



*Universidad de Cienfuegos “Carlos Rafael Rodríguez”*

*Facultad de Ciencias Agropecuarias*

*Carrera de Ingeniería Agronómica*

Título: Regeneración de plantas vía organogénesis en sorgo  
[*Sorghum bicolor* (L.)] variedades cubanas CIAP 132-R y CIAP 2E -95

Tesis para aspirar al título de Ingeniero Agrónomo

Diplomante: Anneris Aguilera Chávez

Tutores: MsC. Silvio de Jesús Martínez Medina

Dr:C Rafael Gómez Kosky

Cienfuegos, 2012

“Si la vida no te sonríe, hazle cosquillas”

Albert Einstein

Al MsC. Silvio de Jesús Martínez Medina, por su apoyo y ayuda incondicional en la realización de este trabajo.

A Caridad Carreño Molejón, que me ha inspirado, alentado y apoyado para cumplir este propósito.

A la memoria de Jorge Iván, que me estimuló a continuar adelante.

A los compañeros de la Biofábrica que hicieron posible esta labor.

A los numerosos amigos cuya opinión y consejo ha influido en este trabajo.

A todo el que de una forma u otra ha colaborado.

A todos, muchas gracias.

A Daniela, que es todo en mi vida....

## RESUMEN

Para desarrollar programas de mejoramiento mediante transformación genética es necesario un eficiente protocolo de regeneración de plantas. En el trabajo se determinó el efecto del 6 bencilaminopurina, ácido ascórbico y sacarosa en la obtención de plantas *in vitro* de sorgo variedades comerciales CIAP 2E-95 y CIAP 132-R vía organogénesis, para utilizar segmentos de su tallo como explantes iniciales en la formación de callos. Al inicio se tomaron semillas maduras en ambas variedades comerciales. Las semillas fueron germinadas *in vitro* en medio de cultivo basal con sales Murashige y Skoog, mio-inositol (100 mg.l<sup>-1</sup>), sacarosa (3%), pH 5.7, Fitagel (2,5 g.l<sup>-1</sup>), sin reguladores de crecimiento. El material vegetal durante los subcultivos, fue incubado en cámaras de luz solar a 15  $\mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , 28 $\pm$  2°C y humedad relativa de 80% con subcultivo cada 21 días. Se incrementó el número de brotes por explante con empleo de 0,04 y 0,15 mg.l<sup>-1</sup> de 6-BAP en el medio de cultivo para las variedades CIAP 132R y CIAP 2E-95 respectivamente. La adición al medio de cultivo de ácido ascórbico (20 y 50 mg.l<sup>-1</sup>) en las variedades CIAP 132R y CIAP- 2E-95 respectivamente eliminó la presencia de pigmentos de color oscuro, incrementó el número de brotes por explante, número de hojas y altura de los brotes. Se incrementó la concentración de sacarosa (40 g.l<sup>-1</sup>) aumentando el grosor de los brotes siendo utilizados como explantes en la formación de callos. Los resultados brindan información estableciendo un protocolo eficiente de regeneración de plantas vía embriogénesis somática.

Palabras clave: genética, plantas, semillas maduras, cultivo, brotes

## ÍNDICE

	Pág.
I. Introducción	1
II. Revisión Bibliográfica	4
2.1 Generalidades	4
2.1.1 Importancia económica y producción mundial del sorgo	4
2.1.2 Situación actual del sorgo en Cuba	5
2.1.3 Clasificación taxonómica	5
2.2 Características de las variedades CIAP 2E-95 y CIAP 132 R	6
2.2.1 Propagación vía organogénesis	6
2.2.2 Fase preparativa	7
2.2.3 Crecimiento de las plantas en ambientes controlados	7
2.2.4 Establecimiento o iniciación de los cultivos	8
2.3 El explante	8
2.3.1 Desinfección del explante	9
2.3.2 Medios de cultivo y hormonas de crecimiento	11
2.3.3 Oxidación Fenolítica	11
2.4 Fase II. Proliferación	15
2.4.1 Medios de cultivo	16
2.5 Fase III enraizamiento	17
III. Materiales y Métodos	19
3.1 Efecto del 6-benzilaminopurina y la kinetina en la proliferación de brotes	20
3.2 Efecto del ácido ascórbico en la multiplicación de brotes.	21
3.3 Efecto de la concentración de sacarosa sobre el engrosamiento de los brotes.	21
IV. Resultados y Discusión	23
4.1 Efecto del 6-benzilaminopurina y la kinetina en la proliferación de brotes	23
4.2 Efecto del ácido ascórbico en la proliferación de brotes.	26
4.3 Efecto de la sacarosa sobre el grosor del tallo de plantas <i>in vitro</i>	30
V. Conclusiones	33
VI. Recomendaciones	34
VII Bibliografía	35

## INTRODUCCIÓN

El sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) es una planta fisiológicamente de metabolismo C-4, que se adapta a un entorno agroecológico cálido y seco en el que es difícil de cultivar otros cereales. Los sorgos (*Sorghum* spp.) están constituidos por unas 20 Poaceas, oriundas de las regiones tropicales y subtropicales de África Oriental. (Liu *et al.*, 2009).

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 almidoneras y alcoholeras (Rooney *et al.*, 2007).

Existen un grupo de factores que limitan la producción de sorgo como son el ataque por aves, plagas y enfermedades. Sin embargo, los bajos contenidos de proteínas constituyen uno de los problemas fundamentales de este cultivo, siendo necesario trabajar en programas de mejoramiento genético.

Estudios de la composición química del grano de sorgo han permitido conocer su riqueza en constituyentes nutritivos básicos para la alimentación humana y animal en proporciones comparables con otros cereales. Tales estudios refieren variabilidad en la composición química de este cereal y en especial del contenido de taninos; el cual determina que la calidad y cantidad de proteína en el grano sea baja. La composición de aminoácidos también constituye un importante renglón a tener presente cuando se estructuran dietas balanceadas con este ingrediente alimenticio (Jaramillo *et al.*, 1993).

El empleo de los métodos tradicionales de mejora genética están limitados por un grupo de factores entre ellos: la evaluación que se hace mediante marcadores morfológicos. Los marcadores morfológicos tienen la desventaja que son limitados en el número de características a medir; se deben medir en cierta etapa del crecimiento vegetativo y pueden estar influenciados por el ambiente. Además requieren largos períodos de selección que los hacen costosos e ineficientes. (Zhao *et al.*, 2000).

El uso de la biotecnología permite mejorar caracteres agrónomicamente importantes y emplear la selección asistida por marcadores moleculares como una herramienta para los planes de mejoramiento, pues permite acelerar la selección y disminuir los costos en el manejo de grandes poblaciones de plantas. En este sentido la transformación genética es un método poderoso y esencial para el mejoramiento genético. Sin embargo para poder usarlo es un requisito indispensable, contar con un eficiente método de regeneración de plantas (Chadrakanth *et al.*, 2002).

La organogénesis constituye la vía de regeneración de plantas sobre la cual hasta la fecha se ha trabajado en sorgo. Esta vía de regeneración de plantas en esta especie constituye un método simple y confiable para una producción de plántulas de tamaño uniforme, libres de enfermedades y con estabilidad genética, sin embargo posee baja eficiencia en la regeneración (Baskaran *et al.*, 2005).

En sorgo para la regeneración de plantas a partir de callos se han usado varios tipos de tejidos 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; 2010). Sin embargo, en ninguno de estos tejidos se ha logrado una alta frecuencia de inducción y regeneración de plantas.

En los genotipos Indios K8 y K5 Baskaran *et al.* (2005) lograron una rápida producción de yemas axilares y adventicias vía organogénesis indirecta, usando como tejidos iniciales yemas apicales.

No obstante existen protocolos de regeneración de plantas vía organogénesis en sorgo, estos están limitados por varios factores fisiológicos y bioquímicos que disminuyen su eficiencia en comparación con el resto de los cereales. Estos factores están relacionados fundamentalmente con los bajos coeficientes de multiplicación, la influencia del genotipo en la producción de brotes y la aparición de compuestos fenólicos.

A partir de los antecedentes antes mencionados, nos proponemos la siguiente hipótesis de trabajo.

“El empleo del 6BAP, ácido ascórbico y sacarosa durante el engrosamiento del tallo, permitirá obtener plantas *in vitro* vía organogénesis directa en sorgo, en las variedades CIAP 2E-95 y CIAP 132-R.”

Para validar esta hipótesis se propone el siguiente

Objetivo general:

Obtener plantas *in vitro* vía organogénesis en sorgo en las variedades CIAP 2E-95 y CIAP 132-R.

Objetivos específicos:

- 1- Determinar el efecto del 6 BAP en la proliferación de brotes de sorgo variedades comerciales CIAP 2E-95 y CIAP 132-R.
- 2- Lograr la reducción o eliminación de la oxidación fenólica con la adición de ácido ascórbico al medio de cultivo.
- 3- Definir la concentración de sacarosa requerida el engrosamiento de los brotes.

## II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Generalidades

La necesidad mundial de aumentar de manera sostenible la producción de cereales para contribuir a la seguridad alimentaria y cubrir las necesidades crecientes de los pueblos, ha propiciado que los productores busquen mayores rendimientos en las áreas improductivas utilizando especies que se adapten a esas condiciones.

El sorgo tropical (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) 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 años sesenta, gran parte de la 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 es muy utilizado en la Agricultura Urbana para evitar la incidencia de plagas (Rodríguez, 2006).

La República de Cuba invierte cuantiosas sumas en divisas la importación de granos y piensos para las necesidades proteicas la alimentación humana y animal. Sin embargo, los costos son cada vez más altos y, a su vez, resultan difíciles de adquirir en el mercado internacional. Por este motivo Cuba debe garantizar la sustitución de importaciones con el empleo de granos, como el sorgo, que deben ser mejorados con tecnologías apropiadas a cada lugar (Saucedo, 2008).

#### 2.1.1 Importancia económica y producción mundial del Sorgo

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). En el mundo se cultivan de 45 millones de ha, con una producción mundial de 63,53 millones de toneladas. 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).

### 2.1.2 Situación actual del sorgo en Cuba

En Cuba el sorgo se ha consumido como alimento humano y animal durante los últimos 100 años, en zonas limitadas del país tales como Bejucal, Alquizar, Quivicán y otras (Oramas , 2003).

