تولید کالوس از بذر بالغ سورگوم شیرین (*Sorghum bicolor* L)

فریبا هادیان،[۱] علی اکبر احسانپور،[۲] عباس المدرس[۳]

چکیده

در مطالعه حاضر با توجه به اهمیت گیاه سورگوم شیرین اندامهای مختلف گیاه شامل قطعات برگ، ریشه و بذر بالغ از گیاهان رشد یافته در شرایط کشت این ویترو در محیط کشت MS روی محیط کشت های حاوی ترکیب مختلفی از هورمونهای IBA, NAA, 2,4-D, Kinetin, کشت گردید. در بین قطعات کشت شده تنها بخشهای تازه روئیده از بذر بالغ جوانه زده روی محیط کشت حاوی 2,4-D و Kinetin توانست پس از ۱ تا ۳ ماه کالوس تولید کند.

واژه های کلیدی: *کالوس، سورگوم شیرین، کشت در شیشه*

مقدمه

جنس سورگوم متعلق به تیره گندمیان (Poaceae) و بومی نواحی گرمسیری و نیمه‌گرمسیری آفریقای شرقی است. انواع گونه‌های این جنس در شمال اروپا، شمال آسیا و آمریکای مرکزی کشت می‌شوند. طبق گزارش سازمان خوار و بار جهانی FAO در سال ۲۰۰۵، ۴۴۰/۰۰۰ کیلومتر مربع از زمین‌ها کشاورزی به کشت سورگوم تخصیص داده شده است (۱۲).

این جنس دارای ۲۱ گونه وحشی و ۳۱ گونه زراعی می‌باشد و پس از گندم، برنج، ذرت و جو پنجمین غله از نظر تولید و مصرف در دنیا می‌باشد. انواع گونه‌های سورگوم بر حسب موارد مصرف به ۴ دسته تقسیم‌بندی می‌شوند: ۱- سورگوم‌های دانه ای (Grain sorghum) مانند milo برای تولید انواع نوشیدنی‌ها ۲- سورگوم‌های علفی (Grass sorghum) به عنوان علف خشک در تغذیه دام و احشام ۳- سورگوم‌های شیرین (Grass sorghum) برای تولید شربت سورگوم و ۴- سورگوم‌های جارویی (Broom corn) به عنوان خاشاک و جاروب جزء مصالح ساختمانی بام خانه در کشورهای آفریقایی می‌باشد. علاوه بر این، تقاضا برای تولید اتانول از سورگوم به جای ذرت افزایش یافته است، چرا که علیرغم مقدار تقریباً مساوی اتانول به دست آمده از این دو گونه، مقاومت و

سازگاری بیشتر سورگوم برای رشد در اقلیم‌های گرم وخشک و زمین‌های بایر، این گونه را به گزینه‌ای مناسب برای تولید انبوه تبدیل کرده است، به طوری‌که در حال حاضر ۱۲٪ الکل تولید شده در آمریکا از سورگوم به دست می‌آید (۱۲).

سورگوم شیرین، *Sorghum bicolor* L. (Moench) یکی از مهمترین گونه‌های زراعی جنس سورگوم است که زندگی بیش از ۳۰۰ میلیون نفر از مردم جهان به آن وابسته است (۲۱). ساقه و فیبر آن مصارف صنعتی داشته و دانه آن برای تولید شکر و شربت سورگوم (*Sorghum syrup*) که در برخی از کشورها مانند هند به عنوان چاشنی شیرین‌کننده در پخت نان استفاده می‌شود و آرد سورگوم که در بسیاری کشورهای آفریقایی و هند در جیره غذایی روزانه مردم استفاده می‌شود (۱۸).

تکثیر یا ریز ازدیادی (Micropropagation) یکی از دستاوردهای تکنولوژی کشت بافت و سلول در شیشه است که نتیجه آن ازدیاد ژنوتیپ‌های برگزیده به منظور تولید گیاهچه‌های عاری از پاتوژن و بیماری و یکسان از نظر ژنوم، در مقیاس وسیع است. ریز ازدیادی از طریق قطعات مریستماتیکی ساقه در مورد بسیاری از گیاهان با موفقیت انجام شده است.

