

# CARACTERIZACIÓN HISTOLÓGICA DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA A PARTIR DE LIMBOS FOLIARES DE BONIATO (*Ipomoea batatas* L. Lam.)

O. S. González<sup>✉</sup>, Ofelia Sam, María M. Hernández, María J. Coronado y J. J. Silva

**ABSTRACT.** With the use of the culture medium proposed by Murashige and Skoog, supplemented with myoinositol (100 mg.L<sup>-1</sup>), thiamin (1 mg.L<sup>-1</sup>), MS vitamin (10.0 ml.L<sup>-1</sup>), sucrose (3 %), gelrite (0.2 %) and different growth regulators in the culture medium, depending on the experimental objective, the callogenesis and somatic embryogenesis were described in explants from sweet potato leaves of INIVIT B 93-1 cv, through a callus histological study; the site where cell proliferation provided the induction of an endogenous callus was determined. The callus could be seen after six days from the aseptic inoculation. At the beginning, the callus was formed from vascular bundles and later, due to the intense mitotic activity, it began to occupy the whole mesophyll. This resulted in a compact mass, destroying the explant epidermis and giving birth to a heterogeneous yellow nodular mass outwards, and five days later, appearing the embryogenic primordia that led to somatic embryos after 20 days.

**RESUMEN.** Con el empleo del medio de cultivo propuesto por Murashige y Skoog, suplementado con mioinositol (100 mg.L<sup>-1</sup>), tiamina (1 mg.L<sup>-1</sup>), vitaminas MS (10.0 ml.L<sup>-1</sup>), sacarosa (3 %), gelrite (0.2 %) y diferentes reguladores del crecimiento incorporados al medio de cultivo, en dependencia de la finalidad del experimento planteado, se realizó, mediante estudios histológicos, una descripción de la callogénesis y embriogénesis somática a partir de explantes de limbos foliares de boniato pertenecientes al clon INIVIT B 93-1, para lo cual se determinó el sitio en que comenzó la proliferación de células que dieron origen a la inducción del callo endógeno en el mesófilo foliar, el cual pudo observarse claramente a partir de los seis días después del cultivo aséptico. Los callos surgieron de las células perivasculares del haz de mayor tamaño y debido a la intensa actividad mitótica comenzó a ocupar todo el mesófilo; como resultado se formó una masa compacta que invadió la epidermis del explante, dando origen a una masa heterogénea que se proyectó hacia el exterior, dando lugar a la aparición de un callo de color crema-amarillo, nodular y friable, subcultivado a otro medio de cultivo, comenzando a los cinco días la aparición de los primordios embriogénicos que dieron inicio posteriormente a los embriones somáticos a los 20 días.

**Key words:** *Ipomoea batatas*, callus, somatic embryogenesis, plant tissues

**Palabras clave:** *Ipomoea batatas*, callo, embriogénesis somática, tejidos vegetales

## INTRODUCCIÓN

El cultivo del boniato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) ofrece diversas ventajas económicas para muchos países y en especial para Cuba, ya que se puede emplear en la alimentación humana y animal, así como en la industria.

Las técnicas de cultivo de tejidos son utilizadas para una rápida propagación de plantas, como una fuente importante de información genética en células vegetales y regeneración de algunas características (1, 2), siendo necesario conocer los aspectos de diferenciación celular y la histogénesis para poder entender mejor la organogénesis (3). La embriogénesis somática es altamente dependiente de la especie, el genotipo, el estado fisiológico de la planta donante, las condiciones de incubación, la composición del medio de cultivo, el estado de desarrollo del explante y la técnica de cultivo *in vitro* que se aplique (4).

