

Inducción y formación de callos de *Anthurium andraeanum* variedad 'Lambada' a partir de secciones foliares de plantas *in vitro*

Nydia del Rivero^{1*}, Daniel Agramonte¹ Raúl Barbón¹; Wilder Camacho², Raúl Collado¹, Felipe Jiménez-Terry¹, Marta Pérez¹, Odalys Gutiérrez¹. *Autor para correspondencia.

¹ Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuani. km 5.5 Santa Clara, Villa Clara, Cuba. CP 54 830. e-mail: delriverobautista@yahoo.com.mx

² Dirección General Tecnológica Agropecuaria. Carretera Cumuapa, Cunduacán, Tabasco, México.

RESUMEN

Secciones foliares de plantas *in vitro* de *Anthurium andraeanum* variedad 'Lambada' fueron utilizados como explantes para la inducción y formación de callos. Se evaluó la formación de callos en dos medios de cultivo (MS y Nitsch y Nitsch, modificados) a los cuales se adicionaron los reguladores del crecimiento ácido diclorofenoxiacético (2,4-D) en cuatro concentraciones 2.26, 4.52, 6.78 y 9.04 μM y 6-Benzilaminopurina (6-BAP) a una concentración de 2.22 μM la que se mantuvo constante para ambos medios de cultivo. Los tratamientos fueron colocados en oscuridad a $28\pm 2^\circ\text{C}$ durante 45 días. Además, se describieron las características de los callos tales como el color y la forma. Los resultados mostraron en el análisis estadístico una interacción significativa entre los factores en estudio (concentraciones del regulador de crecimiento y tipo de medio de cultivo). Los callos obtenidos fueron de color amarillo crema translúcidos con estructuras nodulares. En los dos medios de cultivo empleados se formaron callos, sin embargo, en el medio de cultivo MS modificado cuando se utilizó una concentración de 6.78 μM de 2,4-D se observó el mayor porcentaje de explantes que dieron lugar a estas estructuras. Se demostró que es posible emplear secciones foliares de plantas *in vitro* para formar callos en *Anthurium andraeanum* variedad 'Lambada' en el medio de cultivo MS con los macronutrientes reducidos a la mitad y 2,4-D.

Palabras clave: cultivo *in vitro*, formación de callos, medios de cultivo, micropropagación, reguladores de crecimiento

ABSTRACT

Foliar sections of *in vitro* plants of *Anthurium andraeanum* variety 'Lambada' were used as explants for the induction and formation of callus. The formation of callus was evaluated in two culture mediums (MS and Nitsch, modified) to which the growth regulators 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) were added in four concentrations 2.26, 4.52, 6.78 and 9.04 μM and the addition of 6-Benzilaminopurine (6-BAP) to a concentration of 2.22 μM keeping it constant for both culture mediums. The treatments were placed in darkness at $28\pm 2^\circ\text{C}$ during 45 days. Characteristics of the callus, such as colour and form, were also described. The results showed, in the statistical analysis, a significant interaction among the factors in study (concentrations of the growth regulator and type of culture medium). The calluses obtained presented translucent cream yellow colour with nodular structures. Callus were formed in the two culture medium used, however, the biggest explants percentage that allowed the formation of these structures was observed in the culture medium MS modified when a concentration of 6.78 μM 2,4-D was used. It was demonstrated that it is possible to use foliar sections of *in vitro* plants to form callus in *Anthurium andraeanum* variety 'Lambada' in the culture medium MS with the nitrates reduced in a half and 2,4-D.

Key words: callus formation, culture medium, *in vitro* culture, micropropagation, growth regulators

INTRODUCCIÓN

El género *Anthurium* comprende cerca de 1 000 especies, algunas de las cuales son importantes como plantas ornamentales, flores de corte y de maceta. Son plantas monocotiledóneas, propagadas tradicionalmente por semilla botánica y métodos vegetativos los cuales incluyen secciones de yemas nodales e hijuelos (Dufour y Guerin, 2003). Estos métodos de propagación producen plantas heterocigóticas, los coeficientes de multiplicación son bajos y el proceso de producción es lento (Geier, 1990). Las técnicas de cultivo *in vitro* se han utilizado como un método alternativo para la producción de material

vegetal a nivel comercial para el *Anthurium andraeanum* (Pierik, 1976). En el cultivo *in vitro* de estas especies ornamentales se han empleado diferentes tipo de explantes y se han encontrado diferencias significativas en la formación de callos entre los diferentes genotipos estudiados de *A. andraeanum* (Kuehnle y Sugii, 1991; Chen *et al.*, 1997) y *A. scherzerianum* (Geier, 1986; Hamidah *et al.*, 1997).

