann Whitney* para  $p < 0,05$ .

Los altos niveles de oxidación fenólica generalizada en muchas especies de monocotiledóneas y fundamentalmente en sorgo, parecen ser los responsables de la baja eficiencia en la formación de callos. Como se puede observar en la tabla 3 también el sorgo se comporta como genotipo dependiente ante las concentraciones de este antioxidante, pues con 20 mg l<sup>-1</sup> la variedad CIAP 132R de bajo contenido de tanino reduce la exudación de pigmentos al medio de cultivo, mientras que en la variedad CIAP 2E-95 la mejor respuesta se obtiene con 50 mg l<sup>-1</sup>.

La adición de antioxidantes al medio de cultivo han sido eficaces en la prevención de la oxidación con un aumento en la eficiencia de formación de callos (Farooq *et al.*, 2002). Baskaran y Jayabalan, (2005) quienes evitaron la aparición de oxidación fenólica con la incorporación al medio de cultivo de ácido ascórbico (30 mg l<sup>-1</sup>) y lograron una alta frecuencia de formación de callos en los genotipos K8 y K5.

En la regeneración de los genotipos de sorgo dulce "Yuantian No.1" y "M81E" se previno la oxidación fenólica con la adición al medio de cultivo de 10 mg l<sup>-1</sup> de ácido ascórbico (Zhao *et al.*, 2010). La diferencia de los resultados del presente trabajo con los de la literatura científica, está dada por la influencia del genotipo. Se conoce que en la regeneración de plantas, el sorgo responde como genotipo

dependiente (Kishore *et al.*, 2005). Este resultado está dado por la eliminación de las sustancias oxidantes en el medio de cultivo y sobre la capa más superficiales que permiten una mayor disponibilidad de los nutrientes presentes en el medio de cultivo. Además el ácido ascórbico como agente reductor está implicado en los procesos de división y el alargamiento celular. Sin embargo, otros autores han utilizado el carbón activado en la formación de callo para evitar la secreción de compuestos fenólicos al medio de cultivo (Pola *et al.*, 2008).

#### Tipos de callos formados

Se formaron dos tipos de callos, unos compactos con superficies lisas, compactos, friables, brillantes, de color amarillo claro y otros blandos de coloración oscura y amarillo crema. (figura 6) Estos dos tipos de callos también fueron descritos en sorghum por Cai y Butler, (1990). Los autores antes mencionados caracterizaron los callos embriogénicos con apariencia blanca, compactos además observaron otro tipo de callos no embriogénicos con estructura no organizada, suave y de color Amarillo crema.

Zhao *et al.* (2010) describieron en las variedades Yuantian No 1 M81E la formación de callos no embriogénicos de apariencia acuosa y color oscuro que exudaban pigmentos de color oscuro al medio de cultivo que se asemejan a los formados en las variedades CIAP 132R y CIAP 2E-95 en este estudio donde también secretan pigmentación de color oscuro al medio de cultivo. Otros autores como Girijashankar *et al.*, 2007. Lograron a partir de ápices formar callos con estructuras embriogénicas, cuya descripción coincide con las del presente trabajo. Los callos embriogénicos formados fueron de color amarillos y compactos, sin embargo los callos no embriogénicos se presentan de color blanco grisáceo, suave y globulares.



A

B

Figura 6. Tipos de callos formados en medio MS a partir del cilindro de la vaina de las hojas de brotes *in vitro* de *Sorghum bicolor* (L) Moench variedades CIAP 2-E- 95 y CIAP 132R. (A) Callos compactos con superficies lisas, compactos, friables, brillantes, de color amarillo claro y (B) Callos blandos de coloración oscura y amarillo crema.

## 5- Conclusiones.

- 1- Se logró la formación de callos con estructuras embriogénicas en *Sorghum bicolor* (L) Moench, con el empleo de 4 y 6 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> de 2,4 D en las variedades cubanas CIAP 132 R y CIAP 2- E- 95 respectivamente.
- 2- El ácido ascórbico disminuyó la exudación de pigmentos de color oscuro al medio de cultivo, la necrosis de los explantes e incremento el porcentaje de formación de callos con estructuras embriogénicas en las dos variedades
- 3- Se aumentó la formación de callos con estructuras embriogénicas utilizando como explante el segmento 1 del cilindro de la vaina de las hojas del brote *in vitro* sin eliminar la base..

