

INDUCCIÓN DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA A PARTIR DE CORMOS DE *Crinum x powellii* "album" (Amaryllidaceae)

Induction of somatic embryogenesis from *Crinum x powellii* "album" corms (Amaryllidaceae)

RESUMEN

Se indujo la producción de embriones somáticos (ESs) a partir de callos friables formados de los cormos internos de la parte basal de los bulbos de *Crinum x powellii* "album" cultivados en el medio Murashige y Skoog, suplementado con el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (1 mg/L) y kinetina (1.0 a 1.5 mg/L). La inducción de los ESs se optimizó al utilizar 0.4 mg/L de 2,4-D y 0.375 mg/L de kinetina; los ESs proliferaron en el medio MS libre de hormonas y después de su desecación, se transfirieron al medio MS con ácido giberélico para su maduración; a pesar de las variaciones físicas, de las condiciones y de los fitoreguladores, los ESs no evolucionaron a plántulas.

Palabras clave: ácido 2,4-diclorofenoxiacético, ácido giberélico, 6-benzilaminopurina, callos, embriones somáticos, kinetina, reguladores de crecimiento.

ABSTRACT

The production of somatic embryos (SEs) was induced from friable callus obtained from internal corms at the basal part of the bulbs of *Crinum x powellii* "album" grown on Murashige and Skoog medium supplemented with 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (1 mg/L) and kinetin (1.0 to 1.5 mg/L); the induction of SEs was optimized by using 0.4 mg/L 2,4-D and 0.375 mg/L of kinetin, the SEs proliferated in the hormone-free MS medium and after drying, were transferred to MS medium with gibberellic acid for maturation; in spite of the conditions and types of phytohormones, the SEs did not evolve to plantlets.

Keywords: 2,4-Dichlorophenoxy acetic, gibberellic acid, 6-benzylaminopurine, callus, somatic embryos, kinetin, growth regulators.

1. INTRODUCCIÓN

De los bulbos de *Crinum x powellii* (CP) "album" (Amaryllidaceae), se han aislado diferentes alcaloides: licorina, cherillina, (+) criwellina (3-epitazettina), (+) dihidrohaemantamina, krepowina (*O*-acetilcrinina), neruscina, (-) crinamidina, (-) galantamina, cripowellina A y B, ismina, 1-*O*-acetil-licorina y powellina, entre otros [1]; los cuales, poseen propiedades biológicas diversas y potencialmente pueden ser desarrollados a nuevos medicamentos [2], destacándose los constituyentes del tipo licorina, debido a su potente actividad anticancerígena, antiviral, antiacetilcolinesterasa, antimalárica y antifúngica [3].

Puesto que CP es un híbrido estéril, su propagación es baja, siendo necesario recurrir al cultivo *in vitro* para lograr una mayor tasa de multiplicación. Debido a la dificultad que existe para regenerar tejidos por otras vías como la organogénesis, se propone la embriogénesis somática como método viable y eficiente para la multiplicación vegetativa de especies promisorias [4].

Los niveles de competencia embriogénica, la morfología potencial de los explantes y el establecimiento de cultivos embriogénicos proliferantes dependen del material vegetal de partida. Las variedades de una especie difieren tanto en su respuesta a las condiciones de maduración como en el tiempo requerido para la diferenciación de los embriones somáticos. Por lo tanto, cada fase de la embriogénesis somática debe ser determinada experimentalmente para una especie vegetal en particular [5].

Son pocos los estudios sobre el cultivo de tejidos realizados en el género *Crinum* y en esta especie en particular. Con la realización de este trabajo, se establecieron las condiciones experimentales adecuadas para la inducción de la embriogénesis somática indirecta de CP, como método alternativo de reproducción masiva de este híbrido.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección del material vegetal. Los bulbos de CP fueron recolectados en los jardines de la Universidad

JAIME NIÑO O.

Lic. B. y Qca, MSc, PhD.
Profesor Titular
Universidad Tecnológica de Pereira
janino@utp.edu.co

ANYELA MARCELA RÍOS R.

Estudiante de Química Industrial
Universidad Tecnológica de Pereira
anymar@utp.edu.co

CAROLINA BEDOYA P.

