

Ra Ximhai

Revista de Sociedad, Cultura y Desarrollo
Sustentable

Ra Ximhai
Universidad Autónoma Indígena de México
ISSN: 1665-0441
México

2008

EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN (*Anthurium andraeanum* Lind.) VARIEDAD 'LAMBADA'

Nydia del Rivero Bautista, Daniel Agramonte Peñalver, Raúl Barbón Rodríguez, Wilder Camacho Chiu, Raúl Collado López, Felipe Jiménez Terry, Marta Pérez Peralta y Odalys Gutiérrez Martínez

Ra Ximhai, enero-abril, año/Vol.4, Número 1
Universidad Autónoma Indígena de México
Mochicahui, El Fuerte, Sinaloa. pp. 135-149



EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN (*Anthurium andraeanum* Lind.) VARIEDAD ‘LAMBADA’

SOMATIC EMBRYOGENESIS IN (*Anthurium andraeanum* Lind.) VARIETY ‘LAMBADA’

Nydia del Rivero-Bautista¹, Daniel Agramonte-Peñalver², Raúl Barbón-Rodríguez², Wilder Camacho-Chiu³, Raúl Collado-López², Felipe Jiménez-Terry², Marta Pérez-Peralta² y Odalys Gutiérrez-Martínez²

¹Colegio de Postgraduados Campus-Tabasco. Periférico Carlos A. Molina s/n. H. Cárdenas, Tabasco. CP 86500. Fax: (973) 3722297
*Autor para correspondencia E-mail: delriverobautista@yahoo.com.mx; ²Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas. Carretera a Camajuani km 5.5, Santa Clara, Villa Clara, Cuba. CP 54830. Fax: 53(42)281329. E-mail: agramonte@ibp.co.cu ³Dirección General Tecnológica Agropecuaria. Carretera Cumuapa, Cunduacán, Tabasco, México. E-mail: wildercamachochiu@hotmail.com

RESUMEN

Varias concentraciones y tipos de reguladores de crecimiento fueron probados para inducir la embriogénesis somática indirecta en *Anthurium andraeanum* Lind. (Monocotiledónea). Para la formación de callos, se utilizaron como explantes segmentos foliares de plantas micropropagadas sobre un medio de cultivo MS modificado suplementado con 6,79 μM de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y 2,32 μM kin (kinetina). La diferenciación de los embriones somáticos se logró en el medio de cultivo MS modificado que contenía 4,44 μM de 6-bencilaminopurina (6-BAP), en condiciones de oscuridad. La germinación de los embriones somáticos se obtuvo en el mismo medio de cultivo probado, suplementado con 1,78 μM de 6-BAP cuando se colocaron en una cámara de crecimiento con luz solar.

Palabras clave: Embriones somáticos, medios de cultivo, reguladores de crecimiento.

SUMMARY

Several concentrations and types of growth regulators were tested to induce the indirect somatic embryogenesis in *Anthurium andraeanum* Lind (Monocot). For the callus formation, they were used as explants foliar segments of micropropagated plants on a culture medium MS modified supplemented with 6,79 μM of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and 2,32 μM kin (kinetin). The differentiation of the somatic embryos was achieved in the culture medium MS modified containing 4,44 μM of 6-benzylaminopurine (6-BAP) under conditions of darkness. The germination of the somatic embryos was obtained in the same culture medium tested supplemented with 1,78 μM 6-BAP when placed in the sunlight growth room.

Key words: Culture medium, growth regulators, somatic embryos.

INTRODUCCIÓN

El *Anthurium* es el género más grande de las *Araceae* con 1000 especies (Croat, 1990). Especies e híbridos dentro de este género son altamente apreciados como ornamentales por sus hermosas flores y exótico follaje (Kuenhle *et al.*, 1992). El *Anthurium* ha sido propagado tradicionalmente por vástagos y mediante el cultivo *in Vitro* de yemas axilares y callos, seguido por la formación de yemas adventicias; sin embargo este método resulta en la formación de plantas fuera de tipo (Geier, 1990; Martin *et al.*, 2003; Puchooa, 2005). Métodos eficientes para la regeneración de plantas de células cultivadas de muchas especies importantes de cultivo fueron desarrollados durante la etapa de los años 1980 del siglo XX. Esto fue posible por la inducción de cultivos embriogénicos los cuales formaron embriones somáticos que germinaron para dar lugar a plantas normales. Esta tecnología, combinada con la habilidad de células vegetales genéticamente transformadas forman hoy las bases de la biotecnología vegetal a nivel comercial (Vasil, 2003).