Desde inicios de los años noventa, investigadores de la Universidad Central de Las Villas (UCLV) comenzaron a crear las bases científicas y técnicas para la introducción de este cereal a gran escala. En 1996 comenzó la producción del grano sobre la base de un proyecto de rotación de cultivos sorgo-arroz; en el año 2000 se destacó el Complejo Agroindustrial Arrocerero de Holguín, con 100 caballerías (1 340 ha) y en el año 2001 se empezaron a multiplicar las fincas de bancos de semillas de sorgo y fueron abastecidas con un material genético de alta calidad las provincias de Granma, Villa Clara, Cienfuegos, Camagüey, Las Tunas y Holguín. (Saucedo, 2008). Sus características de adaptabilidad en las condiciones edafo climáticas de Cuba fueron estudiadas por Funes y Yepes (1978) y descritas por Machado y Menéndez (1979), quienes destacan su buena plasticidad.

Se plantea que este cultivo ofrece perspectivas favorables en relación con otros granos (Baffes, 1998), debido a que tiene menos requerimientos agrotécnicos y presenta una mayor plasticidad respecto a la época de siembra y el tipo de suelo (Sánchez, 1998; Oramas, 1998b).

### 2.1.3 Clasificación taxonómica

La clasificación taxonómica del sorgo, es la siguiente:

Reino *Plantae*

División *Magnoliophyta*

Clase *Liliopsida*

Orden *Poales*

Familia *Poaceae*

Subfamilia *Panicoideae*

Tribu *Andropogoneae*

Género *Sorghum* Moench, 1974

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 .Se le denominó sorgo por la capacidad de crecer hasta alcanzar una altura elevada; el nombre procede del latín *surgere* (Duke, 1983).

## 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 (Saucedo, 2008; Pérez, *et al.*, 2010).

### 2.2.1 Propagación vía organogénesis

Para desarrollar un programa de mejoramiento mediante transformación genética es necesario contar con un eficiente y reproducible protocolo de regeneración de plantas. En sorgo se han podido regenerar plantas vía organogénesis y embriogénesis somática.

El cultivo aséptico de ápices, meristemos y semillas, para la formación de una plántula y posteriormente la introducción de brotes axilares a partir de estas constituye la base de la mayoría de los métodos de propagación *in vitro* vía organogénesis (Hu y Wang, 1983; Vasil, 1994)

La técnica de cultivo de meristemo para la obtención de plantas libres de patógenos se fundamenta en el hecho de que la distribución de los microorganismos (virus, bacterias, micoplasmas) en los tejidos de la planta infectada no es uniforme y su concentración tiende a disminuir progresivamente hacia el ápice del tallo, por lo tanto,

las posibilidades de que en las células del meristemo se encuentren menor número de partículas o estén libres de estas son mayores que en los tejidos más diferenciados de la planta (Hernández, 1997).

Actualmente, en la propagación comercial pueden identificarse cinco etapas bien definidas: Fase 0: Preparativa, Fase I Establecimiento o Iniciación de los cultivos, Fase II Multiplicación, Fase III Enraizamiento y Fase IV: Aclimatización (Krikorian, 1991).

### 2.2.2 Fase Preparativa

Inicialmente, esta fase fue concebida para tratar de reducir los problemas de contaminación que se presentaban comúnmente en la fase I (Debergh y Maene, 1981). Sin embargo en la actualidad existe un consenso de que esta etapa es importante e indispensable para el desarrollo de un esquema de micro propagación eficiente y repetible, por lo que cada vez se la va prestando mayor importancia. Tiene una marcada influencia sobre la calidad posterior de las plantas resultantes del proceso tanto desde el punto de vista sanitario, fisiológico, como genético.

Precisamente para uniformar el estado fisiológico de las plantas donadoras y por tanto de los explantes, es que se incluyen en esta etapa una serie de pre tratamientos y cultivos en condiciones especiales.

### 2.2.3 Crecimiento de las plantas en ambientes controlados

El impacto de la Fase 0 no está limitado solamente al aspecto sanitario de los explantes sino también en la supervivencia de los mismos. La importancia de las condiciones ambientales en que se desarrolla la Fase 0 para la calidad del proceso posterior de implantación ha sido demostrada en muchos cultivos.

Una práctica común para uniformar el estado fisiológico de los explantes es cultivar las plantas donadoras en ambientes controlados de la luz, temperatura y humedad relativa, con niveles óptimos para el desarrollo de la especie en cuestión.

Sin embargo, en la mayoría de los casos solo es necesario una instalación con una cubierta plástica, condiciones higiénicas y sistema de riego. Se prefiere en estos casos cualquier sistema de riego que sea por infiltración o directamente al sustrato

para evitar el lavado de productos y condiciones de alta humedad en el área foliar que favorezca el crecimiento de hongos. (Jiménez, 1998)

Especial atención debe prestarse en el caso de las plantas propagadas asexualmente al tamaño y tipo del material de siembra, así como al manejo del mismo.

En caña de azúcar se aplica un procedimiento similar que incluye el tratamiento con agua caliente (50,5°C durante dos horas) a estacas de una yema. Estas son posteriormente sumergidas en una mezcla de fungicidas, se dejan secar, se plantan en bandejas con un sustrato estéril y son cultivadas en invernaderos o cámaras aisladas, los ápices se toman a los 45 días, después de brotadas las yemas (Jiménez *et al.*, 1997).

#### 2.2.4 Establecimiento o iniciación de los cultivos.

El objetivo de esta etapa es lograr el establecimiento de cultivos axénicos y fisiológicamente vigorosos con los cuales iniciar el proceso de multiplicación.

#### 2.3 El Explante.

El estado de desarrollo de la planta madre y la edad fisiológica del explante, así como su tamaño, son de gran influencia en el éxito del cultivo *in vitro* (George y Sherrington, 1984)

Los explantes tomados de plantas jóvenes o zonas de crecimiento activas tienen un mejor desarrollo que aquellos tomados de plantas adultas o yemas en reposo. A medida que es más joven y menos diferenciado el tejido que se va a implantar, mejor será la respuesta *in vitro*.

El tamaño del explante es un factor importante que influye en la desinfección y regeneración de plantas, a medida que el explante es más pequeño es menor el riesgo de contaminación y más difícil la regeneración, mientras que con el aumento del tamaño es mayor el peligro de contaminación y más rápido el crecimiento y la regeneración de plantas (Villalobos y García, 1982).

Es posible utilizar una gran variedad de explantes para iniciar los cultivos *in vitro*, sin embargo para los fines de propagación comercial se emplean generalmente meristemo o ápices. La utilización de uno u otro tipo de explante depende de los

objetivos de la propagación, si el objetivo es la propagación de plantas libres de virus o enfermedades sistémicas es necesaria la utilización de meristemo pero si por el contrario el objetivo es solamente la multiplicación de semillas y no hay peligro de diseminación de enfermedades o se parte de plantas diagnosticadas, es frecuente el empleo de ápices caulinares debido a que la manipulación y la regeneración de plantas es más fácil.

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.

#### 2.3.1 Desinfección del explante.

La contaminación en los cultivos *in vitro* es uno de los principales problemas a resolver en la industria de la micro propagación. Los contaminantes pueden originarse de dos fuentes distintas, primeramente aquellos que vienen en la superficie o en los tejidos de la planta donadora y en segundo lugar los que aparecen como resultado de fallas en los procedimientos de laboratorio. Desde el punto de vista del establecimiento de cultivos axénicos solo la primera causa será abordada.

La superficie de los tejidos de las plantas constituye hábitat para los microorganismos (Campbell, 1998), estos pueden alojarse en estomas, lenticelas o cualquier otra abertura natural, lo cual dificulta en extremo la eliminación de los mismos. Los contaminantes del cultivo de tejidos pueden causar y de hecho causan grandes pérdidas en los procesos de propagación *in vitro*, de ahí la importancia de su eliminación desde la fase de establecimiento donde los daños son menores, debido al menor volumen de explantes que se manipulan. Evitar que estos contaminantes puedan pasar a las etapas siguientes es un requisito indispensable en esta fase, aunque en muchos casos su detección se dificulta. Los principales microorganismos asociados con la contaminación son los hongos, levaduras y bacterias (Cassells, 1991).

Para la eliminación de microorganismos contaminantes los explantes son desinfectados superficialmente. Generalmente se cortan los explantes de un tamaño algo superior y son sometidos a la acción de los desinfectantes y luego en condiciones estériles son reducidos a su tamaño final (Hu y Wang, 1983).

Los desinfectantes más comúnmente utilizados son el hipoclorito de sodio (NaClO), hipoclorito de calcio (CaClO), peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), etanol y bicloruro de mercurio (HgCl<sub>2</sub>). Los tres primeros se emplean en concentraciones de 1 a 3 % en tiempos de 10 a 20 minutos, el alcohol se usa generalmente al 70% y se emplea en combinación con otros desinfectantes. El bicloruro de mercurio es el de mayor toxicidad y se emplea en dosis bajas y corto tiempo (0.1% durante 1 a 3 minutos).

Conjuntamente con los desinfectantes se pueden añadir algunas gotas de Tween 20 con el objetivo de reducir la tensión superficial y eliminar las burbujas que se forman en la superficie y cavidades del explante. Terminando el tiempo de inmersión en desinfectantes se realizan varios enjuagues con agua destilada estéril para eliminar restos del mismo.

En sorgo el uso de los procedimientos anteriormente descritos han sido utilizados indistintamente por varios autores para el establecimiento de distintos tipos de material inicial usados como explantes. (Suldakar *et al.* 2006) empleado como explantes iniciales embriones inmaduros aislados de 0,5 a 2,0 mm de longitud, lavaron las espiguillas con agua corriente del grifo, la superficie se esteriliza con un 70% (v / v) de etanol durante un minuto y se esteriliza durante 15 minutos en un 2,5% (m / v) de hipoclorito de sodio y se enjuaga con un 0,1% HgCl<sub>2</sub> por dos minutos, antes de ser cuidadosamente enjuagado con agua estéril. Otros como (Baskaran *et al.*, 2005) a partir de panículas inmaduras de las cuales aislaron los embriones cigóticos inmaduros (1-1.5mm largo) que fueron refrigerados y 0.1% de Tween-20 y desinfectados 3% con hipoclorito de sodio (NaClO), al vacío por 30 min. Lavados en agua estéril 3 veces. Partiendo de semillas maduras (Baskaran y Jayabalan, 2005) lograron establecer el material de partida empleando como desinfectante 70% etanol durante 1 minuto seguido de hipoclorito de calcio (CaClO) al 2% durante 30 minutos y 3-5 enjuagues con agua destilada.

