



In vitro* germination, seed viability and organogenesis of *Anthurium schlechtendalii* Kunth subsp. *schlechtendalii

Germinación *in vitro*, viabilidad y organogénesis de *Anthurium schlechtendalii* Kunth subsp. *schlechtendalii*

Rangel-Estrada, S. E.¹, Hernández-Meneses, E.², Canul-Kú, J.¹, Barrios-Gómez, E. J.¹,
López-Peralta, M. C. G.³, Tapia-Jaramillo, L.¹

¹Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias-Campo Experimental Zacatepec. Carretera Zacatepec Galeana s/n, Centro, 62780, Zacatepec de Hidalgo, Morelos. Tel (01) (800) 0882222 Ext. 86608.

²Postgrado en Recursos Genéticos y Productividad (PREGEP)-Fisiología Vegetal, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Km. 36.5 Carretera Federal México-Texcoco, Montecillo, Texcoco, Estado de México. 56230. Tel (01) (595) 95 20200 Ext. 1542.

³PREGEP-Genética, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo.

Cite this paper/Como citar este artículo: Rangel-Estrada, S. E., Hernández-Meneses, E., Canul-Kú, J., Barrios-Gómez, E. J., López-Peralta, M. C. G., Tapia-Jaramillo, L. (2018). *In vitro* germination, seed viability and organogenesis of *Anthurium schlechtendalii* Kunth subsp. *schlechtendalii*. *Revista Bio Ciencias* 5(nesp2), e475. doi: <https://doi.org/10.15741/revbio.05.nesp.e475>



ABSTRACT

Anthurium schlechtendalii Kunth subsp. *Schlechtendalii* is a large sized anthurium with lustrous leaves which provides a high horticultural potential as an ornamental pot plant for interiors or landscape. Development of efficient propagation systems to avoid the extraction of their natural environment and use it commercially is required. The objectives of this research were to define the optimal conditions for *in vitro* seeds germination, to determine their viability and to establish plant regeneration via organogenesis from micro-cuttings of *in vitro* germinated seedlings. *In vitro* seed germination was of 96.0-98.8% in MS medium with 50% concentration of salts. Seeds viability was maintained for a maximum period of five months at 10 °C although it was drastically reduced after first month. Organogenesis was achieved in MS medium added with 7.5

Article Info/Información del artículo

Received/Recibido: March 23rd 2018.

Accepted/Aceptado: July 25th 2018.

Available on line/Publicado: December 18th 2018.

RESUMEN

Anthurium schlechtendalii Kunth subsp. *schlechtendalii* es un anturio silvestre de gran porte, que posee hojas lustrosas que le otorgan amplio potencial hortícola como planta ornamental de maceta para la decoración de interiores o jardines. Para su aprovechamiento comercial es necesario desarrollar esquemas de propagación eficientes que eviten su extracción de su ambiente natural. Los objetivos del presente estudio fueron definir las condiciones óptimas para la germinación *in vitro* de semillas, determinar su viabilidad y establecer la regeneración vía organogénesis a partir de microesquejes de plántulas germinadas *in vitro*. La germinación *in vitro* de 96.0-98.8 % se logró en medio MS con 50 % de concentración de sales. La viabilidad de las semillas se mantuvo por un máximo de cinco meses a 10 °C aunque después de un mes se redujo drásticamente. La organogénesis se logró en el medio MS adicionado con 7.5 µM de BAP y 1 µM de IAA donde se indujeron 16.3 brotes por explante después de ocho semanas. La multiplicación de los brotes se obtuvo en las mismas concentraciones de reguladores de cre-

***Corresponding Author:** Sandra Eloísa Rangel-Estrada, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias-Campo Experimental Zacatepec. Carretera Zacatepec Galeana s/n, Centro, 62780, Zacatepec de Hidalgo, Morelos. Tel (01) (800) 0882222 Ext. 86608. Email: doromeneses@hotmailcolpos.mx

μM BAP and $1 \mu\text{M}$ IAA where 16.3 shoots per explant were induced after eight weeks. Shoots multiplication was obtained at the same combination of plant growth regulators. Plants elongation and rooting was achieved in MS medium both at 50 and 100 % concentrations of salts added with $1 \mu\text{M}$ IBA. Plants acclimatization was efficient in peat moss + perlite (1:1) with a survival rate of 95 % after six weeks in greenhouse conditions.

KEY WORDS

Anthurium schlechtendalii, micropropagation, anthurium, epiphyte, wild, native.

Introduction

Araceae family includes around 110 genera and 4,700 species distributed into tropical, subtropical and temperate regions of the Northern hemisphere of all continents. In Mexico, this family is represented by 13 genera and 109 species, between native and naturalized; moreover, 5 genera and 7 species have been introduced (Mayo *et al.*, 1997; Croat & Acebey, 2015). The edible use of leaves, corms, mature fruits, soft spadix and seeds has been reported for some species. Its use as forage, medicinal, building material, fibres for basket making, handicrafts elaboration, packaging and/or as insecticide and pesticide has also been reported. However, the most important use of this botanical family is as ornamental plants (Croat & Acebey, 2015) where the most important genera are *Aglaonema*, *Anthurium*, *Caladium*, *Colocasia*, *Dieffenbachia*, *Monstera*, *Philodendron*, *Spathiphyllum*, *Syngonium*, *Xanthosoma* and *Zantedeschia* (Mayo *et al.*, 1997).

Plants from the *Anthurium* Schott genus are characterized by being epiphytes, sometimes terrestrial or rupicolous; its stems present from short to extended internodes and simple leaves. The number of species originating from neotropical regions has been estimated between 1000 and 1300 (Croat & Acebey, 2015). The main use of *Anthurium* species is as ornamental plants for cut flowers and cut foliage or pot plant. Since last century the commercial cultivars dominating the market have been obtained by plant breeding between *A. andraeanum* Linden ex André and *A. scherzerianum* Schott (Kamemoto & Kuehnle, 1996; Kuehnle *et al.*, 2001; Teixeira da Silva *et al.*, 2015).