La embriogénesis somática es una herramienta útil para la propagación masiva y programas de transformación genética para el *Anthurium* (Geier, 1982; Kuenhle *et al.*, 1992; Hamidah *et al.*, 1997). La formación de los embriones somáticos es muy sensible a las condiciones de cultivo tales como la composición del medio de cultivo, el ambiente físico de cultivo, el genotipo y la fuente del explante (Fuentes *et al.*, 2000). Zaidi *et al.*, (2000) mencionan que el medio de cultivo más utilizado para la embriogénesis somática en monocotiledóneas es el MS (Murashige y Skoog, 1962) y en menor proporción el medio de cultivo NN (Nitsch y Nitsch, 1969). Sin embargo, en el género *Anthurium* se han empleado los dos medios de cultivo mencionados con respuestas diferentes por Pierik (1976); Geier (1986); Kuehnle *et al.*, (1992); Atta-Alla *et al.*, (1998) y Puchooa (2005).

El objetivo de esta investigación fue lograr la inducción de la embriogénesis somática indirecta en *Anthurium andraeanum* Lind., variedad 'Lambada'.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

La presente investigación se realizó en el laboratorio de Propagación Masiva del Instituto de Biotecnología de las Plantas perteneciente a la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, ubicado en Santa Clara, Cuba.

Para iniciar los trabajos de embriogénesis somática se emplearon plántulas propagadas a través de organogénesis indirecta según la metodología propuesta por Pierik (1976). Como explantes iniciales se utilizaron hojas de plantas obtenidas *in vitro* de anturio variedad ‘Lambada’, a las cuales se les eliminaron los bordes y se seccionaron con un tamaño aproximado de un centímetro cuadrado y estos se colocaron con la parte adaxial hacia el medio de cultivo.

El pH de los medios de cultivo fue ajustado a 5.8 antes de su esterilización y gelificados con 2.5 g.l⁻¹ de Gelrite (Sigma, MO, EE.UU).

Inducción y formación de callos

Para la inducción y formación de los callos se empleó el medio de cultivo propuesto por Murashige y Skoog (1962) (MS) modificado con una reducción de los nitratos, componentes de los macronutrientes a 50%, micronutrientes completos, vitaminas MS, mio-inositol 100 mg.l⁻¹, tiamina 0.4 mg.l⁻¹, sacarosa 30 g.l⁻¹. Suplementado con cuatro concentraciones de 2,4-D (2.26; 4.52; 6.79 y 9.05 μM) combinadas con 2.32 μM de kinetina (kin).

Se utilizaron diez frascos de cultivo con cinco explantes para cada tratamiento. Las condiciones de cultivo fueron de oscuridad y una temperatura de 27±2°C. Se realizaron observaciones cada ocho días para describir los cambios y características morfológicas de los callos. A los 30 días de cultivo se evaluó el porcentaje de explantes que formaron callo.

Diferenciación de los embriones somáticos

La diferenciación de los embriones somáticos se desarrolló en el medio de cultivo mencionado arriba y suplementado con tres concentraciones de 6-BAP (2.22; 4.44 y 8.88 μM) y un control sin reguladores de crecimiento.

Se emplearon diez frascos de cultivo con cinco callos como explantes para cada tratamiento. Las condiciones de cultivo fueron de oscuridad y una temperatura de $27\pm 2^\circ\text{C}$. A los 60 días de cultivo se observó la presencia de embriogénesis somática de alta frecuencia (ESAF) y embriogénesis somática de baja frecuencia (ESBF). Las variables evaluadas fueron el número de callos con embriones somáticos, el número de embriones somáticos por callo y el número de embriones somáticos que alcanzaron la etapa coleoptilar.

