

**PROPAGACIÓN *IN VITRO* DE *Stevia rebaudiana* BERTONI A TRAVÉS DE EMBRIOGÉNESIS
SOMÁTICA**

OSMAN DARÍO FERNÁNDEZ BETIN

**PROPAGACIÓN *IN VITRO* DE *Stevia rebaudiana* BERTONI A TRAVÉS DE EMBRIOGÉNESIS
SOMÁTICA**

TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR AL TÍTULO DE BIÓLOGO

OSMAN DARÍO FERNÁNDEZ BETIN

ASESORA

ESTHER JULIA NARANJO, M.Sc.

LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA VEGETAL.

UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA.

CO-ASESORA

LUCÍA ATEHORTÚA GARCÉS, Ph.D.

LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA.

PROFESORA, UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA.

UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

INSTITUTO DE BIOLOGÍA

2012

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo es un esfuerzo en el cual, directa o indirectamente, participaron varias personas teniéndome paciencia, dando ánimo, acompañando en los momentos difíciles y en los momentos de felicidad.

Agradezco a mi familia por su apoyo incondicional. A las Profesoras Esther Julia Naranjo y Lucía Atehortúa por su paciencia, dedicación y por la dirección de este trabajo; y sobre todo por confiar en mí.

Al grupo de Biotecnología de la Universidad de Antioquia, quienes me abrieron las puertas para llevar a cabo este trabajo.

A todos mis compañeros del Laboratorio de Biotecnología Vegetal: Sandra, Paola, Oscar, Andrés y Melissa, por toda su colaboración.

Al CODI por la financiación.

A los profesores Carlos López y Ricardo Callejas quienes tuvieron una gran influencia en mi formación tanto profesional cómo personal.

A mis compañeros y amigos quienes me acompañaron durante toda la carrera.

Y gracias al programa de Regionalización, por brindarme la oportunidad de formarme en la Universidad de Antioquia desde mi municipio.

RESUMEN

Stevia rebaudiana (Asteraceae), es una planta de gran importancia económica debido a la presencia de compuestos endulzantes en sus hojas, los cuales pueden sustituir al azúcar para personas con problemas de diabetes y obesidad. En la presente investigación se evaluaron distintas combinaciones de las fitohormonas 2,4-D y BAP, con el objetivo de inducir la formación de embriones somáticos en *S. rebaudiana* Bertoni. Se usó el medio basal MS (Murashige y Skoog 1962) completo suplementado con Arginina, Glutamina y Asparagina. Los mejores medios de inducción fueron los que contenían 2,4-D y BAP a 4.0 - 3.0 mg/L, y 0.3 mg/L, respectivamente, en los cuales se obtuvo 27.1 y 23.2 embriones somáticos por explante. A la fecha no se ha logrado la regeneración de los embriones.

Palabras claves: *Stevia rebaudiana*, endulzante natural, propagación *in vitro*, embriones somáticos, callo embriogénico.

LISTA DE FIGURAS

Fig 1a. Formación de Callo. Luego de 17 días de cultivo.....	43
Fig 1b. Formación embriones. Luego de 28 días de cultivo.....	43
Fig 1c. Formación embriones. Luego de 42 días de cultivo.....	43
Fig 1d. Embriones somáticos con formación de callo en su superficie. Medios (M1), luego de 62 días de cultivo.....	43
Fig 2. Formación de embriones somáticos en los distintos medios de cultivo, después de 100 días en los medios de inducción. Los valores son la media \pm desviación estándar.....	26
Fig 3. Embriones somáticos. Medios (M1), luego de 52 días de cultivo.....	44
Fig 4. Embriones somáticos. Medios (M1), luego de 62 días de cultivo.....	44
Fig 5. Formación asincrónica de los embriones somáticos. Medio (M1), luego de 100 días.....	45
Fig 6. Embriones somáticos directos. Medio (M1), luego de 28 días de cultivo.....	45
Fig 7a. Callo no embriogénico.....	46
Fig 7b. Callo embriogénico.....	46
Fig 8. Embriones somáticos con callo en su superficie, luego de 40 días en medios de desarrollo.	47

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Contenido de glicósidos en las hojas de <i>S. rebaudiana</i>	13
Tabla 2. Composición de aminoácidos en las hojas de <i>S. rebaudiana</i>	13
Tabla 3. Contenido de minerales (mg/100 g) en las hojas secas de <i>S. rebaudiana</i>	14
Tabla 4. Composición de ácidos grasos en las hojas de Stevia.....	14
Tabla 5. Composición de vitaminas solubles en extractos de hojas y callo de Stevia (mg/100 g). Tomado de Mishra et al. (2010).....	14
Tabla 6. Medios de inducción de embriogénesis somática.....	24
Tabla 7. Medios de desarrollo de embriones somáticos de <i>S. rebaudiana</i>	25
Tabla 8. Porcentaje de explantes con formación de callo embriogénico (CE) y número de embriones somáticos (ES) por explante luego de 100 días de cultivo. Letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo al test de Tukey ($p < 0.000$).....	27

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN.....	9
MARCO TEÓRICO.....	10
Taxonomía.....	10
Descripción botánica.....	10
Distribución geográfica y ecológica.....	11
Usos, propiedades y endulzantes.....	11
Endulzantes.....	11
Propagación de <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni.....	14
Propagación sexual y asexual.....	14
El cultivo de tejidos en la propagación de plantas.....	15
Embriogénesis somática.....	16
Factores que afectan la embriogénesis somática.....	16
Genotipo y fuente de explantes.....	17
El medio basal.....	17
Fitohormonas.....	18
Fuente de nitrógeno.....	18
Ventajas de la micropropagación por medio de la embriogénesis somática.....	19
FORMUACIÓN DEL PROBLEMA.....	20
JUSTIFICACIÓN.....	21
OBJETIVOS.....	22
Objetivo general.....	22
Objetivos específicos.....	22
METODOLOGÍA.....	23

Material vegetal.....	23
Inducción de embriones somáticos.....	23
Medios de cultivos.....	23
Medios de desarrollo.....	25
Condiciones de cultivo.....	25
Análisis estadístico.....	25
RESULTADOS.....	26
Inducción de embriones somáticos.....	26
Desarrollo de los embriones somáticos.....	27
DISCUSIÓN.....	28
Inducción de embriones somáticos.....	28
Medios de desarrollo.....	31
CONCLUSIONES.....	32
SUGERENCIAS.....	33
BIBLIOGRAFÍA.....	34
ANEXOS.....	43

INTRODUCCIÓN

Stevia rebaudiana Bertoni es una planta perteneciente a la familia Asteraceae, nativa del Paraguay. Esta planta produce en sus hojas, endulzantes bajos en calorías; estos son glicósidos diterpénicos entre 30 a 320 veces más dulce que el azúcar (Ahmed et al. 2007, Brandle et al. 1998). El componente que se encuentra en mayor proporción es el esteviósido, 300 veces más dulce que la sacarosa y en segundo lugar se encuentra el rebadiósido A, 400 veces más dulce que la sacarosa (Tabla 1) (Singh y Rao 2005).

Además de las propiedades endulzantes, esta planta es fuente carbohidratos, proteínas, fibra cruda, minerales, aminoácidos, aceites esenciales, entre otros (Tabla 2 a 6) (Abou-Arab et al. 2010). Se le atribuyen también propiedades terapéuticas tales como: antihiperlipidémica, anticancerígena (Jayaraman et al. 2008), antiviral (Kedik et al. 2009) y anti inflamatoria (Ibrahim et al. 2007). Por esto es de gran importancia económica.

La propagación de *Stevia* por medio de esquejes y semillas demandan un alto costo, alta inversión de tiempo y trabajo, las cuales disminuyen la productividad, afectando por lo tanto su mercado. (Taware et al. 2010). Así, la propagación *in vitro* se presenta como una alternativa para solucionar estos inconvenientes; entre ellas vale la pena resaltar el potencial de la embriogénesis somática, la cual es una técnica muy utilizada para la propagación a gran escala (Williams y Maheswaran 1986). Este proceso puede darse de forma directa o indirecta; en la embriogénesis somática directa se forma el embrión directamente del explante, mientras que en la embriogénesis somática indirecta se forman los embriones somáticos con previa formación de callo (Mizukami et al. 2008, Pierik 1990).

A nivel mundial varios investigadores han reportado el cultivo de tejidos para la propagación de la *Stevia*. Anbazhagan et al. (2010), Das et al. (2011), Kumar et al. (2008) reportan la propagación de *Stevia* a través de organogénesis; mientras que Bespalhok et al. (1993), Banerjee y Sarkar (2010), Pande y Khetmalas (2012) reportan la embriogénesis somática, aunque con bajas tasas de regeneración. Teniendo en cuenta lo anterior, el presente proyecto tuvo como objetivo desarrollar un protocolo eficiente de propagación masiva para la *Stevia* a través de embriogénesis somática.

MARCO TEÓRICO

Taxonomía

Clasificación taxonómica de *S. rebaudiana* Bertoni.

Dominio	Eukaryota
Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Asterales
Familia	Asteraceae
Género	Stevia
Especie	<i>Stevia rebaudiana</i>

Descripción botánica

Stevia es un género con cerca de 200 especies de hierbas y arbustos, perteneciente a la familia Asteraceae. El mayor número de especies de este género está localizado dentro del área comprendida entre Perú-Bolivia, sudeste Brasil-Paraguay, y el norte de Argentina; donde ocurren cerca de 120 especies (Ahmed et al. 2007, Soejarto 2002).

Stevia rebaudiana crece hasta 1 m de altura (Mishra et al. 2010), es una hierba perenne con un extensivo sistema radicular, con tallo quebradizo, erecto, subleñoso, durante la fase inicial de desarrollo no posee ramificaciones (Landázuri y Tigrero 2009, Shock 1982). Presenta hojas simples, opuestas, raramente alternas, pecioladas, sin estípulas, sésiles, de 3 a 4 cm de longitud, elongadas-lanceoladas, el margen es aserrado desde la mitad de la hoja hasta la parte apical (Landázuri y Tigrero 2009, Shock 1982). La raíz es pivotante, filiforme y poco profunda, distribuyéndose cerca de la superficie (Landázuri y Tigrero 2009).