Estudiante de Química Industrial
Universidad Tecnológica de Pereira
kabep1911@gmail.com

OSCAR M. MOSQUERA M.

Químico, MSc.
Profesor Titular
Universidad Tecnológica de Pereira
omosquer@utp.edu.co

Tecnológica de Pereira y en el corregimiento La Florida (Pereira, Colombia), a 1300 m sobre el nivel del mar, con temperatura promedio de 22 °C y humedad relativa del 90% (latitud 4.81°, longitud -75.7°).

Desinfección del material vegetal. Los bulbos de CP fueron lavados con detergente comercial (2%), seguido por un tratamiento de desinfección que incluía: EtOH (70%), NaOCl (30%) con Extran® (0.5%), una solución de Glutarex con Extran® (0.5%) y ácido cítrico estéril (0.22%) y una solución de conservante de plantas (PMP®) (0.3%) y Extran® (0.25%), sucesivamente.

Obtención de explantes. Se evaluaron cuatro tipos de explantes de 5 x 5 mm, seccionados de los cormos internos de la parte intermedia (IM) y basal (IB) del bulbo y de los cormos externos de la parte intermedia (EM) y basal (EB) del bulbo de CP (figura 1). Durante este proceso, los materiales vegetales se mantuvieron en una solución estéril de ácido cítrico al 1% para evitar su deshidratación y oxidación.

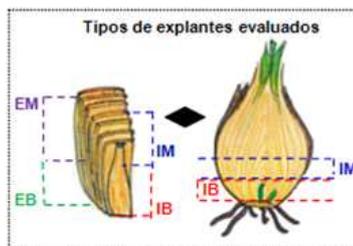


Figura 1. Obtención de explantes del bulbo de *C. x powellii* "album" para la inducción de callos. Tipo de explantes evaluados durante la inducción de callo: EM: Cormos externos de la parte intermedia del bulbo, EB: Cormos externos de la parte basal del bulbo, IM: Cormos internos de la parte intermedia del bulbo, IB: Cormos internos de la parte basal del bulbo.

Inducción de callos. Se evaluaron diferentes concentraciones de 2,4-D (0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 y 4.0 mg/L) solo y en combinación con 6-BAP (0.25, 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 mg/L) y kinetina (0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 mg/L) en el medio Murashige y Skoog (MS) (1962) [6], con las vitaminas típicas de éste y 0.8% de agar como agente gelificante; además, para controlar la oxidación se evaluó el efecto de la polivinilpirrolidona (PVP) (100 mg/L) sola y asociada con cisteína (50 mg/L). Adicionalmente, se evaluaron diferentes concentraciones de 2,4-D (0.2, 0.4, 0.6 y 0.8 mg/L) junto con 6-BAP (0.2, 0.4, 0.8 y 1.0 mg/L) empleando 0.2% de agar (medio semilíquido).

Para la evaluación de cada tratamiento se utilizaron 66 explantes como unidades experimentales. Los explantes fueron subcultivados periódicamente cada 15 días hasta la obtención de callos y su posterior masificación. Toda esta etapa se llevó a cabo en condiciones de oscuridad para disminuir el riesgo de oxidación de los explantes.

Inducción de los embriones somáticos (ESs). Los callos friables obtenidos en la etapa anterior, fueron transferidos al medio basal MS suplementado con las vitaminas típicas de este medio, modificando la relación auxina/citoquinina en los tratamientos evaluados durante la inducción de callos, reduciendo en un 40 y 80% la concentración de 2,4-D sin modificar la concentración inicial del 6-BAP y a un 60 y 65% la concentración de 2,4-D y kinetina, respectivamente. Se evaluó el efecto del agente gelificante, adicionando agar a concentraciones de 0.8% (medio sólido) y 0.2% (medio semilíquido) en los medios MS empleados; los callos cultivados en medio semilíquido se mantuvieron con agitación permanente a 700 rpm. Los callos fueron subcultivados cada 20 días hasta la obtención de ESs para su posterior masificación, en condiciones de oscuridad.