Germinación de los embriones somáticos

La germinación de los embriones somáticos ocurrió en un medio de cultivo MS modificado donde se estudiaron tres concentraciones de 6-BAP (0.89, 1.78 y 2,66 μM), con una temperatura de $25\pm 2^\circ\text{C}$ y una densidad luminosa de flujo de fotones fotosintéticos (FFF) de $100\text{-}125 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Se emplearon seis embriones somáticos en etapa coleoptilar por frasco de cultivo y se utilizaron 24 frascos como repeticiones.

Se efectuaron observaciones diarias para observar el inicio de la germinación y a los 30 días de cultivo se evaluó el número de embriones somáticos con germinación completa, número de embriones somáticos con germinación parcial y número de embriones somáticos con embriogénesis somática secundaria.

Diseño experimental y análisis estadístico

Los experimentos fueron desarrollados con un diseño completamente al azar. A los datos obtenidos se les realizaron la comprobación de los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza. Los datos experimentales fueron analizados con un análisis de varianza simple. La comparación de medias en los tratamientos se efectuó mediante la

prueba de rangos múltiples según Tukey y Dunnett's con una significación de 0.05, mediante el programa estadístico SPSS versión 13.0 para 'Windows'.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Inducción y formación de callos

La formación de callos en los explantes comenzó en las zonas de corte de los segmentos foliares en todos los tratamientos evaluados. Los callos formados cubrieron la totalidad del segmento foliar a los 45 días de cultivo, donde se observó la presencia de un callo compacto, de color amarillo translúcido con características nodulares (Figura 1).



Figura 1. Callos formados a partir de segmentos foliares en *Anthurium andraeanum* Lind. variedad 'Lambada' en el medio de cultivo MS modificado a los 45 días de cultivo.

El mejor tratamiento empleado para la inducción y formación de callos fue donde se utilizó una concentración de 6.79 μM de 2,4-D combinado con 2.32 μM de kinetina, en este se obtuvo el mayor porcentaje de explantes con formación de callos (Cuadro 1).

Cuadro 1. Efecto de la concentración de 2,4-D en la inducción y formación de callos a partir de segmentos foliares de *Anthurium andraeanum* variedad 'Lambada' a los 45 días de cultivo.

	Concentración de regulador de crecimiento (2,4-D) (μM)	Número de explantes con formación de callos	Porcentaje de explantes con formación de callos (%)
	2.26	14.66 cd $\pm 0,59$	29.33
	4.52	20.66 b $\pm 0,56$	41.00
Medio de cultivo MS modificado	6.79	24.33 a $\pm 0,53$	48.67
	9.05	17.36 c $\pm 0,77$	34.73
	$\pm\text{EE}$		

Medias con letras distintas en una misma fila difieren para $p < 0.05$ según prueba de Dunnett's. EE=error estándar.

En cuanto al efecto del 2,4-D en la formación de callos; resultados similares fueron encontrados por Kuehnle *et al.*, (1992) y Matsumoto y Kuehnle (1996) en híbridos de *A. andraeanum*, los cuales alcanzaron la inducción y formación de callos en los explantes con un rango que varió desde 4.52 a 18.1 μM de 2,4-D y 1.39 a 4.56 μM de kinetina en un medio de cultivo MS modificado. Por el contrario, en esta misma especie Kuehnle y Suggii (1991) y Puchooa (2005), indujeron una mayor formación de callos con una combinación de 0.45 μM 2,4-D y 4.44 μM de BA. Otros autores como Hamidah *et al.*, (1997) y Geier (1986) en *A. scherzerianum* lograron la formación de callos (61.4%) con 6.75 μM 2,4-D combinado con 2.3 μM kinetina en un híbrido y con 0.36 μM 2,4-D suplementado con 4.4 μM BA, en un medio de cultivo Nitsch y Nitsch (1969) modificado en 18 genotipos, respectivamente. En otra monocotiledónea, como *Hevea brasiliensis* (Muell.) Arg., la inducción y formación óptima de callo se alcanzó en un medio de cultivo MS modificado suplementado con 9.05 μM de 2,4-D y 2.32 μM de kinetina (Kumari *et al.*, 1999).