## 6 Recomendaciones.

- 1- Aplicar los resultados propuestos en la obtención de callos para continuar la investigación en la formación, maduración y germinación de embriones somáticos en *Sorghum bicolor* (L.) Moench. variedades cubanas CIAP 2 E-95 y CIAP 132R.

- Alfaro F, S. (2002). Variations in storage protein and carbohydrate levels during development of avocado zygotic embryos., *Plant Physiol. Biochem*(40).
- Antonopoulou G, Gavala , Lyberatos G. (2008). Biofuels generation from sweet sorghum: Fermentative hydrogen production and anaerobic digestion of the remaining biomass. 99:110-119., . *Technol.*
- Arias, V.A. et al. (2004). Comportamiento de dos variedades de sorgo asociados con soya. *Centro Agrícola*, 31 (3-4):48.
- Arulselvi, I. ; Krishnaveni, S. (2009). Effect of hormones, explants and genotypes in in vitro culturing of sorghum, 8-10.
- Bewley DJ, S. L. (2002). In vivo characterization of the effects of abscisic acid and drying protocols associated with the acquisition of desiccation tolerance in alfalfa (*Medicago sativa* L.) somatic embryos. *Ann. Bot*, 89, 391-400.
- Birsin A, O. M. (2002). Callus induction and plant regeneration from immature and endosperm-supported mature embryos of winter oat (*Avena sativa*, *J. Genet. Breed*(56), 339-344.
- Botha, F. C, O. (2004). Pearl millet transformation system using the positive selectable marker gene phosphomannose isomerase. *Plant Cell Rep*, (22), 684–690.
- Bravo, J.E, E. D. (1983). . Phenotypic and genotypic stability of tissue cultured plants.
- Browley D, M. B. (1996). embryogenesis and artificial seed in forage legumes., (6), 109-126.
- Butler L, C. T. (1990). Plant regeneration from embryogenic callus initiated from immature inflorescences of several high tannin sorghums. 20:101–110.
- Castro, N.J. et al (último). (2000). Producción de biomasa en línea de sorgo con respuesta al estrés hídrico. *Rev. Fitotec.*
- Constable F, G. O. (1977). Morphogenesis and plant regeneration from callus of immature embryos of sorghum.
- Correa, U.A. (2000). El sorgo en la producción animal.
- Cruz, C.R.J, R. V. (2006). Selección de cultivares forrajeros de sorgo (*Sorghum bicolor*) y mijo (*Pennisetum americanum*) por índices de eficiencia de producción y calidad. *Agronomía Mesoamericana. Técnica. La Habana, Cuba*, 115.

- Cruz, C.R.J., R. V. (n.d.). Selección de cultivares forrajeros de sorgo (*Sorghum bicolor*) y mijo (*Pennisetum americanum*) por índices de eficiencia de producción y calidad. *Agronomía Mesoamericana.*, (2), 159.
- DGEA. (2004). Dirección General de Economía Agropecuaria, Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG).
- Dudits D, F. A. (2003). Transition of somatic plant cells to an embryogenic state.
- Duke, J. (1983). *Sorghum Xalmum Parodi*. Handbook of energy crops.
- FAO. (2006). FAOSTAT database. [http:// faostat.fao.org/](http://faostat.fao.org/), (database. <http://>).
- Farooq S Rao T. (2002). Micropropagation of *nonasquamosa* L. using nodal explants.
- Filipecki M, M. R. (2002). The role of cell wall in plant embryogenesis. *Cellular y Molecular Biology Letters*, (7).
- Filonova L, V. A. (2002). Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell Tiss. Org. Cult*, 69, 233-249.
- Folk R, S. F. (2005). Method of ex vitro sowing, germination, growth and conversion of planta somatic embryos or germinants and nutrient medium used therefore.
- Freire M. (1998). Embriogénesis somática en caña de azúcar (*Saccharum* sp. híbrido var.87).
- Freyssinet G, D. J. (1999.) Germination of synthetic seeds: New substrates and phytoprotection for carrot somatic embryo conversion to plant. En: *Morphogenesis in Plant Tissue Cultures* (eds.).
- García, L. et al. (último). (2003). Determinación del uso eficiente de nitrógeno en cuatro variedades de sorgo para grano en la zona del Pacífico de Nicaragua. *La Calera*. 3:36.
- Garg, G.K, G. S. (2006). Strategies for overcoming genotypic limitations of in vitro regeneration and determination of genetic components of variability of plant regeneration traits in *Sorghum*, 86, 379–388.
- Gómez (último). (1998). Aspectos morfológicos de la embriogénesis somática. En *Propagación Masiva de Planta.*, .(1).
- González, A.T. (1961). Experimentación sobre el cultivo de sorgo en Costa Rica.
- Graveros, I.E (último). (2003). Cultivos sorgos graníferos. <http://www.producción.com>, (Consulta: 21/3/08].).