In Mexico, the diversity of *Anthurium* species is outstanding since between 41 and 48 species have been reported, most

cimiento. El alargamiento y enraizamiento de plantas se alcanzó en medio MS con 50 y 100 % de concentración de sales y $1 \mu\text{M}$ de IBA. La aclimatación de las plantas fue eficiente en turba+perlita (1:1) con tasas de supervivencia de 95% después de seis semanas en invernadero.

PALABRAS CLAVE

Anthurium schlechtendalii, micropropagación, anturio, epífita, silvestre, nativo.

Introducción

La familia de las aráceas agrupa 110 géneros y 4,700 especies aproximadamente que se distribuyen en regiones tropicales, subtropicales y templadas del hemisferio norte de todos los continentes, con excepción de la Antártida. En México la familia está representada por 13 géneros y 109 especies entre nativas y naturalizadas; además, cinco géneros y siete especies introducidas (Mayo *et al.*, 1997; Croat & Acebey, 2015). Para algunas especies se ha documentado el uso comestible de sus hojas, cormos, frutos maduros, espádice tiernos y semillas. También se reporta su uso como forraje, medicinal, material de construcción, fibras para cestería, elaboración de artesanías, embalaje y/o como insecticida y pesticida. Sin embargo, el uso más importante de esta familia es como planta ornamental (Croat & Acebey, 2015) donde los géneros más importantes son *Aglaonema*, *Anthurium*, *Caladium*, *Colocasia*, *Dieffenbachia*, *Monstera*, *Philodendron*, *Spathiphyllum*, *Syngonium*, *Xanthosoma* y *Zantedeschia* (Mayo *et al.*, 1997).

Las plantas del género *Anthurium* Schott se caracterizan por ser hierbas epífitas, a veces terrestres o rupícolas; sus tallos poseen entrenudos de cortos a alargados y hojas simples. Se ha estimado entre 1000 y 1300 el número de especies de origen neotropical (Croat & Acebey, 2015). El uso principal de las especies de *Anthurium* es como planta ornamental para flores y follajes de corte o planta de maceta; desde el siglo pasado los cultivares comerciales que dominan en el mercado son producto del mejoramiento genético de *A. andraeanum* Linden ex André y *A. scherzerianum* Schott (Kamemoto & Kuehnle, 1996; Kuehnle *et al.*, 2001; Teixeira da Silva *et al.*, 2015).

En México la diversidad de especies de *Anthurium* es sobresaliente ya que se han registrado entre 41 y 48 especies, la mayoría con amplio potencial ornamental. *Anthurium schle-*

with a wide ornamental potential. *Anthurium schlechtendalii* Kunth subsp. *Schlechtendalii* is a wild species, distributed from Mexico to Nicaragua. They are characterized for being epiphytes plants with erected leaves in rosette and obovate and elliptic blades, measuring 30-112 cm long and 10-58 cm wide. The inflorescence is patent shorter than leaves; the spathe is green to nuanced-purple-violet green; the spadix is green and tapered. Infructescences are arched and pendant; the spathe is persistent and brown; berries are glossy and red (Croat, 1983; Croat & Acebey, 2015). The large size and brightness of the leaves are the main attributes that confer value to this variety as an ornamental pot plant for the decoration of interiors or landscape.

Incorporating this phylogenetic resource to the agricultural production at a commercial scale is limited by the way of propagation. It is mainly carried out from seeds, but they can be obtained only once a year and, based on producers' opinion, they present viability issues. Moreover, the division of plants is not a method effective enough since plants have to reach at least five years to produce shoots. These restrictions require the development of effective propagation systems that favor the constant production of vegetative material along the year. In this sense, the current research aimed to determine optimal conditions for *in vitro* seed germination of *Anthurium schlechtendalii* subsp. *schlechtendalii*, to assess its viability and to develop a protocol for regeneration via organogenesis from *in vitro* germinated seedlings.

Materials and Methods

Source of seeds and disinfection. Seeds were extracted from mature infructescences collected from wild plants of the high evergreen forest in of the Sierra of Tabasco state, Mexico (Figure 1a-b). Seeds were washed with a commercial detergent for 5 minutes to remove the mucilage and were rinsed three times with tap water and then sterile distilled water. Then, they were submerged in a commercial sodium hypochlorite solution (NaOCl, Cloralex®; 40 % v/v) and Tween-20® (Sigma-Aldrich, 0.5 % v/v) for 15 minutes and were washed five times with sterile distilled water. Finally, seeds were immersed in Captan (N-triclorometiltilio-4-ciclohexeno-1,2 dicarboximida, 4 g L⁻¹) for 10 minutes and were rinsed with sterile distilled water.

Culture medium and incubation conditions. The culture medium was composed of the complete salts of the MS medium (Murashige & Skoog, 1962), added with sucrose (30 g L⁻¹), myo-inositol (100 mg L⁻¹), thiamine (0.1 mg L⁻¹),

chtendalii Kunth subsp. *schlechtendalii* es una especie silvestre que se distribuye desde México hasta Nicaragua. Se caracterizan por ser hierbas epífitas con hojas arrosetadas erectas y láminas obovado-elípticas que miden de 30-112 cm de largo y 10-58 cm de ancho. La inflorescencia es patente más corta que las hojas; la espata es de color verde a verde matizada con violeta-púrpura; el espádice es verde y ahusado. Las infrutescencias son arqueado-colgantes; la espata es persistente y de color marrón; las bayas son de color rojo lustrosas (Croat, 1983; Croat & Acebey, 2015). El gran tamaño y brillo de las hojas son principales los atributos que le confieren valor como planta ornamental de maceta para la decoración de interiores o jardines.