La flor es hermafrodita, pequeña y normalmente de color blanco (Soejarto 2002), su corola es tubular, pentalobulada, formando capítulos pequeños terminales o axilares (Landázuri y Tigrero 2009). Los frutos son tipo aquenios cilíndricos (Shock 1982).

Distribución geográfica y ecológica

Stevia rebaudiana Bertoni es una planta originaria del sudeste de Paraguay, de la parte selvática subtropical de Alto Paraná (Shock 1982). Es encontrada naturalmente a altitudes entre 500 - 3500 msnm (Soejarto 2002). Aunque usualmente crecen en terrenos montañosos semiáridos, sus hábitats se encuentran en un rango desde pradera, bosques de arbustos, pendientes de montañas boscosas, bosques de coníferas hasta vegetación subalpina (Soejarto 2002).

S. rebaudiana crece bien en un amplio rango de suelos; desde suelos con una consistencia húmeda hasta suelos con mucho drenaje (Shock 1982). Esta planta debe ser cultivada como una planta anual en latitudes altas y medias (Lemus-Mondaca et al. 2012).

Usos, propiedades y aplicaciones

Endulzantes

El uso de endulzantes no calóricos en los alimentos de la población humana es cada vez mayor. Por ello, hay una intensa búsqueda de compuestos con alto poder endulzante y contenido bajo en calorías (Faus 2000).

Existen varias alternativas de compuestos con un alto poder endulzante y no calóricos originados por síntesis orgánica, los cuales han sido aprobados en varios países: aspartame, sacarina, ciclamato, neohesperidina DC, acesulfama-K (Kant 2005, Larsen 2012). Sin embargo, estudios han reportado que el uso de los endulzantes artificiales genera problemas en salud de las personas; tales como náuseas, dolor de cabeza, vómito, mareo, diarrea y jaqueca (Whitehouse et al. 2008). Por ello se ha incrementado la búsqueda de endulzantes naturales (Faus 2000).

La existencia de endulzantes naturales ha sido conocida desde hace muchos años. Estos han sido encontrados en plantas tropicales, y los indígenas los han utilizado para endulzar sus comidas y como tratamiento para algunas enfermedades (Faus 2000, Megeji et al. 2005). La *S. rebaudiana* una planta con alto poder endulzante natural en sus hojas, es actualmente considerada como un sustituto de los endulzantes artificiales (Megeji et al. 2005).

Por siglos, las tribus Guaraníes de Paraguay y Brasil usaron diferentes especies de *Stevia* y, principalmente *S. rebaudiana*; ellos la llamaron *ka'a he'e* o yerba dulce (Landázuri y Tigreiro 2009); las hojas de esta planta eran utilizadas en sus bebidas y comidas como un endulzante y también era utilizada medicinalmente para la obesidad, hipertensión, ardor de estómago, y para ayudar a bajar los niveles de ácido úrico (Mishra et al. 2010). Esto fue

conocido sólo hasta el siglo XVI, cuando los Europeos llegaron y comenzaron a utilizarla en té (Mishra et al. 2010).

El botánico suizo Moisés Santiago Bertoni fue el primero que la describió, en 1887, detallando su sabor dulce. En 1900 el químico paraguayo Ovidio Rebaudi, logró aislar dos principios activos. Posteriormente, estos compuestos fueron llamados esteviósido y rebaudiósido, que son de 200 a 300 veces más dulces que la Sucrosa (Landázuri y Tigreiro 2009). En la actualidad son bien conocidas las propiedades de estos compuestos: endulzante natural no calórico, termoestable, no fermentable, estable a diferentes rangos de pH, potencian el sabor en las comidas, y apta para el consumo humano (Brandle et al. 1998, Lemus-Mondaca et al. 2012, Abou-Arab et al. 2010, Kroyer 2010, Mishra et al. 2010).

Varios autores han evaluado el efecto de *Stevia rebaudiana* sobre asma, hipertensión, diabetes y cáncer que son patologías de común ocurrencia y motivo de preocupación para gobiernos, asociaciones médicas e industria farmacéutica, debido al creciente número de personas afectadas (Shaw et al. 2010). La diabetes mellitus sobresale por su alta prevalencia (alrededor de un 7% en la población mundial), pero cercana al 20% si tomamos el grupo de los mayores de 80 años (Jácome 2004). En 2010, se realizó una estimación sobre la diabetes; se encontró que la prevalencia mundial de la diabetes entre los adultos (entre los 20-79 años de edad) sería del 6.4 %, afectando a 285 millones de adultos, e incrementaría a 7.7 % para el 2030 (Shaw et al. 2010).

El uso de endulzantes artificiales, sustitutos del azúcar, los cuales van dirigidos a esta población en general, pueden presentar efectos secundarios tales como dolores de cabeza, jaquecas, mareos, náuseas (Castleman 2010). Lo anterior, hace que la importancia y el consumo de los endulzantes naturales sea cada vez más creciente.

La Stevia, es un endulzante natural no calórico, que gracias a sus características, se presenta como una alternativa saludable para reemplazar los endulzantes artificiales. Goyal et al. (2010) reportaron una reducción de la glucosa en sangre en pacientes hiperglicémicos al ser tratados con extractos de hojas de *Stevia rebaudiana*. Además se le han conferido características de actividad antiviral (Kedik et al. 2009, Madan et al. 2009), anti inflamatoria (Ibrahim et al. 2007), anti cáncer (Jayaraman et al. 2008).

Con el conocimiento de las propiedades y principios edulcorantes de esta planta (Brandle et al. 1998, Chan et al. 1998), su cultivo comercial adquirió gran relevancia no solo en el

país de origen, sino en otros como Brasil, Japón, Corea, Taiwán, Tailandia, Indonesia, Malasia, China, Filipinas, Canadá y en Estados Unidos (California) (Marín 2004).

De otro lado tenemos que la Stevia ya fue aprobada como endulzante por la Food and Drug Administration (FDA) (Kraska et al. 2010, U.S. Food and Drug Administration 2011), además los esteviósidos han sido evaluados en alimentos sin encontrar efectos negativos en la salud de las personas (Madan et al. 2009, RIRDC 2005). Lo anterior junto con las condiciones climáticas que presenta este país, hace que en Colombia se mire el cultivo de Stevia como cultivo promisorio.

Además de los esteviósidos y rebaudiósidos, las hojas de Stevia son buena fuente de carbohidratos, proteínas, fibra cruda, minerales, aminoácidos esenciales y no esenciales, aceites esenciales, entre otros (Tablas 1 a 5) (Cioni et al. 2006, Abou-Arab et al. 2010). Características importantes con miras a una explotación comercial.

Glycosides	Contents, % of the leaves dry weight		
	Gardana et al. (2010)	Goyal et al. (2010)	Kinghorn and Soejarto (1985)
Stevioside	5.8 ± 1.3	9.1	5–10
Rebaudioside A	1.8 ± 1.2	3.8	2–4
Rebaudioside C	1.3 ± 1.4	0.6	1–2
Dulcoside A	ND	0.3	0.4–0.7

Tabla 1. Contenido de glicósidos en las hojas de *S. rebaudiana*. Tomado de Mishra et al. (2010).

Reported by Abou-Arab et al. (2010)			
Essential amino acid g 100 g ⁻¹ d.m.		Non-essential amino acid g 100 g ⁻¹ d.m.	
Arginine ^a	0.45	Aspartate	0.37
Lysine	0.70	Serine	0.46
Histidine	1.13	Glutamic	0.43
Phenyl alanine	0.77	Proline	0.17
Leucine	0.98	Glycine	0.25
Methionine	1.45	Alanine	0.56
Valine	0.64	Cysteine ^b	0.40
Threonine	1.13	Tyrosine ^b	1.08
Isoleucine	0.42		
Total	7.67	Total	3.72

Tabla 2. Composición de aminoácidos en las hojas de *S. rebaudiana*.

Minerals	References					
	Mishra et al. (2010)	Goyal et al. (2010)	Serio (2010)	Tadhani and Subhash (2006a)	Kaushik et al. (2010)	Abou-Arab et al. (2010)
Calcium	464.4	544	600	1550	722	17.7
Phosphorous	11.4	318	318	350	ND	ND
Sodium	190	89.2	ND	160	32.7	14.93
Potassium	1800	1780	1800	2510	839	21.15
Iron	55.3	3.9	3.9	36.3	31.1	5.89
Magnesium	349	349	500	ND	ND	3.26
Zinc	1.5	1.5	ND	6.39	ND	1.26

Tabla 3. Contenido de minerales (mg/100 g) en las hojas secas de *S. rebaudiana*. Tomado de Mishra et al. (2010).

Fatty acids	g 100 g ⁻¹
Palmitic acid (C16)	27.51
Palmitoleic acid (C16-1)	1.27
Stearic acid (C18)	1.18
Oleic acid (C18-1)	4.36
Linoleic acid (C18-2)	12.40
Linolenic acid (C18-3)	21.59

Tabla 4. Composición de ácidos grasos en las hojas de Stevia. Tomado de Mishra et al. (2010).

Vitamin	Leaf	Callus
Vitamin C	14.98 ± 0.07	1.64 ± 0.02
Vitamin B2	0.43 ± 0.02	0.23 ± 0.02
Vitamin B6	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Folic acid	52.18 ± 0.21	0.09 ± 0.01
Niacin	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Thiamin	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00

Tabla 5. Composición de vitaminas solubles en extractos de hojas y callo de Stevia (mg/100 g). Tomado de Mishra et al. (2010).

Propagación de *Stevia rebaudiana* Bertoni

Propagación sexual y asexual

La Stevia se reproduce sexualmente por medio de aquenios, los cuales son livianos y de fácil dispersión por el viento. La producción de plántulas a través de semilla se realiza en almácigos convencionales (Landázuri y Tigrero 2009).