Proliferación de los embriones somáticos. Una vez obtenidos los ESs, fueron transferidos al medio sólido MS suplementado con una mezcla compleja de vitaminas, aminoácidos, carbohidratos, entre otros, tomando como base los propuestos por Kao y Michayluk [7], con algunas modificaciones: mio-inositol (100 mg/L), sacarosa (2%), caseína hidrolizada (100 mg/L), niacina (1.0 mg/L), piridoxina (1.0 mg/L), tiamina (1.0 mg/L), glicina (0.8 mg/L), biotina (0.01 mg/L), ácido fólico (0.4 mg/L), cloruro de colina (1.0 mg/L), riboflavina (0.2 mg/L), ácido ascórbico (2.0 mg/L), glutamina (20.0 mg/L), alanina (4.0 mg/L), asparagina (8.0 mg/L), ácido *p*-aminobenzoico (0.02 mg/L), PVP (100 mg/L) y cisteína (50 mg/L).

También se evaluaron dos agentes gelificantes: agar (0.8%) y phytagel (0.3%); se determinó el efecto de las fito-hormonas en el desarrollo de los ESs empleando medios libres de fito-reguladores y otros con 2,4-D (0.3 y 0.5 mg/L), 6-BAP (0.5 y 1.0 mg/L) y GA₃ (0.5 y 0.75 mg/L) en diferentes combinaciones. Los ESs fueron subcultivados cada 20 días hasta su masificación con un fotoperíodo de 12 h de luminosidad.

Maduración de los embriones somáticos. Los ESs fueron transferidos al medio MS empleado en la etapa anterior, se utilizó phytagel (0.3%) como agente gelificante y se evaluó el efecto de la desecación de los ESs formados en la etapa de proliferación previo a su transferencia al medio de maduración [8]. Para lograr dicha desecación, los ESs fueron cultivados durante una semana sobre la superficie de un disco de papel filtro estéril ubicado sobre el medio de cultivo MS suplementado con diferentes concentraciones de GA₃ (0.5, 0.75, 1.0, 1.5 y 2.0 mg/L); después de este periodo, el papel de filtro se retiró y los embriones fueron sembrados directamente sobre el medio de cultivo. Los ESs fueron subcultivados cada 20 días con un fotoperíodo de 12 h de luminosidad.

Germinación y conversión en plántula. Los ESs fueron transferidos al medio MS utilizado en la etapa de

maduración. Se emplearon los siguientes fitoreguladores: 2,4-D (0.02 mg/L), ANA (0.1, 0.2 y 0.5 mg/L), GA₃ (0.1, 0.3, 0.75, 1.0, 1.5 y 2.0 mg/L), 6-BAP (0.2 y 0.5 mg/L) y kinetina (0.1, 0.2 y 0.5 mg/L) en diferentes composiciones. Los ESs fueron subcultivados periódicamente cada 30 días y bajo un fotoperiodo de 12 h de luminosidad

Análisis estadístico. Todos los experimentos fueron evaluados a través del análisis de varianza y de la técnica multivariada de análisis de conglomerados [9], utilizando los software estadísticos SPSS 10.0 e InfoStat 2007 d.3.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Inducción de callos. La contaminación microbiana durante la etapa de inducción de callos a partir de los explantes utilizados del bulbo de CP, fué del 6.2% de un total de 3608 explantes empleados. Los explantes provenientes de los cormos internos de la parte basal del bulbo (IB) (figura 1) respondieron mejor a todos los tratamientos ensayados en la formación de callos friables (figura 2a) con el 34% de los explantes a los 34 días de iniciada la inducción de callos; se ha demostrado que estas zonas del bulbo son las más totipotentes y por consiguiente promueven la inducción de callos y embriones somáticos (ESs) abundantemente cuando se cultivan en el medio de cultivo adecuado [10]. Estos resultados fueron similares a los obtenidos por Anbari et al., [11], quienes alcanzaron una respuesta óptima durante la inducción de la embriogénesis somática (ES) de *Narcissus papyraceus* cv. Shirazi, al utilizar como explante los cormos internos basales del bulbo.