En este sentido, la histogénesis de los callos ocupa un papel preponderante, porque permite establecer correlaciones sobre la influencia de los reguladores del crecimiento y el proceso considerado como desenvolvimien-

O. S. González y J. J. Silva, Profesores Asistentes del Centro de Estudios de Biotecnología Vegetal, Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad de Granma, Apdo. 21, Bayamo, CP 85100, Granma; Dra.C. Ofelia Sam, Investigadora Titular del Departamento de Fisiología Vegetal; Dra.C. María M. Hernández, Investigadora Titular del Departamento de Genética y Mejoramiento de las Plantas, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Gaveta Postal 1, San José de las Lajas, La Habana, CP 32700, Cuba; Dra. María J. Coronado, Investigadora Titular del Centro de Investigaciones Científicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Madrid, España.

✉ ogpaneque@udg.co.cu, opaneque@inca.edu.cu

to “desordenado” típico de los callos y la organización celular de los tejidos con estructuras organizadas.

La embriogénesis somática es, sin duda, el medio más poderoso de micropropagación y explota una de las totipotencialidades de las células vegetales, que es la de generar embriones idénticos a los embriones cigóticos sin pasar por la fecundación, siendo utilizada como una alternativa dentro de los métodos de propagación debido a su alto índice de multiplicación (5).

En el cultivo del boniato, con el empleo de la embriogénesis somática, se abren nuevas áreas a la investigación científica y se dispone de una vía para la producción de “semilla” en este cultivo, la cual constituye una problemática en la actualidad, representando una herramienta de gran utilidad para la multiplicación e introducción de nuevos clones. La utilización de la embriogénesis somática permite la obtención de un número elevado de plantas en corto tiempo, cuando no se dispone de abundante material de propagación y es de gran utilidad en los programas de multiplicación en diferentes cultivos de interés; en el boniato, en particular, constituye un aspecto de gran importancia en la agricultura moderna.

Para un mayor conocimiento y una mejor comprensión de los cambios estructurales, que dan lugar a la embriogénesis somática del boniato mediante la aplicación del cultivo *in vitro*, se ha hecho uso de las técnicas histológicas que han facilitado describir el proceso que conduce a un tejido a readquirir sus potencialidades embriogénicas y la selección de un apropiado procedimiento para una buena preservación de las estructuras embriogénicas y esto puede ser determinado por estudios histológicos de diferentes especies de plantas y tejidos (6).

Es por ello que el objetivo del presente trabajo fue evaluar histológicamente el proceso de callogénesis y embriogénesis somática a partir de explantes de limbos foliares de boniato en el clon INIVIT B 93-1.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se realizó en el Departamento de Fisiología Vegetal del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA) de La Habana, en colaboración con el Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), España. Se efectuaron cortes histológicos en explantes de limbo foliar, callos, callos con estructuras embriogénicas y embriones somáticos en diferentes estadios de desarrollo.

Para la obtención de los brotes, se recolectaron raíces tuberosas pertenecientes al clon INIVIT B 93-1, cultivadas en parcelas experimentales según el Instructivo técnico del boniato (7). Las raíces tuberosas fueron seleccionadas tomando en cuenta su sanidad y uniformidad en el tamaño, y se colocaron en frascos de cristal con agua en condiciones de laboratorio a la temperatura de  $27 \pm 2^\circ\text{C}$ , humedad relativa de 75-80 % e iluminación de 4000-5000 lx.

A partir de los 25 días después de aparecer los brotes, se procedió al corte de estos para la selección de los explantes de limbos foliares, con el empleo del medio de cultivo propuesto por Murashige y Skoog, suplementado con mioinositol ( $100 \text{ mg.L}^{-1}$ ), tiamina ( $1 \text{ mg.L}^{-1}$ ), vitaminas MS ( $10.0 \text{ ml.L}^{-1}$ ), sacarosa (3 %) y gelrite (0.2 %). Los reguladores del crecimiento fueron incorporados al medio de cultivo en dependencia del objetivo planteado en cada experimento. Las pesadas se realizaron en una balanza analítica Sartorius de 0.1 mg de precisión.

El pH del medio se ajustó a  $5.8 \pm 0.01$  en todos los casos, previo a la adición del agente solidificante y se distribuyeron añadiendo 10 mL en tubos de ensayo de 10.0 cm de longitud y 2.5 cm de diámetro, esterilizados en autoclave a  $121^\circ\text{C}$  ( $1.2 \text{ Kg/cm}^2$  de presión) durante 20 minutos.