پیش از این در مورد سورگوم تولید کالوس با استفاده از جداکشت‌های مختلف نظیر گل آذین نابالغ ، نوساقه(۲۰)، دانه (جنین) بالغ (۱۱) دانه (جنین) نابالغ (۸)، قطعات برگ (۱۳)، قطعات ریشه (۴) و بساک (۱۹) گزارش شده است. کشت بافت غلات، انواع متفاوت کالوس را تولید می‌کند که ممکن است به لحاظ قوه باززایی با یکدیگر متفاوت باشند. با این وجود، نرخ باززایی گیاهان به ازای هر جداکشت به اندازه کافی نمی باشد. بنابراین یک روش مؤثر و تکرارپذیر برای باززایی گیاه از طریق کالوس یا کشت سلولی در مورد گیاه سورگوم لازم به نظر می‌رسد (۱۷، ۱۸). به طور کلی تولید کالوس در شیشه از گیاهان تک لپه بسیار مشکل‌تر گیاهان دو لپه است (۴) و سورگوم یکی از گونه‌های تک لپه با داشتن دانه‌هایی از نوع سخت که مواد فنلی زیادی در محیط کشت ازاد می کند از جمله گیاهانی است که کشت بافت آن دشوار می‌باشد (۱۰).

بهبود ژنتیکی سورگوم با انتقال الل‌های مفید در توالی ژنوم از طریق دو رگه‌گیری و یا با درج جایگاه ژنی جدید از طریق ترانسفورماسیون امکانپذیر می‌باشد(۱۴). همانند اغلب گونه‌های گیاهی بهینه‌سازی گونه سورگوم از طریق بیوتکنولوژی وابسته به پیشرفت جنبه‌های کشت بافت و خصوصاً مرحله تولید کالوس و باززایی آن است تا از این طریق به معرفی شکل موفقی از یک تراریخته مفید منجر شود(۱۸). علی رغم اینکه تا کنون گزارشاتی مبنی بر تولید کالوس از بخشهایی از گیاه سوگوم ارائه شده است.(۲۲). ولی تولید کالوس ازبذر بالغ سوگوم شیرین گزارش نشده است. از انجائیکه گیاه سوگوم را به منظور استفاده از قند تجمع یافته در ساقه ان کشت می نمایند بنابراین در این مطالعه برای اینکه بتوان نسبت به تغییر ژنتیکی این گیاه به عنوان مثال تغییر درجه پلوئیدی اقدام نمود. نیاز به ارائه یک روش قابل تکرار و مناسب برای تولید کالوس از بذر بالغ می باشد تا بدین

ترتیب بتوان در مراحل بعدی نسبت به اصلاح ژنتیکی این گیاه و از جمله باززائی گیاه از کالوس تریپلوئید اقدام نمود. دست یابی به چنین گیاهی از نظر اقتصادی بسیار با ارزش می باشد و بدیهی است بهینه سازی شرایط تولید کالوس اولین قدم برای نیل به چنین هدفی می باشد.

مواد و روشها

ابتدا بذرهای سورگوم شیرین رقم Moench از درون پوسته خارج شده و ۳-۲ مرتبه با آب معمولی شستشو داده شدند. سپس به مدت ۱ دقیقه در الکل ۷۰٪ قرار گرفته و پس از آن به مدت ۳۰-۲۰ دقیقه درون محلول آب ژاول (وایتکس) ۳۰-۲۵٪ به اضافه ۲-۱ قطره Tween 80ضدعفونی شدند. سپس بذرها ۳-۲ بار با آب مقطر استریل شستشو داده شدند. بذرهای استریل شده به تعداد ۱۰ عدد در ۱۰ تکرار در سطح محیط کشت MS (Murashige and Skoog, 1962) (۱۶)، حاوی ۱۰ گرم در لیتر آگار و ۳۰ گرو در لیتر ساکاروز در pH معادل ۵/۸ کشت و سپس به اتاق کشت در دمای C ° ۲۵ و در تاریکی نگهداری شدند.

قطعات جداکشت مورد استفاده برای تولید کالوس

در این تحقیق جهت تولید کالوس و مقایسه تولید و رشد کالوس‌ها، از بذر بالغ و ریشه و ساقه گیاهان تولید شده در محیط کشت MS استفاده شد.