La incorporación de este recurso fitogenético a la producción a agrícola a escala comercial se limita por su forma de propagación. Principalmente se hace a partir de semillas pero solo se pueden obtener una vez al año y, en opinión de productores, presentan problemas de viabilidad. Además, la división de plantas no es un método tan eficiente porque las plantas madre deben alcanzar al menos cinco años de edad para emitir un hijuelo. Estas restricciones precisan el desarrollo de sistemas de propagación eficientes que favorezcan la producción constante de material vegetativo durante el año. Por ello, la presente investigación se planteó como objetivos determinar las condiciones óptimas para la germinación *in vitro* de semillas de *Anthurium schlechtendalii* subsp. *schlechtendalii*, evaluar su viabilidad y desarrollar un protocolo de regeneración vía organogénesis a partir de plántulas germinadas *in vitro*.

Materiales y Métodos

Fuente de semillas y desinfección. Las semillas se extrajeron de infrutescencias maduras colectadas de plantas silvestres de la selva alta perennifolia de la Sierra del estado de Tabasco, México (Figura 1a-b). Las semillas se lavaron con detergente comercial durante 5 min para retirar el mucílago y se enjuagaron por triplicado con agua de la llave y agua destilada estéril. Después se sumergieron en hipoclorito de sodio comercial (NaOCl, Cloralex®; 40 % v/v) y Tween-20® (Sigma-Aldrich, 0.5 % v/v) por 15 min y se enjuagaron con agua destilada estéril cinco veces. Enseguida, las semillas se sumergieron en Captan (N-triclorometiltilio-4-ciclohexeno-1,2 dicarboximida, 4 g L⁻¹) durante 10 minutos y se enjuagaron con agua destilada estéril.

Medio de cultivo y condiciones de incubación: El medio de cultivo estuvo compuesto por las sales completas del me-

pyridoxine (0.5 mg L^{-1}), glycine (2 mg L^{-1}), nicotinic acid (0.5 mg L^{-1}) and solidified with agar-agar (Merck®, 7 g L^{-1}). The pH of the culture medium was adjusted to 5.7 by means of a pH-meter (Hanna® HI 3220) with NaOH or HCl 1N and the culture medium was sterilized in a vertical autoclave (FELISA®, FE-405) at $121 \text{ }^\circ\text{C}$ and under 1.5 kg cm^{-2} of pressure for 20 min. Cultures were incubated at $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, with a 16/8 light/dark photoperiod and a luminous intensity of $45 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

In vitro seed germination and viability

Seeds were placed in the MS medium with 50 or 100% concentration of mineral salts and added with 10, 20 or 30 g L^{-1} of sucrose. Thirty mL of the culture medium were poured in 90 mL glass flasks. After four weeks, the percentage of germinated seeds, plant height (cm) and rooting (%) were measured. The experiment was established in completely randomized design with 25 repetitions per treatment

MS (Murashige & Skoog, 1962) adicionado con sacarosa (30 g L^{-1}), mio-inositol (100 mg L^{-1}), tiamina (0.1 mg L^{-1}), piridoxina (0.5 mg L^{-1}), glicina (2 mg L^{-1}), ácido nicotínico (0.5 mg L^{-1}) y solidificado con agar-agar (Merck®, 7 g L^{-1}). El pH del medio se ajustó a 5.7 en un pH-metro (Hanna® HI 3220) con NaOH o HCl 1N y se esterilizó en autoclave vertical (FELISA®, FE-405) a $121 \text{ }^\circ\text{C}$ y 1.5 kg cm^{-2} de presión por 20 min. Los cultivos se incubaron a $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ en fotoperíodo de 16 horas e intensidad luminosa de $45 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

Germinación *in vitro* y viabilidad de semillas

Las semillas se sembraron en el medio de cultivo MS con 50 y 100 % de la concentración de sales minerales y adicionado con 10, 20 y 30 g L^{-1} de sacarosa. Se sirvieron 30 mL de medio de cultivo en frascos de vidrio de 90 mL de capacidad. A las cuatro semanas se contabilizó el porcentaje de semillas germinadas, altura de plántula (cm) y enraizamiento (%). El experimento se estableció en diseño completamente al azar

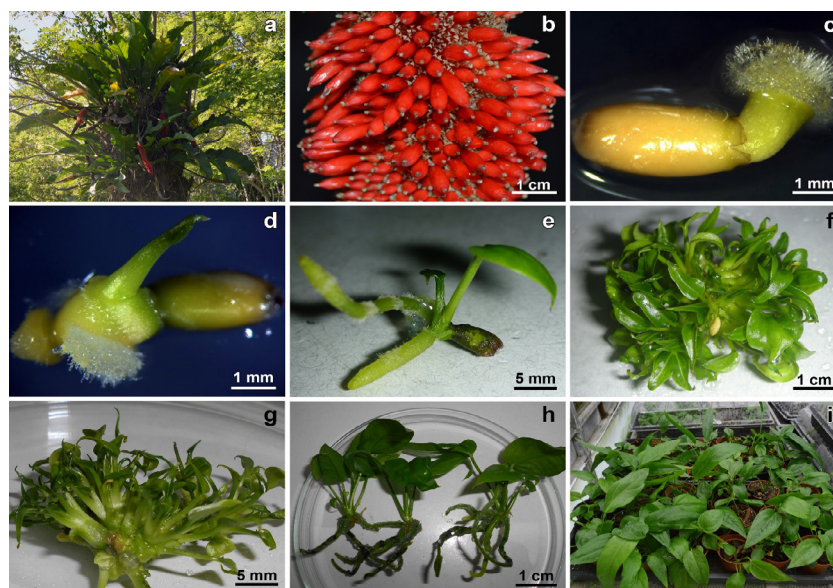


Figure 1. *In vitro* seed germination and organogenesis of *Anthurium schlechtendalii* subsp. *schlechtendalii*. a) Adult plant; b) Infrutescence; c) Emergence of the radicle four days after sowing, d) Growth of first leaf and root after two weeks and e) Seedlings of eight weeks old obtained in half strength MS medium added with 20 g L^{-1} of sucrose; f) Shoots multiplication after eight weeks and g) Second cycle of multiplication with $7.5 \text{ } \mu\text{M}$ of BAP and $1 \text{ } \mu\text{M}$ of IAA; h) Plant elongation and rooting; i) Acclimatization of plants after six weeks.