Debido a la alta heterogeneidad de las plantas obtenidas a través de semillas, la propagación vegetativa es considerada como una buena técnica de propagación, ya que conserva las características de la planta madre. Ésta puede ser por hijuelos, estacas y por cultivo de tejidos. La reproducción por hijuelos puede utilizarse para plantaciones pequeñas, ya que su número es reducido; los hijuelos nacen en la base del tallo o bajo tierra; apareciendo pequeños vástagos, muchos con sus respectivas raíces, que pueden separarse y plantarse en otro lugar (Jordán 1984 citado por Landázuri y Tigrero 2009). La propagación por estacas es el método más conveniente para ser usado a escala comercial; para esto es importante tener una plantación madre, que va a proveer del material vegetativo inicial. Para el establecimiento de la plantación madre se debe realizar una selección de plantas que presenten características deseables como vigor, calidad y productividad (Lemus-Mondaca et al. 2012). El manejo de esta plantación es similar al manejo de una plantación comercial (Goettemoeller y Ching 1999, Landázuri y Tigrero 2009).

Los primeros cultivos de Stevia para Colombia fueron reportados en el Valle del Cauca y Antioquia en la década de los noventas. En la actualidad hay registros de la siembra de esta especie en Antioquia, Córdoba, Tolima, Huila, Valle del Cauca y Meta (Arana-Contreras 2009, Bonilla et al. 2007, Jarma-Orosco 2008).

Estudios realizados por la Universidad de Córdoba en Montería- Colombia, han encontrado que este departamento y en general Colombia gracias a su ubicación geográfica privilegiada, ofrece las condiciones ambientales ideales para potencializarse como un gran productor de Stevia (Jarma-Orosco 2008, Morrone 2006), ofreciendo las condiciones de luminosidad, humedad, suelo, etc., necesarias para su desarrollo (Jarma-Orosco 2008).

El cultivo de tejidos en la propagación de plantas

El cultivo de tejidos es otro método de propagación vegetativa que permite plantaciones más uniformes; además, se obtiene una rápida multiplicación clonal (Das et al. 2011). Las ventajas de la micropropagación, en comparación con sistemas convencionales, son el incremento acelerado del número de plantas, la disminución del tiempo de multiplicación, mayor control de la sanidad, el fácil transporte para intercambio de material vegetal y la posibilidad de multiplicar rápidamente especies en peligro de extinción. Además, este sistema ofrece la posibilidad para el estudio de diferentes procesos en la fisiología de plantas (Loyola-Vargas y Vásquez-Flota 2006).

La tecnología comercial para la multiplicación de plantas está principalmente basada en la micropropagación. Los explantes más utilizados son: el tejido meristemático, localizado en la yema terminal o en la yema axilar, los cuales son inducidos para proliferar hasta formar brotes en respuesta a tratamientos con fitohormonas (Loyola-Vargas y Vásquez-Flota 2006). Los hipocótilos son también frecuentemente usados como explantes debido a que la formación de la yema puede ser fácilmente inducida. Las condiciones de cultivo, principalmente la fuente de nitrógeno, régimen de luz y la temperatura pueden desempeñar un papel crítico en la formación y desarrollo de las yemas a plántulas (Loyola-Vargas y Vásquez-Flota 2006). Adicionalmente, la producción a través del cultivo *in vitro* implica que se puede obtener material vegetal durante todo el año, independientemente de las condiciones ambientales (Atehortúa y Valencia 2002).

El cultivo *in vitro* de *Stevia rebaudiana* ha sido reportado tanto por organogénesis a partir de segmentos nodales (Jain et al. 2009, Suárez y Salgado 2008), punta del vástago apical (Ahmed et al. 2007, Anbazhagan et al. 2010, Huda et al. 2007, Sivaram y Mukundan 2003, Taware et al. 2010) y explantes foliares (Anbazhagan et al. 2010, Jain et al. 2009, Sivaram y Mukundan 2003), como por embriogénesis somática (Banerjee y Sarkar 2010, Besspalhok et al. 1993, Das y Mandal 2010, Pande y Khetmalas 2012), sin embargo, las tasas de regeneración son aún muy bajas.

Embriogénesis somática

La embriogénesis somática es el proceso por el que células somáticas haploides o diploides se desarrollan diferenciándose en plántulas a través de los estadios embriogénicos característicos que se presentan en la embriogénesis zigótica, sin la fusión de gametos (Loyola-Vargas y Vásquez-Flota 2006, Williams y Maheswaran 1986). Este proceso permite la inducción de cuerpos bipolares con ejes del vástago y de la raíz bien definidos (Loyola-Vargas y Vásquez-Flota 2006, Mizukami et al. 2008, Pierik 1990).

La embriogénesis somática ofrece una mejor alternativa sobre otros métodos de propagación vegetativa, debido a la posibilidad de propagación a gran escala y bajo riesgo de variación somaclonal (Arnold et al. 2002, Kantharajah y Golegaonkar 2004, Mizukami et al. 2008, Pareek y Kothari 2003, Park y Facchini 1999, Siriwardana y Nabors 1983, Vargas et al. 2005) permitiendo así la conservación de genotipos seleccionados (resistentes a enfermedades, de mejor calidad, de alta productividad, etc.) (Chalupa 2005).

Embriogénesis somática en *Stevia rebaudiana* Bertoni

La propagación de *Stevia rebaudiana* vía embriogénesis somática ha sido reportada; sin embargo, las tasas de regeneración ha sido muy bajas. Besspalhok et al (1993) obtuvieron

embriones somáticos directos, pero no lograron su desarrollo; Bessalov y Hattori (1997) lograron solo la formación de callos embriogénicos; Kryvenki et al (2008) obtuvieron un número muy reducido de embriones y difíciles de detectar, sin regenerantes; Das y Mandal (2010) reportan la regeneración de plántulas a partir de embriones somáticos, Banerjee y Sarkar (2010), Pande y Khetmalas (2012) lograron desarrollar un protocolo con un buen porcentaje de tejido caloso embriogénico, embriones somáticos, pero no reportan la eficiencia de regeneración de plántulas.

De acuerdo a la revisión bibliográfica realizada, no se reportan trabajos publicados sobre el cultivo *in vitro* de esta especie en Colombia. Desarrollar un protocolo de propagación *in vitro*, por medio de embriogénesis somática, podría significar un mejor aprovechamiento en la producción de esta plántula, generando fuente de productividad y empleo para el país.

Factores que afectan la embriogénesis somática

Genotipo y fuente de explantes

El genotipo es un factor clave que afecta la embriogénesis somática. Se ha reportado que la embriogénesis somática se ve afectada al utilizar incluso variedades de una misma especie (Ji et al. 2011, Kantharajah y Golegaonkar 2004).

El estado fisiológico y de desarrollo de los explantes influyen en la embriogénesis somática. En general el tejido con altos niveles del metabolismo y bajos niveles de diferenciación pueden promover la inducción de embriones somáticos. Esto ha sido reportado en muchas especies (Kryvenki et al. 2008, Abdin y Ilah 2006, Zhang et al. 2007). Por lo anterior, la selección del explante es un factor clave para la inducción de embriones somáticos.

El medio basal

Los componentes del medio basal desempeñan un papel muy importante en la embriogénesis somática. Los principales medios basales para la inducción de embriones somáticos son: MS (Murashige y Skoog 1962), SH (Schenk y Hildebrandt 1972), B5 (Gamborg et al. 1968) y DKW (Gupta y Durzan 1985) (Ji et al. 2011, Pierik 1990). El efecto de los distintos medios basales ha sido reportado en distintas especies (Kumar et al. 2003, Kantharajah y Golegaonkar 2004, Ji et al. 2011).

Fitohormonas

El efecto de las fitohormonas es un factor muy importante en la embriogénesis somática. En muchos casos, el éxito de la embriogénesis somática depende tanto de la combinación de auxinas y citoquininas, como de las concentraciones usadas (Ji et al. 2011, Kantharajah y Golegaonkar 2004). En general, el ácido 2,4-diclorofenoxi acético (2.4-D), es una de las fitohormonas mas reportadas para la inducción de la embriogénesis somática (Ji et al. 2011).

Para el establecimiento y mantenimiento de los cultivos embriogénicos de la mayoría de las especies es necesario el uso de fitohormonas. En particular, la presencia de auxina promueve la proliferación de callo e inhibe la diferenciación celular, mientras la remoción o la reducción de esta en el medio permite el desarrollo de los embriones somáticos (Deo et al. 2010).

Las auxinas son también responsables del establecimiento de la polaridad celular (eje apical-basal). Es sugerido que el transporte polar de auxina en los embriones somáticos es esencial para el establecimiento de la simetría bilateral durante la embriogénesis (Deo et al. 2010).

Fuente de nitrógeno

La fuente de nitrógeno es un factor muy importante en la embriogénesis somática (Trigiano et al. 1992). Los primeros estudios han demostrado que las especies de nitrógeno inorgánico (NO_3 y NH_4) son especialmente importantes para promover el desarrollo de los embriones somáticos (Durzan 1986, Joy et al. 1996). Sin embargo, la aplicación simultánea de compuestos orgánicos de nitrógeno reducido con nitratos estimula fuertemente la embriogénesis somática (Higashi et al. 1996). El nitrógeno orgánico, adicionado cómo aminoácidos ha sido reportado como promotor de la inducción y desarrollo de los embriones somáticos. Entre los aminoácidos más reportados se encuentran: Glutamina, Prolina, Arginina y Triptófano. Su efecto sobre la inducción de la embriogénesis somática ha sido atribuida a que contribuyen en varios procesos celulares tales cómo aumento en la señalización celular de varias rutas de transducción de señales, como moléculas precursoras para ciertos tipos de fitohormonas, reguladores de síntesis de DNA promueven la diferenciación celular, regulan y modulan el crecimiento (Deo et al. 2010, Basu et al. 1989, Divakaran y Nair 2011, de Carvalho et al. 2012).