Mediante un análisis de conglomerados y teniendo en cuenta el porcentaje de explantes que presentaron crecimiento abundante de callos en cada tratamiento evaluado, se determinó que el mayor porcentaje de formación de callos friables (figura 2a) de CP, se logró con el medio basal MS suplementado con 1.0 mg/L de 2,4-D en combinación con kinetina (1.0 y 1.5 mg/L), utilizando PVP (100 mg/L) y cisteína (50 mg/L) como

agentes antioxidantes, donde se presentaron porcentajes de crecimiento superiores al 80%. A los 41 días de cultivo se obtuvo proliferación rápida de callos friables y la formación de ESs globulares y alargados de color crema, particularmente en los medios MS que contenían 1 mg/L de 2,4-D con cualquier concentración de kinetina (0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 mg/L).

En cuanto al efecto de los antioxidantes evaluados, los resultados coinciden con lo reportado por Malabadi and Van Staden [12], quienes lograron reducir la oxidación de los compuestos fenólicos y la necrosis de los explantes provenientes de brotes apicales de *Pinus patula* (Pinaceae), al incluir PVP y cisteína al medio de cultivo, favoreciendo la supervivencia y la iniciación de cultivos embriogénicos.

Los resultados obtenidos al utilizar 2,4-D asociado con kinetina durante la inducción de callos, concuerdan con lo reportado por Chaudhuri and Sen [13], quienes indujeron callos a partir de explantes de bulbos de *Scilla siberica* (Hyacinthaceae, monocotiledónea) en el medio MS suplementado con 1 mg/L de 2,4-D y 0.5 mg/L de kinetina. Sumaryono et al., [14], reportaron resultados similares en cuanto al efecto del 2,4-D en la formación de callos en la palma aceitera (*Elaeis guineensis* Jacq.), puesto que se logró la inducción y proliferación de callos en el medio MS con 1.0 mg/L de 2,4-D y 0.1 mg/L de kinetina. Mientras que la mayor proliferación de callos en *Anthurium andraeanum* (monocotiledónea) se presentó en el medio MS suplementado con 1.8 mg/L de 2,4-D y 0.5 mg/L de kinetina [15].

Inducción de embriones somáticos. La inducción de los ESs (figura 2b y 2c) más alta se obtuvo en los medios MS suplementados con 0.3 mg/L de 2,4-D y 0.5 mg/L de 6-BAP (medio semi-líquido) y con 0.4 mg/L de 2,4-D y 0.375 mg/L de kinetina (medio sólido), siendo éste último tratamiento el más efectivo, debido a que el porcentaje de ESs formados fue mucho mayor, como se observa en la tabla 1.

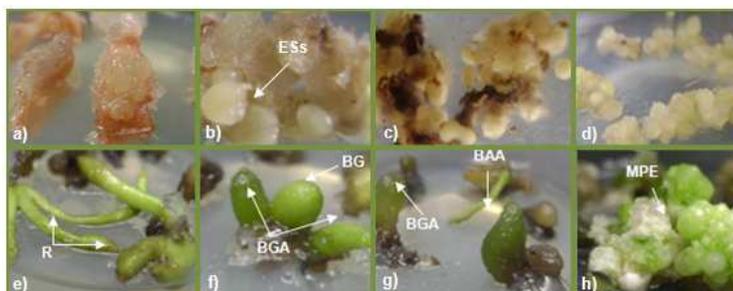


Figura 2. Tipo de callos y estructuras embriogénicas obtenidas en los diferentes medios evaluados durante la embriogénesis somática de *C. x powellii* "album". a) Callos friables obtenidos en los medios MS suplementados con 2,4-D en combinación con kinetina. b) Inducción de embriones somáticos (ESs) en medio MS sólido en presencia de 2,4-D y kinetina. c) Inducción de ESs en el medio semi-líquido en presencia de 2,4-D y 6-BAP. d) Proliferación de ESs en el medio libre de hormonas de crecimiento. e - h) Estructuras formadas a partir de ESs cultivados en medio MS suplementado con GA₃ durante la etapa de maduración: raíces (R), brote globular alargado (BGA), brote alargado con ápice (BAA), brote globular (BG) y masas pro-embriogénicas (MPE).