Para el estudio histológico se tomó una porción de  $2 \text{ mm}^2$  para los explantes de limbo foliar y de  $2 \text{ mm}^3$  para el resto de los materiales estudiados con tres repeticiones, tomadas en cada muestreo. Las muestras fueron fijadas en formaldehído (4 %) en buffer fosfato a pH 7.1, durante 24 horas a  $4^\circ\text{C}$ ; posteriormente se lavaron tres veces con PBS durante 10 minutos, se deshidrataron en soluciones crecientes de etanol y se pasaron a óxido de propileno/etanol hasta quedar en óxido de propileno puro, para realizar la infiltración e inclusión en Epon, según la técnica empleada por Risueño (4).

Los cortes semifinos de  $1 \mu\text{m}$  de grosor se obtuvieron con cuchillas de vidrio en un ultramicrotomo *LKB Nova (Uppsala Sweden)*. La tinción se realizó con azul de toluidina (0.01 %) en agua. Las secciones fueron fotografiadas en un microscopio *Olympus* con cámara digital acoplada.

Para los estudios histológicos se tuvieron en cuenta las siguientes etapas:

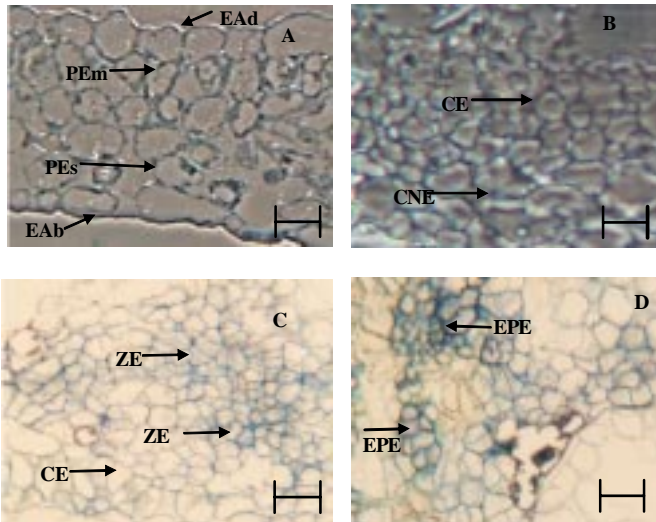
**Inducción del callo con estructuras embriogénicas.** Se seleccionaron explantes de limbos foliares ( $1.0 \text{ cm}^2$ ), desinfectados con hipoclorito de sodio (1 %) durante 15 minutos y sembrados en el medio de cultivo propuesto por Murashige y Skoog, vitaminas MS ( $10 \text{ mg.L}^{-1}$ ), mioinositol ( $100 \text{ mg.L}^{-1}$ ), sacarosa (3 %), gelrite (0.2 %), 2,4-D ( $0.50 \text{ mg.L}^{-1}$ ) y 6-BAP ( $0.25 \text{ mg.L}^{-1}$ ), mantenidos en la oscuridad permanente durante 30 días. Las muestras fueron fijadas a los tres, seis, nueve, 14 y 21 días después de la siembra y los callos no embriogénicos y con estructuras embriogénicas a los 30 días, para su posterior procesamiento e inclusión en resina y obtención de cortes semifinos.

**Inducción de los embriones somáticos.** Se empleó el medio anteriormente mencionado conteniendo además tiamina ( $1 \text{ mg.L}^{-1}$ ) y el 2,4-D a una concentración de  $0.2 \text{ mg.L}^{-1}$ , con un fotoperíodo de 16 horas luz y 8 oscuridad durante 30 días; transcurrido este tiempo se les realizaron los cortes histológicos.