En general, se ha encontrado que muchos aminoácidos mejoran el proceso de embriogénesis somática en muchas especies de plantas (Basu et al. 1989, Divakaran y Nair 2011, Siriwardana y Nabors 1983). Sin embargo, estos son dependientes de la

concentración y en algunos casos pueden presentar efectos negativos sobre la embriogénesis somática (Sarker et al. 2007, Trigiano et al. 1992, Gerdakaneh et al. 2011).

Ventajas de la micropropagación por medio de la embriogénesis somática

La producción de plantas a gran escala a través de la embriogénesis somática es la aplicación comercial más atractiva. Ésta presenta muchas ventajas sobre otros tipos de propagación (Deo et al. 2010), tales como:

- Permite el cultivo de un gran número de embriones en espacio reducido.
- Durante la regeneración, la formación de la raíz y del vástago es simultánea, eliminándose así la necesidad de un medio de inducción de raíces, tal como se presenta con la organogénesis.
- permite un fácil escalado.
- Los cultivos pueden ser manipulados, permitiendo que la formación y germinación del embrión pueda ser sincronizada, maximizando el rendimiento mientras se minimiza el trabajo.
- Así como los embriones zigóticos, los embriones somáticos pueden entrar en latencia, permitiendo que se almacene por largo tiempo

FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

El problema actual es la falta de un sistema de micropropagación masiva que permita ofrecer a los cultivadores material vegetal de excelente calidad y en cantidades comerciales.

La propagación de *S. rebaudiana* por medio de semillas presentan alta heterogeneidad en las poblaciones resultantes, debido principalmente a la polinización cruzada (Landázuri y Tigrero 2009). Gran parte de sus aquenios son estériles, la recolección de la semilla es lenta y difícil debido a que la floración no es uniforme, lo que afecta la maduración de la semilla; además el porcentaje de germinación es bajo, entre el 10 y 38% (Landázuri y Tigrero 2009); además es un proceso dependiente del genotipo (Goettemoeller y Ching 1999).

La producción de plántulas a través de semilla se realiza en almácigos convencionales, pero con algunas recomendaciones y prácticas especiales, como poner cobertura inmediatamente después de sembrar con una tela fina, para evitar que las semillas sean arrastradas por el viento. Por todos los inconvenientes que se han analizado, la propagación por medio de aquenios no es apta para cultivos comerciales (Landázuri y Tigrero 2009).

Aunque la propagación por estacas es el método más conveniente para ser usado a escala comercial; para esto es importante tener una plantación madre, que va a proveer del material vegetativo inicial. Para el establecimiento de la plantación madre se debe realizar una selección de plantas que presenten características deseables como vigor, calidad y productividad (Lemus-Mondaca et al. 2012). Una vez que la plantación madre se ha establecido para la propagación comercial, se deben cortar los esquejes. El corte y trasplante de los esquejes se debe realizar inmediatamente para evitar la desecación de las futuras plántulas (Landázuri y Tigrero 2009). Previo a la plantación, se corta la parte apical de los esquejes, que normalmente se oxidan rápidamente. Una vez plantados los esquejes, debe garantizarse un buen sistema de riego (Landázuri y Tigrero 2009). Todo lo anterior, hace a este sistema bastante costoso y poco práctico para el establecimiento de cultivos comerciales.

Stevia rebaudiana ha sido introducida en muchos países, debido a su importancia económica y los beneficios que esta ofrece a la población humana. Estos países para ofrecer y abastecer una mayor demanda han venido desarrollando técnicas para mejorar su propagación y para mayor aprovechamiento de la misma, sin embargo, un protocolo eficiente a través embriogénesis somática, aun no ha sido desarrollado.

JUSTIFICACIÓN

Debido a los problemas descritos en la propagación de esta especie y a los altos costos que se generan en su propagación a través de esquejes; con el presente proyecto se pretendió desarrollar un sistema eficiente vía embriogénesis somática, con el fin de mejorar los resultados reportados para *Stevia rebaudiana*, utilizando este tipo de sistema de micropropagación y ofrecer a los cultivadores material elite para el inicio de procesos productivos a pequeña y mediana escala.

Lo anterior, contribuirá al desarrollo del país en la medida de que se logre ofrecer material vegetal de calidad élite, tanto para los pequeños como los medianos productores, quienes hoy demandan plántulas para el establecimiento de cultivos, pero que por las limitaciones de los sistemas de obtención de material vegetal se ven afectados en su producción y mercado.

El mercado de esta especie está centrado principalmente como fuente de materia prima para elaboración de varios productos de uso alimenticio, medicinal y cosmético, donde Colombia puede explorar su potencial a escala industrial.

La biotecnología vegetal ofrece alternativas para superar los problemas de oferta y demanda de material vegetal y a través de los métodos de cultivo *in vitro* y en especial a través de embriogénesis somática, podría lograrse una producción automatizada que satisfaga la creciente demanda del mercado.

Colombia por ser un país ubicado en la zona neotropical, brinda grandes ventajas para el cultivo en campo de la Stevia, principalmente en departamentos como Meta, Córdoba, Antioquia, entre otros, afectados fuertemente por la violencia.

OBJETIVOS

Objetivo general

Desarrollar un protocolo de propagación masiva, vía embriogénesis somática a partir de explantes foliares de *Stevia rebaudiana* Bertoni.

Objetivos específicos

Evaluar diferentes combinaciones de fitohormonas para la inducción de embriones somáticos a partir de explantes foliares de *Stevia rebaudiana* Bertoni.

Evaluar diferentes combinaciones de fitohormonas para el desarrollo de los embriones somáticos de *Stevia rebaudiana* Bertoni.

METODOLOGÍA

Material vegetal

El Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad de Antioquia posee un stock de plantas *in vitro* de *Stevia rebaudiana* Bertoni, mutante SRQ-93. Este material fue la fuente de explantes (segmentos de hojas) para los diferentes procesos de inducción de embriogénesis somática.

Inducción de embriones somáticos

Medios de cultivo

De acuerdo a la revisión bibliográfica realizada y a la experiencia en el laboratorio, el material vegetal que se tiene responde bien a la combinación de sales y vitaminas de Murashige y Skoog (1962), por lo cual, esta fue la combinación de sales usada durante todo el proceso. El medio basal (MB) para todos los tratamientos consistió en: sales y vitaminas MS completas (Murashige y Skoog, 1962), suplementado con glutamina (50 mg/L), Arginina (50 mg/L), Asparagina (50 mg/L), sacarosa (30 g/L), gelrite (3.0 g/L).

Los tratamientos evaluados son presentados en la Tabla 6. Un medio basal libre de fitohormonas fue usado como control (M0). Los explantes en el medio de inducción fueron mantenidos en oscuridad a $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Como fuente de explantes se utilizaron hojas de plántulas *in vitro* con aproximadamente 20 días de subcultivadas. Los explantes fueron aproximadamente de 1.0 cm^2 . Se utilizaron 15 explantes por tratamiento y cada uno de los explantes fue tomado como unidad experimental. Estos fueron inoculados en cajas de Petri de 60x15 mm, con aproximadamente 10 mL de medio de cultivo; el haz de la hoja fue puesto en contacto con el medio de cultivo. La variable de respuesta para este experimento fue el número de embriones somáticos formados por explante.

	Combinación de fitohormonas	
Medio	2,4-D (mg/L)	BAP (mg/L)
M1	4.0	0.3
M2	4.0	0.5
M3	4.0	1.0
M4	4.0	1.5
M5	4.0	2.0
M6	3.0	0.3
M7	3.0	0.5
M8	3.0	1.0
M9	3.0	1.5
M10	3.0	2.0
M11	2.0	0.3
M12	2.0	0.5
M13	2.0	1.0
M14	2.0	1.5
M15	2.0	2.0
M0	0.0	0.0

Tabla 6. Medios de inducción de embriogénesis somática.

Medios de desarrollo

Después del proceso de inducción (100 días de cultivo), los embriones fueron transferidos a los nuevos medios para evaluar su desarrollo (Tabla 7).

Medio	Combinación de fitohormonas		
	2,4-D (mg/L)	BAP (mg/L)	GA3 (mg/L)
2M	2.0	0.0	0.0
MGA	2.0	0.3	0.1

Tabla 7. Medios de desarrollo de embriones somáticos de *S. rebaudiana*.

Condiciones de cultivo

El pH de los medios de cultivo fue ajustado a 5.75 con NaOH y HCl 1N, antes de autoclavar y esterilizados a 120°C y 15 psi durante 20 minutos. La temperatura del cuarto de crecimiento se mantuvo a $23 \pm 2^\circ\text{C}$. Los cultivos fueron mantenidos bajo condiciones de completa oscuridad durante el período de inducción y transferidos a condiciones de luz (aproximadamente $20 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$) para su desarrollo. El subcultivo de los explantes fue realizado cada 20 días.

Análisis estadístico

El análisis estadístico fue realizado por medio de un diseño unifactorial denotado por los tratamientos (combinaciones de fitohormonas) a evaluar. Se empleó el programa Statgraphics Centurion para la aleatorización de los tratamientos y el análisis de los datos y se verificaron los supuestos básicos del ANOVA. Para determinar las diferencias significativas entre los tratamientos (en la inducción de embriones somáticos) se utilizó la prueba de Tukey. Los valores $p < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

RESULTADOS

Inducción de embriones somáticos

La formación de embriones somáticos fue observada luego de 28 días de cultivo (Anexo. Fig 1b). El análisis estadístico presentó diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.0000$). Los mejores medios de inducción fueron M1 y M6; donde se obtuvo el mayor número de embriones somáticos (Fig 2 y Anexo. Fig 3). Los demás tratamientos no evidenciaron diferencias significativas respecto al control.