Fecha Recepción: 9 de Septiembre de 2010

Fecha aceptación: 15 de Noviembre de 2010

En la inducción de ESs de CP lograda con 1 mg/L de 2,4-D en combinación con kinetina (0.5, 1, 1.5 y 2 mg/L) se obtuvieron resultados similares a los reportado por Kuehnle et al., [16], quienes indujeron la ES de híbridos de *Anthurium andraeanum* en medios MS suplementados con 1 a 4 mg/L de 2,4-D y 0.33 mg/L de kinetina. Por otra parte, Sumaryono et al., [14], obtuvieron ESs en la palma aceitera (*E. guineensis* Jacq.) empleando 0.01mg/L de 2,4-D y 0.01 mg/L de kinetina. A concentraciones bajas de 2,4-D (0.117 mg/L) se indujo ESs en explantes de hojas de *Drimiopsis kirkii* Baker (Liliaceae) y al combinarlo con kinetina (0.5 mg/L) aumentó su inducción; en ausencia de 2,4-D no hubo formación de embriones y las concentraciones altas de éste (1.18 mg/L) redujeron la embriogénesis y aumentaron la formación de callos [17].

En cuanto a la combinación de 2,4-D y 6-BAP en la formación de callos embriogénicos, se reportaron resultados similares en la inducción de la ES de *Narcissus papyraceus* cv. Shirazi (Amaryllidaceae) [11]; también se obtuvieron ESs a partir de bulbos de *Narcissus pseudonarcissus* cvs. Golden Harvest and St. Keverne al emplear el medio MS suplementado con 1.305 mg/L de 2,4-D y 0.113 mg/L de 6-BAP [18].

Proliferación de embriones somáticos. De todos los medios evaluados durante esta etapa (diez en total), los mejores resultados se obtuvieron al transferir los ESs al medio MS libre de hormonas, puesto que éstos proliferaron rápidamente, al desarrollar una embriogénesis repetitiva [19] que generó embriones de color crema libres de oxidación y en fase globular que podían ser separados y diferenciados fácilmente, tal como se muestra en la figura 2d.

Con respecto a los dos agentes gelificantes evaluados, agar (0.8%) y phytigel (0.3%), no se observaron diferencias estadísticamente representativas en el porcentaje de proliferación de los ESs y además fueron homogéneos en las estructuras embriogénicas formadas durante esta etapa. Sin embargo, durante la proliferación se utilizó exclusivamente phytigel (0.3%), como soporte sólido de los medios de cultivo [20].

Para lograr la proliferación de ESs de varias especies vegetales, se han utilizado diferentes concentraciones y combinaciones de reguladores de crecimiento, cuyo efecto difiere de una especie a otra. Por ejemplo, Anbari et al., [11], obtuvieron mayor número de ESs globulares en *Narcissus papyraceus* cv. Shirazi al utilizar el medio MS suplementado con 2,4-D (1.6 mg/L), 6-BAP (1.6 mg/L) y 0.5 mg/L de GA₃; mientras que en la regeneración *in vitro* de lichi o ciruela China (*Litchi chinensis* Sonn, monocotiledonea) [21] y de diferentes especies del género *Tricyrtis* [22], la proliferación de callos embriogénicos se obtuvo en el medio MS libre de hormonas.

Maduración de los embriones somáticos. Al transferir los ESs que proliferaron en el medio MS libre de hormonas de crecimiento a los medios de maduración, éstos aumentaron de tamaño y desarrollaron raíces (figura 2e), brotes de color crema y verde de diferentes formas (globular u oblonga) (figura 2f y 2g) y masas pro-embriogénicas con pigmentación verde (figura 2h).

Los embriones que fueron sometidos a desecación durante cinco días antes de transferirlos al medio MS suplementado con GA₃ presentaron mayor pigmentación verde y produjeron gran número de brotes en forma globular y alargada (figura 2f). En el desarrollo de la ES de varias especies como: mandioca (*Manihot esculenta*, *Manihot utilisima*) [8] y ajo (*Allium sativum* L.) cv. Lumbu Hijau [23], se empleó un proceso de desecación similar al realizado en este trabajo antes de la etapa de maduración de los ESs con el fin de evitar su germinación precoz.