**Caracterización de los embriones somáticos.** Se empleó el medio de cultivo anteriormente mencionado con ABA ( $1.0 \text{ mg.L}^{-1}$ ) y se realizaron los cortes a los embriones somáticos en los estadios siguientes: globular, corazón, torpedo y cotiledonal.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Inducción del callo con estructuras embriogénicas.** En secciones transversales del limbo foliar tomadas en el momento de realizar la siembra en el medio de cultivo, se observó la estructura foliar característica de este tipo de plantas, donde se distingue claramente la epidermis (adaxial y abaxial) y el parénquima clorofílico bien diferenciado en empalizada y el lagunar o esponjoso (Figura 1A).



EAd: Epidermis adaxial  
PEm: Parénquima en empalizada  
CE: Células embriogénicas  
ZE: Zona embriogénica

EAb: Epidermis abaxial  
PEs: Parénquima esponjoso  
CNE: Células no embriogénicas  
EPE: Estructura proembriogénica

**Figura 1. Cortes histológicos del limbo foliar y de callos de boniato: (A): Secciones transversales del limbo foliar tomadas al momento de realizar la siembra. (B): Callo con treinta días de formado evidenciando un pleno desarrollo predominando células pequeñas y abundantes. (C): Sección transversal de un callo con zonas embriogénicas después de los cinco días del subcultivo. (D): Sección transversal de un callo con estructuras proembriogénicas. Barras en las fotos: (A)=100 m[, (B)=150 m[, (C) y (D)=200 m[**

A partir de los tres días de sembrado el explante, ocurrió la inducción del callo, donde las estructuras del limbo foliar se mantuvieron intactas y solo se observó la proliferación de células indiferenciadas en el parénquima esponjoso, lo cual se considera una fase preparatoria, donde ocurre una alteración metabólica celular. Las primeras divisiones celulares dieron lugar a la callogénesis, originándose callos de cicatrización en los bordes del explante cercanos a la región del haz vascular y una disminución de la intensidad de la coloración verde. Resultados similares fueron obtenidos a partir de explantes de limbos de cafeto (*Coffea arábica*, L.), donde las divisiones celulares se iniciaron en las células perivasculares y

se apreciaron primeramente dentro del parénquima esponjoso, observándose cambios anatómicos (8).

A los seis días se observó un mayor engrosamiento del callo, que se había iniciado en las células perivasculares del haz de mayor tamaño, dando lugar a un callo endógeno. El incremento en todas direcciones originó que se hiciera notable y luego se proyectó hacia el exterior a través de la epidermis.

Después de los siete días de establecida la siembra, se observó la aparición de pequeños callos de color amarillo-crema en los bordes del explante y en los extremos de su nervadura, mostrando el explante sus bordes ondulados y se observó la presencia de agrupaciones celulares similares a las que forman las células embriogénicas meristemáticas. No cabe duda que en este período el callo comenzó una etapa de división con una rápida multiplicación celular, todo lo cual coincide con los que han demostrado que a partir de los siete días después de la siembra (9), se observó en el callo de cicatrización y en las células meristemáticas divisiones periclinales del callo endógeno y a partir de los doce días se encontraba ocupando toda la superficie del explante, incrementándose el crecimiento con la multiplicación de células meristemáticas, formando meristemoides que constituyen centros o regiones localizadas de división y proliferación celular activa; esos centros se componen de células isodiamétricas y es a partir de estas células que se originan los embriones somáticos.

A los 21 días se observó el desarrollo pleno del callo de color crema-amarillo, con estructuras nodulares formadas por células pequeñas y abundantes. A los 30 días de la siembra, el callo presentó una apariencia homogénea y las células meristemáticas fueron las predominantes, relacionado esto con la textura friable de los callos (Figura 1B), presentándose una total decoloración del explante, cubierto por el callo en su totalidad y en la medida que el tiempo transcurrió se experimentaron cambios en la constitución del callo, aunque se puede encontrar una sección del callo no embriogénico y se pudo observar que este se caracterizó por presentar en su mayoría células alargadas, parenquimáticas (Figura 1B).