Los medios más eficientes en la formación de los embriones somáticos fueron aquellos que presentaron la mayor relación auxina/citoquinina; es decir, aquellos que contenían altas concentraciones de auxina (ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D)) y baja concentración de citoquinina (N6-Benzilaminopurina (BAP)). Así mismo, se evidenció que las altas concentraciones de BAP no favorecieron la formación de los embriones somáticos (Tabla 8).

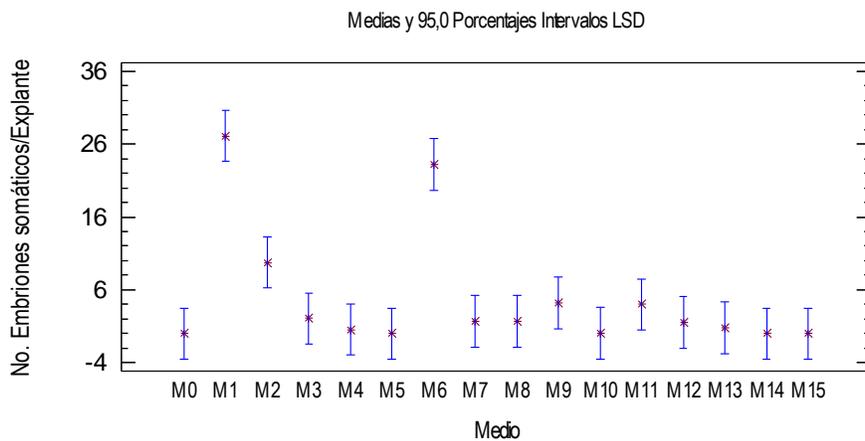


Fig 2. Formación de embriones somáticos en los distintos medios de cultivo, después de 100 días en los medios de inducción. Los valores son la media \pm desviación estándar.

Porcentaje de explantes con callo embriogénico y Número de embriones somáticos por explante.																
Medios	M0	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12	M13	M14	M15
% CE	0.0	100.0	93.3	60.0	66.7	93.3	93.3	66.7	53.3	80.0	66.7	86.7	60.0	100.0	100.0	100.0
No. ES	0.0 ^b	27.1 ^a	9.7 ^b	2.1 ^b	0.5 ^b	0.0 ^b	23.2 ^a	2.5 ^b	1.6 ^b	4.2 ^b	0.1 ^b	4.0 ^b	1.5 ^b	0.8 ^b	0.0 ^b	0.0 ^b

Tabla 8. Porcentaje de explantes con formación de callo embriogénico (CE) y número de embriones somáticos (ES) por explante luego de 100 días de cultivo. Letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo al test de Tukey ($p < 0.000$).

Luego de 62 días en el medio de inducción, algunos embriones presentaron formación de callo sobre su superficie (Anexo. Fig 4 y Fig 1d).

La embriogénesis somática en *Stevia rebaudiana*, Bertoni fue asincrónica; es decir, se obtuvo embriones somáticos en diferentes estados de desarrollo (embriones globulares de diferentes tamaños) (Anexo. Fig 5). Además, se obtuvo formación de embriones somáticos tanto de forma indirecta (Anexo. Fig 1a-c) como directa (Anexo. Fig 6).

Todos los medios que contenían fitohormonas presentaron formación de callo embriogénico (Tabla 1). Por lo general éste callo se forma en los bordes del explante, y en menor proporción en las zonas centrales de éste.

En los explantes tratados con las distintas combinaciones de fitohormonas se obtuvo dos tipos de callo. Uno muy compacto, nodular, de color verde amarillo y con estructuras parecidas a los embriones somáticos, este fue reconocido como callo embriogénico, mientras que el callo menos compacto, de color blanco fue identificado como no embriogénico (Anexo. Fig 7 a-b).

Desarrollo de los embriones somáticos

Después de 100 días en el medio de inducción, los embriones fueron transferidos a los medios de desarrollo 2M y MGA. Sin embargo, después de 40 días en estos medios no se logró desarrollo, por el contrario, muchos continuaron presentando callo sobre su superficie (Anexo. Fig 8) y en algunos casos hubo formación de nuevos embriones.

DISCUSIÓN

Inducción de embriones somáticos

Los mejores medios de inducción fueron M1 y M6, los cuales contenían las mayores concentraciones de 2,4-D (4 y 3 mg/L) y las concentraciones más bajas de BAP (0.3 mg/L) presentaron en promedio 27.1 y 23.2 embriones somáticos por explante, respectivamente; sin diferencias significativas entre ellos. Estos resultados superan lo reportado por Bessalho et al. (1993) quienes obtuvieron 9.06 embriones somáticos directos por explante, en un medio que contenía 2,4-D (5 mg/L) y BAP (0.3 mg/L). Banerjee y Sarkar (2010) evaluaron distintas combinaciones y concentraciones de fitohormonas para la inducción de embriones somáticos en *S. rebaudiana*; estos autores reportaron haber obtenido 40 embriones somáticos por explante en su mejor medio (2,4-D (2 mg/L), BAP (0.2 mg/L), TDZ (0.2 mg/L)); en nuestro caso la adición de TDZ al medio de cultivo no mejoró la obtención de embriones somáticos, sólo indujo la formación de callo embriogénico (resultados no mostrados). Otros autores han evaluado la inducción de embriogénesis somática para la *S. rebaudiana* obteniendo sólo la formación de callo embriogénico (Bessalho y Hattori 1997, Kryvenki et al. 2008).

Los medios más eficientes en la inducción de los embriones somáticos (M1 y M6) fueron aquellos que presentan las mayores relaciones de fitohormonas; es decir, altas concentraciones de auxina (2,4-D) con bajas concentraciones citoquinina (BAP), sugiriendo que una alta relación auxina/citoquinina es requerida para una mayor inducción de los embriones somáticos en *S. rebaudiana*. Resultados similares fueron obtenidos por Bessalho et al. (1993), quienes lograron la inducción de embriones somáticos directos con relaciones auxina/citoquinina similares. Otros autores han reportado el uso de relaciones auxina/citoquinina altas para la inducción de callo embriogénico y/o embriones somáticos en especies como *Manihot esculenta* (Mathews et al. 1993), *Helianthus annuus* (Charriere et al. 1999), *Crambe abyssinica* (Palmer y Keller 2011) y *Gossypium* (Zeng et al. 2007).

También se logró inducir embriones somáticos en algunos medios con bajas relaciones auxinas/citoquininas, sin embargo, no fueron los mejores medios de inducción. Das y Mandal (2010), Pande y Khetmalas (2012) han reportado la embriogénesis somática en *S. rebaudiana* con una baja relación auxina/citoquinina; sin embargo, no reportan la eficiencia de estos medios.

Estos resultados están en desacuerdo con Banerjee y Sarkar (2010) quienes reportaron una alta formación de embriones somáticos en un medio con baja relación

auxina/citoquinina. Esta diferencia puede deberse a la influencia del genotipo, al material fuente de explantes, entre otros. En otras especies también se ha conseguido la inducción de embriones somáticos con bajas relaciones de fitohormonas *crysantemum* (Mandal y Datta 2005), *Dendranthema grandiflora* (May y Trigiano 1991), en la fresa (Gerdakaneh et al. 2011).

En este experimento fueron evidenciadas Diferencias significativas entre los tratamientos con altas y bajas relaciones auxina/citoquinina, por el contrario, Besspalhok et al. (1993) no obtuvieron diferencias significativas en el número de embriones somáticos formados entre los medios con altas y bajas relaciones auxina/citoquinina. Por otro lado, en la inducción de callo embriogénico, Besspalhok y Hattori (1997) evaluaron altas y bajas relaciones auxina/citoquinina (2,4-D/Kinetina) sin obtener diferencias significativas.

También se evidenció que los medios con las mayores concentraciones de BAP presentaron poca formación de embriones somáticos, inclusive en algunos medios no se lograron formar, lo que podría sugerir que *S. rebaudiana* contiene un alto contenido endógeno de citoquinina, afectando la formación de los embriones somáticos. Wenck et al. (1988) compararon los niveles endógenos de citoquinina en las hojas de *Dactylis glomerata* en tres genotipos diferentes; uno con capacidad para formar embriones somáticos, y los otros sin dicha capacidad. Estos autores encontraron que los genotipos incapaces de formar embriones somáticos contenían de 3 a 4 veces más altas las concentraciones de citoquininas que el genotipo con capacidad embriogénica. Las fitohormonas son determinantes en la respuesta embriogénica ya que estos interactúan con los niveles endógenos y, en algunos casos, las respuestas están dadas por la acción conjunta de dos o más fitohormonas (Anami et al. 2010 citado por Urrea et al. 2011).

Los medios M14 y M15 presentan altas concentraciones de BAP y las menores relaciones de fitohormonas. En dichos medios se obtuvo callo embriogénico sin formación de embriones somáticos. Resultados similares han sido reportados en *S. rebaudiana* utilizando explantes foliares, usando concentraciones similares (Besspalhok et al. 1993, Kryvenki et al. 2008) y explantes florales (Besspalhok y Hattori 1997); así como también ha sido reportado en otras especies (Ghorbani-Marghashi et al. 2012, Palmer y Keller 2011).

En esta investigación la mayoría embriones somáticos fueron obtenidos en forma indirecta, aunque también se observó la presencia de embriones somáticos directos. Besspalhok et al. (1993) reportaron embriones somáticos directos, mientras que Banerjee y Sarkar (2010), Das y Mandal (2010), Pande y Khetmalas (2012) reportaron embriogénesis somática indirecta. Kumar et al. (2003) reportan la formación de embriones somáticos tanto directos cómo indirectos en un medio con baja concentración de 2,4-D y BAP. Según

Parrot (2002) citado por Kryvenki et al. (2008) la capacidad de un organismo determinado para formar embriones somáticos está determinada por el tipo de células presentes en el explante. Si el explante posee células con capacidad embriogénica basta solamente un estímulo para que las mismas se dividan para formar un embrión, originando lo que se conoce como embriogénesis somática directa. Sin embargo, cuando el explante se trata de un tejido ya desarrollado en donde las células perdieron su carácter embriogénico, éstas pueden dividirse mitóticamente bajo condiciones que terminan induciendo un estado embriogénico, con lo que se genera un callo que adquiere embriogenicidad y consecuentemente la embriogénesis es indirecta (Kryvenki et al. 2008).