La formación de callos con estructuras embriogénicas se ha llevado a cabo a partir de hojas completas de plantas *in vitro* de híbridos Hawaianos de *Anthurium andraeanum* por Kuehnle *et al.* (1992), los cuales lograron la regeneración de plantas. Sin

embargo, no se han encontrado en la literatura científica investigaciones realizadas sobre la formación de callos con estructuras embriogénicas para la variedad 'Lambada' de esta especie. En otras plantas ornamentales como *Rosa hybrida* (Ibrahim *et al.*, 1998; Ibrahim y Debergh, 2000, 2001) se han utilizado como explantes hojas de plantas *in vitro* para iniciar la formación de callos, porque se evita la contaminación microbiana que se produce al introducir explantes *in vivo*.

Rachmawati *et al.* (2004) refieren, que la formación de callos es la primera fase para iniciar el proceso de embriogénesis somática. Los factores más importantes para lograrlo son el genotipo, la composición del medio de cultivo así como la concentración del regulador de crecimiento (Aloísio, 1997). Además, Lee *et al.* (2002) señalan que el número, color, forma y apariencia del callo con estructuras embriogénicas varía entre los genotipos y esto depende del medio de cultivo utilizado, indicando que la formación de callos está influenciada por las características propias del explante (la edad, el tamaño, la procedencia, el genotipo).

Autores como Martin *et al.* (2003) y Vargas *et al.* (2004) lograron la formación de callos en variedades de *A. andraeanum* cuando utilizaron el medio de cultivo MS modificado. Mientras que Puchoa (2005) observó mayor formación de callos en variedades de *A. andraeanum* cuando empleó como medio de cultivo basal el propuesto por Nitsch y Nitsch (1969).

Teniendo en cuenta estos antecedentes y la necesidad de desarrollar la embriogénesis somática en la variedad 'Lambada', que tiene gran importancia y demanda comercial en Cuba y México de la cual, no existen referencias en la literatura científica que haya sido propagada por esta vía, se realizó este trabajo que tuvo como objetivo lograr la formación de callos con estructuras embriogénicas a partir de secciones foliares de plantas *in vitro* de *A. andraeanum* variedad 'Lambada'.

MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Propagación Masiva de Plantas del Instituto de Biotecnología de las Plantas, perteneciente a la Universidad Central Marta Abreu de Las Villas en Santa Clara, Cuba.

Material vegetal

Como material vegetal para la formación de callos se utilizaron secciones foliares de plantas *in vitro* de *Anthurium andraeanum* variedad 'Lambada'. Estas plantas fueron obtenidas por organogénesis indirecta de acuerdo con el protocolo propuesto por Pierik *et al.* (1974). Las secciones foliares tenían

un tamaño aproximado de 1.0 cm² (Figura 1) y se colocaron con la parte adaxial en contacto con el medio de cultivo.

Medios y condiciones de cultivo

Para la formación de callos se utilizaron dos medios de cultivo, el primero descrito por Murashige y Skoog (1962) con las sales inorgánicas modificadas en los macronutrientes reducidos a la mitad, micronutrientes completos, vitaminas MS y complementado con 2.22 µM de 6-BAP, 100 mg.l⁻¹ de mio-inositol y 30 g.l⁻¹ de sacarosa. El segundo medio de cultivo descrito por Nitsch y Nitsch (1969) con las sales inorgánicas modificadas en los macronutrientes con el nitrato de amonio reducido al 20% (NH₄NO₃ 200 mg.l⁻¹), micronutrientes completos, vitaminas MS y la adición de 2.22 de 6-BAP, 100 mg.l⁻¹ de mio-inositol y 30 g.l⁻¹ de sacarosa.