En los medios MS suplementados con 1.0, 1.5 y 2.0 mg/L de GA₃ se presentó el mayor desarrollo de los ESs sin diferencias estadísticamente significativas, los cuales alcanzaron estructuras más definidas, mientras que en los medios MS suplementados con 0.5 y 0.75 mg/L de GA₃ se observaron masas pro-embriogénicas de color verde que solo aumentaron de tamaño.

CONCENTRACIÓN AUXINA (mg/L)/CITOQUININA (mg/L)	NÚMERO DE EMBRIONES SOMÁTICOS	CONCENTRACIÓN AUXINA (mg/L)/CITOQUININA (mg/L)	NÚMERO DE EMBRIONES SOMÁTICOS
2,4-D (0.4) + kinetina (0.125)	397	2,4-D (0.3) + 6-BAP (1.5)	40
2,4-D (0.4) + kinetina (0.250)	731	2,4-D (0.75) + 6-BAP (0.25)	31
2,4-D (0.4) + kinetina (0.375)	888	2,4-D (0.75) + 6-BAP (1.0)	17
2,4-D (0.4) + kinetina (0.500)	330	2,4-D (0.6) + 6-BAP (1.0)	11
2,4-D (0.3) + 6-BAP (0.5)	129	2,4-D (0.9) + 6-BAP (1.0)	11
2,4-D (0.6) + 6-BAP (0.5)	111	2,4-D (0.3) + 6-BAP (0.25)	9
2,4-D (0.3) + 6-BAP (1.0)	46	2,4-D (0.75) + 6-BAP (0.5)	7

Tabla 1. Número de embriones somáticos (ESs) desarrollados en los diferentes medios de crecimiento evaluados con 2,4-D en combinación con las diferentes concentraciones de 6-BAP y kinetina.

Germinación y conversión en plántula. Al transferir los ESs a los medios de germinación, no se observaron diferencias con lo obtenido en la etapa de maduración, en el desarrollo de los ESs cultivados. Las masas pro-embriogénicas aumentaron de tamaño; algunos embriones llegaron hasta la fase escutelar, después de la cual su desarrollo se detuvo y un porcentaje alto formaron raíces.

Hasta el final del proceso inductivo no se logró el desarrollo de plántulas en ninguno de los tratamientos evaluados, aunque se produjo rizogénesis (organogénesis) en la mayoría de los ESs cultivados; la razón de esto se debe posiblemente a los niveles liberados de auxina endógena por los tejidos durante el desarrollo del material vegetal cultivado, los cuales al combinarse con las auxinas exógenas presentes en el medio de cultivo, pudieron inducir la formación de raíces en vez de permitir el desarrollo de los embriones hacia la fase escutelar [24].

En el caso de CP, es factible que los tejidos utilizados como explantes no presentaran competencia embriogénica y estuvieran predeterminados principalmente para la formación de raíces, impidiendo reemplazar el patrón de expresión de sus genes por un programa nuevo de expresión de los de la ES y por ende al desarrollo de plántulas por esta vía [25]. Si los tejidos y las células que se someten a la inducción de la ES no son competentes embriogénicamente, no darán paso a ESs ni al desarrollo de plántulas, así se les suministren los estímulos adecuados a través de los reguladores de crecimiento, la composición del medio de cultivo y las condiciones externas [24].

Por otro lado, pudo ocurrir una alteración en el potencial morfogenético del material vegetal mostrando pérdida gradual de la capacidad regenerante a lo largo del cultivo, causado por los reguladores de crecimiento exógenos que afectan el crecimiento de las células en el momento de la división y su capacidad para sintetizar sustancias o metabolitos esenciales para el desarrollo óptimo de los embriones somáticos [25].

Otro factor que pudo haber afectado la germinación de los ESs fue la producción de etileno en el material cultivado *in vitro* de CP; estudios en condiciones de laboratorio indican que el etileno puede inhibir el desarrollo de la embriogénesis somática, dependiendo de la especie evaluada [26].