Nakano *et al.*, (2004) en especies del género *Tricyrtis* una planta ornamental, obtuvieron la mayor formación de callo con estructuras embriogénicas con 4.5 μM de 2,4-D y 0.045 μM de TDZ. En otras especies como trigo (*Triticum sp.*) y caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.), Zale *et al.*, (2004) y Gandonou *et al.*, (2005) indicaron que la habilidad en la inducción de callos está fuertemente influenciada por el genotipo.

Diferenciación de los embriones somáticos

En los callos empleados como explantes y colocados en el medio de cultivo para la formación y diferenciación de los embriones somáticos, a partir de los 40 días de cultivo se observó la presencia de pequeñas estructuras de coloración amarillo transparente en los callos a los 60 días de cultivo, además en un gran número de callos se observó la presencia de ESAF y ESBF. La embriogénesis somática de alta frecuencia se caracterizó por la presencia de grupos de proembriones y también de embriones somáticos en etapa globular agrupados de color amarillo transparente; sin embargo, en la embriogénesis somática de baja frecuencia se observaron embriones somáticos aislados en diferentes etapas de desarrollo.

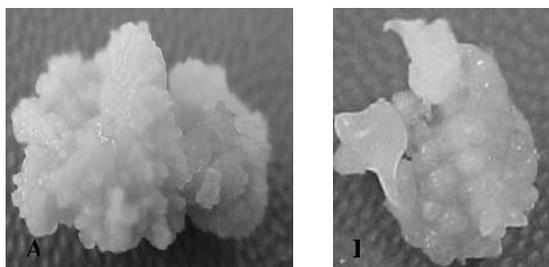


Figura 2. (A)- Callo con embriogénesis de alta frecuencia (ESAF) obtenido a partir de explantes foliares de *Anthurium andraeanum* con 4,44 μ M de 6-BAP a los 40 días de cultivo, (B)- Callo con embriogénesis de baja frecuencia (ESBF).

En cuanto al número de callos con embriones somáticos el mayor porcentaje (68,0%) se presentó en el tratamiento que contenía 4.44 μ M de 6-BAP con diferencias significativas con el resto de los tratamientos. La presencia de los embriones somáticos en los callos cultivados con esta citoquinina demostró el efecto de la misma en la formación de embriones somáticos en anturio variedad ‘Lambada’ (Cuadro 2).

En lo que respecta al número de embriones somáticos por callo los valores más altos se obtuvieron en un medio de cultivo con 8.88 μ M de 6-BAP, con diferencias con respecto al resto de los tratamientos (Cuadro 2). A medida que se aumentó la concentración de 6-BAP se incrementó la formación de embriones somáticos por callo. Sin embargo, el mayor porcentaje (84.2%) de embriones somáticos que alcanzaron la etapa coleoptilar se logró con 4,44 μ M de 6-BAP.

Cuadro 2. Efecto de diferentes concentraciones de 6-BAP en el desarrollo de los embriones somáticos en medio de cultivo MS modificado en anturio (*A. andraeanum* Lind.) a los 80 días de cultivo.

Concentraciones de 6-BAP (μ M)	Número de callos con embriones somáticos	Porcentaje de callos con embriones somáticos (%)	*Número de embriones somáticos por callo	Número de embriones somáticos en etapa coleoptilar	Porcentaje de embriones somáticos en etapa coleoptilar (%)
0	11.0 d	22.0	11.0 b \pm 1,1	7.0 d	63.6
2.22	31.0 b	62.0	12.7 b \pm 2,3	9.0 b	70.9
4.44	34.0 a	68.0	19.0 b \pm 0,2	16.0 a	84.2
8.88	13.0 c	26.0	29.4 a \pm 3,1	19.0 c	64.6
\pm EE	0.51			0.48	

Medias con letras diferentes en una misma columna difieren según la prueba por Tukey para $p < 0.05$.

*Medias con letras diferentes en la misma fila difieren según la prueba por Dunnett's para $p < 0.05$.

EE= Error estándar.