Efecto de la concentración de 2,4-D en la formación de callos

Se estudió el efecto del ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) en cuatro concentraciones 2.26, 4.52, 6.78 y 9.04 µM para la formación de callos en cada medio de cultivo propuesto. No se utilizó un tratamiento sin reguladores de crecimiento porque en resultados previos no se observó la formación de callos bajo estas condiciones. Se colocaron cinco segmentos foliares por tratamiento. Se emplearon diez frascos de cultivo como repeticiones para cada tratamiento. El experimento fue repetido tres veces.

Se añadieron 30 ml de medio de cultivo gelificado con 2.5 g.l⁻¹ de Gelrite (Sigma, Co.) en frascos de vidrio de 250 ml capacidad. Estos se esterilizaron en autoclave a una temperatura de 121 °C y 1.2 kg.cm⁻² de presión. El pH fue ajustado a 5.8 antes de la esterilización con una solución de NaOH 0.1N y HCl 0.1N.

Los tratamientos fueron colocados en condiciones de oscuridad y temperatura de 28±2°C durante un tiempo de incubación de 45 días.

Al cabo de ese tiempo las variables a evaluar fueron el número de secciones foliares que formaron callos con estructuras embriogénicas que se expresó en porcentaje. Además, se evaluó visualmente el color y forma de los callos. Para determinar el efecto de la combinación del regulador de crecimiento y los medios de cultivo empleados se realizó un análisis de varianza en un diseño completamente al azar con arreglo factorial. Para la comparación de medias se utilizó la prueba de Dunnett's C y al valor expresado en porcentaje se le aplicó una prueba de proporciones con un nivel de significación de 0.05. Se emplearon los paquetes estadísticos SPSS versión 13.0 y Statistix versión 1.0 para Windows.

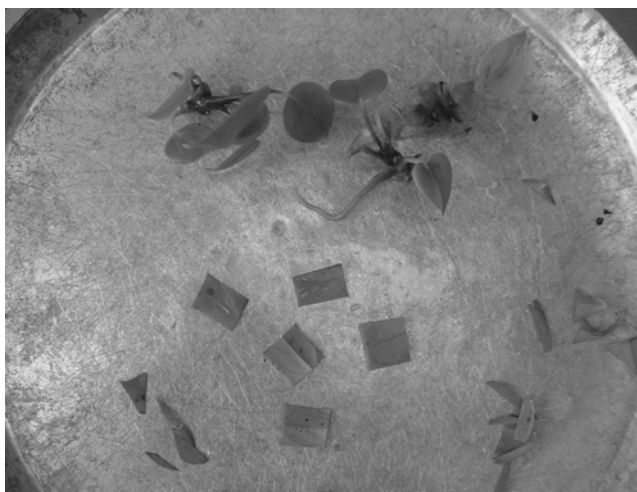


Figura 1. Secciones foliares de plantas *in vitro* de *Anthurium andraeanum* variedad 'Lambada', con un tamaño aproximado de 1.0 cm² empleados para la formación de callos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto de la concentración de 2,4-D en la formación de callos

A partir de la tercera semana de cultivo (21 días) se observó la formación de callos en las secciones foliares colocados en los dos medios de cultivo, principalmente en los bordes donde se les realizaron los cortes (Figura 2A). La totalidad del tejido de la sección foliar se cubrió a los 45 días de cultivo (Figura 2B). Los callos presentaron color amarillo claro, eran translúcidos y tenían estructuras nodulares.

El análisis estadístico mostró que la interacción fue significativa entre los factores en estudio (concentraciones de 2,4-D y medios de cultivo), por lo que la formación de callos con estructuras embriogénicas dependió de la relación entre ambos factores. La mejor respuesta para la formación de callos (48.6%), se logró con una concentración de 6.78 μ M de 2,4-D y el medio de cultivo MS, con diferencias significativas respecto al resto de los tratamientos (Figura 3). Esto pudo estar dado, porque al emplear el 2,4-D se promueve la dediferenciación y rediferenciación celular. Las heridas realizadas a los segmentos foliares producen efectos de estrés, y esto puede apreciarse en una rápida acidificación del medio de cultivo (Fehér *et al.*, 2002) y la presencia de divisiones celulares que permiten la formación de callos (Raghavan, 2004). La activación simultánea del estrés y la auxina causan cambios en el metabolismo celular y como respuesta en la adaptación celular al estrés se generan una reprogramación genética, metabólica y fisiológica el cual resulta en la estimulación de la totipotencia de las células epidérmicas que pasan de un estado somático a uno embriogénico (Samaj *et al.*, 2003).