پس از ۶-۳ روز که ساقه سورگوم در محیط MS به طول ۷-۴ سانتی‌متر رسید، قطعات ۲-۱/۵ سانتی‌متری برگ و ریشه از این گیاهان جدا شده و به تعداد ۵ عدد در ۶ تکرار روی محیط کشتهای لیست شده در جدول شماره ۱ قرار داده شدند. کلیه محیط کشتها در دمای°C ۱۲۱ به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو شدند. برای القاء تولید کالوس از بذر بالغ سورگوم، ۷- ۵ روز پس از جوانه زنی، بخش ساقه مانند و سبز رنگ آنها جدا شده و قسمت باقیمانده یعنی دانه و هیپوکوتیل سفید رنگ، در تماس با محیط کشت قرار داده شد. نتایج پس از یک تا سه ماه گزارش شد. در روش دیگر دانه‌های ضد عفونی شده به دو قسمت حاوی جنین و بدون جنین تقسیم شد و در تماس با محیط کشت قرار داده شد. کلیه آزمایشات در یک طرح کامل تصادفی انجام و در نهایت داده ها بر اساس ازمون **Kruskal-Wallis one way ANOVA** مورد مقایسه آماری قرار گرفت.

بررسی قدرت زیست (viability)

مقدار ۵ میلی‌گرم پودر FDA در ۱ میلی‌لیتر استون حل گردید. از محلول به دست آمده، ۱۰µl برداشته و در ۱ میلی‌لیتر آب مقطر ریخته شد. استوک به دست آمده در فریزر نگهداری گردید). مقدار بسیار کم بافت کالوس به اندازه تقریبی ۵-۶ میلی متر مکعب از کالوس برداشته و با یک میلی لیتر اب مقطر مخلوط و درون تیوب ۱/۵ ml اپندورف گذاشته شد. سپس ۵ µl از استوک FDA به آن افزوده و درب آن بسته شد. تیوب‌ها به مدت ۵-۴ دقیقه بر روی یخ نگه داشته شدند. برای بررسی زیست‌پذیری سلول‌های کالوس به ازای تیمار ۳ قطعه کالوس بر روی لام قرار داده شد پس از لامل‌گذاری

سلولهای کالوس به ارامی روی لام پخش شدند و با میکروسکوپ فلورسنت مدل Axiovert 25 HBO 50/AC با استفاده از فیلتر آبی و بزرگنمایی ۵۰X مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج

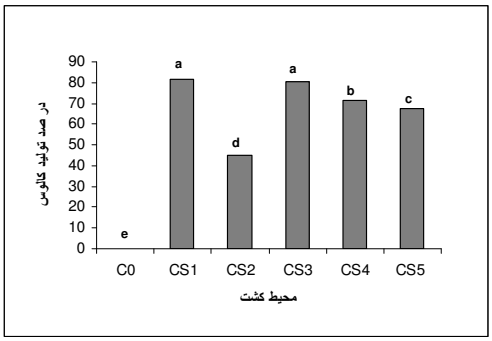
تولید کالوس

قطعات ریشه و برگ سورگوم (تولید شده در شیشه) در محیط کشتهای مختلف یعنی CO تا CS5 (جدول ۱) هیچگونه رشدی نشان نداده و قهوه‌ای شدند. افزودن محیط‌های کشت مایع و نیز جایگزینی محیط کشت مایع به جای محیط کشت جامد نیز برای بر طرف شدن ترکیبات قهوه‌ای کمک نکرد.

در آزمایشی که بذرها به دو نیمه تقسیم شدند، تنها نیمه‌ای که دارای جنین بود تولید ساقه و ریشه کرد ولی به دلیل این‌که نیمی از ذخیره دانه را از دست داده بود، رشد محدودی داشت و نیمه دیگر نیز بدون تغییر پس از چند روز به رنگ قهوه‌ای در آمد. وقتی دانه‌های بالغ ابتدا روی محیط کشت MS جوانه زدند و سپس بخش برگ مانند و سبز آنها قطع شد بقیه روی محیط کشت مولد کالوس (CS1-CS5) قرار داده شد، ، تولید کالوس به آهستگی شروع شد. محیط CO، باعث تولید کالوس نشده و با ایجاد ترکیبات فنلی قهوه‌ای رنگ از رشد نمونه جلوگیری نمود. در آزمایشات مکمل افزودن ۱۰٪ شیر نارگیل به همراه ۱٪ عصاره مخمر نیز به بهبود تولید کالوس در این محیط کشت کمک ننمود. در مقابل اگر چه سرعت تولید کالوس کند بود به هر حال کالوس‌های سفیدرنگی در محیط‌های کشت CS1-CS5 ۱به ویژه در محیط کشت CS1 پس از ۴۵-۳۰ روز در اطراف نمونه کشت شده تشکیل شد و به تدریج در طول ۳ ماه رشد بیشتر نموده و به ابعاد چند سانتمتر مکعب رسید.. درصد تولید کالوس در محیط‌های کشت مورد استفاده CO-CS5 در نمودار ۱ ارائه شده است.کالوس‌های به دست آمده از محیط‌های CS2-CS5 سفیدرنگ با انشعابات ریشه‌مانند وسفت تر بودند در حالیکه کالوس حاصل از محیط CS1 کِرِم رنگ، کروی با ظاهری آبدار و نرم و بافت دانه‌ای بود (شکل ۱).