### 2.3.2 Medios de cultivo y hormonas de crecimiento.

Para el desarrollo de la organogénesis no existe un medio universal, sin embargo el medio basal propuesto por Murashige y Skoog, (1962) con algunas modificaciones en sus ingredientes ha sido el más frecuentemente utilizado, reportándose su utilización en la mayoría de las especies propagadas *in vitro* (Kartha, 1981).

Un balance apropiado entre auxinas y citoquininas en el medio de cultivo es necesario para la formación de plantas a partir de meristemo, ápices o yemas. Este balance está determinado por las concentraciones endógenas de auxinas y citoquininas presentes en el explante, las cuales dependen de la especie y del tipo de explante. Algunas especies son cultivadas sin adición de ningún regulador externo, probablemente debido a que existe suficiente cantidad de hormonas endógenas.

Usualmente en el desarrollo de la organogénesis en sorgo es indirecta no necesita de citoquininas exógenas para el establecimiento de los explantes iniciales, sino que necesita de auxinas. Algunos autores emplean en los medios de cultivo el 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) como auxina para la inducción del callo (en concentraciones de 2 mg l<sup>-1</sup> (Duncan *et al.*, 1995, Zhao *et al.*, 2000; Oldach *et al.*, 2001, Suldakar *et al.*, 2006,2008). Sin embargo (Baskaran *et al.*, 2005) además del 2,4-D empleó distintas auxinas como el ácido indolacético (AIA), ácido naftalenacético (ANA) y el ácido indolbutírico (IBA).

### 2.3.3 Oxidación Fenólica.

Las oxidaciones fenólicas pueden en ocasiones constituir un serio problema en el establecimiento y supervivencia de meristemas y ápices, las cuales se manifiestan como un ennegrecimiento del medio de cultivo que comienza por la zona cercana al explante y puede extenderse a todo el medio produciendo una seria afectación en el crecimiento del tejido, al que puede provocar la muerte. (Jímenez, 1998)

Una de las consecuencias que trae consigo es la acción de enzimas oxidasas, frecuentemente nombradas como polifenoloxidasas (PPOs), fenolasas y tiroxinasas, así como de las peroxidasas (POX). Las cuales son liberadas, sintetizadas o están

presentes en ciertos sustratos y en condiciones oxidativas cuando los tejidos son lesionados o se encuentran senescentes.

En muchos casos, la oxidación se ha relacionado directamente con el acumulo de PPOs y decrecimiento de putrescina, espermidina, y espermina de los tejidos. Los sustratos para estas enzimas, que pueden variar entre los diferentes tejidos, son comúnmente la tirosina o los fenoles.

Estas enzimas normalmente se encuentran compartimentalizadas, por ejemplo: PPOs en cloroplastos, POX en peroxisomas, o se ubican en las membranas subcelulares y los sustratos son almacenados dentro de la vacuola. La enzima y el sustrato entran en contacto cuando la célula sufre algún daño, estrés o se encuentra senescente y, generalmente, da como resultado la muerte del explante (Vatanpour-Azghandi, *et al.*, 2002; Tang y Newton, 2004; Gratão *et al.*, 2005; Pompeu *et al.*, 2008).

Por otro lado los factores ambientales como: intensidad de luz, cortes, herbicidas, senescencia, patógenos, metales pesados, lesiones, sustancias abrasivas pueden desencadenar el estrés oxidativo (Bray *et al.*, 2000; Pompeu *et al.*, 2008). En el caso particular del cultivo de tejidos *in vitro*, los procesos de oxidación son causados principalmente por el efecto abrasivo del agente desinfectante aplicado durante la asepsia del explante, los cortes que sufre el explante, composición del medio de cultivo, volumen y calidad del frasco de cultivo (Tabiyet *et al.*, 2006; Van Staden *et al.*, 2006 Abdelwahd *et al.*, 2008).

El establecimiento *in vitro* de tejidos vegetales de algunas especies de plantas, están limitado por la ocurrencia de oscurecimientos letales en los tejidos y en el medio de cultivo. Esto constituye uno de los problemas más serios y frecuentes, desde el inicio y durante el mantenimiento de un tejido cultivado *in vitro* (Tang, y Newton, 2004).

Cuando los tejidos son dañados, por ejemplo durante la preparación del explante, los compuestos fenólicos que están acumulados en grandes cantidades en las vacuolas se mezclan con el contenido de los plastidios y otros orgánulos donde están confiadas las polifenoloxidasas y aparece la coloración negra o marrón como consecuencia del proceso de oxidación. Estos compuestos oxidados son altamente

reactivos e inhiben la actividad enzimática (Hu y Wang, 1983), lo cual puede resultar en un oscurecimiento letal de los explantes.

En general los fenoles son productos extremadamente lábiles que se oxidan con gran facilidad. Estos productos oxidados pueden ser fitotóxicos y a la vez pueden incrementar los procesos de oxidación, debido a que después de oxidados se convierten a la vez en fuertes agentes oxidantes.

Existen estrategias para evitar los procesos de oxidación que conllevan al oscurecimiento de los tejidos del explante cultivado *in vitro*, entre las que tenemos, la prevención y disminución de las circunstancias que provocan o estimulan el estrés oxidativo en el explante es el mejor procedimiento para impedir el desencadenamiento de eventos que conllevan a la oxidación del mismo. Cuando el estrés oxidativo no se logra evitar, se puede recurrir a una serie de medidas prácticas. Según Álvaro Azofeifa, (2009) las principales estrategias utilizadas en el cultivo *in vitro*, para evitar o disminuir los problemas oxidativos que ocurren en los explantes vegetales son:

1. Uso de explantes en estado juvenil o de material en crecimiento activo.
2. Crecimiento del explante a baja luminosidad o en oscuridad.
3. Crecimiento del explante en una temperatura baja.
4. Subcultivos frecuentes.
5. Cultivo en medio líquido.
6. Uso de adsorbentes, en la preparación del explante para su cultivo o en el medio de cultivo.
7. Uso de antioxidantes en la preparación del explante para su cultivo o en el medio de cultivo.
8. Elección del medio de cultivo.
9. Elección de los reguladores del crecimiento.
10. Cambio del potencial osmótico del medio de cultivo.

En el cultivo del sorgo el empleo de antioxidantes ha sido uno de los más empleados. En términos generales, un agente antioxidante es un compuesto que inhibe o demora la oxidación de un sustrato propenso al fenómeno. De esta forma evitan las reacciones en cascada de los radicales libres (Matkowski, 2008). Los antioxidantes

incluyen agentes reductores, los cuales pueden remover oxígenos de moléculas e incluso de compuestos que actúan con mecanismos alternativos, tales como capturadores o desactivadores de iones; reaccionando con intermediarios en el equilibrio redox o en la catálisis del transporte de electrones. Agentes reductores con bajo pH en solución, previenen el oscurecimiento de tejidos, ya que evitan la oxidación de fenoles y ayudan a una rápida remoción de las quinonas formadas. Los principales antioxidantes endógenos de plantas superiores mencionados incluyen a la glutatona, ascorbato, tocoferol, prolina y labetaina (George, 1996).

Según Murashige (1974) la adición de antioxidantes al medio de cultivo en la etapa de establecimiento *in vitro* de los explantes algunas veces es necesario agregar al medio de cultivo un antioxidante que retarda o evita la oxidación, sea del explante o del medio de cultivo. Entre los antioxidantes más incorporados al medio de cultivo encontramos el ácido ascórbico (AA) el ácido cítrico (AC) que disminuyen considerablemente la oxidación que ocurre en los explantes.

El sorgo ha sido caracterizado dentro de las Poaceas como la especie de planta más difícil de manipular por cultivo de tejidos, considerándose recalcitrante (Manjula *et al.*, 2000; Chandrakan *et al.*, 2002; Harshavaradhan *et al.* 2002; Gupta *et al.*, 2006; Kisore *et al.*, 2006, Maheshwari *et al.*, 2006).

El principal problema descrito en los diferentes protocolos de regeneración y transformación en sorgo es la formación de compuestos fenólicos que pueden perjudicar la formación de los callos y la regeneración de plantas (Zhu *et al.*, 1998). En la regeneración de plantas *in vitro* y el sistema de propagación masiva de *Sorghum bicolor* Baskaran y Jayabalan, (2005) empleando ácido ascórbico 33 mg l<sup>-1</sup> lograron detener la exudación (pigmento marrón en de 5 semanas de subcultivo) y mejoraron la frecuencia de regeneración de brotes. Según (Farooq *et al.*, 2002) la adición de antioxidante al medio de cultivo es efectiva para prevenir la exudación de exudados de pigmentos de color oscuro al medio de cultivo y mejoran la regeneración de brotes en algunas especies vegetales.

En general en el cultivo del sorgo podemos resumir que son muy pocos los trabajos en que en la regeneración de plantas se emplean antioxidantes como estrategia para reducir la oxidación fenólica, pues además de los antes mencionados solo (Zhao *et*

*al.*, 2000) que utiliza  $10 \text{ mg l}^{-1}$  de ácido ascórbico en la formación de callos y regeneración de plantas y (Arulselvi y Krishnaveni, 2009) que utilizan caseína hidrolizada en la prevención de la oxidación fenólica.

#### 2.4 Fase II. Proliferación

La proliferación de los diferentes explantes en cultivo *in vitro*, pueden lograrse con el uso de sustancias reguladoras del crecimiento como componentes principales de un medio de cultivo previamente establecido y un adecuado manejo de proceso *in vitro*. Los explantes, al ser divididos en condiciones estériles y cultivadas nuevamente en el medio fresco inducen nuevos brotes, operación que se repite hasta lograr la cantidad de propágulos deseados para pasar a la fase III: Enraizamiento.

Para lograr la multiplicación de propágulos *in vitro*, la proliferación de yemas axilares posibilita la mayor estabilidad genética en las plantas producidas y pueden ser más fácilmente logradas en la mayoría de las especies. Es el método que mayor popularidad ha alcanzado en los últimos años, por ejemplo, en 1974 solo cuatro de las especies que se propagan comercialmente utilizaban este método, a finales de 1981 eran más de 90 especies; ya en 1987 se lograba la multiplicación satisfactoria de más de 1000 especies (Murashige y Huang, 1987).