- Griffith M, J. R. (1997). Water and sucrose regulate canola embryo development. *Physiol.*, 361-366.
- Gupta, (n.d.). Strategies for overcoming genotypic limitations of in vitro regeneration and determination of genetic components of variability of plant regeneration traits in Sorghum.
- Haccius, B. (1978). Question of unicellular origin of nonzygotic embryos in callus cultures. *Phytomorphology*, (28), 74-81.
- Hagio, T. (2002). Adventitious shoot regeneration from immature embryo of sorghum. *culture* 68, 65-72.
- Hagio, T. (1994). Difference of plant Regeneration from callus of Sorghum mature seed. *Breed.* (Breed. Sci. 44), 121-126.
- Hamill, J.D., B. S. (2000). Ultrastructural studies of somatic embryos of *Eucalyptus nitens* and comparisons with zygotic embryos found in mature seeds. 237-244, *Annals of Botany* 86.
- Harti, C.C, M. (2000). Regeneration establishment and evaluation of soma clones in Sorghum bicolor (L.) Moench. *Euphytica*.
- Hernández L. (2004). El cultivo del Anthurium. *Cultivos Tropicales*, 4(Cultivos Tropicales).
- Hildebrandt HC, S. R. (1972). Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures., 50, 199-204.
- Jaramillo M. (1991). Estudio nutricional de cultivares de sorgo granífero (*Sorghum bicolor* (L) Moench) altos en taninos condensados producidos en Venezuela.
- Jayabalan N, B. P. (2005). simple approach to improve plant regeneration from callus culture of *Sorghum bicolor*. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 1(179-192).
- Jiménez MV. (2001). Regulation of in vitro somatic embryogenesis with emphasis on the role of endogenous hormones., 2(. *Fisiol. Veg*), 196-223.
- KaviKishor,, J. G. (2007). High frequency somatic embryogenesis and regeneration in different genotypes of *Sorghum bicolor* (L.) Moench from immature inflorescence explants. In *Vitro Cell Dev. Dev. Biol.* 43, 159–166.

- Komamine, -. T. (1980). The serial observation of embryogenesis in a carrot cell suspension culture.
- Korban SS, L. X. (2002). Somatic embryogenesis, secondary somatic embryogenesis, and shoot organogenesis in Rosa. *J. Plant Physiol.*, (159).
- Leitch IJ, B. M. (2000). Nuclear DNA amounts in angiosperms and their modern uses. *Lond*) 86, 859–909.
- Lemaux, G. S. (2009). Efficient reproducible Agrobacterium-mediated transformation of sorghum using heat treatment of immature embryos.
- Liang G, -. O. (2005). Efficient genetic transformation of Sorghum using a visual screening marker.
- Liang, G.H, M. H. (1987). Plant regeneration from cultured immature embryos of Sorghum bicolor (L.) Moench., 73(Theoretical and Applied Genetics).
- Lindsey K, S. M. (2000). Polarity and signaling in plant embryogenesis., 51, 971-983.
- Lort,H, S. A. (2006). Agrobacterium-mediated transformation of cereals a promising approach crossing barriers, 4, 575-603.
- M.,Yusuf, A. S. (2009). Effect of various amino acids on shoot regeneration of sugarcane (Sacchrum officinarum L. 1214-1218.
- Madhavan, M. (2002). Physiological adaptations for nitrogen use efficiency in sorghum, (Plant and Soil), . 245:25.
- Maheswaran, M, -. E. (1986). Somatic embryogenesis: Factors influencing coordinated behavior of cell as an embryogenic group. *Annals of Botany* 57.p.
- Mashayekhi NK. (2000). The protein synthesis spectrum during the induction phase of somatic embryogenesis in carrot (Daucus carota L.) cultures and the role of nitrogen forms for embryo development.
- McComb J, R. R. (2002). Direct somatic embryogenesis from mature embryos of sandalwood. *Plant Cell*, 65-70.
- Mears, K, S. F. (n.d.). Growth and organized development of cultured cells, *American journal of Botany*, 705-708.