En cuanto al medio de cultivo empleado, según Neumann (1995), existe una selectividad preferencial de las células por la forma amino del nitrógeno en las sales inorgánicas MS. En estas mismas sales el amonio como forma reducida de nitrógeno es fácilmente utilizado para la síntesis de aminoácidos y permite el crecimiento de un callo friable (disgregable).

En el medio de cultivo propuesto por Nitsch y Nitsch (1969) también se observó la formación de callos en todas las concentraciones de 2,4-D estudiadas, el mayor valor alcanzado fue de 28.0% de formación de callos con la concentración de 6.78 μ M de 2,4-D. Los resultados restantes con las diferentes concentraciones de la auxina fueron significativamente inferiores a los alcanzados en el medio de cultivo MS modificado (Figura 3). Estos resultados difieren de los alcanzados por Geier (1986), cuando empleó el medio de cultivo propuesto por Nitsch modificado observó la formación de callos en un rango que varió desde 0 hasta 100% en los 18 genotipos de *A. scherzerianum* estudiados. Sin embargo, señaló que el genotipo determina fuertemente la habilidad de regeneración.

Por otra parte, Puchoo (2005) en tres variedades de *A. andraeanum* obtuvo el 100% de formación de callos cuando utilizó el medio de cultivo Nitsch modificado (1969) que cuando empleó el medio de cultivo MS modificado.

Según, Khanna y Raina (1998) y Ogawa (1999) la composición del medio de cultivo juega un papel importante en la formación de callos. El nutriente, particularmente la fuente de nitrógeno afecta la formación de los callos en monocotiledóneas (Leifert *et al.*, 1995). Nuutila *et al.* (2002) señalan que la procedencia del explante y el estado de desarrollo tienen un efecto en la formación de callos.

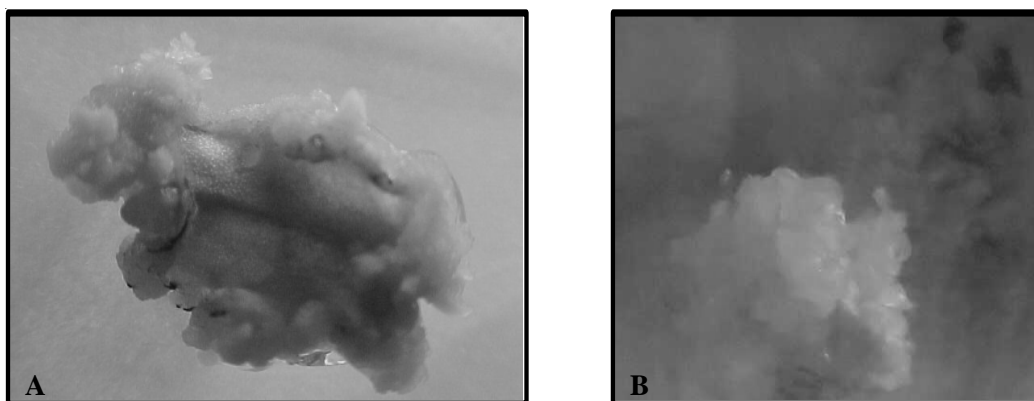
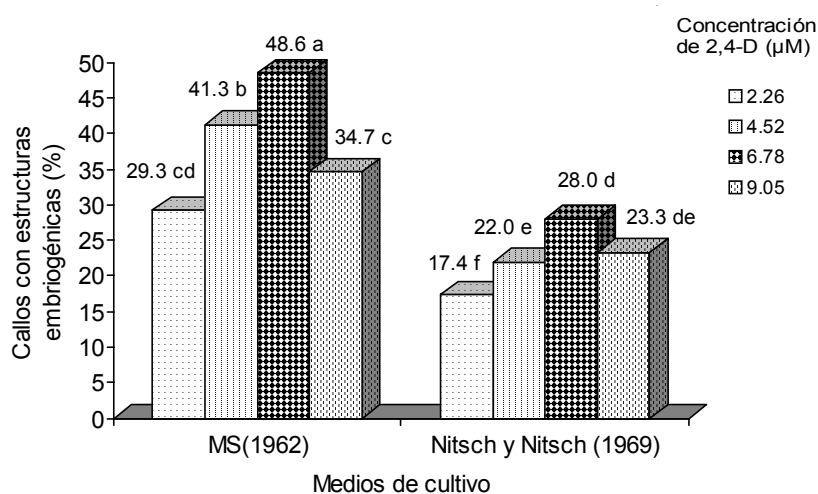