La regeneración eficiente en el sorgo fue referida por (Pola y Mani, 2006; Kishore *et al.*, 2006 y Baskaran *et al.*, 2006). Sin embargo, la tasa de regeneración de plantas por explante no es lo suficientemente alta para ser una aplicación práctica. Por lo tanto, un protocolo reproducible para la regeneración eficiente de la planta se necesita en el sorgo.

Baskaran *et al.*, (2005) establecieron y optimizaron un sistema de regeneración de genotipos de sorgo agrónomicamente importantes de la India, incluyendo dos variedades comerciales (NSH27 y K8) de *Sorghum bicolor*. Los autores antes mencionados infieren en sorgo la dependencia del genotipo, las concentraciones de las sustancias y la composición de crecimiento y en número de ciclos de regeneración *in vitro* sufrido por la planta donante.

En los genotipos de sorgo (K8 y K5) (Baskaran y Jayabalan, 2005) lograron un aumento de la proliferación de brotes en los segmentos de yemas apicales en el

medio de cultivo MS, enriquecido con reguladores del crecimiento vegetal y agua de coco con marcada influencia en la propagación *in vitro*.

El sistema de producción de plántulas *in vitro* en el medio de cultivo (MS) con la combinación sinérgica de 6-benciladenina (22,2 mM), kinetina (4,6 mM), Adenina Sulfato (2,8 mM), 5% de agua de coco y 3% de sacarosa promovió el número máximo de brotes, así como longitud del tallo fue beneficiado.

#### 2.4.1 Medios de cultivo

El medio de (Murashige y Skoog, 1962) MS es ampliamente utilizado para la micro propagación de plantas; muchas mejoras han sido hechas desde entonces, siendo las más notables, el mejoramiento en los niveles de N, P y K, la reducción del nivel de calcio y la prevención de la precipitación del Fe a pH altos (Hu y Wang, 1983). En la actualidad la mayor parte de las publicaciones reportan el medio de cultivo, MS como medio basal suplementado con concentraciones variables de citoquinina, combinadas, en algunos casos, con auxinas. Aunque una pequeña cantidad de citoquininas pueden ser sintetizadas por los brotes en crecimiento, es reconocido que esta es insuficiente para soportar el crecimiento y desarrollo *in vitro*. Por tal razón, más del 85% de los medios de cultivo empleados en la micro propagación incluyen como suplemento alguna citoquinina.

La proliferación de los brotes axilares se logra con la adición de citoquinina en el medio de cultivo para romper la dominancia apical y estimular la brotación de las yemas que se encuentran en las axilas de las hojas. Su concentración varía en dependencia de balance endógeno de auxinas y citoquininas en los explantes. La 6 Benzilaminopurina (6-BAP) es en general la citoquinina más efectiva y la más empleada en la inducción de yemas axilares, seguida en orden decreciente por la kinetina, el 2-ip y la zeatina, reportándose su utilización en el 74,6%, 19,4%, 3% y 3% respectivamente, de los medios de cultivo empleados en la propagación (Hu y Wang, 1983).

No obstante el papel determinante de la citoquinina en esta fase, en algunos casos es necesario la adición de auxinas para estimular el crecimiento de los brotes. Uno de los posibles efectos de las auxinas en la Fase II es anular el efecto depresivo

acumulado de las altas concentraciones de citoquininas sobre la elongación de los brotes axilares y restablecer el crecimiento normal de los mismos.

En sorgo las sales (MS), complementadas con 4.5-18.1 mM 2,4-D, 5.4-21.5 mM ANA, 5.7-22.8 mM AIA y 4.9-19.7 mM IBA y se combinó con 10% (v / v) de agua de coco (CW) fueron utilizadas para el desarrollo de la organogénesis indirecta en la inducción de callo (Baskaran *et al.*, 2006).

Estos autores cultivaron los callos en medio MS con 2.2-17.8 mM BAP, combinada con 5% (v / v) CW y adición de 2,3 mM 2, 4-D o 2,7 mM ANA. El balance auxinas-citoquininas y determinante en el coeficiente de multiplicación, por lo que al lograr un balance adecuado es posible alcanzar elevadas tasas de proliferación aumentando la efectividad del método de micro propagación.

Sin embargo, el empleo continuado de altas concentraciones de citoquininas en el medio de cultivo puede inducir la formación de yemas adventicias (Evans y Bravo, 1985), lo cual representa un inconveniente dentro del proceso de propagación. No obstante, aún en bajas concentraciones, la formación de yemas adventicias puede ser observada y está muy relacionada con el manejo de los explantes y el número de subcultivos.

### 2.5 Fase III Enraizamiento.

La fase enraizamiento se caracteriza por ser la fase más voluminosa de todo el proceso, pues en ella cada brote, esqueje o yema de forma individual que se ha formado durante la fase de multiplicación, debe ser cultivada y manipulada *in vitro*. Si no se logra una uniformidad en la calidad de la vitroplanta que se produce *in vitro*, ello creará problemas no solo en el desarrollo durante la aclimatización, sino que el rechazo que tiene el producto en su comercialización, ya sea que se comercialice en la Fase III o como vitroplanta ya lista para trasplantarse a campo (fase IV)

Según (Baskaran *et al.*, 2005) las diferenciaciones de plantas de sorgo con alta eficiencia de múltiples de brotes se iniciaron a las cuatro semanas después de la inoculación. Inducción de raíces se logró en la mitad de la fuerza que contiene el medio MS IAA (2,9-28,5 mM). Plantas enraizadas se aclimataron exitosamente y con la tasa de supervivencia a alcanzar casi el 80%. Estas plantas crecieron

normalmente sin mostrar ninguna variación morfológica. Otros como (Saradamani *et al.*, 2003) lograron la producción de raíces en un medio con las sales MS con  $1 \text{ mg l}^{-1}$  de IAA.

Según Sudhakar *et al.* (2007) las plantas *in vitro* proliferaron brotes que fueron alargados y trasladados de forma individual a un medio de inducción de raíz que contenía 2% de sacarosa +  $1,0 \text{ mg l}^{-1}$  de NAA y dentro de 21 días. Estas plántulas regeneradas se aclimatizaron en un suelo mezclado con vermiculita y se alcanzó un 60% de supervivencia.

La concentración de sacarosa en la mayoría de los medios de cultivo para enraizamiento se recomienda elevar para lograr un crecimiento vigoroso de raíces. En poaceas como la caña de azúcar se observa un abundante enraizamiento en medios que contengan entre 5 y 9% de sacarosa (Ballester y González, 1983).

Estos autores al discutir el mecanismo de acción de las concentraciones relativamente altas de sacarosa plantean que su acción en el incremento del desarrollo no es a través de un mecanismo osmótico, aunque tampoco plantean un posible mecanismo que explique su acción.

Con las mayores concentraciones de sacarosa en los medios de cultivo, las vitroplantas presentan una mayor supervivencia al ser sembradas en la fase de aclimatización, debido a una mejor adaptación para soportar el stress hídrico motivados por las condiciones de mayor presión osmótica donde se desarrollan, unido a una mejor constitución morfológica de la vitroplanta. (Jiménez, 1995)

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, ni tratamientos previos a la planta *in vitro* para la formación de callos. Sin embargo, según (Freire, 1998) en *Sacharum* sp. variedad Cuba 87-51 encontró que era necesario incrementar el diámetro del cilindro de la vaina de las hojas de plantas *in vitro* para la formación de callos para lo cual empleó el medio de cultivo con las sales MS y sacarosa ( $30 \text{ g l}^{-1}$ ). Con este pre tratamiento logró formar callos a partir de segmentos de plantas de más 2,4 mm de grosor.

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en la Biofábrica de la provincia de Cienfuegos y en el Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP) de la Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas (UCLV), Santa Clara, durante el período comprendido entre enero 2011 y marzo 2012.

Como material vegetal inicial se tomaron semillas maduras de *Sorghum bicolor* (L.) Moench en las variedades comerciales CIAP 2-E 95 y CIAP 132R obtenidas en la Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas.

#### Desinfección

Se colocaron 50 semillas por frasco de 250 ml<sup>-1</sup> de capacidad que contenía 125 ml de agua desionizada estéril y una gota de Tween-80. Los frascos fueron colocados en zaranda a 140 rpm durante 15 minutos. Luego, las semillas fueron enjuagadas tres veces con agua desionizada estéril. Las semillas se desinfectaron bajo una campana horizontal de flujo laminar, con etanol 70% durante un minuto, hipoclorito de sodio (NaOCl) 3% durante 30 minutos. Finalmente se enjuagaron tres veces con agua desionizada estéril y fueron colocadas en una solución antioxidante que contenía agua desionizada estéril y ácido ascórbico (2 mg l<sup>-1</sup>) hasta su establecimiento en el medio de cultivo.

#### Procedimientos generales

Las semillas fueron germinadas *in vitro* en medio de cultivo basal con sales MS (Murashige y Skoog, 1962), mio - inositol (100 mg.l<sup>-1</sup>), sacarosa (3%), pH 5,7, Fitigel (2,5 g.l<sup>-1</sup>), sin reguladores de crecimiento.

Se colocaron cuatro semillas por frasco de 250 ml de capacidad, con 30 ml de medio de cultivo y se establecieron 20 repeticiones por tratamiento. El material vegetal incubado en cámara de crecimiento con luz solar a 15  $\mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , a temperatura de 28± 2°C y humedad relativa de 80% con subcultivo cada 21 días con medio de cultivo de multiplicación.

Procesamiento estadístico.

Fue utilizado un diseño experimental completamente aleatorizado y se emplearon 20 réplicas en cada experimento con cuatro 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 Kruskal Wallis/ Mann Whitney para ( $p < 0.05$ ) debido que los datos no cumplían los supuestos de distribución normal y homogeneidad de varianzas.

3.1. Efecto del 6-benzilaminopurina y la Kinetina en la proliferación de brotes.

Este experimento se realizó con el objetivo de determinar el efecto del 6-BAP en la proliferación de brotes de Sorgo variedades comerciales CIAP-2E-95 y CIAP132R.