Figura 1. Germinación *in vitro* y organogénesis de *Anthurium schlechtendalii* subsp. *schlechtendalii*. a) Planta adulta; b) Infrutescencia; c) Emergencia de la radícula a los cuatro días de sembrada, d) Crecimiento de primera hoja y raíz después de dos semanas y e) Plántulas de ocho semanas de edad obtenidas en medio MS a la mitad de sales y 20 g L^{-1} de sacarosa; f) Multiplicación de brotes después de ocho semanas y g) Segundo ciclo de multiplicación con $7.5 \text{ } \mu\text{M}$ de BAP y $1 \text{ } \mu\text{M}$ de IAA; h) Alargamiento y enraizamiento de plantas; i) Acclimatización de plantas después de seis semanas.

and the experimental unit was 10 seeds placed in each culture glass flask. For viability tests, seeds were placed in paper envelopes and stored at room temperature (25 ± 1 °C) and kept refrigerated (10 °C) for six months. Batches of 300 seeds were planted every month, divided into groups of 25 in each 90 mL glass flasks with 30 mL of the best response culture medium obtained in the germination phase.

Regeneration via organogenesis

Shoots multiplication. Dissected micro-cutting of 8 weeks old of *in vitro* germinated seedlings, with an average length of 1.5 cm and devoid of roots and leaves, were planted in MS medium added with four concentrations of 6-benzylaminopurine (BAP: 2.5, 5, 7.5 and 10 μ M), alone or combined with indoleacetic acid (IAA: 1 μ M). After eight weeks, the number of explants that generated shoots (to obtain % of shooting), the number of shoots per explant and shoots length (cm) were quantified. A completely randomized design was used; each treatment was represented by 25 repetitions and the experimental unit was five seedlings per culture glass flask. To increase the number of plants, shoots of 2 cm length were selected and established in the best combination of BAP and IAA resulting from the previously assessed treatments. Two culture cycles of 8 weeks each were made and the number of shoots per explant was quantified at the end of each culture cycle.

Plants elongation and rooting. Shoots 3 cm in length were cultivated in MS medium with 50 or 100% concentration of mineral salts, added with 1 μ M of indolebutyric acid (IBA) and without plant growth regulators. After four weeks, plant height (cm), rooting (%) and the number of roots were quantified. The experimental design was completely randomized where each treatment was represented by 25 repetitions and the experimental unit was five plants per culture glass flask.

Plants acclimatization. At this stage, 300 rooted plants of 7 cm height were planted in peat moss and perlite substrates (1:1) (Atak & Çelik, 2012) in 3 inches plastic pots and covered with a transparent dome. Plants were maintained in greenhouse conditions for 4 weeks at a temperature of 26 °C and watering with 50% concentration of mineral salts from the MS culture medium every third day. At the end of this period of time, the protector dome was removed and after 2 weeks the survival rate was quantified.

con 25 repeticiones por tratamiento y la unidad experimental fueron 10 semillas sembradas en cada frasco de cultivo. Para las pruebas de viabilidad, las semillas se colocaron en sobres de papel y se conservaron en temperatura ambiente (25 ± 1 °C) y en refrigeración (10 °C) durante seis meses. Cada mes se sembraron lotes de 300 semillas divididas en grupos de 25 en cada frasco de 90 mL con 30 mL del medio de cultivo de mejor respuesta obtenido en la etapa de germinación.

Regeneración vía organogénesis

Multiplicación de brotes. Se usaron microesquejes disecados de plántulas germinadas *in vitro* de ocho semanas de edad con longitud promedio de 1.5 cm y desprovistas de raíces y hojas que se sembraron en medio MS adicionado con cuatro concentraciones de 6-bencilaminopurina (BAP; 2.5, 5, 7.5 y 10 μ M) solas y combinadas con ácido indolacético (IAA; 1 μ M). A las ocho semanas se cuantificó el número de explantes que generaron brotes para obtener la brotación (%), el número de brotes por explante y la longitud de brote (cm). Se usó un diseño experimental completamente al azar; cada tratamiento estuvo representado por 25 repeticiones y la unidad experimental fueron cinco plántulas por frasco de cultivo. Para incrementar el número de plantas se seleccionaron brotes de 2 cm de longitud y se establecieron en la mejor combinación de BAP y AIA resultante de los tratamientos evaluados. Se hicieron dos ciclos de cultivo de ocho semanas cada uno y se cuantificó el número de brotes por explante al final de cada ciclo.

Alargamiento y enraizamiento de plantas. Brotes de 3 cm de longitud se cultivaron en medio MS con 50 y 100 % de concentración de sales minerales adicionado con 1 μ M de ácido indolbutírico (AIB) y sin reguladores de crecimiento. Después de cuatro semanas se cuantificó la altura de planta (cm), enraizamiento (%) y número de raíces. El diseño experimental fue completamente al azar donde cada tratamiento estuvo representado por 25 repeticiones y la unidad experimental fueron cinco plantas por frasco.

Acimatación de plantas. En esta etapa se plantaron 300 plantas enraizadas de 7 cm de altura en sustrato de turba (peat moss) y perlita (1:1) (Atak & Çelik, 2012) en macetas de plástico de tres pulgadas y cubiertas con un domo transparente. Las plantas se mantuvieron en condiciones de invernadero por cuatro semanas con temperatura de 26 °C y riegos con 50 % de las sales del medio MS cada tercer día; al término de este tiempo se retiró el domo protector y después de dos semanas se cuantificó el porcentaje de supervivencia.