Con respecto a los resultados alcanzados estos difieren con los encontrados por Kuehnle *et al.*, (1992) quienes inducen la formación de embriones somáticos en *A. andraeanum* con 6.79 μM de 2,4-D combinado con 2.32 μM de kinetina y con Hamidah *et al.*, (1997) quienes indujeron la producción de embriones somáticos con 0.46 μM de kinetina en *A. scherzerianum*. Sin embargo, concuerdan con Shibli y Ajlouni (2000) en black iris (*Iris nigricans*) una especie ornamental que con una cantidad similar 4.5 μM de BA lograron el mayor número de embriones somáticos por callo. Otros autores, como Nakano *et al.*, (2004) en *Liliaceae* hallaron la formación de embriones somáticos en un medio de cultivo libre de reguladores de crecimiento. Choi *et al.*, (1998) mencionan que el desarrollo de embriones en tejido somático se logró en ausencia de reguladores de crecimiento así como también con la presencia de otros reguladores de crecimiento. Se ha demostrado que las citoquininas son necesarias para el desarrollo de los embriones somáticos (Fujimura y Komamine, 1980; Tan *et al.*, 2001). En caucho (*Hevea brasiliensis*) Kumari *et al.*, (1999) el máximo número de embriones somáticos se desarrolló en un medio de cultivo suplementado con 3.25 μM de kinetina y 1.07 μM de ANA.

Por otra parte, Vega y Prehn (2005) en *Quillay* y Lee y Lee (2003) en *Dicentra spectabilis* al suplementar el medio de cultivo con 6-BAP hallaron un incremento en la diferenciación de los embriones somáticos, demostrando el efecto de las citoquininas. En el cultivo de rosas en la variedad 'Carefree Beauty' y en *Musa* con la adición de 2.2 μM de 6-BAP al medio de cultivo se alcanzó la mayor frecuencia en la diferenciación de los embriones somáticos (Khalil *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2002). George (1993) señala que las citoquininas promueven el crecimiento de los embriones preformados cuando son adicionados al medio de cultivo de formación de embriones somáticos.

Germinación de los embriones somáticos

Cuando se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de 6-BAP en la germinación de embriones somáticos en *Anthurium andraeanum* Lind., se pudo observar que el mayor porcentaje de embriones somáticos con germinación completa y parcial se obtuvo en el tratamiento con 1,78 μM de 6-BAP con diferencias significativas con el resto de los

tratamientos (Cuadro 3). Los valores de esta variable disminuyeron con el incremento de las concentraciones de 6-BAP y con el control.

Cuadro 3. Efecto de diferentes concentraciones de 6-BAP en la germinación de embriones somáticos en *Anthurium andraeanum* Lind., a los 60 días de cultivo.

Tratamientos 6-BAP (μ M)	Germinación completa de los embriones somáticos		Germinación parcial de los embriones somáticos		
	No. embriones somáticos/frasco		*Rangos medios	No. embriones somáticos/frasco	
	Media	Porcentaje (%)		Media	Porcentaje (%)
0	2.20 bc	36.6	43.81 b	0.37	6.16
0.89	2.67 b	44.5	47.77 b	0.45	7.50
1.78	3.87 a	64.5	66.52 a	0.87	14.50
2.66	1.79 c	29.8	35.89 b	0.20	3.33
\pm EE	0.22				

Medias con letras desiguales en una misma columna difieren según la prueba de Tukey para $p < 0.05$.

*Rangos medios con letras desiguales en una misma columna difieren según la prueba de Kruskal-Wallis para $p < 0.05$.

EE= Error estándar

Los resultados alcanzados difieren con los obtenidos por Kuehnle *et al.*, (1992) quienes con una concentración de 0.89 μ M de 6-BAP lograron la germinación de embriones somáticos de híbridos de *A. andraeanum*. Algunos autores han señalado que la adición de 6-BAP al medio de cultivo incrementa la germinación de los embriones somáticos (Kuehnle *et al.*, 1992; Laxmi *et al.*, 1999; Ashok *et al.*, 2002; Barbón *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2002). Sin embargo, Mohammed *et al.*, (2002) y Nakano *et al.*, (2004) en estatices (*Limonium bellidifolium*) y lirios (*Tricyrtis* spp.) encontraron que los embriones somáticos en etapa cotiledonal germinaron después de dos a tres días sobre medio basal MS carente de sacarosa y reguladores de crecimiento.