Para ello después de siete días en la fase de establecimiento a las plantas obtenidas a partir de semillas maduras, se le realizó un corte transversal al tallo, a 0,5 cm de altura (a partir de la base) y fueron transferidos a medio de cultivo de multiplicación constituido por sales MS, tiamina ( $2 \text{ ml.l}^{-1}$ ), mio - inositol ( $100 \text{ mg.l}^{-1}$ ), ácido ascórbico ( $50 \text{ mg.l}^{-1}$ ), sacarosa ( $30 \text{ g.l}^{-1}$ ), fitagel ( $2.5 \text{ g.l}^{-1}$ ). El pH fue ajustado a 5,8 con una solución de NaOH (0.1 N) y HCl (0.1N) previo la esterilización.

Se evaluaron concentraciones de 6-BAP (0; 0,04; 0,1; 0,15; 0,22 y  $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$ ) y kinetina (0; 0,05; 0,10; 0,21 y  $0,45 \text{ mg.l}^{-1}$ ). Al final de cada subcultivo se evaluaron las siguientes variables:

- Número de brotes por explante.
- Altura de los brotes (cm).
- Número hojas por brotes.
- Número de brotes fuera de tipo.
- Número de brotes muertos.

Desde el punto de vista cualitativo se evaluó visualmente la presencia de

pigmentos de color oscuro el medio de cultivo.

### 3.2 Efecto del ácido ascórbico en la proliferación de brotes

Este experimento tuvo como objetivo determinar el efecto del ácido ascórbico en la reducción de la oxidación fenólica durante la fase de proliferación de brotes. Por ello se tomaron brotes con un tamaño uniforme y fueron subcultivados en el medio de cultivo con sales MS, la concentración de 6-BAP que produjo el mayor número de brotes por explante, definida en el experimento anterior y diferentes concentraciones de ácido ascórbico (0, 20, 50 y 80 mg.l<sup>-1</sup>).

Al final de cada subcultivo se evaluaron las siguientes variables:

- Número de brotes por explante.
- Altura de los brotes (cm).
- Número hojas por brotes.
- Número de brotes fuera de tipo.
- Número de brotes muertos.

Desde el punto de vista cualitativo se evaluó visualmente la presencia de pigmentos de color oscuro el medio de cultivo.

### 3.3. Efecto de la concentración de sacarosa sobre el engrosamiento de los brotes.

El objetivo del presente experimento fue definir la concentración de sacarosa que favorece el engrosamiento de los brotes para su uso como explante inicial en la formación de callos.

Para ello, los brotes axilares de sorgo de 1,0 cm de altura y 0,2 cm de diámetro del tallo, con cuatro subcultivos a medio de cultivo de multiplicación fueron transferidos para su engrosamiento a un medio de cultivo, constituido por las sales MS, tiamina (2 ml.l<sup>-1</sup>), mio-inositol, (100 mg.l<sup>-1</sup>), ácido ascórbico (50 mg.l<sup>-1</sup>), fitagel (2,5 g.l<sup>-1</sup>) a pH 5,8 con tres concentraciones de sacarosa (20, 40, y 60 g.l<sup>-1</sup>).

A los 21 días de subcultivos fueron evaluadas la siguientes variables:

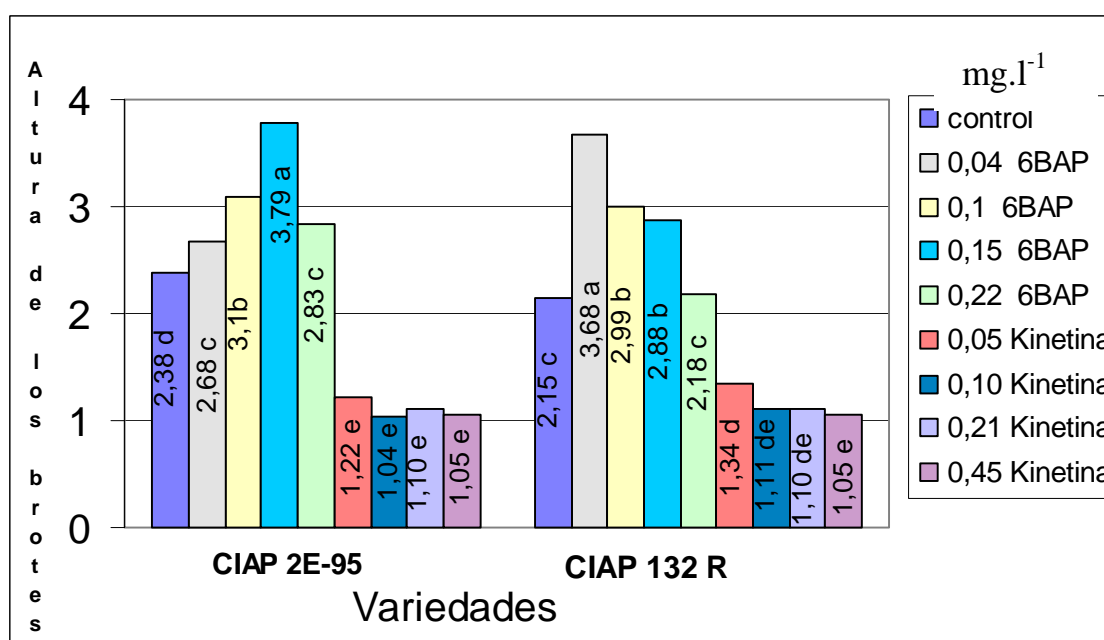
- Altura de los brotes (cm).
- Diámetro de los brotes (cm).
- Número de raíces/ brotes.
- Número hojas por brotes.

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

## 4.1 Efecto del 6-bencilaminopurina y la kinetina en la proliferación de brotes

En la fase de multiplicación, el 6-BAP influyó significativamente sobre el número de brotes por explante con respecto al resto de los tratamientos en el. Se observaron diferencias significativas a los 15 días de trasferidos los explante a medio de cultivo con  $0,15 \text{ mg l}^{-1}$  de 6 BAP (tratamiento IV), con incremento en el número de brotes por explante (3,79) en la variedad CIAP 2E-95, mientras que para la variedad CIAP 132R se logró un número significativamente superior de brotes en el tratamiento II con ( $0,04 \text{ mg l}^{-1}$ ) de 6 BAP (Fig. 1).

Fig 1. Efecto del 6-bencilaminopurina y la kinetina sobre el número de brotes en la multiplicación *in vitro* en las variedades cubanas de sorgo CIAP 2-E-95 y CIAP 132R



Medias con letras diferentes en un mismo cultivar difieren según la prueba de Kruskal-Wallis/Mann Whitney para  $p < 0,05$   $n = 40$ .

El 6-BAP, ha sido utilizado con éxito para estimular la proliferación de brotes en muchos protocolos de cultivo de tejidos de otros cereales (Medina *et al.*, 2004). Según, Syamala y Devi (2003), al incrementar las concentraciones de 6-BAP en el

medio de cultivo de multiplicación de sorgo, se estimuló la formación de brotes axilares. Existen referencias en la literatura sobre formación de yemas múltiples en sorgo, en medios de cultivo con altas concentraciones de citoquininas. La respuesta diferente de las dos variedades a la concentración de 6 BAP muestra evidencias de su comportamiento como genotipo dependiente.

El número de hojas, longitud de los brotes varió en todas las concentraciones de 6-BAP y kinetina usadas en la multiplicación de los brotes. Al incrementar la concentración de 6-BAP y kinetina disminuyó la altura del brote y número de hojas en ambas variedades, debido a que el equilibrio auxina-citoquininas favorece a estas últimas que promueven la división celular (Villegas, 1990). Se observó una tendencia a la formación de yemas múltiples en la base del explante, en medios de cultivo con kinetina (0,10 y 0,21  $\text{mg.l}^{-1}$ ). En ninguno de los tratamientos evaluados se observó mortalidad de los explante durante los 21 días de cultivo.

En este sentido Sudhakar *et al.*, (2006) encontraron que el sorgo se comporta como genotipo dependiente al obtener una respuesta diferente en seis variedades de sorgo a la formación de brotes múltiples en presencia de 2  $\text{mg.l}^{-1}$  de 6 BAP. Este autor obtiene yemas múltiples por la elevada concentración de 6-BAP usada, mientras que en el presente trabajo se forman yemas axilares empleando bajas concentraciones de esta citoquinina (0.04 y 0.15  $\text{m.g.l}^{-1}$ ). Es evidente, que en estas condiciones el sorgo es genotipo dependiente, por lo que los protocolos de regeneración deben ser optimizados para cada especie y cultivar (Gupta *et al.*, 2006).

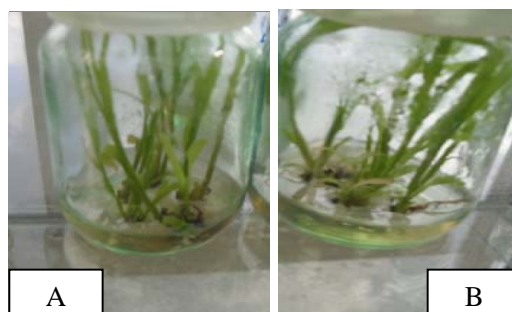


Figura 2. Brotes de sorgo variedades CIAP 2E- 95 (A) y CIAP 132 R (B) obtenidos o con 0,15 y 0.04  $\text{mg.l}^{-1}$  de 6-BAP respectivamente a 21 días de cultivo

Tabla 1. Efecto del 6-bencilaminopurina y la kinetina sobre el número de hojas y altura de los brotes en la multiplicación *in vitro* de las variedades de sorgo CIAP 2-E-95 y .CIAP 132R

Tratamientos	Número de hojas				Altura media de los brotes			
	CIAP 132R		CIAP 2E-95		CIAP 132R		CIAP 2E-95	
	Medias	Rangos o medias	Medias	Rangos o medias	Medias	Rangos o medias	Medias	Rangos o medias
I	3,97	150,48 a	3,97	139,10 a	1,93	126,93 ab	2,59	161,43 a
II	4,05	160,50 a	4,06	145,78 a	1,98	135,13 a	1,98	121,75 b
III	3,32	114,48 b	4,07	153,21 a	1,97	131,55 a	1,97	118,50 b
IV	2,91	90,58 c	3,32	103,83 a	1,90	120,25 ab	2,05	122,15 b
V	2,93	91,50 bc	2,93	82,85 b	1,79	108,68 a	1,85	109,05 b
VI	3,03	89,65 bc	3,03	78,60 b	1,30	72,13 c	1,43	71,68 c
VII	2,40	43,43 d	2,40	41,93 c	1,03	49,80 d	1,19	50,63 c
VIII	1,92	28,88 e	1,92	28,13 d	0,97	46,00 de	1,04	39,38 c
IX	2,28	45,03 de	2,28	42,48 c	0,69	24,05 e	0,79	19,95d