Conjuntamente con las células embriogénicas, también se observaron células de tipo no embriogénicas altamente diferenciadas y vacuoladas, demostrándose que en un mismo callo pueden existir células con capacidad embriogénica y células no embriogénicas (10). La formación de un tipo de callo u otro depende del explante empleado y la formación de los proembriones puede ser influido por el genotipo (11, 12).

Se ha demostrado que las células embriogénicas proceden de las meristemáticas y el aumento en el número de estas se debe casi enteramente a la división repetida en tejidos meristemáticos específicos, que se hallan solo en regiones limitadas y están formados por células permanentemente embrionarias (13).

La capacidad morfogénica de algunos tejidos puede no tomarse en consideración (14), debido a la asociación

de estos con tejidos diferenciados que están dentro de un sistema organizado y es por ello que, en ocasiones, las heridas permiten poner en contacto directo algunos tejidos internos con el medio de cultivo y sus componentes, especialmente los reguladores del crecimiento. Resultados similares fueron también expuestos (15) al realizar estudios bioquímicos e histológicos en el cultivo del cacao (*Theobroma cacao*, L.).

**Inducción de los embriones somáticos.** Después de los cinco días de colocados los callos en el medio de cultivo, se observó el desarrollo de zonas embriogénicas (Figura 1C), que posteriormente dieron inicio a la formación de estructuras proembriogénicas (Figura 1D); estructuras similares han sido descritas y a partir de ahí se muestran los estadios multicelulares tempranos de la diferenciación de los embriones somáticos (16). En las zonas meristemáticas ocurren frecuentemente divisiones anticlinales y periclinales de las células, y existe poco conocimiento acerca del origen y desarrollo de los embriones somáticos (15, 17). Se han realizado observaciones donde se demuestra que en la organización incipiente de zonas embriogénicas se puede apreciar la presencia de diferentes tipos celulares (4).

Pasados 20 días, se observó una elevada presencia de embriones somáticos, principalmente en aquellas partes ubicadas en el centro y los bordes del callo, los cuales se caracterizaron por presentar una morfología similar a los embriones cigóticos. A los 25 días, se pudo observar la emergencia de los embriones y en muchos casos se vio la presencia de varios embriones en una misma zona del callo.

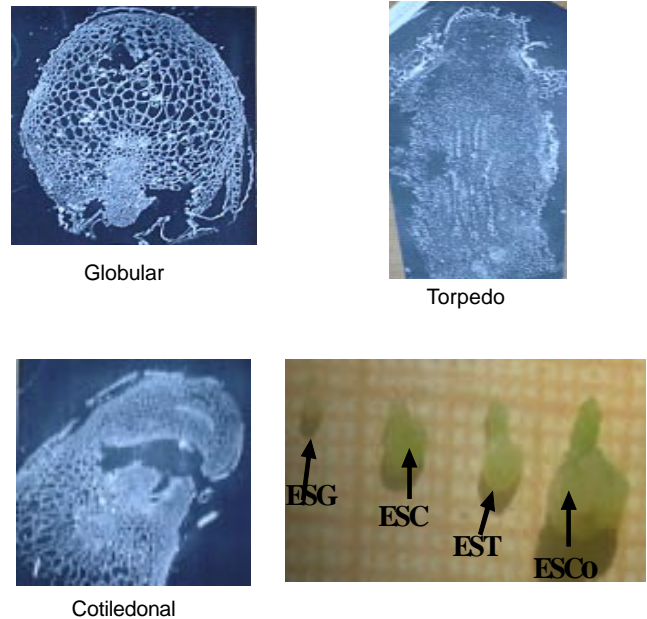
Estas observaciones histológicas, al igual que el posterior desarrollo morfológico bipolar de los embriones somáticos al ser colocados en el medio de germinación, demostraron la naturaleza embriogénica del proceso estudiado.