El efecto del etileno sobre el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales puede variar a medida que éstos avanzan por sus diferentes estadios de desarrollo. Por ejemplo, durante la embriogénesis somática (ES) de *Leucojum aestivum* (Amaryllidaceae), la inclusión del ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) (1.01 mg/L) al medio de cultivo estimuló la síntesis de etileno y disminuyó el crecimiento de callos; mientras que al utilizar

AgNO₃ (1.7 mg/L) y KMnO₄ (4.5 g) para reducir los niveles producidos del etileno, la inducción de callos aumentó significativamente. Posteriormente, el ACC (1.01 mg/L) estimuló la inducción de los ESs y su desarrollo hasta la fase globular, los cuales germinaron al remover el etileno mediante el uso del KMnO₄ [27].

4. CONCLUSIONES

Se logró establecer las condiciones experimentales para la inducción de callos y embriones somáticos (ESs) de *C. x powellii* "album". De igual manera, se establecieron los parámetros para la proliferación y maduración de los ESs; sin embargo, el protocolo para la germinación y conversión en plántulas de los ESs, no fue exitoso.

5. AGRADECIMIENTOS

5. BIBLIOGRAFÍA

- [1] N. T. N. Tram, Tz. V Titorenkova, V. St. Bankova, N. V. Hanjieva, and S. S. Popov, "Crinum L. (Amaryllidaceae)," *Fitoterapia*, vol. 73, pp. 183-208, 2002.
- [2] F. Cabezas, J. Argoti, S. Martinez, C. Codina, J. Bastida, and F. Viladomat, "Alcaloides y actividad biológica en *Eucharis amazonica*, *E. grandiflora*, *Caliphurria subdentata* y *Crinum kunthianum*, especies Colombianas de Amaryllidaceae," *Science et Technica*, vol. 33, pp. 237-241, 2007.
- [3] J. Liu, Y. Li, L. J. Tang, G. P. Zhang, and W. X. Hu, "Treatment of lycorine on SCID mice model with human APL cells," *Biomedicine & Pharmacotherapy*, vol. 61, pp. 229-234, 2007.
- [4] R. Verpoorte, A. Contin, and J. Memelink, "Biotechnology for the production of plant secondary metabolites," *Phytochemistry*, vol. 1, pp. 13-25, 2002.
- [5] S. von Arnold, "Somatic Embryogenesis," en *plant propagation by tissue culture*, 3ra ed., Vol. 1, F. E. George, Ed. Dordresht. Netherlands Springer, 2008, pp. 335-354.
- [6] T. Murashige, and F. Skoog, "A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures," *Plant Physiology*, vol. 15, pp. 473-497, 1962.
- [7] K. N. Kao, and M. R. Michayluk, "Nutritional requirements for growth of *Vicia hojastana* cells and protoplast plate at a very low population density in liquid medium," *Planta*, vol. 126, pp. 2519-2530, 1975.