El genotipo y la fuente de explante pueden afectar el proceso de inducción de la embriogénesis somática (Kryvenki et al. 2008). En este experimento se utilizaron como fuente de explantes hojas provenientes de plántulas *in vitro* de *S. rebaudiana* mutante SRQ93, obteniendo buena formación de embriones somáticos. Banerjee y Sarkar (2010) utilizaron hojas de plántulas recién establecidas *in vitro*, obteniendo igualmente un alto número de embriones somáticos con un genotipo diferente. Sin embargo, Bessalho et al. (1993) utilizaron como explantes hojas provenientes de plantas de invernadero y obtuvieron un bajo número de embriones somáticos; lo que podría sugerir que tanto el genotipo como la condición fisiológica del explante pueden influenciar la respuesta embriogénica. La dependencia del genotipo en la respuesta a la embriogénesis somática es reportada por varios autores en diferentes especies, *Phoenix dactylifera* (Zouine y Hadrami 2007), *Theobroma cacao* (Urrea et al. 2011), *Gossypium hirsutum* (Wu et al. 2004), *Cajanus cajan* (Aboshama 2011), *Elaeis guineensis* (de Carvalho et al. 2012).

Muchos de los embriones obtenidos presentaron callo sobre su superficie después de 62 días de cultivo en el medio de inducción. Esto puede ser debido al tiempo de exposición a la alta concentración de 2,4-D. Esta fitohormona además de ser ampliamente reportada como efectiva para la inducción de la embriogénesis somática (Bajaj 1995b), también ha sido reportada por tener efectos deletéreos sobre el desarrollo de éstos mismos cuando son sometidos por largos periodos de tiempo y/o altas concentraciones (Habibi et al. 2009, Pescador et al. 2008). En *Daucus carota* la exposición al 2,4-D durante un periodo prolongado genera deformación en los embriones somáticos (Bajaj 1995a, Nomura y Komamine 1985). Sin embargo, en otras especies como *Phoenix dactylifera* y Feijoa la prolongada exposición al 2,4-D es necesaria para inducir la formación de embriones somáticos (Vesco y Guerra 2001, Zouine y Hadrami 2007).

La formación de los embriones somáticos y su aumento en tamaño se obtuvo de forma asincrónica. Esta asincronía en la embriogénesis somática ha sido reportada en varias especies (Fambrini et al. 1996, Capuana y Debergh 1997, Mandal y Datta 2005, Torres et

al. 2001). Cuando este fenómeno es exhibido se afecta la producción de los cultivos (Mandal y Datta 2005, Torres et al. 2001).

Medios de desarrollo

Para la etapa de desarrollo de los embriones somáticos se evaluaron dos medios de cultivos con diferentes combinaciones de fitohormonas. El primero contenía sólo 2,4-D, y el segundo contenía una combinación de 2,4-D, BAP y GA3. En este estudio, los embriones somáticos no lograron su desarrollo después de 60 días en estos medios. Banerjee y Sarkar (2010) reportan el desarrollo de embriones somáticos al reducir la concentración de 2,4-D en el medio, aunque con baja eficiencia. Otros autores reportan la disminución de 2,4-D en los medios para lograr el desarrollo de los embriones somáticos previamente inducidos en diferentes especies; *Cichorium intybus* (Abdin y Ilah 2006), *Pinus bungeana* (Zhang et al. 2007) y algunas especies de gramíneas (Ribnicky et al. 1996).

En el medio que contenía la combinación de 2,4-D, BAP y GA3 tampoco se logró el desarrollo en los embriones somáticos. En *Cichorium* se logró el desarrollo de los embriones somáticos en un medio que contenía GA3 (Bajaj 1995). Resultados similares han sido reportado en otras especies, donde el GA3 tiene un efecto positivo sobre el desarrollo de los embriones somáticos (Xie y Hong 2001, Li et al. 2002, Rajasekaran et al. 1987). Aunque es de resaltar que la respuesta para esta fitohormona es dependiente de la concentración y del genotipo evaluado (Li et al. 2002).

En los procesos de inducción, desarrollo y germinación de los embriones somáticos se presentan muchos cambios en los patrones de expresión de genes; esto ha sido reportado en muchas especies (Businge et al. 2012, Correia et al. 2012, Dodeman y Ducreux 1996, Rode et al. 2011). En nuestro experimento no se logró desarrollar los embriones somáticos lo que podría sugerir que muchos de los cambios a nivel de expresión de genes no se estén dando de forma adecuada (depende de muchos factores). En zanahoria se encontró que durante el desarrollo de los embriones somáticos se presentaba pérdida de actividad de glutamina sintetasa, lo que afectaba el desarrollo de estos (Higashi et al. 1996).

CONCLUSIONES

1. Los hojas son buena fuente de explantes para la inducción de embriogénesis somática en *Stevia rebaudiana* Bertoni, mutante SQR-93.
2. Una alta relación auxina/citoquinina favorece la formación de los embriones somáticos en *Stevia rebaudiana* Bertoni, mutante SQR-93.
3. Las altas concentraciones de BAP afectan la inducción de embriones somáticos en *Stevia rebaudiana* Bertoni, mutante SQR-93.
4. La reducción de 2,4-D en el medio basal no favorece el desarrollo de los embriones somáticos en *Stevia rebaudiana* Bertoni, mutante SQR-93.

SUGERENCIAS

Realizar ensayos donde se pueda disminuir el tiempo de formación de embriones somáticos y por consiguiente reducir el tiempo de exposición al 2,4-D. Estos ensayos podrían incluir otras combinaciones de fitohormonas (2iP, Zeatina), evaluar el efecto de la temperatura, efectos de aditivos cómo agua de coco y adenina.

Evaluar el mejor medio de inducción de embriones somáticos con material proveniente de invernadero y de una variedad comercial.

Evaluar otros medios de cultivo para el desarrollo de los embriones somáticos.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdin M, Ilah A. 2006. Plant regeneration through somatic embryogenesis from stem and petiole explants of Indian chicory (*Cichorium intybus* L.). *Indian Journal of Biotechnology*, 6: 250-255.
- Aboshama H. 2011. Somatic embryogenesis proliferation, maturation and germination in *Cajanus cajan*. *World Journal of Agricultural Sciences*, 7(1): 86-95.
- Abou-Arab A, Abou-Arab A, Abu-Salem M. 2010. Physico-chemical assessment of natural sweeteners steviosides produced from *Stevia rebaudiana* Bertoni plant. *African Journal of Food Science*, 4: 269-281.
- Ahmed M, Salahin M, Karim R, Razvy M, Hannan M, Sultana R, Hossain M, Islam R. 2007. An efficient method for in vitro clonal propagation of a newly introduced sweetener plant (*Stevia rebaudiana* Bertoni.) in Bangladesh. *American-Eurasian Journal of Scientific Research*, 2: 121-125.
- Anbazhagan M, Kalpana M, Rajendran R, Natarajan V, Dhanavel D. 2010. In vitro production of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 22: 216-222.
- Arana-Contreras O. 2009. Estudio de factibilidad para un cultivo de *Stevia rebaudiana* Bertoni en el Departamento del Tolima (Trabajo de grado para optar al título de Ingeniero Industrial). Bogotá D.C: Facultad de Ingeniería, Universidad de los Andes. p. 75.
- Arnold S, Sabala I, Bozhkov P, Dyachok J, Filonova L. 2002. Development pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 69: 233-249.
- Atehortúa L, Valencia C. 2002. Bioconversion de embriones somáticos de *Heliconia stricta* Huber utilizando los sistemas de inmersión temporal RITA. *Actualidades Biológicas*, 24: 223-29.
- Bajaj Y, editor. 1995a. *Biotechnology in agriculture and forestry* 30, somatic embryogenesis and synthetic seed I. 1ra ed. New Delhi: Springer-Verlag. p. 31.
- Bajaj Y, editor. 1995b. *Biotechnology in agriculture and forestry* 30, somatic embryogenesis and synthetic seed II. 1ra ed. New Delhi: Springer-Verlag. p. 15.
- Banerjee M, Sarkar P. 2010. Somatic embryogenesis in *Stevia rebaudiana* Bertoni using different concentration of growth hormones. *International Journal of Plant Sciences*, 5(1): 284-289.

- Basu A, Sethi U, Mukherjee S. 1989. Regulation of cell proliferation and morphogenesis by amino acids in Brassica tissue cultures and its correlation with threonine deaminase. *Plant Cell Reports*, 8(6): 333-335.
- Bespalhok J, Hashimoto J, Esteves L. 1993. Induction of somatic embryogenesis from leaf explants of *Stevia rebaudiana*. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 5: 51-53.
- Bespalhok J, Hattori K. 1997. Embryogenic callus formation and histological studies from *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni Floret explants. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 9: 185-188.
- Bonilla C, Sánchez M, Perlaza D. 2007. Evaluación de métodos de propagación, fertilización nitrogenada y fenología de estevia en condiciones del Valle del Cauca. *Acta Agronomica (Colombia)*, 56: 131-134.
- Brandle J, Starratt A, Gijzen M. 1998. *Stevia rebaudiana*: its agricultural, biological, and chemical properties. *Canadian Journal of Plant Science*, 78: 527-536.
- Businge E, Brackmann K, Moritz T, Egertsdotter U. 2012. Metabolite profiling reveals clear metabolic changes during somatic embryo development of Norway spruce (*Picea abies*). *Tree Physiology*, 00: 1-13.
- Cangahuala-Inocente G, Dal L, Steinmacher D, Torres A, Guerra M. 2007. Improvements in somatic embryogenesis protocol in Feijoa (*Acca sellowiana* (Berg) Burret): Induction, conversión and synthetic seeds. *Scientia Horticulturae*, 111: 228-234.
- Castleman M. 2010. Stevia: This sugar substitute; is sweet and healthy. *Mother earth news*, 241. Consulta: 2011, Marzo, 8. Disponible en: <http://www.motherearthnews.com>
- Chalupa V. 2005. Protocol of somatic embryogenesis: pedunculate oak (*Quercus robur* L.) and sessile oak (*Quercus petraea* / Matt./ Liebl.), in: Jain S, Gupta P (eds) *Protocol for Embryogenesis in Woody Plants*. Springer, Netherlands, 369-378.
- Chan P, Xu D, Liu J, Chen Y, Tomlinson B, Huang W, Cheng J. 1998. The effect of stevioside on blood pressure and plasma catecholamines in spontaneously hypertensive rats. *Life Sciences*, 63(19): 1679-1684.
- Cioni P, Morelli I, Andolfi L, Macchia M, Ceccarini L. 2006. Qualitative and quantitative analysis of essential oils of five lines *Stevia rebaudiana* Bert. Genotypes cultivated in Pisa (Italy). *Journal of essential Oil Research*, 18: 76-79.