Statistical analysis

Data obtained in each experiment were submitted to analysis of variance with the statistic software SAS (SAS Institute, 2003). Values in percentage were squared root and the Tukey test ($p \leq 0.05$) was performed to compare means.

Results and Discussion

In vitro seeds germination and viability

Treatments of culture medium and sucrose concentration showed a similar response in the germination and its effect was significant only on seedlings height and number of roots ($p \leq 0.05$). The higher germination percentage (98.8%) occurred in the MS medium with 50% concentration of salts added with 20% of sucrose. Seedlings growth was higher in the MS medium with 100% concentration of salts added with 20 and 30% of sucrose. Rooting was present in every treatment, although the higher number of roots was obtained reached with 20% sucrose in MS medium with 50% concentration of salts (Table 1).

Análisis estadístico

Los datos obtenidos en cada experimento se sometieron a análisis de varianza con el paquete estadístico SAS (SAS Institute, 2003); los valores de porcentaje se transformaron usando la raíz cuadrada y se usó la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) para la comparación de medias.

Resultados y Discusión

Germinación *in vitro* y viabilidad de semillas

Los tratamientos de medio de cultivo y concentración de sacarosa evaluados mostraron una respuesta similar en la germinación y su efecto sólo fue significativo sobre la altura de plántula y el número de raíces ($p \leq 0.05$). El mayor porcentaje de germinación (98.8 %) se presentó en el medio MS con 50 % de la concentración de sales adicionado con 20 % de sacarosa. El crecimiento de las plántulas fue mayor en el medio MS con 100 % de las sales adicionado con 20 y 30 % de sacarosa. El enraizamiento se presentó en todos los tratamientos aunque el mayor número de raíces se alcanzó con 20 % de sacarosa del medio MS con 50 % de concentración de sales (Tabla 1).

Table 1. *In vitro* seed germination and seedling growth of *Anthurium schlechtendalii* subsp. *schlechtendalii* after four weeks of culture.

Tabla 1. Germinación *in vitro* y crecimiento de plántulas de *Anthurium schlechtendalii* subsp. *schlechtendalii* después de cuatro semanas de cultivo.

MS (%) + sucrose (g L ⁻¹)	Germination (%)	Plant height (cm)	Rooting (%)	Roots (Num.)
50 + 10	97.2 ^a	1.2 ^d	100 ^a	1.7 ^c
50 + 20	98.8 ^a	1.5 ^{cd}	100 ^a	1.8 ^c
50 + 30	97.2 ^a	1.7 ^c	100 ^a	1.9 ^{bc}
100 + 10	98.0 ^a	2.2 ^b	100 ^a	2.2 ^{ab}
100 + 20	96.4 ^a	2.8 ^a	100 ^a	2.4 ^a
100 + 30	96.8 ^a	3.1 ^a	100 ^a	2.3 ^{ab}
MSD	1.9	0.3	0	0.4

Averages with equal letters within each column are not statistically different (Tukey, 0.05). MSD= Minimum significant difference. MS = Murashige y Skoog. Medias con letras iguales dentro de cada columna no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). DMS = Diferencia mínima significativa; MS = Murashige y Skoog.

Germination started on the third day and ended after a week in all of the treatments (Figure 1c). After 2 weeks, the growth of the first leaf was observed and after 4 weeks, seedlings with leaves and roots were observed (Figure 1d-e). In wild species where the conservation is prioritized and where a clonal reproduction is not an objective, sexual reproduction is the most effective propagation method, because genetic variability is maintained and used. However, reproduction of *Anthurium schlechtendalii* by means of seeds in its natural habitat is complicated due to the need of birds for consuming fruits and scatter their seeds. In addition, because it is an epiphyte species, the seeds must be deposited and adhered on tree barks or rock crevices so they can germinate and grow.

The source of carbohydrates in the culture medium is indispensable for cells, tissues and organs explants because they are not completely autotrophic. However, in *in vitro* germination of seeds, sucrose effectiveness is associated to seeds maturity degree and genotype, as it has been reported in orchids (Deb & Pongener, 2011; Johnson et al., 2011; Udomdee et al., 2014). Normally sucrose is added because it contributes to maintain the osmotic potential and supplies a source of vital source of energy for the development of morphogenic processes (Yaseen et al., 2013).

In *Anthurium schlechtendalii*, sucrose concentrations of 10, 20 and 30 g L⁻¹ did not have a significant effect on *in vitro* germination and a significant effect on seedlings growth. This response is due to the fact that the seeds used the reserve substances (lipids, proteins and starch) which allowed them to germinate. However, for plants to keep on growing, a source of carbohydrate and nutrients was necessary, in this case 30 g L⁻¹ of sucrose from the MS medium with 100% concentration of salts. The growth of *Anthurium schlechtendalii* seedlings has to be vigorous for them to posteriorly serve as a source of explants in regeneration processes.

In literature, there are few scientific reports where seeds germination conditions of *Anthurium* wild species have been determined for purposes of conservation and commercial use. In all cases, MS medium with 50% concentration of salts favored germination with variations in sucrose concentration. In *A. parvispathum* Hemsl the germination was viable after six weeks, although sucrose concentration was not specified (Atta-Alla et al.,

La germinación inició al tercer día y finalizó después de una semana en todos los tratamientos (Figura 1c); a las dos semanas se observó el crecimiento de la primera hoja y después de cuatro semanas se observaron plántulas con hojas y raíces (Figura 1d-e). En especies silvestres donde se prioriza la conservación y no se busca una propagación clonal, la reproducción sexual es el método de propagación más eficiente ya que se mantiene y aprovecha la variabilidad genética. Sin embargo, la reproducción de *Anthurium schlechtendalii* mediante semillas en su hábitat natural se dificulta porque se requieren de aves que consuman los frutos y dispersen las semillas. Además, por ser una especie de hábito epífita, éstas se deben depositar y adherir sobre cortezas de árboles o grietas de rocas para que puedan germinar y crecer.