جدول۱. نام و ترکیب هورمونی ($mg\ L^{-1}$) محیط کشت های القاء تولید کالوس در سورگوم

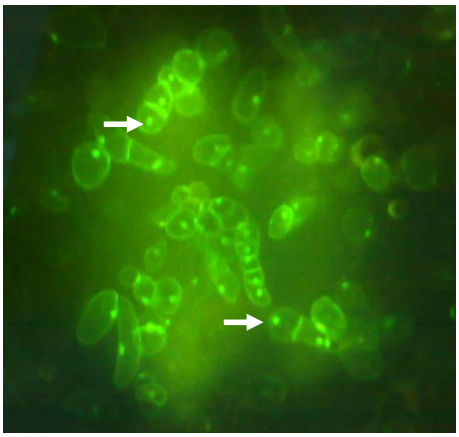
نام محیط کشت	2,4-D	Kinetin	IBA	IAA	NAA	BAP	Ascorbic acid
CO	۲	۲	۰	۰	۲	۰	۵
CS1	۵	۰/۰۵	۰	۰	۰	۰	۵
CS2	۲	۲	۲	۰	۰	۰	۵
CS3	۲	۰	۲	۲	۲	۰	۵
CS4	۲	۰/۵	۰	۰	۰	۰	۵
CS5	۲/۵	۱/۵	۲/۵	۲/۵	۲	۱	۵



نمودار ۱. درصد تولید کالوس از بذر بالغ سورگوم شیرین در محیط‌های کشت کالوس CO- CS5 پس از یک ماه. داده ها میانگین ۶ تکرار می باشد. (حروف غیر مشابه بیانگر معنی دار بودن داده ها P<0.05 بر اساس تست Kruskal-Wallis one way ANOVA).

شکل ۱. کالوس تولید شده از بذر بالغ گیاه سورگوم شیرین در محیط کشت CS1 پس از ۳ ماه

نتایج حاصل از بررسی قدرت زیست سلولهای کالوس در شکل ۲ ارائه شده است. برای بررسی قدرت زیست کالوس های بدست آمده. از ماده فلورسئین‌دی‌استات (FDA) استفاده شد. این ماده قابلیت نفوذپذیری خوبی داشته و توسط استرآزهای غیر تخصصی سلول‌های زنده به فلورسئین تبدیل می‌شود؛ فلورسئین نمی‌تواند جابجا شود و لذا در جایی که به وجود می‌آید، متوقف می‌شود که با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت UV با فیلتر آبی قابل مشاهده است. سلول‌های مُرده توانایی احیاء کردن این ماده را ندارند بنا براین سلولهای زنده به رنگ زرد سبز و سلول دیده می شوند (۱۰) در تمام کالوسهای تولید شده ازمایش تست قدرت زیست نشان داد که سلولها بین ۹۵-۹۸ در صد قدرت زیست دارند.



شکل ۲. قدرت زیست سلولهای کالوس سورگوم را نشان مس دهد. رنگ روشن درخشان بیانگر زنده بودن سلول است. فلش هسته سلول را نشان می دهد.

بحث

هدف از این تحقیق معرفی یک روش مناسب جهت تولید کالوس از بذر بالغ سورگوم شیرین در شرایط کشت در شیشه بود. تاکنون گزارشات بسیار کمی در مورد تولید کالوس از بذر بالغ این گیاه منتشر شده است و بیشتر تحقیقات، بر تولید کالوس از برگ سورگوم متمرکز شده است(۱۷) در این تحقیق از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی و نیز شیره نارگیل و عصاره مخمر و سکوربیک اسید به عنوان