- Correia S, Vinhas R, Manadas B, Lourenco A, Veríssimo P, Canhoto J. 2012. Comparative proteomic analysis of auxin-induced embryogenic and nonembryogenic tissues of the Solanaceous tree *Cyphomandra betacea* (Tamarillo). *Journal of Proteome Research*, 11: 1666-1675.
- Dal L, Guerra M. 2001. The effectiveness of nitrogen sources in Feijoa somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 64: 19-25.
- Das A, Gantait S, Mandal N. 2011. Micropropagation of an elite medicinal plant: ***Stevia rebaudiana*** Bert. *International journal of Agricultural Research*, 6(1): 40-48.
- Das A, Mandal N. 2010. Enhanced development of embryogenic callus in ***Stevia rebaudiana*** Bert by additive and amino acids. *Biotechnology*, 9(3): 368-372.
- De Carvalho R, Gomes Z, Scherwinski J. 2012. Differential responses to somatic embryogenesis of different genotypes of brazilian oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*.
- Deo P, Tyagi A, Taylor M, Harding R, Becker D. 2010. Factors affecting somatic embryogenesis and transformation in modern plant breeding. *The South Pacific Journal of Natural and Applied Science*, 28: 27-40.
- Divakaran S, Nair A. 2011. Somatic embryogenesis from bract cultures in diploid *Musa acuminata* cultivars from South India. *Scientia Horticulture*, 131: 99-102.
- Dodeman V, Ducreux G. 1996. Total protein expression during induction and development of carrot somatic embryos. *Plant Science*, 120: 57-69.
- Durzan D. 1986. Ammonia: its analogues, metabolic products and site of action in somatic embryogenesis.
- Farzana A, Palkadapala P, Meddegoda K, Samarajeewa P, Eeswara J. 2008. Somatic embryogenesis in papaya (*Carica papaya* L. cv. Rathna). *Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka*, 36(1): 41-50.
- Faus I. 2000. Recent developments in the characterization and biotechnological production of sweet-tasting proteins. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53: 145-151.
- Gerdakaneh M, Mozafari A, Adel S, Sarabi B. 2011. Effects of different amino acids on somatic embryogenesis of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.). *Acta Physiologiae Plantarum*, 33: 1847-1852.

Goettemoeller J, Ching A. 1999. Seed germination in *Stevia rebaudiana*. Perspectives on new crops and new uses. ASHS Press.

Goyal S, Samsher, Goyal R. 2010. Stevia (*Stevia rebaudiana*) a bio-sweetener: a review. International Journal of Food Sciences and Nutrition, 61(1): 1-10.

Higashi K, Kamada H, Harada H. 1996. The effects of reduced nitrogenous compounds suggests that glutamine synthetase activity is involved in the development of somatic embryos in carrot. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 45: 109-114.

Huda Md, Ahmed A, Mandal Ch, Alam K, Hossain Md, Wadud A. 2007. In vitro morphogenic responses of different explants of stevia (*Stevia rebaudiana* Bert.). International Journal of Agricultural Research, 2(12): 1006-1013.

Ibrahim N, El-Gengaihi S, Motawe H, Raid S. 2007. Phytochemical and biological investigation of *Stevia rebaudiana* Bertoni; 1-labdane-type diterpene. European Food Research and technology, 224: 483-488.

Jácome A. 2004. Diabetes en Colombia: recuento histórico y bibliográfico. Internista-Endocrinólogo, de la consulta externa, Asociación Colombiana de diabetes. Miembro de número, Academia Nacional de Medicina, miembro honorario, Asociación Colombiana de Endocrinología.

Jain P, Kachhwaha S, Kothari S. 2009. Improved micropropagation protocol and enhancement in biomass and chlorophyll content in *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni by using high copper levels in the culture medium. Scientia Horticulturae, 119: 315-319.

Jarma-Orosco A. 2008. Estudios de adaptación y manejo integrado de estevia (*Stevia rebaudiana* Bert.): nueva alternativa agroindustrial del Caribe Colombiano. Una revisión. Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas, 2: 110-121.

Jayaraman S, Saravanan M, Illanchezian. 2008. In-vitro antimicrobial and antitumor activities of *Stevia rebaudiana* (Asteraceae) leaf extracts. Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 7(4): 1143-1149.

JayaSree T, Pavan U, Ramesh M, Rao A, Jagan K, Sadanandam A. 2001. Somatic embryogenesis from leaf cultures of potato. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 64: 13-17.

Ji A, Geng X, Zhang Y, Yang H, Wu G. 2011. Advances in somatic embryogenesis research of horticultural plants. American Journal of Plant Sciences, 2: 727-732.

- Jiménez V, Bangerth F. 2001. Endogenous hormone concentrations and embryogenic callus development in wheat. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 67: 37-46.
- Joy R, McIntyre D, Vogel H, Thorpe T. 1996. Stage- specific nitrogen metabolism in developing carrot somatic embryos. *Physiologia Plantarum*, 97: 149-159.
- Kant R. 2005. Sweet proteins – Potential replacement for artificial low calorie sweeteners. *Nutrition Journal*, 4: 1-6.
- Kantharajah A, Golegaonkar P. 2004. Somatic embryogenesis in eggplant. *Scientia Horticulture*, 99: 107-117.
- Kedik S, Yartsev E, Stanishevskaya I. 2009. Antiviral activity of dried extract of Stevia. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 43: 198-199.
- Kovylyayeva G, Bakaleinik G, Strobykina I, Gubskaya V, Sharipova R, Al'fonsov V, Kataev V, Tolstikov A. 2007. Glycosides from *Stevia rebaudiana*. *Chemistry of Natural Compounds*, 43: 81-85.
- Kraska R, McQuate R, Soni M. 2010. Rebaudioside A ($\geq 97\%$). Food usage conditions for general recognition of safety. GRAS ASSOCIATE. Pag: 247.
- Kroyer G. 2010. Stevioside and stevia-sweetener in food: application, stability and interaction with food ingredients. *Journal of Consumer Protection and Food safety*, 5: 225-229.
- Kryvenki M, Kosky R, Guerrero D, Dominguez M, Reyes M. 2008. Obtención de callos con estructuras embriogénicas de *Stevia rebaudiana* Bert en medios de cultivo semisólidos. *Bioteología Vegetal*, 8(2): 91-98.
- Kumar J, Kumari B, Castaño E. 2008. Cyclic somatic embryogenesis and efficient plant regeneration from callus of safflower. *Biologia Plantarum*, 52: 429-436.
- Kumar H, Murthy H, Paek K. 2003. Embryogenesis and plant regeneration from anther cultures of *Cucumis sativus* L. *Scientia Horticulture*, 98: 213-222.
- Landázuri P, Tigrero J, Editores. 2009. *Stevia rebaudiana* Bertoni, una planta medicinal. 1ra ed. Sangolquí, Ecuador. EDIESPE.
- Larsen J. 2012. Artificial sweeteners. A brief review of their safety issues. *Nutrafoods*, 11: 3-9.

- Lemus-Mondaca R, Vega-Gálvez A, Zura-Bravo L, Ah-Hen K. 2012. *Stevia rebaudiana* Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. *Food Chemistry*, 132: 1121-1132.
- Li X, Krasnyanski S, Korban S. 2002. Somatic embryogenesis, secondary somatic embryogenesis, and shoot organogenesis in *Rosa*. *Journal of Plant Physiology*, 159: 313-319.
- Loyola-Vargas V, Vásquez-Flota F, editores. 2006. *Plant Cell Culture Protocols*. 2da ed. Yucatán, México. Humana press: p. (441).
- Madan S, Ahmad S, Singh G, Kohli K, Kumar Y, Singh R, Garg M. 2009. ***Stevia rebaudiana*** (Bert.) Bertoni – A review. *Indian Journal of Natural Products and Resources*, 01(3): 267-286.
- Mandal A, Datta S. 2005. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from ray florets of chrysanthemum. *Biologia Plantarum*, 49(1): 29-33.
- Marín W. 2004. Sondeo de Mercado de la Estevia. Instituto de Investigación de recursos Biológicos Alexander von Humboldt. Bogotá Colombia.
- Mathews H, Schopke C, Carcamo R, Chavarriaga P, Fauquet C, Beachy R. 1993. Improvement of somatic embryogenesis and plant recovery in cassava. *Plant Cell Reports*, 12: 328-333.
- May R, Trigiano R. 1991. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaves of *Dendranthema grandiflora*. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 116(2): 366-371.
- Megeji N, Kumar J, Singh V, Kaul V, Ahuja P. 2005. Introducing *Stevia rebaudiana*, a natural zero-calorie sweetener. *Current Science*, 88(5): 801-804.
- Mishra P, Singh R, Kumar U, Prakash V. 2010. *Stevia rebaudiana* – A magical sweetener. *Global Journal of Biotechnology and Biochemistry*, 5(1): 62-74.
- Mizukami M, Takeda T, Satonaka H, Matsuoka H. 2008. Improvement of propagation frequency with two-step direct somatic embryogenesis from carrot hypocotyls. *Biochemical Engineering Journal*, 38: 55-60.
- Monsalve L, García C. 2005. Obtención de embriones somáticos primarios de *Theobroma cacao* en clones de interés para el departamento Norte de Santander, Colombia. *Revista de la Universidad francisco de Paula Santander (Cúcuta)*, 10: 21-29.