**Caracterización de los embriones somáticos.** Las secciones longitudinales de los embriones somáticos mostraron la naturaleza bipolar propia de estos y la posterior diferenciación en embriones somáticos independientes. Además, se observó el estadio de corazón y el comienzo de la polaridad, siendo este estadio embrionario relativamente corto, ya que pasan rápidamente al estadio de torpedo.

Durante la embriogénesis somática, se pudo constatar la gran variación existente en cuanto a forma, tamaño y apariencia de los embriones somáticos que sugirieron la ruta de desarrollo, según lo establecido por la vía cigótica (18). Lo anterior demuestra que es necesario realizar estudios histológicos detallados desde el inicio del callo hasta la completa formación y desarrollo de los embriones somáticos, lo que puede ser usado para conocer el tiempo de subcultivo de estos, optimizando la efectividad de las condiciones físicas y químicas de los cultivos durante los sucesos de la embriogénesis somática, lo que corrobora lo planteado en cuanto a la evolución histológica del desarrollo de los callos con estructuras embriogénicas (14).

En el boniato, como en otros cultivos donde se ha estudiado la embriogénesis somática, las células con potencialidades embriogénicas son las que dan lugar a la inducción de los embriones somáticos, que se establecen en la periferia de los lóbulos del callo y en diferentes partes de este.

Al estudiar el embrión cotiledonal, se observó que este presentó un meristemo apical y uno radical conectados vascularmente; estas estructuras se formaron simultáneamente pasando los embriones somáticos por diferentes estadios de desarrollo, entre los cuales se encuentran: globular, acorazonado, torpedo y cotiledonal (Figura 2).



ESG: Embrión somático globular ESC: Embrión somático corazón  
EST: Embrión somático torpedo ESCo: Embrión somático cotiledonal

### Figura 2. Diferentes estadios histomorfológicos de los embriones somáticos (globular, torpedo y cotiledonal)

Aunque todas las células de un organismo son consideradas del mismo genotipo, no todas responden a la formación de embriones somáticos de igual manera, debido a que solamente ciertas células parecen estar aptas para responder a la embriogénesis somática bajo la influencia de los reguladores del crecimiento y una vez formadas las células embriogénicas, no todas están simultáneamente listas desde el punto de vista fisiológico para expresar su totipotencia, aún en un medio favorable para su desarrollo.

De manera general, se puede plantear que el callo se produjo a partir de células del parénquima perivascular y que de este surgieron las estructuras embriogénicas, las cuales se dividieron activamente tomando un mayor desarrollo que ocasionó el rompimiento de la epidermis, para así permitir la emergencia de las células del callo y la aparición del callo exógeno, donde posteriormente aparecieron los embriones somáticos caracterizados por presentar una morfología totalmente normal.

## AGRADECIMIENTOS

A los compañeros Lisbeth Sardiñas Reynaldo, Mirtha López Machado y el Ms.C. Michel Martínez Cruz del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA); la Ms.C. Marlyn Valdés de la Cruz de la Facultad de Biología de la Universidad de La Habana y la Dra. Hildelisa Saralegui Boza del Jardín Botánico Nacional, por las sugerencias y la ayuda brindada en la ejecución de este trabajo.