La fuente de carbohidratos en el medio de cultivo es indispensable para explantes de células, tejidos y órganos que no son totalmente autótrofos. Sin embargo, en la germinación *in vitro* de semillas la efectividad de la sacarosa se asocia con el grado de madurez de las semillas y el genotipo, como se ha reportado en orquídeas (Deb & Pongener, 2011; Johnson et al., 2011; Udomdee et al., 2014). Normalmente se agrega sacarosa porque contribuye a mantener el potencial osmótico y proporciona una fuente de energía vital para el desarrollo de los procesos morfogénicos (Yaseen et al., 2013).

En *Anthurium schlechtendalii* se observó que la concentración de 10, 20 y 30 g L⁻¹ de sacarosa no tuvo un efecto significativo sobre la germinación *in vitro* pero sí sobre el crecimiento de las plántulas. La respuesta se debe a que las semillas aprovecharon las sustancias de reserva (lípidos, proteínas y almidón) que les permitieron germinar; sin embargo, para que las plantas continuaran su crecimiento fue necesaria una fuente de carbohidratos y nutrientes, en este caso 30 g L⁻¹ de sacarosa del medio de cultivo MS con 100 % de las sales. El crecimiento de las plántulas de *Anthurium schlechtendalii* debe ser vigoroso para que después sirvan como fuente de explantes en procesos de regeneración.

En la literatura es limitado el número de reportes científicos donde se hayan determinado las condiciones de germinación de semillas de especies silvestres de *Anthurium* con fines de conservación y aprovechamiento comercial. En todos los casos el medio de cultivo MS con 50 % de concentración de sales fue el que favoreció la germinación con variaciones en el contenido de sacarosa. La germinación de *A. parvispathum* Hemsl fue viable después de seis semanas aunque no se precisa la concentración de sacarosa (Atta-Alla et al., 1998); en *A. affine* Schott la germinación también se logró adicionando 30 g L⁻¹

1998). In *A. affine* Schott germination was obtained too by adding 30 g L⁻¹ of sucrose after four weeks of culture (Oliveira De Freitas et al., 2010). In *A. antioquiense* Engl, a threatened species, 20 g L⁻¹ of sucrose favored germination after two weeks of culture (Murillo-Gómez et al., 2014); while in *A. andreaum* cv. Rubrun it was efficient with 30 g L⁻¹ of sucrose (Maira et al., 2010). In the present study, germination was favored by both concentrations of salts of MS medium, although seedlings grew better with 100% concentration of salts and 20 and 30 g L⁻¹ of sucrose.

Seeds viability

Six-months-stored seeds showed distinct responses in its capacity to germinate when they were planted in 50% concentration of salts of MS medium added with 20 g L⁻¹ of sucrose. Independently from temperature storage, viability presented a reduction, consistent over time, until being null after five months. Stored seeds at 10 °C showed germination values slightly superior to those stored at room temperature; however, they maintained the same downward trend (Table 2). This viability response is the main limiting factor for *Anthurium schlechtendalii* subsp. *Schlechtendalii* propagation since its seeds can only be efficiently used during the first month of harvests. These results confirm what producers exposed about limited viability of this species.

de sacarosa después de cuatro semanas de cultivo (Oliveira De Freitas et al., 2010). En *A. antioquiense* Engl, una especie amenazada, 20 g L⁻¹ de sacarosa favorecieron la germinación después de dos semanas de cultivo (Murillo-Gómez et al., 2014); mientras que en *A. andreaum* cv. Rubrun fue eficiente con 30 g L⁻¹ de sacarosa (Maira et al., 2010). En el presente estudio la germinación fue favorecida por las dos concentraciones de sales del medio MS, aunque las plántulas alcanzaron mejor crecimiento con 100 % de las sales y 20 y 30 g L⁻¹ de sacarosa.

Viabilidad de las semillas

Las semillas almacenadas durante seis meses mostraron diferente respuesta en la capacidad para germinar cuando se sembraron en 50 % de las sales del medio MS adicionado con 20 g L⁻¹ de sacarosa. Independientemente de la temperatura de almacenamiento, la viabilidad mostró una reducción consistente con el paso del tiempo hasta ser nula después de cinco meses. Las semillas almacenadas a 10 °C mostraron valores de germinación ligeramente superiores que las conservadas a temperatura ambiente; sin embargo, mantuvieron la misma tendencia a la baja (Tabla 2). Esta respuesta de viabilidad es la principal limitante para la propagación de *Anthurium schlechtendalii* subsp. *schlechtendalii* ya que sus semillas solo se pueden usar eficientemente durante el primer mes de cosechadas. Estos resultados confirman lo expuesto por productores sobre la viabilidad limitada de esta especie.

Table 2. Seed viability of *Anthurium schlechtendalii* subsp. *schlechtendalii* (%) during six months of storage.

Tabla 2. Capacidad de semillas de *Anthurium schlechtendalii* subsp. *schlechtendalii* para germinar (%) durante seis meses de almacenamiento.

Temperature	Month 0	Month 1	Month 2	Month 3	Month 4	Month 5	Month 6
10 °C	98.8	81.3	52.3	27.7	9.3	2.3	0
25 °C	98.8	76.3	49.7	23.3	5.7	0	0

This is the first study where seeds viability of a *Anthurium* species is reported. Viability loss in *Anthurium schlechtendalii* subsp. *Schlechtendalii* might be related to its tropical origin, since the seeds of many species growing in these climates showed a low tolerance to desiccation (recalcitrance), making its preservation difficult under conventional methods for germplasm conservation (Berjak & Pammenter, 2008; Bewley et al., 2013). Results

Este es el primer estudio donde se reporta la viabilidad de las semillas de una especie de *Anthurium*. Es probable que la pérdida de viabilidad en *Anthurium schlechtendalii* subsp. *schlechtendalii* esté relacionada con su origen tropical, ya que las semillas de muchas especies que crecen en estos climas presentan baja tolerancia a la desecación (recalcitrancia), lo que dificulta su preservación bajo métodos de conservación de germoplasma convencionales (Berjak & Pammenter, 2008;

of viability tests suggest the need for implementing new studies on conservation strategies for this kind of phyto-genetic resource.