- Merkle S Flinn B. (1996). Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. Thorpe, T. in vitro Embryogenesis in Plant. p., 155-203.
- Merkle SA. (1997). Somatic embryogenesis in ornamentals. En: RL Geneve, JE Preece and SA Merkle (eds): *Biotechnology of ornamental plants*.
- Merkle SA Flinn BS. (1995). Morphogenic aspects of somatic embryogenesis (Chapter 5). En: TA Thorpe (ed.) *In vitro Embryogenesis in Plant*. Kluwer Academic Publishers.
- Milián, P. A. (2010). Caracterización y potencialidades del grano de sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) Characterization and potential of sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) grain. *Pestos y Forrajes*, Vol. 33(No 1).
- Molinas M, P. P. (2001). Ultrastructure of early secondary embryogenesis by multicellular and unicellular pathways in cork oak, 87, 1-12.
- Monnier, M. (1990). Zygotic embryo culture. In: Bhojwani SS (ed) *Plant tissue culture: Applications and limitations*, (Elsevier, Amsterdam), 366-393.
- Murashige, T. (1979). Somatic embryogenesis in angiosperms., 1-78.
- Nabors, M.N, M. (1987). High efficiency plant regeneration by somatic embryogenesis from callus cultures of mature embryo explants of bread wheat (*Triticum aestivum*) and grain sorghum (*Sorghum bicolor*). *dev. Biol*, (23).
- Nguyen TV Angenon G. (2007). Agrobacterium mediated transformation of sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) using an improved in vitro regeneration system. *Plant Cell Tissue Organ*, (2), 155–164.
- Nomura K, K. A. (2005). SIVB Congress Symposium Proceeding: Mechanisms of Somatic Embryogenesis in Carrot Suspension Cultures - Morphology, Physiology, Biochemistry and Molecular Biology. *In Vitro*, (41), 6-10.
- Pakhomova, E. (2000).). The addition of L-proline and L-asparagine has improved the production of sorghum embryogenic callus and reduced the incidence of toxic phenolic compounds in medium.
- Parrot WA, S. V. (1998). Soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) embryogenic cultures: the role of sucrose and total nitrogen content on proliferation., 34, 8-13.

- Pedersen JF, K. H. (1997). Evaluation of 41 elite and exotic inbred sorghum genotypes for high quality callus production. *Plant Cell Tiss Org Cult*, (48), 71– 75.
- Pliego AF, P. (2004). Factors affecting maturation of avocado somatic embryos., *102*:(Scientia Horticulturae).
- Plourde A, G. E. (2000). Effect of sugars, amino acids and culture technique on maturation of somatic embryos of *Pinus strobus* on medium with two gellan gum concentrations.
- Pola S. (2005). Tissue culture and genetic transformation studies of *Sorghum bicolor* Ph.D. Thesis, college of science and technology, *Andhra University, Visakhapatnam, INDIA*.
- Pola, S. (2009). Enhanced shoot regeneration in tissue culture studies of sorghum bicolor., *32*(. *Journal of agricultural Tecnology*).
- Portykus, T. E. (1977). Shoot and embryo-like structure formation from cultured tissues of *Sorghum bicolor*. *Journal of Plant Physiology*, 193 – 218.
- Raghavan V. (2000). *Developmental Biology of Flowering Plants*. Springer-Verlag, *New York*, pp, 309–322.
- Raghavan V. (2003). One Hundred years of zygotic embryo culture investigations., 437-442.
- Raghavan V. (2004). Role of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) in somatic embryogenesis on cultured zygotic embryos of *Arabidopsis*: cell expansion, cell cycling, and morphogenesis during continuous exposure of embryos to 2,4-D., (11), 1743-1756.
- Ramana, T, P. S. (2008). Enhanced shoot regeneration in tissue culture studies of *Sorghum bicolor*. *Journal of Agricultural Technology*, 275-286.
- Ramana, T., S. P. (2008). Plant tissue culture studies in sorghum bicolor; immature embryo explants as the source material. *International Journal of Plant Production*2.
- Reinert, J. (1959). Untersuchungen uber die morphogenese in gewebeulturen, *Ver Dtsch*, (71), 15.
- Rodríguez. (2006). Agricultura Urbana: Una expresión de la agricultura agraria cubana. En: *Las Investigaciones agropecuarias en Cuba cien años después. Las Investigaciones agropecuarias en Cuba cien años después*, (Editorial Científico-Técnica. La Habana, Cuba).
- Saiprasad, G.V.S. (2001). Artificial seeds and their applications., *6*(Resonance).