- [8] K. E. Danso, and B. V. Ford-Llyod, "The effect of abscisic acid and sucrose on post-thaw embryogenic competence and subsequent plant recovery from embryogenic calli of cassava," *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences*, vol. 3, pp. 663-671, 2008.
- [9] J. E. Freud, I. Miller, and M. Miller, *Estadística matemática con aplicaciones*, 6a ed. México: Pearson Educación, 2000, pp. 496-527.
- [10] D. O. Sage, J. Lynn and N. Hammatt, "Somatic embryogenesis in *Narcissus pseudonarcissus* cvs. Golden Harvest and St. Keverne," *Plant Science*, vol. 150, pp. 209 – 216, 2000.
- [11] S. Anbari, M. Tohidfar, R. Hosseini, and R. Haddad, "Somatic Embryogenesis Induction in *Narcissus papyraceus* cv. Shirazi," *Biotechnology*, vol. 6, pp. 527-533, 2007.
- [12] R. Malabadi, and J. Van Staden, "Role of antioxidants and amino acids on somatic embryogenesis of *Pinus patula*," *In Vitro Cellular Developmental Biology Plant*, vol. 4, pp. 18-186, 2005.
- [13] D. Chaudhuri, and S. Sen, "In vitro response of *Scilla siberica*," *Scientia Horticulturae*, vol. 95, pp. 51-62, 2002.
- [14] Sumaryono, I. Riyadi, P. D. Kasi, and G. Ginting, "Growth and differentiation of embryogenic callus and somatic embryos of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) in temporary immersion system," *Indonesian Journal of Agriculture*, vol. 1, pp. 109-114, 2008.
- [15] B. N. Del Rivero, P. D. Agramonte, R. R. Barbón, C. W. Camacho, L. R. Collado, T. F. Jiménez, P. M. Pérez, and M. O. Gutierrez, "Embriogénesis somática en (*Anthurium andraeanum* Lind.) variedad 'lambada'," *Ra Ximhai*, vol. 1, pp. 135-149, 2008.
- [16] A. Kuehnle, F-C. Chen and N. Sugii, "Somatic embryogenesis and plant in *Anthurium andraeanum* hybrids," *Plant Cell Reports*, vol. 11, pp. 438-442, 1992.
- [17] T. H. Lan, P. I. Hong, C. C. Huang, W. C. Chang, and C. S. Lin, "High-frequency direct somatic embryogenesis from leaf tissues of *Drimiopsis kirkii* Baker (giant squill)," *In Vitro Cellular Developmental Biology Plant*, vol. 45, pp. 44-47, 2009.
- [18] D. O. Sage, J. Lynn, and N. Hammatt, "Somatic embryogenesis in *Narcissus pseudonarcissus* cvs. Golden Harvest and St. Keverne," *Plant Science*, vol. 150, pp. 209-216, 2000.
- [19] W. Parrott, "La embriogénesis somática en las angiospermas," *VI Simposio Internacional de Biotecnología Vegetal. Instituto de Biotecnología de las Plantas*. Villa Clara, Cuba, pp. 7-15, 2002.
- [20] E. H. Lee, C. A. Laguna, G. J. Murguía, M. P. Elorza, A. L. Iglesias, R. B. García, P. F. Barredo, and Santana B. N, "In vitro regeneration of *Laelia anceps* ssp. *Dawsonii*," *Revista Científica UDO Agrícola*, vol. 7, pp. 58-67, 2007.
- [21] D. Puchooa, "In vitro regeneration of lychee (*Litchi chinensis* Sonn.)," *African Journal of Biotechnology*, vol. 3, pp. 576-584, 2004.
- [22] M. Nakano, K. Mizunashi, S. Tanaka, T. Godo, M. Nakata, and H. Saito, "Somatic embryogenesis and plant regeneration from callus cultures of several species in the genus *Tricyrtis*," *In Vitro Cellular Developmental Biology Plant*, vol. 40, pp. 274-278, 2004.
- [23] S. T. Mariani, H. Miyake, R. R. Esyanti, and I. Nurwendah, "Effect of 2,4-D on indirect somatic embryogenesis and surface structural changes in Garlic (*Allium sativum* L.) cv. Lumbu Hijau," *Journal Matematika dan Sains*, vol. 8, pp. 133-139, 2003.
- [24] V. Jiménez, "Regulation of in vitro somatic embryogenesis with emphasis on the role of endogenous hormonas," *Revista Brasileira de Fisiología Vegetal*, vol. 13, pp. 196-223, 2001.
- [25] S. von Arnold, I. Sabala, P. Bozhkov, J. Dyachok, and L. Filonova, "Developmental pathways of somatic embryogenesis," *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, vol. 69, pp. 233-249, 2002.
- [26] V. Kumar, G. Parvatam, and G. A. Ravishankar, "AgNO₃ - a potential regulator of ethylene activity and plant growth modulator," *Electronic Journal of Biotechnology*, vol. 12, pp. 1-15, 2009.
- [27] A. Ptak, A. El Tahchy, G. Wyzgolik, M. Henry, and D. Laurain-Mattar, "Effects of ethylene on somatic embryogenesis and galanthamine content in *Leucojum aestivum* L. cultures," *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, vol 72, pp. 142-147, 2010.