- Morrone J. 2006. Biogeographic areas and transition zones of Latin America and the Caribbean islands based on panbiogeographic and cladistic analyses of the entomofauna. *Annual Review of Entomology*, 51: 467-494.
- Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiology of Plant*, 15: 473- 497.
- Palmer C, Keller W. 2011. Somatic embryogenesis in *Crambe abyssinica* Hochst. ex R.E. Fries using seedling explants). *Plant Cell Tissue, and Organ Culture*, 104: 91-100.
- Pande S, Khetmalas M. 2012. Effect of concentration of sucrose on callus induction and somatic embryogenesis of anti-diabetic plant: *Stevia rebaudiana*. *Asian Journal of Biochemical and Pharmaceutical Research*, 1(2): 27-31.
- Pareek A, Kothari S. 2003. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf cultures of ornamental species of *Dianthus*. *Scientia Horticulturae*, 98: 449-459.
- Park S, Facchini P. 1999. High-efficiency somatic embryogenesis and plant regeneration in California poppy, *Eschscholzia californica* Cham. *Plant Cell Reports*, 19: 421-426.
- Pescador R, Kerbauy G, Viviani D, Kraus J. 2008. Anomalous somatic embryos in *Acca sellowiana* (O. Berg) Burret (Myrtaceae). *Revista Brasileira de Botânica*, 31(1): 155-164.
- Pierik R. 1990. Cultivo in vitro de las plantas superiores. 3ra ed. Madrid (España): Ediciones Mundi-Prensa. p. 326.
- Rajasekaran K, Hein M, Vasil I. 1987. Endogenous abscisic acid and indole-3-acetic acid and somatic embryogenesis in cultured leaf explants of *Pennisetum purpureum* Schum. *Plant Physiology*, 84: 47-51.
- Ribnicky D, Ilic N, Cohen J, Cooke T. 1996. The effects of exogenous auxins on endogenous indole-3-acetic acid metabolism. *Plant Physiology*, 112: 549-558.
- RIRDC, Rural Industries Research and Development Corporation. 2005. A new rural industry –Stevia- to replace imported chemical sweetener. Publicacion No. W02/022. Consulta: 2011, Febrero, 17. Disponible en: <http://www.rirdc.gov.au>
- Rode C, Lindhorst K, Braun H, Winkelmann T. 2011. From callus to embryo: a proteomic view on the development and maturation of somatic embryos in *Cyclamen persicum*. *Planta*.

Sarker K, Kabir A, Sharmin S, Nasrin Z, Alam M. 2007. Improved somatic embryogenesis using L-Asparagina in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Sjemenarstvo*, 24: 187-196.

Sghaier B, Kriaa W, Bahloul M, Jorrín J, Drira N. 2009. Effect of ABA, Arginine and sucrose on protein content of date palm somatic embryos. *Scientia Horticulturae*, 120: 379-385.

Shaw J, Sicree R, Zimmet P. 2010. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 87: 4-14.

Shock C. 1982. Rebaudi's stevia: natural noncaloric sweeteners. University of California, pag 5.

Singh SD, Rao G. 2005. Stevia: the herbal sugar of 21st century. *Sugar Tech*, 7: 17-24.

Siriwardana S, Nabors M. 1983. Tryptophan enhancement of somatic embryogenesis in rice. *Plant Physiology*, 73: 142-146.

Sivaram L, Mukundan U. 2003. In vitro studies on *Stevia rebaudiana*. *In Vitro Cellular and Developmental Biology- Plant*, 39: 520-523.

Soejarto D. (2002). Botany of Stevia and *Stevia rebaudiana*. In A. Kinghorn (Ed.), *Stevia: The genus Stevia* (pp. 18–39). London, New York: Taylor and Francis.

Suárez I, Salgado J. 2008. Propagación in vitro de ***Stevia rebaudiana*** Bertoni (Asteraceae-Eupatorieae) a través de organogénesis. *Temas Agrarios*, 13(1): 40-48.

Taware A, Mukadam D, Chavan A, Taware S. 2010. Comparative studies of in vitro grown plants and callus of ***Stevia rebaudiana*** (Bertoni). *International Journal of Interrogative Biology*, 9: 10-15.

Trigiano R, May R, Conger B. 1992. Reduced nitrogen influences somatic embryo quality and plant regeneration from suspension cultures of orchardgrass. *In Vitro celular and Developmental Biology-Plant*, 28: 187-191.

U.S Food and Drug Administration. 2011. GRAS Notice inventory. Fecha de acceso: 2011 Abril 12. Disponible en: <
<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/fcn/fcnDetailNavigation.cfm?rpt=grasListing&id=369> >

Uddin M, Hossain M, Haque M, Uddin MB, Ahmed R, Baten M. 2006. In vitro propagation of ***Stevia rebaudiana*** Bert in Bangladesh. *African Journal of Biotechnology*, 5: 1238-1240.

- Urrea A, Atehortúa L, Gallego A. 2011. Regeneration through somatic embryogenesis of an elite colombian *Theobroma cacao* L. variety. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 9(2): 39-50.
- Vargas T, De Garcia E, Oropeza M. 2005. Somatic embryogenesis in *Solanum tuberosum* from cell suspension cultures: histological analysis and extracelular protein patterns. *Journal of Plant Physiology*, 162: 449-456.
- Vesco L, Guerra M. 2001. The effectiveness of nitrogen sources in *Feijoa* somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 64: 19-25.
- Wenck A, Conger B, Trigiano R, Sams C. 1988. Inhibition of somatic embryogenesis in Orchardgrass by endogenous cytokinins. *Plant Physiology*, 88: 990-992.
- Whitehouse C, Boullata J, McCauley L. 2008. The potential toxicity of artificial sweeteners. *American Association of Occupational Health Nurses*, 56(6): 251-261.
- Williams E, Maheswaran G. 1986. Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. *Annals of Botany*, 57, 443-462.
- Wu J, Zhang X, Nie Y, Jin S, Liang S. 2004. Factors affecting somatic embryogenesis and plant regeneration from a range of recalcitrant genotypes of chinese cottons (*Gossypium hirsutum* L.). *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 40: 371-375.
- Xie D, Hong Y. 2001. Regeneration of *Acacia mangium* through somatic embryogenesis. *Plant Cell Reports*, 20: 34-40.
- Zhang C, Li Qian, Kong L. 2007. Induction, development and maturation of somatic embryos in Buge's pine (*Pinus bungeana* Zucc. ex Endl.). *Plant Cell Tissue, and Organ Culture*, 91: 273-280.
- Zouine J, Hadrami I. 2007. Effects of 2,4-D, glutamine and BAP on embryogenic suspensión culture of date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *Scientia Horticulturae*, 112: 221-226.

ANEXOS



Fig 1a. Formación de Callo. Luego de 17 días de cultivo.



Fig 1b. Formación embriones. Luego de 28 días de cultivo.



Fig 1c. Formación embriones. Luego de 42 días de cultivo.



Fig 1d. Embriones somáticos con formación de callo en su superficie. Medios (M1), luego de 62 días de cultivo.



Fig 3. Embriones somáticos. Medios (M1), luego de 52 días de cultivo.



Fig 4. Embriones somáticos. Medios (M1), luego de 62 días de cultivo.



Fig 5. Formación asincrónica de los embriones somáticos. Medio (M1), luego de 100 días.

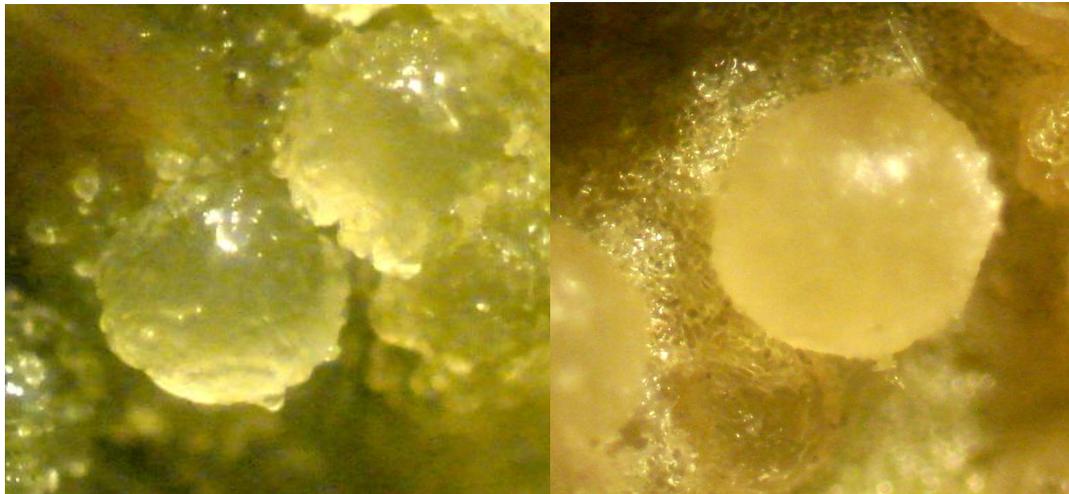


Fig 6. Embriones somáticos directos. Medio (M1), luego de 28 días de cultivo.



Fig 7a. Callo no embriogénico.



Fig 7b. Callo embriogénico.



Fig 8. Embriones somáticos con callo en su superficie, luego de 40 días en medios de desarrollo.