Regeneration via organogenesis.

Shoots multiplication. All concentrations of BAP, alone or combined with IAA, induced s formation in explants (100%); however, the higher number of shoots per explant (16.3) and shoots length (4.0 mm) were promoted by the combination of 7.5 μM of BAP and 1 μM of IAA ($P \leq 0.05$) (Table 3). BAP concentrations also promoted the formation of calluses with a compact appearance at the base of the explants; its size increased as the dose in the culture medium increased, but it did not result morphogenic.

Bewley et al., 2013). Los resultados de las pruebas de viabilidad sugieren que es necesario implementar estudios sobre estrategias de conservación de este tipo de recurso fitogenético.

Regeneración vía organogénesis

Multiplicación de brotes. Todas las concentraciones de BAP, solas o combinadas con IAA, indujeron la formación de brotes en los explantes (100 %); sin embargo, el mayor número de brotes por explante (16.3) y longitud de los mismos (4.0 cm) fue promovido por la combinación de 7.5 μM de BAP y 1 μM de IAA ($P \leq 0.05$) (Tabla 3). Las concentraciones de BAP también promovieron la formación de callo de apariencia compacta en la base de los explantes; su tamaño incrementó conforme aumentó la dosis en el medio de cultivo, pero no resultó morfogénico.

Table 3. *In vitro* shoots multiplication in micro-cuttings of *Anthurium schlechtendalii* subsp. *schlechtendalii* cultured with benzylaminopurine (BAP) and idolacetic acid (IAA) after eight weeks.

Tabla 3. Multiplicación de brotes *in vitro* en microesquejes de *Anthurium schlechtendalii* subsp. *schlechtendalii* cultivados con bencilaminopurina (BAP) y ácido idolacético (IAA) después de ocho semanas.

BAP (μM)	IAA (μM)	Explants with shoots (%)	Shoots per explant (Num.)	Shoot length (cm)
2.5	-	100 ^a	6.1 ^f	1.9
5.0	-	100 ^a	7.3 ^{ef}	2.1 ^{cd}
7.5	-	100 ^a	9.2 ^{cd}	2.4 ^{bc}
10.0	-	100 ^a	6.9 ^f	2.3 ^{bc}
2.5	1	100 ^a	8.5 ^{de}	2.0 ^{cd}
5.0	1	100 ^a	9.7 ^{bc}	2.7 ^b
7.5	1	100 ^a	16.3 ^a	4.0 ^a
10.0	1	100 ^a	10.9 ^b	2.7 ^b
MSD		0	1.2	0.18

Averages with equal letters within each column are not statistically different (Tukey, 0.05). MSD= Minimum significant difference.
Medias con letras iguales dentro de cada columna no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). MSD = Diferencia mínima significativa.

The use of seeds as explants results important when studies focused on the rescue or the conservation of a phyto-genetic resource of ecological importance (threatened or endangered species). It is also valuable when the purpose is the sustainable commercial use of some species without affecting natural populations.

Studies on *in vitro* germination of *Anthurium* species are limited in literature; the common objective in the studied cases is to obtain explants to establish regeneration via organogenesis. In the current study, the purpose of obtaining *in vitro* *A. schlechtendalii* seedlings was to get explants which would be assessed in the regeneration via organogenesis from micro-cuttings.

In *A. parvispathum*, shoots regeneration was induced from explants of dissected shoots apexes of seedlings obtained from seeds; MS medium with 50% concentration of salts supplemented with 8.9 μM of BAP and 1.1 μM of NAA produced the higher quantity of shoots per explant (4.1) after six weeks of culture (Atta-Alla et al., 1998). In the case of *A. antioquiense*, Murillo-Gómez et al. (2014) induced the shoots formation using seedlings obtained from *in vitro* germinated seeds as explants; the best response of shoots per explant (23.2) was obtained in the MS medium with 50% concentration of salts added with 4.4 μM of BAP after four weeks of culture.

Results obtained in *A. parvispathum* and *A. antioquiense* differed from those achieved in the present research with *A. schlechtendalii* where the best organogenetic response (16.3 shoots per explant) was induced with 7.5 μM of BAP and 1 μM of IAA in 100% concentration of salts of MS medium (Figure 1f). Regarding the quantity of shoots produced per explant, it was also appreciated that it was different and strongly defined by genotype. In *A. andraeanum*, differences in morphogenetic response have been proved to be present at the level of cultivars, that is the reason why more than a hundred of specific protocols for *in vitro* regeneration have been developed in this species to obtain the clonal propagation of commercial cultivars (Teixeira da Silva et al., 2015).

In wild species of *Anthurium*, research on *in vitro* propagation is insufficient and more studies are required to allow defining specific conditions of culture medium and optimal plant growth regulators since it was not possible to propose a standard methodology for the species of this genus.

El empleo de semillas como explantes resulta importante cuando los estudios se enfocan al rescate o conservación de algún recurso fitogenético de importancia ecológica (amenazados o en peligro de extinción). También son valiosas cuando se desea llevar a cabo el aprovechamiento comercial de alguna especie de forma sustentable sin afectar las poblaciones naturales.

Los estudios sobre germinación *in vitro* de especies de *Anthurium* son limitados en la literatura; el objetivo común en los casos estudiados es obtener explantes para establecer la regeneración vía organogénesis. En el presente estudio la finalidad de obtener plántulas *in vitro* de *A. schlechtendalii* fue para disponer de explantes que se evaluarían en la regeneración vía organogénesis a partir de microesquejes.