En todos los tratamientos se observaron embriones somáticos con embriogénesis somática secundaria, pero el mayor porcentaje (53.33%) de esta variable se alcanzó cuando se le adicionó al medio de cultivo 2.66 μ M de 6-BAP con diferencias significativas con el resto de los tratamientos (Cuadro 4).

Tabla 4. Influencia de diferentes concentraciones de 6-BAP en el número de embriones somáticos que desarrollaron embriogénesis somática secundaria en *Anthurium andraeanum* variedad 'Lambada' a los 60 días de cultivo.

Tratamientos 6-BAP (μM)	Embriones somáticos con embriogénesis secundaria		
	No. de ES por frasco		
	Rangos medios	Media	Porcentaje (%)
0	29.45 c	0.79	13.16
0.89	44.77 bc	1.41	23.50
1.78	47.56 b	1.79	29.83
2.66	72.20 a	3.20	53.33

Rangos medios con letras distintas en una misma columna difieren según prueba de Kruskal-Wallis para $p < 0.05$.

Ravishankar y McComb (2006) encontraron en sándalo (*Santalum album* L.) que la producción de embriones somáticos secundarios a partir de los embriones primarios ocurrió cuando los embriones somáticos se mantuvieron por períodos largos de tiempo sobre medios de cultivo de inducción con 6-BAP o TDZ. La formación de embriogénesis secundaria es una de las causas de la asincronía durante la embriogénesis somática, los embriones somáticos pueden formarse a partir del eje principal del embrión (Gavich *et al.*, 1992) y esto es debido a que existe una inducción de la división de las células embriogénicas que quedan latentes en las paredes del embrión (Nomura y Komamine, 1995).

De los resultados presentados en este estudio permiten concluir que la combinación de 6.79 μM de 2,4-D y 2.32 μM de kinetina en un medio de cultivo MS modificado fue donde se alcanzaron el mayor número de explantes con formación de callos. La diferenciación de los embriones somáticos se logró en el mismo medio de cultivo suplementado con 4.44 μM de 6-BAP. Por último la germinación de los embriones somáticos se obtuvo con una concentración de 1.78 μM de 6-BAP.

AGRADECIMIENTOS

Nuestro agradecimiento a la Asociación Nacional de Universidades e Instituciones de Educación Superior (ANUIES) y al Colegio de Postgraduados Campus Tabasco por la beca y el apoyo otorgado para la realización de esta investigación y los estudios de Doctorado.

LITERATURA CITADA

- Ashok, K. H.G., Murthy, H. N. y Paek, K. Y. 2002. **Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Gymnema silvestre***. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 71:85–88.
- Atta-Alla, H., McAlister, B. G. y Van, S. J. 1998. ***In vitro* culture and establishment of *Anthurium parvispathum***. S. Afr. J. Bot 64(5):296-298.
- Barbón, R., Jiménez, E., De Feria, M., Quiala, E., Capote, A. y Chávez, M. 2002. **Influencia del genotipo y la densidad de inoculación sobre la diferenciación de embriones somáticos de *Coffea arabica* L. cv. Caturra rojo y *Coffea canephora* cv. Robusta**. Biotecnología Vegetal 3:145-148.
- Choi, Y. E., Yang, D. C., Park, J. C., Soh, W. Y. y Choi, K. T. 1998. **Regenerative ability of somatic single and multiple embryos from cotyledons of Korean ginseng on hormone-free medium**. Plant Cell Rep. 17:544-551.
- Croat, T. B. 1990. **A comparison of ardid classification systems**. *Aroideana* 13:44-63.
- Fuentes, R.L.S., Calheiros, B. P. M., Manetti-Filho J. y Vieira, G. E. L. 2000. **The effects of silver nitrate and different carbohydrate sources on somatic embryogenesis in *Coffea canephora***. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 60:5-13.
- Fujimura, T. y Komamine, A., 1980. **The serial observation of embryogenesis in a carrot cell suspension culture**. New Phytol. 86:213-218.
- Gandonou, Ch., Errabii, T., Abrini, J., Idaomar, M., Chibi, F., Senhaji, N.S. 2005. **Effect of genotype on callus induction and plant regeneration from leaf explants of sugarcane (*Saccharum sp.*)**. African Journal of Biotechnology 4(11):1250-1255.
- Gavich, H., Vardi, A., Fluhr, R. 1992. **Suppression of somatic embryogenesis in *Citrus* cell cultures by extracellular proteins**. Planta 186:511-517.
- Geier, T. 1982. **Morphogenesis and plant regeneration from spadix fragments of *Anthurium scherzerianum* cultivated *in vitro***. In A. Fujiwara (ed.) Proceeding of the Fifth International Congress Plant Tissue and Cell Culture, 137-138. Japanese Association for Plant Tissue Culture, Japan.
- Geier, T. 1986. **Factors affecting plant regeneration from leaf segments of *Anthurium scherzerianum* Schott (*Araceae*) cultured *in vitro***. Plant Cell Tissue and Organ Culture 6:115-125.