- Saito H, N. M. (2004). Somatic embryogenesis and plant regeneration from callus culture of several species in the genus *Tricyrtis*. *In Vitro Cell. Tricyrtis. In Vitro Cell. Dev, Biol. Plant*(40).
- Saucedo, (2008). Empleo del sorgo en la alimentación animal y humana. *Taller Nacional sobre empleo del sorgo*.
- Seetharama, N, -. (2006). In vitro culture methods in Sorghum with shoot tip as the explant. *Plant Cell*, (25), 174–182.
- Seetharama,, G. (2007). Direct somatic embryogenesis and organogenesis pathway of plant regeneration can seldom occur simultaneously within the same explant of sorghum., 3.
- Sharp WR, S. M. (1991).) Propagación in vitro del café. En: Roca WM y Mroginski LA (eds.) *Cultivo de Tejidos en la Agricultura. CIAT.*, (Cali Colombia. pp), 621-642.
- Shekelle P, C. I. (2006).).Antioxidants vitamin C and vitamin e for the prevention and treatment of cancer. *Journal of general internal medicine: official journal of the Society for Research and Education in Primary Care Internal Medicine*.
- Skoog F, M. T. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. . Physiol. Plantarum*, (15), 473-497.
- Smith F, K. K. (2005). Regeneration from long-term embryogenic callus of the *Rosa hybrida* cultivar Kardinal. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, (41), 32–36.
- Soh WY, -. K. (2002). High frequency plant regeneration from *Aralia cordata* somatic embryos.*Plant. Org. Cult*, (68).
- Sopory SK, D. D. (2002). An efficient leaf-disc culture method for the regeneration via somatic embryogenesis and transformation of grape. *Plant Cell Rep*, 20:991-1005.
- Strasburges, E. (1978). Uber polyembryonie. *Jenaische Z. naturwiss.*12.p.647.
- Steward FC, Mapes MO y Mears K (1958) Growth and organized development of cultured cells. II: Organization in cultures grown from freely suspended cells. *Amer.*, 45, 705-708.
- Sugii N, K. R. (1992). Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Anthurium andraeanum* hybrids.*Plant*, (11).

- Teissont,C, -. (1989). Somatic embryogenesis and plant from immature zygotic embryos of species *Musa acuminata* and *Musa balbisiana*. *Plant Cell. Reports*.7.
- Toribio M, H. I. (2003). Vegetative propagation of *Quercus suber* L., by somatic embryogenesis, *II.*, 765-770.
- Venkateswarlu b. (2006). Efficient plant regeneration from shoot apices of sorghum. *BIOLOGÍA PLANTARUM*, (4).
- Wang,, B. (2007). Plant regeneration through callus initiation from mature embryo of *Triticum*. *Plant Breed.*
- Williams, E, P. W. (1988). Optimization of somatic embryogenesis and embryo germination in soybean. *In vitro*, (24), 817.
- Yeung EC, S. C. (2003). Recent advances in conifer somatic embryogenesis: improving somatic embryo quality. *Plant Cell Tiss.*, 74.
- Zafar S, Z. N. (2000). Bulbous and cormous monocotyledonous ornamental plants in vitro. *Quarterly Science Vision, African Journal of Biotechnology*, Vol. 9(16).
- Zaidi N Song S. (2010). Optimization of callus induction and plant regeneration from germinating seeds of sweet sorghum (*Sorghum bicolor* Moench)., 9(*African Journal of Biotechnology*), 2367- 2374.
- Zhao L Song S. (2010). Optimization of callus induction and plant regeneration from germinating seeds of sweet sorghum (*Sorghum bicolor* Moench)., 9(*African Journal of Biotechnology*), 2367- 2374.
- Zimmerman. (1993). This process has several applications on plant iotechnology aiming plant breeding, such as cryopreservation, genetic transformation and mutagenesis.