Figura 2. Formación de callos a partir de segmentos foliares de *Anthurium andraeanum* Lin. variedad 'Lambada' en dos medio de cultivo MS suplementado con 6.78 μM de 2,4-D. A) a los 21 días de cultivo y B) a los 45 días de cultivo.



Medias con letras distintas difieren para $p < 0.05$ según prueba de Dunnett's C $EE = \pm 1.24$.

Figura 3. Efecto de la concentración de 2,4-D y dos medios de cultivo en la formación de callos a partir de secciones foliares de *Anthurium andraeanum* variedad 'Lambada' a los 45 días de cultivo.

En diferentes especies del género *Anthurium* se ha logrado la formación de callos cuando se ha utilizado el medio de cultivo MS modificado y diferentes tipos de explantes como hojas y pecíolos de plantas *in vivo* (Kuehne y Suggi, 1991), semillas (Atta-Alla *et al.*, 1998), cotiledones de semillas inmaduras y hojas (Prasad *et al.*, 2001), hojas de plantas *in vivo* (Dominic *et al.*, 2003; Martín *et al.*, 2003) y micro-cortes de plantas *in vitro* (Vargas *et al.*, 2004). Estos últimos autores señalan que cuando se emplean explantes de plantas *in vivo*, se dificulta la aplicación de las técnicas de cultivo y el establecimiento por los altos índices de contaminación microbiana observados en esos cultivos. Además, demostraron que cuando utilizaron explantes provenientes de plantas de semillas germinadas *in vitro* eliminaron los problemas de contaminación previamente encontrados cuando emplearon explantes procedentes de plantas de invernadero.

De igual forma en otras especies de plantas, se ha comprobado que la formación de callos está relacionada con el tipo de explante, el genotipo y los reguladores del crecimiento empleados. Por ejemplo, en Iris negra (*Iris nigricans*) Shibli y Ajlouni (2000) observaron la formación de callos en un 90% cuando emplearon segmentos de hojas de plantas *in vitro*, un medio de cultivo MS completo con la adición de 4.5 μM de 2,4-D, 0.5 μM de kinetina y 4.5 μM de ácido naftalenacético (ANA).

De igual forma, Carsono y Yoshida (2006) mencionan que para la formación de callos en genotipos de arroz (*Oriza sativa* L.) (monocotiledónea) la concentración óptima encontrada fue de 9.05 μM de 2,4-D. Sin embargo, las diferencias encontradas en la respuesta para la formación de callos entre los genotipos estudiados, dependió del medio de cultivo empleado y del tipo de explante utilizado. Otros autores como

Tiel *et al.* (2006), en caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) encontraron que la frecuencia de formación de callos varió en relación con las concentraciones de 2,4-D empleadas. El mayor valor (61.9%) de formación de callos lo obtuvieron cuando utilizaron una concentración de 4.5 μ M de 2,4-D.

Por otra parte Lee *et al.* (2002) en diferentes genotipos de arroz, encontraron que el número, color, tamaño, forma y apariencia de los callos varió entre los genotipos, dependiendo del tipo de medio de cultivo basal empleado e indicaron que la formación de callos estuvo influenciada por el genotipo, medio de cultivo y el tipo de explante así como también por sus interacciones. Rachmawati y Anzai (2006) obtuvieron los mayores valores en la formación de callos cuando emplearon 9.05 μ M de 2,4-D y un medio de cultivo MS modificado. Estos mismos autores señalan que el índice de crecimiento y la calidad de los callos fueron dependientes del medio de cultivo empleado y del genotipo.