- Geier, T. 1990. ***Anthurium***. En: Ammirato, PV, Evans DA, Sharp WR y Bajaj YPS (eds.). Handbook of plant cell and tissue culture. Vol. 5. McGraw-Hill, New York. P. 228-252.
- George, E. E. 1993. **Plant micropropagation of tissue culture:sugars-nutritional and regulatory effects**. London:Exegetics, 322-336.
- Hamidah, M., Ghani-Abdul, K. A. G. y Debergh, P. 1997. **Somatic embryogenesis and planta regeneration in *Anthurium scherzerianum***. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 48:189-193.
- Khalil, S. M., Cheah, K. T., Perez, E. A., Gaskill, D. A. y Hu, J. S. 2002. **Regeneration of banana (*Musa* spp. AAB cv. Dwarf Brazilian) via secondary somatic embryogenesis**. Plant Cell Rep 20:1128–1134.
- Kuehnle, A. R. y Sugii, N. 1991. **Callos induction and plantlet regeneration in tissue cultures of Hawaiian *Anthuriums***. HortSci 26:919-921.
- Kuehnle, R. A., Chen, F. Ch. y Sugii, N. 1992. **Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Anthurium andraeanum* hybrids**. Plant Cell Reports 11:438-442
- Kumari, J. P., Asokan, P. M., Sobha, S., Sankari, A. L., Rekha, K., Kala, G. R., Jayasree, R. y Thulaseedharan, A. 1999. **Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature anthers of *Hevea brasiliensis* (Muell.)**. Arg. Curr. Sci. 76:1242–1245.
- Laxmi, D. V., Sharma, H. C., Kirti, P. B. y Mohan, M. L. 1999. **Somatic embryogenesis in mango(*Mangifera indica* L.) cv. Amrapali**. Current Science 77(10):1355-1358.
- Lee, K. P., y Lee, D. W. 2003. **Somatic embryogenesis and plant regeneration from seeds of wild *Dicentra spectabilis* (L.) LEM**. Plant Cell Reports 22:105-109.
- Li, X., Krasnyanski, F. S. y Korban, S. S. 2002. **Somatic embryogenesis, secondary somatic embryogenesis, and shoot organogenesis in *Rosa*. J.** Plant Physiol. 159:313–319.
- Martin, K. P., Dominic, J., Madassery, J. y Phillip, V. J. 2003. **Direct shoot regeneration from lamina explants of two commercial cut flower cultivars of *Anthurium andraeanum* Hort.** In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant 39:500-504.
- Matsumoto, T. K. y Kuenhle, A. R. 1996. ***Anthurium* micropropagation**. En: Bajaj YPS (Ed). Biotechnology in agriculture and forestry: High technology and micropropagation. Springer Verlag, New York. 40:14-29.