Medias con letras diferentes en una misma columna difieren según la prueba de Kruskal-Wallis/Mann Whitney para  $p < 0,05$   $n=40$

Según, Baskaran *et al.* (2005) lograron en sorgo el mayor número de brotes por explante, cuando incrementaron las concentraciones de 6-BAP hasta  $0,15 \text{ mg.l}^{-1}$ . Además, lograron incrementar con esta concentración la longitud del brote con adición al medio de cultivo de ácido indolacético (AIA) y  $40 \text{ g.l}^{-1}$  de sacarosa. En nuestros resultados, la disminución de la altura con  $0,15 \text{ mg.l}^{-1}$  de 6-BAP, fue debido a la ausencia de auxinas. Sin embargo, estas variables, estuvieron dentro de los límites aceptables para esta fase, donde nuestro objetivo fundamental fue incrementar el número de brotes por explante. Baskaran *et al.* (2005) encontraron solo que la combinación de 6 BAP ( $13.3 \text{ } \mu\text{mol}$ ) con de ANA ( $2,7 \text{ } \mu\text{mol}$ )

incrementó la altura de los brotes en las variedades comerciales (NSH27 y K8) de *Sorghum bicolor*. Resultados similares refieren Abubachker y Murugesan (1999) quienes lograron en sorgo un incremento de la altura con 1,5 mg.l<sup>-1</sup> de 6 BAP y 0,5 mg.l<sup>-1</sup> ANA en *Sorghum*.

En todos los tratamientos se observaron pigmentos de color oscuro con apariencia de oxidación fenólica en la base de los explantes y en el medio de cultivo, siendo más marcadas en la variedad CIAP 2E-95.

Los altos niveles de oxidación fenólica parecen ser generalizados en muchas especies de monocotiledóneas. También, Baskaran y Jayabalan (2005) observaron en la multiplicación de brotes de sorgo la producción de pigmentos de color marrón oscuro. Se conoce que la alta producción de compuestos fenólicos hacen que el sorgo sea considerada, la planta monocotiledónea más difícil de manipular en el cultivo de tejidos, así como la menor respuesta a la regeneración de plantas (Gupta *et al.*, 2006; Masherawari *et al.*, 2006). Se plantea, en diferentes protocolos de regeneración que el principal problema en sorgo es la formación de compuestos fenólicos que afectan la regeneración de plantas, pues estos perjudican la regeneración de plantas (Sudhakar *et al.*, 2007).

El 6 BAP estimula en concentraciones de 0,04 y 0,15 mg.l<sup>-1</sup> en las variedades CIAP 132R y CIAP 2E-95 estimulan la formación brotes axilares y reducen la formación de yemas múltiples.

#### 4.2 Efecto del ácido ascórbico en la multiplicación de brotes.

La figura 3 muestra el efecto del ácido ascórbico sobre el número de brotes en la multiplicación *in vitro* de las variedades cubanas de sorgo CIAP 2E-95 y CIAP 132 R. Se pudo observar la eliminación de exudados de pigmentos de color oscuro al medio de cultivo y en la superficie de los explantes, al ejercer este antioxidante un efecto benéfico al inhibir o demorar la oxidación del sustrato y de esta forma proteger las hormonas endógenas presentes en los explantes (Vasar 2004).



Figura 3 Aspecto de los brotes *in vitro* de sorgo variedad CIAP 2E-95 a los 21 días de cultivo. (A) tratamiento control sin ácido ascórbico. (B) tratamiento con  $50 \text{ mg l}^{-1}$  de ácido ascórbico.

La Tabla 2 muestra el efecto del ácido ascórbico sobre el número de brotes en el cual se produce un incremento significativo en el número de brotes al utilizar  $50$  y  $20 \text{ mg l}^{-1}$  de ácido ascórbico en las variedades CIAP 2E-95 y CIAP 132R respectivamente. Con respecto a las demás concentraciones evaluadas, incluyendo el control que contenía las sales MS,  $0,5$  y  $0,04 \text{ mg l}^{-1}$  de 6-BAP para las variedades CIAP 2E-95 y CIAP 132R respectivamente sin ácido ascórbico.

La adición de antioxidantes al medio de cultivo han sido eficaces en la prevención de la oxidación con un aumento en la eficiencia de regeneración de brotes sanos (Farooq *et al.*, 2002).

De esta forma Baskaran y Jayabalan, (2005) evitaron la aparición de la oxidación fenólica con la incorporación al medio de cultivo de ácido ascórbico ( $30 \text{ mg l}^{-1}$ ) y lograron una alta frecuencia de regeneración en los genotipos de sorgo K8 y K5. Los resultados del presente trabajo muestran la diferente respuesta de las dos variedades a las concentraciones de ácido ascórbico, lo cual evidencia su comportamiento como genotipo dependiente ante este antioxidante.

Tabla 2 Efecto del ácido ascórbico sobre el número de brotes en la multiplicación *in vitro* de la variedad de sorgo CIAP 2-E-95 y CIAP 132 R

Tratamientos	Número de brotes por explante			
	CIAP 2E-95		CIAP 132R	
	Medias	Rango Medio	Medias	Rango Medio
I( Control)	2,21	31,64 c	2,00	30,2 b
II	3,81	41,69 b	3,87	53,53 a
III	4,22	63,29 a	3,67	35,21 b
IV	3,71	36,02 b	3,66	35,06 b

Medias con letras diferentes en una misma columna difieren según la prueba de Kruskal-Wallis/Mann Whitney para  $p < 0,05$   $n=40$ .

La tabla 3 muestra el efecto del ácido ascórbico sobre el número de hojas y la altura de los brotes en la multiplicación *in vitro* de la variedad cubana de sorgo CIAP 2E-95 y CIAP 132 R. En ambas variables evaluadas se obtuvo una respuesta similar a la obtenida en el número de brotes, produciéndose una respuesta diferente entre las variedades. El número de hojas y altura de la planta en la variedad CIAP 2E-95 fue significativamente superior con  $50 \text{ mg.l}^{-1}$ , mientras que para la CIAP 132R se lograron valores superiores con  $20 \text{ mg.l}^{-1}$ . En estas condiciones las variedades se comportan como genotipo dependiente.

Tabla 3 Efecto del ácido ascórbico sobre el número de hojas y la altura de los brotes en la multiplicación *in vitro* de la variedad cubana de sorgo CIAP 2E-95 y CIAP 132 R

Tratamientos	Número de hojas				Altura de los brotes (cm)			
	CIAP 2E-95		CIAP 132R		CIAP 2E-95		CIAP 132R	
	Medias	Rango Medio	Medias	Rango Medio	Medias	Rango Medio	Medias	Rango Medio
I (Control)	3,32	33,20 b	4,05	40,5 b	2,05	39,80 b	1,98	19,6 c
II	3,24	30,89 b	3,28	56,98 a	2,04	39,76 b	2,19	52,10 a
III	4,04	46,89 a	3,92	31,36 b	2,37	59,50 a	2,00	37,48 b
IV	3,26	31,03 b	3,37	34,23 b	2,06	41,74 b	1,97	34,97 b

Medias con letras diferentes en una misma variedad difieren según la prueba de *Kruskal-Wallis/Mann Whitney* para  $p < 0,05$   $n=40$ .

Los altos niveles de oxidación fenólica generalizada en muchas especies de monocotiledóneas y fundamentalmente en sorgo, parecen ser los responsables de la reducción del número de brotes por explante, altura de la planta y número de hojas. La incorporación al medio de cultivo de ácido ascórbico disminuye considerablemente la oxidación de los explantes (Azofeifa, 2009). Este antioxidante es un agente reductor que puede reducir y de tal modo neutralizar reacciones del oxígeno, como el peróxido de hidrógeno (Coulter *et al.*, 2006). Con la incorporación al medio de cultivo de  $50 \text{ mg l}^{-1}$  de ácido ascórbico, se logró eliminar la oxidación fenólica de color oscuro de la base de los explantes (Fig. 3). 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  $10 \text{ mg l}^{-1}$  de ácido ascórbico (Zhao *et al.*, 2010). El hecho de que nuestros resultados difieran de los anteriores y sean más eficaces con  $50 \text{ mg l}^{-1}$  de ácido ascórbico, estuvo

influenciado por genotipo estudiado CIAP 2E-95 que posee alto contenido de taninos (metabolitos secundarios, fenólicos no nitrogenados, solubles en agua y no en alcohol, ni solventes orgánicos).

Además, se conoce que el sorgo en la regeneración de plantas, responde como genotipo dependiente. Con este tratamiento se incrementa el número de brotes, altura y el número de hojas no solo 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, sino también porque este agente reductor está implicado en los procesos de división y el alargamiento celular (Kishore *et al.*, 2006).

La adición al medio de cultivo de concentraciones de ácido ascórbico eliminó la presencia de pigmentos de color oscuro, incrementó el número de brotes por explante, el número de hojas y altura de los brotes respectivamente en CIAP 132R y CIAP 2E-95.

#### 4.3 Efecto de la sacarosa sobre el grosor del tallo en plantas *in vitro*

El efecto de la sacarosa en el medio de cultivo MS sobre el diámetro de los brotes *in vitro* de sorgo variedad CIAP 2E-95 y CIAP 132R se puede observar en la tabla 4. Se produjo un incremento con respecto al resto de los tratamientos en la altura de los brotes, número de hojas y formación de raíces por planta al emplear 40 g l<sup>-1</sup> de sacarosa en el medio cultivo.

Tabla 4. Efecto de la sacarosa en el medio de cultivo sobre el diámetro de los brotes *in vitro* de sorgo variedad CIAP 2-E-95 y CIAP 132R

Tratamientos	Número de hojas				Altura de los brotes (cm)			
	CIAP 2E-95		CIAP 132R		CIAP 2E-95		CIAP 132R	
	Medias	Rango Medio	Medias	Rango Medio	Medias	Rango Medio	Medias	Rango Medio
I	2,55	15,08 b	1,85	12,75 c	2,67	19,45 b	3,35	28,90 b
II	3,07	49,82 a	3,85	51,05 a	3,86	50,00 a	4,05	50,07 a
III	2,91	26,10 c	2,73	29,81 b	2,90	21,55 b	3,63	15,4 c

Medias con letras diferentes difieren según la prueba de Kruskal-Wallis/Mann Whitney para  $p < 0,05$   $n=40$ .