یک انتی اکسیدان خوب نیز برای القاء و رشد کالوس استفاده گردید. محیط کشت CO علی رغم داشتن کلیه مواد محرک رشد سبب قهوه‌ای شدن محیط کشت گردید. در این محیط کشت هیچکدام از قطعات برگ، ریشه، و یا بذر قادر به تولید کالوس نبودند. عدم تولید کالوس از سوگو شیرین در مطالعه حاضر بر خلاف یافته های Baskaran and Jayabalan,در سال ۲۰۰۶ بود. (۳) تولید کالوس‌از سورگوم در شرایط تاریکی انجام گرفت به نظر می رسد نور به دلیل القاء تمایز کلروپلاست در برخی از ژنوتیپهای گیاهی مانع تولید و رشد کالوس می باشد همچنین نور می تواند مسیر تولید پلی فنلها را که اکثرا در سیتوزول و کلروپلاست ساخته می شوند تحریک و با ترشح پلی فنلها و اکسیداسیون بعدی انها را تبدیل به ترکیبات قهوه ای نماید که خود عاملی برای ممانعت از تولید کالوس می باشد.. کالوس‌های به‌دست آمده از محیط‌های CS2-CS5 به صورت ریشه‌های متراکم و سفیدرنگ با ظاهری خشک و بدون آب بودند و کالوس به دست آمده از محیط CS1 زرد رنگ و نسبتاً آبدار بود. در محیط کشتهای CS2 تا CS5 ترکیب هورمونی محیط کشت با نوعی برتری اکسین از نظر نوع ، غلظت و یا اثر هورمونی مشاهده می گردد. از انجا که اکسین در محیط کشت بافت گیاهی می تواند محرک القاء ریشه دهی و رشد و تکثیر سلولهای گیاهی گردد بنابراین حضور اکسینهائی نظیر IBA و یا ترکیبی از IBA ، NAA و 2,4-D تمایز ریشه را بیشتر از کالوس تحریک نموده است. بنابراین ریشه ای شدن کالوس می تواند حد اقل بخشی به دلیل تحریک بیشتر مجمو عه ای از هورمونهای اکسین در محیط کشت باشد.

محیط CS1 حاوی $5\ mg\ L^{-1}$ 2,4-D، $mg\ L^{-1}$ Kinetin ۰/۰۵ و $5\ mgL^{-1}$ آسکوربیک اسید بود. (اسید اسکوربیک به عنوان یک انتی اکسیدانت بکار می رود)، 2,4-D یک اکسین قوی بوده (۲ و ۴) که در مورد بسیاری از گونه‌های گیاهی از شکل‌گیری جوانه ساقه جلوگیری می‌نماید و Kinetin نوعی سیتوکینین است که سبب افزایش تقسیم سلولی و موجب افزایش شکل‌گیری جوانه می‌گردد. القاء تولید کالوس و یا اندام‌زایی (تمایز ریشه و ساقه) در بیشتر موارد بستگی به نسبت اکسین و سیتوکینین در محیط کشت دارد. در بیشتر غلات برای تولید کالوس، جداکشت مورد نظر ابتدا در یک محیط غنی از 2,4-D قرار داده می‌شود و پس از تولید کالوس به منظور تولید ساقه و ریشه به محیطی فاقد 2,4-D منتقل می‌شود. مشخص شده که تمام اکسین‌ها به غیر از 2,4-D سبب تولید ریشه می‌شوند ولی در حضور 2,4-D کالوس به وجود می‌آید. مقادیر کم این هورمون منجر به تمایز سلولی و مقادیر زیاد آن سبب القاء و ایجاد کالوس می‌گردد (۱).

Baskara و همکارانش (۲۰۰۶) (۳) در مقایسه تولید کالوس از ریشه دو رقم سورگوم (K8, NSH27)، متوجه شدند که از میان ۴ اکسین 2,4-D، NAA، IAA و IBA، مهمترین و مؤثرترین اکسین 2,4-D با بیشینه غلظت $2\ mgL^{-1}$ بوده است، همچنین در این غلظت کالوس تولید شده زرد و فشرده می‌شود. چنین نتایجی توسط Hagio

(۱۹۹۴) (۷) نیز گزارش گردیده است. Pola و Mani (۲۰۰۶) (۱۷، ۱۸) با بررسی کالوس‌زایی ۶ رقم سورگوم از قطعات برگ متوجه شدند که بهترین تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی در تولید کالوس، 2,4-D و 2,4,5-T می‌باشند. همچنین Cai و همکارانش (۱۹۸۷) (۵) با ترکیب ۱ به ۱۰۰ هورمون‌های Kinetin و 2,4-D موفق به تولید کالوس‌های نرم و کروی از قطعات برگ سورگوم شیرین شدند. نتایج بدست امده در تحقیق حاضر نیز با یافته های این محققین مشابهت زیادی دارد.