- Mohammed, A. M. A., Rathinasabapathi, B. y Kelley, K. 2002. **Somatic embryogenesis in perennial statice *Limonium bellidifolium*, (*Plumbaginaceae*)**. Plant Cell, Tiss. Org. Cult. 68:127–135.
- Murashige, T. y Skoog, F. 1962. **A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture**. Physiol Plantarum 15: 473-497.
- Nakano, M., Mizunashi, K., Tanaka, S., Godo, T. T., Nakata, M. y Saito, H. 2004. **Somatic embryogenesis and plant regeneration from callus culture of several species in the genus *Tricyrtis***. In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant 40:274–278.
- Nitsch, J. y Nitsch, C. 1969. **Haploid plants from pollen grains**. Science 163:85-87.
- Nomura, K. y Komamine, A. 1995. **Physiological and biochemical aspects of somatic embryogenesis**. En: Thorpe, T.A. (ed). *In vitro* embryogenesis in plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht 248-265.
- Pierik, R. L. M. 1976. ***Anthurium andraeanum* plantlets produced from callus tissues cultivated *in vitro***. Physiol. Plant. 37:80-82.
- Puchooa, D. 2005. ***In vitro* mutation breeding of *Anthurium* by gamma radiation**. Int. J. Biol. 7(1):11-20.
- Ravishankar y McComb. 2006. **Factors influencing *in vivo* and *in vitro* micrografting of sandalwood (*Santalum album* L.): an endangered tree species**. In: Journal of Forest Research. núm. 3, año/vol. 11. págs. 147-151.
- Shibli, A. R. y Ajlouni, M. M. 2000. **Somatic embryogenesis in the endemic black iris**. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 61:15-21.
- Tan, N. D., van, Le Bui y Thanh, V. T. 2001. **Manipulation of the morphogenetic pathways of *Lilium longiflorum* transverse thin cell layer explants by auxin and cytokinin**. In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant 37:44-49.
- Vasil, K. I. 2003. **Somatic embryogenesis and its applications to plant biotechnology**. V Reunión de la Sociedad Española de Cultivo *in vitro* de Tejidos Vegetales. 29 Junio-2 Julio Pamplona, España.
- Vega, A. y Prehn, D. 2005. **Inducción e inicio de maduración *in vitro* de tejido embriogénico de *Quillaja saponaria***. Ciencia e Investigación Agraria 32(3):197-207.

Zaidi, N., Habib, N. K., Zafar, F. y Zafar, S. 2000. **Bulbous and cormous monocotyledonous ornamental plants *in vitro***. Quarterly Science Vision 6(1):58-73.

Zale, J. M., Borchardt-Wier, H., Kidwell, K. K. y Steber, C. M. 2004. **Callus induction and plant regeneration from mature embryos of a diverse set of wheat genotypes**. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 76:277-281.

Nydia del Rivero Bautista

Bióloga por el Colegio de Postgraduados Campus-Tabasco.

Daniel Agramonte Peñalver

Doctor en Ciencias en Universidad Central Marta Abreu de las Villas, Instituto de Biotecnología de las Plantas, Santa Clara, Cuba. Maestro en Ciencias en Biotecnología Vegetal, Instituto de Biotecnología Vegetal. Santa Clara, Cuba. Licenciatura en la Universidad Central Marta Abreu de las Villas, Facultad de Ciencias Agropecuarias. Santa Clara Cuba. Profesor Investigador del Instituto de Biotecnología de las Plantas desde 1994. Director del Institución de Biotecnología de las Plantas desde 2002.

Raúl Barbón Rodríguez

Doctor y Profesor Investigador Titular por el Instituto de Biotecnología de las Plantas de la Universidad Central de Marta Abreu de las Villas, Facultad de Ciencias Agropecuarias. Santa Clara Cuba.

Wilder Camacho Chiu

Doctor en Ciencias Agrícolas, Universidad Autónoma de Nuevo León, México. Maestro en Ciencias en Suelos Tropicales. Ingeniero Agrónomo, Colegio Superior de Agricultura Tropical, México. Correo electrónico: wildercamachochiu@hotmail.com

Raúl Collado López

Maestro por Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas.

Felipe Jiménez Ferry

Profesor Investigador por el Instituto de Biotecnología de las Plantas de la Universidad Central de Marta Abreu de las Villas, Facultad de Ciencias Agropecuarias. Santa Clara Cuba.

Marta Pérez Peralta

Biología Vegetal por el Instituto de Biología de las Plantas de la Universidad Central de Marta Abreu de las Villas, Facultad de Ciencias Agropecuarias. Santa Clara Cuba.

Odalys Gutiérrez Martínez

Profesor Investigador por el Instituto de Biología de las Plantas de la Universidad Central de Marta Abreu de las Villas, Facultad de Ciencias Agropecuarias. Santa Clara Cuba.