Figura 4. Plantas *in vitro* de sorgo variedad CIAP 2E-95 en medio de cultivo de engrosamiento compuesto por las sales MS y  $40 \text{ g.l}^{-1}$  de sacarosa para la formación de callos, a los 21 días de cultivo

No existen referencias en la literatura para el cultivo del sorgo de tratamientos previos a la planta *in vitro* para la formación de callos. Sin embargo, ha resultado indispensable para lograr este objetivo colocar las plantas en un medio de cultivo que incremente el vigor, para que los fragmentos de plantas utilizados como explantes formen callos. Según, Freire, (1998) en *Sacharum* sp. variedad Cuba 87-51 se incrementó el diámetro de la plantas *in vitro* en medio de cultivo con las sales MS y sacarosa ( $30\text{g l}^{-1}$ ), con este pretratamiento logró formar callos a partir de segmentos de plantas de más 2,4 mm de grosor.

Las altas concentraciones de sacarosa en el medio de cultivo constituyen un suplemento energético de la célula y aumentan el potencial osmótico en el medio de cultivo. Según George *et al.* (2008) el potencial osmótico del medio de cultivo influye en el crecimiento de los cultivos y se podría esperar que sea la concentración óptima de sacarosa la que promueve este efecto, la cual puede variar de un medio a otro. Además refiere que el alto potencial osmótico disminuye el contenido de agua en la célula e incrementan en esta las concentraciones de nutrientes asimilables por la planta. El incremento del valor nutricional promueve el crecimiento celular y pudiera ser la causa de formar plantas con mayor grosor del tallo, altura, número de hojas y que emitan raíces con  $40\text{ g.l}^{-1}$  de sacarosa en ausencia de auxinas en el medio de cultivo. En muchas especies de plantas concentraciones entre 4,5 y 6 % benefician el crecimiento de plantas cultivadas *in vitro* y estimulan el enraizamiento (Lassocinski, 1985). El incremento de la concentración de sacarosa hasta  $40\text{ g.l}^{-1}$  en el medio de cultivo incrementa el grosor del tallo, altura, y número de hojas.

## V. CONCLUSIONES

1. Se incrementó el número de brotes por explante en las variedades CIAP 132R y CIAP 2E-95 con empleo de 0,04 y 0,15 mg.l<sup>-1</sup> de 6-BAP, comportándose como genotipo dependiente.
2. La adición al medio de cultivo de concentraciones 20 y 50 mg.l<sup>-1</sup> de ácido ascórbico eliminó la presencia de pigmentos de color oscuro, incrementó el número de brotes por explante, el número de hojas y altura de los brotes respectivamente en CIAP 132R y CIAP 2E-95.
3. Se logró aumentar el grosor de los brotes para la formación de callos, con el incremento de la concentración de sacarosa a 40 g.l<sup>-1</sup> en el medio de cultivo.

## VI. RECOMENDACIONES

Emplear el protocolo propuesto en el presente trabajo para la obtención de explantes para la fase de inducción de callos y su posterior uso en el desarrollo de la embriogénesis somática en las variedades CIAP 2E-95 y CIAP 132R.

## VII. BIBLIOGRAFÍA 80

- Abdelwahd, R., Hakam, N., Labhilili, M. & UduPa, S.M. (2008). Use of an adsorbent and antioxidants to reduce the effects of leached phenolics in vitro plantlet regeneration of faba bean. *African Journal of Biotechnology*, 7(8). [Online]. Available: [http://www.ajol.info/index.php/ajb/article/viewFile/58590/4\\_6931](http://www.ajol.info/index.php/ajb/article/viewFile/58590/4_6931)[2012, enero 10].
- Abubachker, M.N., & Murugesan, N.P. (1999). In vitro organogenesis of various explants of *Sorghum bicolor* (L.) Moench (Sweet sorghum). *Plant Tiss Cult*, 9, 173-176.
- Arulselvi, I., & Krishnaveni, S. (2009). Effect of hormones, explants and genotypes in in vitro culturing of sorghum. *J Biochem Tech*, 1(4). [Online]. Available: <http://jbiochemtech.com/4two.pdf>[2012, enero 28].
- (Azofeifa, 2009). Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes in vitro. *Agronomía Isoamericana*, 20(1), 153-175.
- (Baffes, 1998). Structural reforms and price liberalization in Mexican agricultura. [Abstract]. *Journal of International Development*, 10(5). [Online]. Available: [http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/\(SICI\)1099-1328\(199807/08\)10:5%3C575::AID-JID430%3E3.0.CO;2-L/abstract](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/(SICI)1099-1328(199807/08)10:5%3C575::AID-JID430%3E3.0.CO;2-L/abstract). [2012 enero 19 ].
- Ballester, R., & González, A. (1983). Comprobación de la eficiencia de nuevos medios de cultivo en enraizamiento de plantines de caña de azúcar (*Saccharum* ssp. Híbrido) obtenidos por cultivos de tejidos. Trabajo de Diploma. Universidad Central de las Villas. Facultad de Ciencias Agrícolas. Santa Clara, Villa Clara, Cuba, 19.
- Baskaran, P., Raja Rajeswari, B., & Jayabalan N. (2005). A simple approach to improve plant regeneration from callus culture of *Sorghum bicolor* for crop improvement. *Journal of Agricultural Biotechnology*;. 1 (1), 179-192

- Baskaran, P., Rajeswari, B.R. & Jayabalan, N. (2006). Development of an *In Vitro* Regeneration System in Sorghum [*Sorghum bicolor* (L) Moench] Using Root Transverse Thin Cell Layers. *Turkish Journal of Botany*, 30. [Online]. Available: <http://journals.tubitak.gov.tr/botany/issues/bot-06-30-1/ bot-30-1-1-0502-3.pdf> [2012, enero 28].
- Bray, E., Bailey-Serres, J. & Weretilnyk, E. (2000). Responses to abiotic stresses. In: Buchanan, B. Gruissem, W; Jones, R. [Eds]. *Biochemistry and molecular biology of plants. american society of Plant Physiologists*. (pp. 1158-1203). Maryland, USA.
- (Caballero, 1998b). Recuperación de la disponibilidad de semilla categorizada de granos básicos del país. Instituto de Investigación Hortícolas “Liliana Dimitrova”, La Habana. p.274.
- Campbell, M.A., Lara, M.H. & Jennifer, C. (1998) The characterization of a gene encoding a putative germin-like protein from *Solanum tuberosum*. *Plant Physiol*, 118, 711–715
- (Cassells, 1991). Problem in tissue culture contamination en Micropropagation. Debergh, Zimmermann RH. (Eds). *Kluwer Academic Publishers, Dordrecht (Netherlands)*, pp. 31-44.
- Chandrakanth, E., Sunil, K. G. y Rathore, K. S. (2002) Transgene silencing and Chinese. *Bull Bot*, 25, 465-468.
- (Coulter et al., 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*, 21, (7), 735-744.
- Debergh, P.C. & Maene L.J., (1981). A scheme for commercial propagation of ornamental plant by tissue culture. *Scientia Hort*, 14, 335-345.
- (Duke 1983). Sorghum X alium Parodi. Handbook of energy crops[Online]. Available: <http://www.hort.purdue.edu/newcrop/duke-energy/Sorghum-Xalmu m.html> [2012, mayo 20].

- Duncan, R.R., Waskom, R.M. & Nabors, M. W.(1995) *In vitro* screening and field evaluation of tissue-culture-regenerated sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) for soil stress tolerance. [Abstract], *Euphytica*, 85, (1-3). [Online]. Available: <http://www.springerlink.com/content/w17g2104h2034025/> [2012, mayo 20].
- Evans, D.A., & Bravo, J.E. (1986). Phenotypic and genotypic stability of tissue cultured plants. In: R.H. Zimmerman, Tissue culture as a plant production system for horticultural crops. (pp. 73-94) Dordrecht (Netherlands): Martinus Nijhoff Publishers.
- FAO-ICRISAT. (1997). La Economía del sorgo y del mijo en el mundo; hechos, tendencias y perspectivas. ICRISAT. p.123.
- Farooq S.A., Farooq T.T. & Rao T. (2002). Micropropagation of *Annona squamosa* L. using nodal explants. *Pakistan Journal of Biological Science*, 5 (1), 43-46.
- Freire M. (1998). Embriogénesis somática en caña de azúcar (*Saccharum* sp. híbrido variedades.87 – 51) Tesis para optar por el grado Científico de Master en Biotecnología Vegetal inédita. p.61.
- Funes, F., & Yepes, S. (1978). Discriminación de especies y variedades de gramíneas introducidas en Cuba. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 12(2), 179-188.
- George, E.F. (1996). Plant propagation by tissue culture; Part 2. in Practice. (2 Ed, pp. xii + pp. 575-1361), Westbury, England: Exegetics Limited.
- George, E.F., & Sherrington, P.D. (1984). Plant propagation by tissue culture: Handbook and directory of commercial laboratories. (pp. 182-189). Eversley, England: Exegetics Ltd.
- George, F.E., Hall, M. A. & De Klerk, G-J. (2008). Plant Tissue Culture Procedure – Background. Plant Propagation by Tissue Culture. (3 Ed, 1, 131-139.) Springer Netherlands:Biomedical and Life Sciences
- Gnansounou, E., Dauriat, A. & Wyman C.E. (2005). Refining sweet sorghum to ethanol and sugar: Economic trade-offs in the context of north china. *Bioresour. Technol*, 96, 985-1002.