## REFERENCIAS

1. Maximova, S. N.; Alemanno, L.; Young, A.; Ferriere, N.; Traore, N. y Gultiman, M. J. Efficiency, genotypic variability, and cellular origins of primary and secondary somatic embryogenesis of *Theobroma cacao* L. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 2002, vol. 38, no. 3, p. 252-259.
2. Hita, O.; Gallego, P.; Villalobos, N.; Lanas, I.; Blazquez, A.; Martín, J. P.; Fernández, J.; Martín, L. y Guerra, H. Improvement of somatic embryogenesis in *Medicago arborea*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2003, vol. 72, no. 1, p. 13-18.
3. Vieira, R. y Esquibel, M. D. Histogenesis of callus from stem explants of *Ipomoea batatas* (L.) Lam. *Leandra*, 1998, vol. 13, p. 45-55.
4. Risueño, M. Microspore-derived embryogenesis from *in vitro* cultures of heat-stressed anthers of *Capsicum annum* involves a dedifferentiation followed by proliferation and further redifferentiation. *Plant Development and Nuclear Organization*. CSIC, 2000.
5. Testillano, P.; Coronado, M.; Seguí, J.; Domenech, J.; González-Melendi, P.; Rasha, I. y Risueño, M. Defined nuclear changes accompany the reprogramming of the microspore to embryogenesis. *Journal of Structural Biology*, 2000, vol. 129, p. 223-232.
6. Ramírez, C.; Testillano, P.; Pintos, B.; Moreno, M.; Domenech, J.; Gómez, A.; Manzanera, J.; Bueno, M. y Risueño, M. Cellular characterization of microspore embryogenesis in anther culture of *Quercus suber*. *Biotechnological Approaches for Utilization of Gametic Cells*. Cost 824, Bled, Slovenia, P. 2000.
7. Cuba. MINAGRI. Instructivo técnico del boniato. La Habana:SEDAGRI/AGRINFOR. 1998. 21 p.
8. Lee, T. S.; Zapata-Arias, F.; Brunwer, H. y Afza, R. Histology of somatic embryo initiation and organogenesis from rhizome explants of *Musa* sp. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1997, vol. 51, p. 1-8.
9. González, M. E. y Ferrer, M. Caracterización histológica de la callogénesis en *Coffea arabica* var. "Caturra" durante la embriogénesis somática. Resúmenes. Taller de Biotecnología Vegetal de las Provincias Orientales. 1996, p. 6.
10. Santos, D. y Feveireiro, P. Loss of DNA methylation affects somatic embryogenesis in *Medicago truncatula*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2002, vol. 70, p. 155-161.
11. Rival, A. Somatic embryogenesis in oil palm. En: *Somatic embryos in woody plant*, Dordrecht, Boston, London: Kluwer Academic Publishers. 2000, p. 249-290.
12. Goh, D.; Bon, M.; Aliotti, F.; Escoute, J.; Ferriere, N. y Montevvis, O. *In vitro* somatic embryogenesis in two major rattan species: *Calamus merrilli* and *Calamus subinermis*. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*, 2001, vol. 37, p. 375-881.
13. Laparra, H.; Bronner, R. y Hahne, G. Histological analysis of somatic embryogenesis induced in leaf explants of *Helianthus smithii* Heiser. *Protoplasm*, 1997, vol. 196, p. 1-11.
14. Concepción, O.; Nápoles, L.; Trujillo, R.; Pérez, A. y Peralta, N. Regeneración de brotes en hojas de guayaba (*Psidium guajava* L.) propagadas *in vitro*. Resúmenes. En: Taller Internacional de Biotecnología Vegetal. (BioVeg 2003). Centro de Bioplantitas. CD-ROM. Ciego de Ávila, 2003.
15. Dangou, J.S.; Hoher, V.; Ferrer, N.; Fuicheri, C.; Morard, P. y Alemanno, L. Histological and biochemical characterization of *Theobroma cacao* L. endosperm during seed development. *Seed Science Research*, 2002, vol. 12, no. 2, p. 89-100.
16. Testillano, P.; Coronado, M.; Barany, I.; Latino, A.; Seguí, J.; Ramírez, C.; Díaz-Mendoza, M. y Risueño, M. Defined cellular markers including specific MAPK distribution in two pollen developmental programmes. *Microscopy*, Barcelona. 2001, p. 68-69.
17. Budimir, G. Developmental histology of organogenic and embryogenic tissue in *Picea omorika* culture. *Biologia Plantarum*, 2003, vol. 47, no. 3, p. 467-470.
18. Farias, F. R. Cultivo *in vitro* de *Anthurium schlechtendalii* Kunth (*Araceae*), especie silvestre del estado de Veracruz, México. [Tesis de Maestría]; Universidad Veracruzana. 2000, 119 p.

Recibido: 27 de octubre de 2004

Aceptado: 19 de julio de 2005