از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مؤثر در تولید کالوس، Kinetin می‌باشد که یکی از سیتوکینین‌ها به شمار می‌رود. این ترکیبات عموماً برای تقسیم سلولی و تمایز ساقه از کالوس استفاده می‌شوند، سیتوکینین‌ها در سنتز DNA و پروتئین نقش فعال دارند. نسبت بالاتر اکسین به سیتوکینین می‌تواند منجر به تولید کالوس و کاهش تولید ساقه گردد (۱). در تحقیق حاضر محیط CS1 حاوی نسبت Kinetin۱/ 2,4-D ۱۰۰ بوده که سبب تولید کالوس از بذر بالغ در شرایط در شیشه گردید.

اکسین‌های دیگر مانند IAA، IBA و NAA و همچنین سیتوکینین BAP نیز سبب القاء کالوس از بذر شدند ولی درصد کالوس‌زایی کم بوده و کیفیت توده‌های کالوس ایجاد شده مطلوب نبود.

همان‌گونه که قبلاً اشاره شد تمامی اکسین‌ها به‌غیر از 2,4-D سبب ریشه‌دهی می‌شوند. به نظر می‌رسد مقادیر مساوی از غلظت ۴ اکسین 2,4-D، NAA، IAA و IBA (همگی ۲ $mg\ L^{-1}$) در محیط CS3 سبب ایجاد ظاهر ریشه‌ای کالوس شده است. همچنین حضور 2,4-D مانع ایجاد ریشه حقیقی در این بافت شده است. این محیط پس از CS1، دارای بیشترین درصد تولید کالوس‌زایی بوده است. مشخص شده است که در بیشتر غلات وقتی بافت کالوس از محیط دارای 2,4-D به محیط حاوی مقادیر کم NAA و IAA منتقل شود، بسته به نوع کالوس، ریشه یا ساقه (اندام‌زایی) ایجاد می‌شود (۷) به نظر می‌رسد داشتن توازن غلظت میان ۴ اکسین مذکور سبب تداوم حالت تمایز نیافتگی در این سلول‌ها گردیده است.

محیط کشت CS4 با داشتن تنها 2,4-D و Kinetin با نسبت ۴ به ۱ پس از محیط‌های CS1 و CS3 بیشترین درصد کالوس‌زایی (۷۱/۴٪) را نشان داد. همان طور که قبلاً اشاره شد، همیشه تناسب بالاتر اکسین به سیتوکینین سبب تولید کالوس می‌شود. طبق نتایج Bhaskaran و همکاران (۲۰۰۶) (۵) کنترل مورفوژنز در سورگوم از طریق مقادیر 2,4-D و Kinetin امکانپذیر است.

محیط کشت CS5 با ۶۷/۳٪، تولید کالوس نسبتاً مطلوبی داشت. به نظر می‌رسد وجود دو نوع سیتوکینین BAP و Kinetin در تقابل با ۴ اکسین استفاده شده در این محیط توانسته‌اند، روند تولید کالوس را تا حدودی کاهش دهند و همچنین سبب ایجاد ظاهر ریشه‌ای مانند کالوس شوند.

محیط CS2 در مقایسه با ۴ محیط دیگر کمترین درصد تولید کالوس را نشان داد. ولی از نظر موفولوژیکی، این نوع کالوس تا حدی نرم و کِرِم رنگ بود و برخلاف محیط‌های CS3-CS5 از ظاهر ریشه‌ای مانند آن کاسته شده بود. در این محیط

دو اکسین 2,4-D و IBA و سیتوکینین از نوع Kinetin به یک نسبت به کار رفته بود. با توجه به یافته های این تحقیق و با توجه به اینکه تولید کالوس و باززائی ار گیاه سورگوم وابسته به ژنوتیپ می باشد (۱۷) به نظر می رسد محیط کشت CS1 از بقیه محیط کشتها مناسبتر و در صد تولید کالوس از بذر های بالغ سورگوم در این محیط کشت بالاتر از بقیه می باشد و می تواند به عنوان یک روش قابل اعتماد جهت تولید کالوس از این گیاه در مطالعات محققین بکار گرفته شود.