- Graveros, I.E. (2003). Cultivos sorgos granjeros. [En línea]. Disponible: <http://www.producción.com.ar/2003/03ago-10.htm>. [2012 marzo 08]
- Gratão, P.L., Polle, A., Lea, P.J. & Azevedo, R.A. (2005). Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. *Functional Plant Biology*, 32, 481-494.
- Gupta S., Khanna V., Singh R., Garg G. (2006). Strategies for overcoming genotypic limitations of *in vitro* regeneration and determination of genetic components of variability of plant regeneration traits in sorghum. *Plant Cell Tiss Organ Cult.*, 86, 379–388.
- Harshavardhan, D., Rani, T.S., Ulaganathan, K. & Seetarama, N. (2002) An improved protocol for regeneration of *Sorghum bicolor* from isolated shoot apices. *Plant Biotechnol.*, 19, 163-171.
- (Hernández 1997). Obtención de plantas libres de patógenos. Curso teórico práctico de Propagación Masiva de Plantas. Instituto de Biotecnología de las Plantas p. 31-43.
- Hu, C.V., Wang, J.P. (1983). Meristem, shoot tip and bud culture. En: Handbook of Plant Cell Culture. Evans, D.A.; Ammirato, P.V. y Yameda, Y. (eds). MacMillan Publishing, Nueva York. v. 1, p 177-227.
- ICRISAT. (1998) Partnerships in research for development. Annual Report. Instituto Internacional de Investigación de Cultivos para las zonas tropicales semiáridas. Andha Pradesh, India. p.12.
- Jaramillo, M. (1991). Estudio nutricional de cultivares de sorgo graniferos (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) alto en taninos condensados producidos en Venezuela. Tesis de maestría. Postgrado en producción animal. Facultad de agronomía y ciencias veterinaria. Universidad Central. Venezuela.
- (Jiménez 1998). Propagación y mejoras de plantas por Biotecnología. p.48
- (Jiménez 1995). Propagación in vitro de la caña de azúcar (*Saccharum sspnm* Híbrido). Tesis de Doctorado. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de las Villas. Santa Clara. p.24.
- Jiménez, E., García, L., Suárez, M. & Alvarado, Y. (1997). Instructivo técnico para la micropropagación de la caña de azúcar. Instituto de Biotecnología de las Plantas.

- Jogeswar, G., Ranadheer, D., Anjaiah, V. & KaviKishor, P.B. (2007). High frequency somatic embryogenesis and regeneration in different genotypes of *Sorghum bicolor* (L.) Moench from immature inflorescence explants. *In vitro Cell Dev. Biol.*, 43, 159-166.
- (Kantha 1981). Meristem culture and cryopreservation: Methods and applications. In: Plant Tissue Culture, Methods and Applications in Agriculture. T.A. Thorpe (ed) (pp. 181-211). New York: Academic Press.
- Kishore K., Visarad K., Aravinda Y., Pashupatinath E., Rao S. & Seetharama N. (2006). *In vitro* culture methods in sorghum with shoot as the explant. *Plant Cell*, 25, 174-182.
- Krikorian, A. D. (1991) Propagación clonal *in vitro*. En: Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos teóricos prácticos. Roca, W.M. y Mroginski L.A. (eds). (pp. 95-126). Colombia: CIAT
- Lassocinski, W. (1985). Chlophyll-deficient cacti in tissue cultures. *Acta Hort.* 167, 287-293.
- Liming Zhao, L., Li, S. and Song, S. (2010). Optimization of callus induction and plant regeneration from germinating seeds of sweet sorghum (*Sorghum bicolor* (L) Moench). *African Journal of Biotechnology*, 9(16), 2367-2374.
- (Liu, et al., 2009). Research advances into germplasm resources and molecular biology of the energy crop sweet sorghum[Abstract] *China Bull Bot.*, 44, 253-261.
- Machado, R., y Menéndez, J. (1979). Descripción de gramíneas y leguminosas. En: Los pastos en Cuba. Ministerio de la Agricultura. La Habana, Cuba. p. 91.
- (Maheswari 2006). *Efficient plant regeneration from shoot apices of sorghum*. *Biol Plant.*, 50, 741–744.
- Manjula, S.M., Kuru vinashetti, M.S. & Harti, C.C. (2000). *Regeneration establishment and evaluation of soma clones in Sorghum bicolor* (L.) Moench. *Euphytica*, 115, 173-180.
- (Matkowski 2008). Plant *in vitro* culture for the production of antioxidants – a review. *Biotechnology advances*, 26: 548-560.

- Medina, R., Faloci, M., Marassi, M.A. and Mroginski, L.A. (2004). Genetic stability in rice. pp. 101-104
- Murashige, T. Y. & Skoog, F.S. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Plant Physiol*, (5), 173-197.
- (Murashige 1974). Plant Propagation through Tissue Culture. *Ann. Rev. Plant. Physiology.*, 25, 135-166.
- Murashige, T., & Huang L.C, (1987). Cloning plants by tissue culture: Early years, current status and future prospects. *Acta Hort.*, 212, 639-643.
- Niemeijer, D. (1998). Soil nutrient harvesting in indigenous teras water harvesting in Eastern Sudan. *Land Degradation and Development.*, 9 (4), 323
- (Novoa et al., 2001). Actividad antioxidante y ácidos fenólicos del alga marina *Bryothamnion triquetrum* (s.g. gmelim) Howe. *Revista Brasileira de ciências Farmacêuticas*, 37, 373-382.
- Oldach, K.H., Morgnstern, A., Rother, S. Girgi, M., O'Kennedy, M. & Lorz, H (2001). Efficient *in vitro* regeneration from immature zygotic embryos of pearl millet (*Pennisetum glaucum* (L) R.Br.) and *Sorghum Bicolor* (L) Moench. *Plant Cell Rep.*, 20, 416-421
- (Oramas 1998b). Nueva colección se sorgo (*Sorghum bicolor* L.) para diferentes fines. IIHLD, La Habana. p.161.
- (Oramas *et al.*, 2002). Obtención de variedades de sorgo (*Sorghum bicolor*) de doble propósito a través del método de selección progenie por surco. *Agrotecnia de Cuba*, 28 (1), 39
- (Oramas 2003). Evaluación de nuevas variedades de sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) de grano para consumo humano y animal. *Cultivos Tropicales*, 24 (1), 73.
- (Pérez 2010) Caracterización y potencialidades del grano de sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench). *Pastos y Forrajes*, 33(1), 1-18.
- Pola-Sudhakar, R. & N Saradamani. (2006) Somatic embryogenesis and plantlet regeneration in *Sorghum bicolor* (L.) Moench, from leaf segments *Journal of Cell and Molecular Biology* 5(2), 99-107

- Pompeu, G, Gratão, P; Vitorello, V. & Azevedo, R. (2008). Antioxidant isoemzym responses to nickel-induced stress in tabacco cell suspension culture. *Scientia agrícola*, 65, 548-552
- (Rodríguez 2006). Agricultura Urbana: Una expresión de la agricultura agraria cubana. En: Las Investigaciones agropecuarias en Cuba cien años después.( pp.115). La Habana: Editorial Científico-Técnica.
- Rooney, W.L., Blumenthal, J., Bean, B. & Mullet, J.E. (2007). Designing sorghum as a dedicated bioenergy feedstock. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 1, 147-157.
- (Sánchez 1998). Densidad de población óptima de sorgo enano de grano "V-3018". Producción de cultivos en condiciones tropicales. IIH "Liliana Dimitrova". La Habana, p. 47
- Saradamani, N., Muralimohan, S.; Sudhakar, R.P. & Dora, (2003). *In vitro* morfogénesis in cultivated varieties of *Sorghum bicolor* (L) Moench. *Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology*, 4, 43-48.
- (Saucedo 2008) Empleo del sorgo en la alimentación animal y humana. Taller Nacional sobre empleo del sorgo. Universidad Central de Las Villas. Santa Clara.
- Sudhakar N., Sarada M. & Ramana T. (2008). Plant tissue culture studies in *Sorghum bicolor*, immature embryo explants as the source material. *International Journal of Plant Production*, 2(1), 1-14.
- Sudhakar R., Saradamani N. & Ramana T., (2007) Enhanced shoot regeneration in tissue culture studies of *sorghum bicolor*. *Journal of agricultural Tecnology*, 32, 275-286.
- Syamala D. & Devi P. (2003). Efficient regeneration of sorghum, *Sorghum bicolor* (L.) Moench, from shoot-tip explant. *Indian Journal of Experimental Biology*, 41, 1482-1486.
- Tabiyeh, D., Bernard, F. & Shacker, H. (2006). Investigation of glutathione, salicylic acid and ga3 effects on browning in *pistacia vera* shoot tips culture. *Acta Horticulturae*, 726, 201-204.

- Tang, W. & Newton, R. (2004). Increase of polyphenol oxidase and decrease of polyamines correlate with tissue browning in Virginia pine (*Pinus virginiana* mill.). *Plant science*, 167, 621-628.
- Van Staden, J., Fennell, C. & Taylor, N. (2006). Plant stress *in vitro*: the role of phytohormones. *Acta Horticulturae*, 725, 55-62.
- (Vasar 2004). Application of antioxidants in rooting of *Prunus avium* L. microshoots. *Acta Universitatis Latviensis, Biology*, 676, 251-256.
- (Vasil 1994). Automation of plant micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 39 (2), 105-108.
- Vatanpour-Azghandi, A., Villiers, T., Ghorbani, A. & Tajabadi, A. (2002). The microscopy of tissue decolouration and browning problem in pistachio callus cultures. *Acta Horticulturae*, 591, 377-388.
- Villalobos, A. y García, V.A. (1982). Obtención de plantas de clavel (*Dianthus caryophyllus* L.) libres de virus por cultivo *in vitro* de meristemos y ápices vegetativos, *Agrociencia*, 48, 107-118.
- Zhao L., Liu S. & Song S. (2010). Optimization of callus induction and plant regeneration from germinating seeds of sweet sorghum (*Sorghum bicolor* Moench). *African Journal of Biotechnology*, 9 (16), 2367-2374.
- Zhao L.M., Liu S.J. & Song S.Q. (2008). Efficient induction of callus and plant regeneration from seeds and mature embryos of sweet sorghum. *Chinese Bull Bot.*, 25, 465-468.
- Zhao, Z.Y., Cai T., Tagliani L., Miller M., Wang N. & Pang H, et al., (2000). *Agrobacterium*-mediated sorghum transformation. *Plant Mol. Biol.* 44: 789-798.
- Zhong, H., Wang, W. & Sticklen, M.B. (1998). *In vitro* morphogenesis of *Sorghum bicolor* (L.) Moench: efficient plant regeneration from shoot apices. - *J. Plant Physiol.*, 153, 719-726,
- Zhu H., Muthukrishnan, S., Krishnaveni, S., Wilde, G. Jeoung, J.M. & Liang, G.H. (1998). Biolistic transformation of sorghum using a rice chitinase gene. *J. Genet. Breed*, 52, 243-252.