Según Ogawa (1999) en la composición del medio de cultivo, el nutriente, particularmente la fuente de nitrógeno, afecta la formación de callos en monocotiledóneas. El medio de cultivo MS modificado comparado con el medio de cultivo Nitsch modificado tiene una mayor concentración de nitratos, tales diferencias pudieron causar las diferencias encontradas en la respuesta de los explantes a la formación de callos (Leifert *et al.*, 1995).

Según Parrot (2002), la concentración de reguladores de crecimiento, el tipo de explante inicial, así como el estado fisiológico y los niveles de diferenciación y polarización del tejido que compone el explante son algunos de los factores que favorecen o dificultan la formación de callos.

En esta investigación se demostró que es posible emplear secciones foliares de plantas *in vitro* para formar callos en *Anthurium andraeanum* variedad 'Lambada' en el medio de cultivo MS modificado y 2,4-D.

Agradecimientos

Agradecemos a la Asociación Nacional de Universidades e Instituciones de Estudios Superiores (ANUIES) y al Colegio de Postgraduados Campus-Tabasco, México por el apoyo financiero brindado para la realización de esta investigación.

REFERENCIAS

Aloísio X (1997) Enraizamiento *in vitro* de gemas de *Eucalyptus* multiplicadas e alargados. *Scientia Forestales* 51:26-29

Atta-Alla, H, McAlister BG y van Staden J (1998) *In vitro* culture and establishment of *Anthurium parvispathum*. *S. Afr. J. Bot.* 64(5):296-298

Carsono, N, Yoshida T (2006) Identification of callus induction potential of 15 Indonesian rice genotypes. *Plant Prod. Sci.* 9(1):65-70

Chen, FC, Kuehnle AR, Sugii N (1997) *Anthurium* roots for micropropagation and *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 49(1):71-74

Dominic, J, Martin KP, Madassery J, Philip VJ (2003) *In vitro* propagation of three commercial cut flower cultivars of *Anthurium andraeanum* Hort. *Indian J. Experimental Biology* 41:160-166

Dufour L, Guérin V (2003) Growth, developmental features and flower production of *Anthurium andraeanum* Lind. in tropical conditions. *Scientia Horticulturae* 98(1) :25-35

Fehér, A, Pasternak T, Ötvös K, Mis kolczi P, Dudits D (2002) Induction of embryogenic competent in somatic plant cells: a review. *Biology* 57:5-12

Geier, T (1986) Factors affecting plant regeneration from leaf segments of *Anthurium scherzerianum* Schott (*Araceae*) cultured *in vitro*. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* 6:115-125

Geier, T (1990) *Anthurium*. En: Ammirato PV, Evans DA, Sharp WR, Bajaj YPS (eds) *Handbook of plant cell and tissue culture*, vol (5) *Ornamental species*, pp. 228-252. McGraw-Hill, New York

Hamidah, M, Karim AGA, Debergh P (1997) Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Anthurium scherzerianum*. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* 48:189-193

Ibrahim, R, Mondelaers W, Debergh PC (1998) Effects of X-irradiation on adventitious bud regeneration from *in vitro* leaf explants of *Rosa hybrida*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 54:37-44

Ibrahim, R, Debergh PC (2000) Improvement of adventitious bud formation and plantlet regeneration from *in vitro* leaflet explants of roses (*Rosa hybrida* L.). *Acta Hort.* 520:271-280

Ibrahim, R, Debergh PC (2001) Factors controlling high efficiency adventitious bud formation and plant regeneration from *in vitro* leaf explants of roses (*Rosa hybrida* L.). *Sci. Hort.* 88:41-57

Khanna, HK, Raina SK (1998) Genotype x media culture interaction effects on regeneration response of three Indica rice cultivars. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 52:145-153

Kuehnle, AR, Sugii N (1991) Callos induction and plantlet regeneration in tissue cultures of Hawaiian *Anthuriums*. *HortSci.* 26:919-921