منابع

۱. احسانپور، ع. الف. و امینی، ف.، کشت سلول و بافت گیاهی. چاپ ۲، انتشارات جهاد دانشگاهی اصفهان. ۱۸۱ صفحه، ۱۳۸۲.

2. Balakin, K. V., Savchuk, N. P. and Tetko, I. 2006. In silico approaches to prediction of aqueous and DMSO solubility of drug-like compounds: trends, problems and solutions. Current Medicinal Chemistry. 13, 223-238, 2006.

3. Baskaran, P., Rajeswari, B. R. and 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, 1-9, 2006.

4. Bhaskaran, S. and Smith, R. H., Control of morphogenesis in Sorghum by 2,4-dichlorophenoxy acetic acid and cytokinins. Annual Botany. 64, 217-224, 1989.

5. Cai, T., Daily, B. and Butler, L., Callus induction and plant regeneration from shoot portions of mature embryos of high tannin Sorghums. Plant Cell Tissues and Organ Culture. 9, 245-252., 1987.

6. Gamez-Pastrana, R., Martinez-Ocampo, Y., Beristain, C. I. and Gonzalez-Arnao, M. T., An improved cryopreservation protocol for pineapple apices using encapsulation-vitrification. Cryo-Letters. 25, 405-414, 2004.

7. Hagio, T., Varietal difference of plant regeneration from callus of Sorghum mature seed. Breeding Science. 44, 121-126, 1994.

8. Hagio, T., Adventitious shoot regeneration from immature embryo of Sorghum. Plant cell Tissue and organ culture. 68, 65-72, 2002.

9. Heslop-Harrison, Y. and Shivanna, K. R. The evaluation of pollen quality and a further appraisal of the fluorochromatic (FCR) test procedure. Theoretical and Applied Genetics. 67, 367-375, 1984.

10. Kishore, S. N., Visarada, K. B. R. S., Lakshmi, A. Y., Pashupatinath, E., Rao, S. V. and Seetharama, N., *In vitro* culture methods in Sorghum with shoot tips the explant Material. Plant Cell Reports. 25, 174-182, 2006.

11. Kuruvinashetti, M. S., Patil, V. M., Sumangala, B. and Maheshwar, H. High frequency plant regeneration from embryogenic callus cultures in genus Sorghum. Indian journal of agricultural Sciences. 68, 27-28, 1998.

12. Laopaiboon, L., Thanonkeo, P., Jaisil, P. and Laopaiboon, P. Ethanol production from sweet Sorghum juice in batch and fed-batch fermentations by *Saccharomyces cerevisiae*. World Journal Microbiol Biotechnol. 23, 497-1501, 2007.

13. Ma, H., Gu, M. and Liang, G. H. Plant regeneration from cultured immature embryos of *Sorghum bicolor* (L.) Moench. Theory of Applied Genetics. 73, 389-394, 1987.

14. Mifflin, M. Crop improvement in the 21st century. Experimental Botany. 51, 1-8, 2002.

15. Mishra, A. and Khurana, P., Genotype dependent somatic embryogenesis and regeneration from leaf base cultures of *Sorghum bicolor*. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology. 12, 53-56, 2003.

16. Murashige, T. and Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15, 473-497, 1962.

17. Pola, S., Saradamani, N. and Ramana, T. Enhanced shoot regeneration in tissue culture studies of *Sorghum bicolor*. Agricultural Technology. 3, 275-286, 2007.

18. Pola, S. R. and Mani, N. S. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration in *Sorghum bicolor* (L.) Moench, from leaf segments. Cell and Molecular Biology. 5, 99-107, 2006.

19. Rose, J. B., Dunwell, J. M. and Sunderland, N. Anther culture of *Sorghum bicolor* (L.) Moench. Effect of panicle pretreatment, Anther incubation temperature and 2,4-D concentration. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 6, 15-22, 1986.

20. Seetharama, N., Sairam, R. V. and Rani, T. S. Regeneration of Sorghum from shoot tip cultures and field performance of the progeny. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 61, 169-173, 2000.

21. Smith, C. W. Structure and Chemistry of the Sorghum caryopsis. In: Sorghum: Origin, History, Technology and Production: John Wiley and Sons, Inc. Texas. pp: 721-723, 2000.

22. Zhong, H., Wang, W. and Sticklen, M. 1998. *In vitro* regeneration of efficient *Sorghum bicolor* (L.) Moench: plant regeneration from shoot apices. Journal of Plant Physiology. 153, 719-726.