Kuehnle, RA, Chen FCh, Sugii N (1992) Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Anthurium andraeanum* hybrids. *Plant Cell Rep.* 11:438-442

Lee, K, Jeon H, Kim M (2002) Optimization of mature embryo-based *in vitro* culture system for high-frequency somatic embryogenic callus induction and plant regeneration from Japonica rice cultivars. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 71: 237-244

Leifert, C, Murphy KD, Lumsden PJ (1995) Mineral and carbohydrate nutrition of plant cell and tissue cultures. *Crit. Rev. Plant Sci.* 14:83-109

Martin, KP, Dominic J, Madassery J, Phillip VJ (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

Murashige, T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plantarum* 15: 473-497

- Neumann, KH (1995) Pflanzliche Zell-und Gewebekulturen. Ulmer, Stuttgart.
- Nitsch, J, Nitsch C (1969) Haploid plants from pollen grains. Science 163: 85-87
- Nuutila, AM, Villiger C, Oksman-Caldentey KM (2002) Embryogenesis and regeneration of green plantlets from oat (*Avena sativa* L.) leaf-base segments: influence of nitrogen balance, sugar and auxin. Plant Cell Rep. 20:1156-1161
- Ogawa, T, Fukuoka H, Yano H, Ohkawa Y (1999) Relationships between nitrite reductase activity and genotype-dependent callus growth in rice cell cultures. Plant Cell Rep. 18: 576-581
- Parrott, W (2002) La embriogénesis somática en las angiospermas. Resúmenes. En: VI Simposio Internacional de Biotecnología Vegetal. Sexto Coloquio Internacional. Junio 17 al 21. Instituto de Biotecnología de las Plantas, Villa Clara, Cuba
- Prasad, KV, Piakasli D, Aswath C, Choudhary ML (2001) *In vitro* regeneration from leaf and cotyledon explants of *Anthurium magnificum*. The 2nd International Symposium on Biotechnology of Tropical and Subtropical Species. Taipei. Noviembre 5-9
- Puchooa, D (2005) *In vitro* mutation breeding of *Anthurium* by gamma radiation. Int. J. of Biol. 7(1):11-20
- Rachmawati D, Hosaka T, Inoue E, Anzai H (2004) *Agrobacterium*-mediated transformation of Javanica rice cv. Rojolele. Biosci. Biotechnol. Biochem. 68:1193-1200
- Rachmawati D, Anzai H (2006) Studies on callus induction, plant regeneration and transformation of Javanica rice cultivars. Plant Biotechnology 23: 521-524
- Raghavan, V (2004) Role of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) in somatic embryogenesis on cultured zygotic embryos of *Arabidopsis*: cell expansion, cell cycling, and morphogenesis during continuous exposure of embryos to 2,4-D. American Journal of Botany 91(11): 1743-1756
- Samaj, J, Baluska F, Pretová A, Volkmann D (2003) Auxin deprivation induces a developmental switch in maize somatic embryogenesis involving redistribution of microtubules and actin filaments from endoplasmic to cortical cytoskeletal arrays. Plant Cell Rep. 21:940-945
- Pierik, RLM (1976) *Anthurium andraeanum* plantlets produced from callus tissues cultivated *in vitro*. Physiol. Plant 37:80-82
- Pierik, RLM, Steegmans HMM, Van der Meys Jaj (1974) Plantlet formation in callus tissues of *Anthurium andraeanum* Lind. Hort. Sci. 2: 193-198
- Shibli, AR y Ajlouni MM (2000) Somatic embryogenesis in the endemic black iris. Plant Cell, Tiss. Org. Cult. 61:15-21
- Tiel, K, Enríquez AG, Ceballo Y, Soto N, Fuentes DA, Ferreira A, Coll Y, Pujol M (2006) Development of a system for rapid plant regeneration from *in vitro* sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) meristematic tissue. Biotecnología Aplicada 23:22-24
- Vargas, TE, Mejías A, Oropeza M y De García E (2004) Plant regeneration of *Anthurium andraeanum* cv Rubrun. Electronic Journal of Biotechnology [online]. 15 December 2004, 7(3) [cited 17 February 2005]. <http://www.ejbiotechnology.info/content/vol7/issue3/full/11.html>