En *A. parvispathum* la regeneración de brotes se indujo a partir de explantes de ápices de brotes disecados de plántulas obtenidas de semillas; el medio de cultivo MS con 50 % de concentración de sales adicionado con 8.9 μM de BAP y 1.1 μM de NAA produjo la mayor cantidad de brotes por explante con 4.1 después de seis semanas de cultivo (Atta-Alla et al., 1998). Para el caso de *A. antioquiense*, Murillo-Gómez et al. (2014) indujeron la formación de brotes usando como explantes plántulas obtenidas de semillas germinadas *in vitro*; la mejor respuesta de brotes por explante (23.2) se obtuvo en el medio de cultivo MS con 50 % de concentración de sales adicionado con 4.4 μM de BAP después de cuatro semanas de cultivo.

Los resultados obtenidos en *A. parvispathum* y *A. antioquiense* difieren de los alcanzados en la presente investigación con *A. schlechtendalii* donde la mejor respuesta organogénica (16.3 brotes por explante) se indujo con 7.5 μM de BAP y 1 μM de IAA en el medio MS con 100 % de las sales (Figura 1f). Respecto a la cantidad de brotes producidos por explante, también se apreció que fueron diferentes y están fuertemente definidos por el genotipo. En *A. andraeanum* se ha comprobado que las diferencias en las respuestas morfogénicas se presentan a nivel de cultivares, razón por la cual en esta especie se han desarrollado más de un centenar de protocolos de regeneración *in vitro* específicos para conseguir la propagación clonal de cultivares comerciales (Teixeira da Silva et al., 2015).

En especies silvestres de *Anthurium* la investigación sobre propagación *in vitro* es insuficiente y se requieren de más estudios que permitan definir las condiciones específicas de medios de cultivo y reguladores de crecimiento óptimos ya que no es posible proponer una metodología estandarizada para las especies del género.

To increase the quantity of *A. schlechtendalii* plants, two culture cycles of eight weeks each were performed in MS medium added with 7.5 μM of BAP and 1 μM of IAA. With this combination of plant growth regulators a multiplication rate similar to the obtained in initial explants of seedlings micro-cutting was maintained. Cultivated shoots produced in average 17.3 shoots in the first cycle (Figure 1g) and 15.6 in the second.

In *A. schlechtendalii*, as well as in others wild species of *Anthurium*, plants regeneration from seedlings micro-cutting represents a great advantage compared to commercial cultivars developed in *A. andraeanum*. In species of wild *Anthurium*, benefit is taken from genetic diversity, while in cultivars of *A. andraeanum*, clonal multiplication systems are required to guarantee genetic stability of agronomic traits of interest (George & Debergh, 2008). In addition many of these cultivars have lost the capacity to produce seeds.

Plants elongation and rooting. Rooting was induced in all of the treatments of culture medium; however, plant height

Para incrementar la cantidad de plantas de *A. schlechtendalii* se hicieron dos ciclos de cultivo de ocho semanas cada uno en el medio MS adicionado con 7.5 μM de BAP y 1 μM de IAA. Se observó que con esta combinación de reguladores de crecimiento se mantuvo una tasa de multiplicación similar a la alcanzada en los explantes iniciales de microesquejes de plántulas. Los brotes cultivados produjeron en promedio 17.3 brotes en el primer ciclo (Figura 1g) y 15.6 en el segundo.

En *A. schlechtendalii*, así como en otras especies silvestres de *Anthurium*, la regeneración de plantas a partir de microesquejes de plántulas representa una gran ventaja comparada con los cultivares comerciales desarrollados en *A. andraeanum*. En especies de anturios silvestres se aprovecha la diversidad genética, mientras que en los cultivares de *A. andraeanum* se requieren de sistemas de multiplicación clonal que garanticen la estabilidad genética de características agronómicas de interés (George & Debergh, 2008); además muchos de los cultivares han perdido la capacidad para generar semillas.

Alargamiento y enraizamiento de plantas. El enraizamiento se obtuvo en todos los tratamientos de medio de

Table 4. Height and rooting of plants of *Anthurium schlechtendalii* subsp. *schlechtendalii* in MS medium added with indolebutyric acid (IBA) after four weeks of culture.

Tabla 4. Alargamiento y enraizamiento de plantas de *Anthurium schlechtendalii* subsp. *schlechtendalii* en medio MS adicionado con ácido indolbutírico (AIB) después de cuatro semanas de cultivo.

MS (%)	IBA (μM)	Plant height (cm)	Rooting (%)	Roots (Num.)
50	-	5.4 ^b	100 ^a	5.0 ^a
50	1	5.7 ^b	100 ^a	5.1 ^a
100	-	7.0 ^a	100 ^a	4.8 ^a
100	1	7.3 ^a	100 ^a	4.9 ^a
MSD		0.7	0	0.9

Averages with equal letters within each column are not statistically different (Tukey, 0.05). MSD= Minimum significant difference. MS = Murashige y Skoog.

Medias con letras iguales dentro de cada columna no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). DMS = Diferencia mínima significativa; MS = Murashige y Skoog.

was higher with 100% concentration of salts of MS medium; the number of roots was not significant, but the response was slightly higher in the MS medium with 50% concentration of salts added with 1 μM of IBA ($p \leq 0.05$; Table 4; Figure 1h). Rooting initiated after the first week of culture

cultivo evaluados, sin embargo la altura de planta fue mayor con el 100 % de las sales del medio MS; el número de raíces no fue significativo, pero la respuesta fue ligeramente mayor en el medio MS con 50 % de concentración de sales adicionado con 1 μM de IBA ($p \leq 0.05$; Tabla 4; Figura

and at the fourth week, plants showed a complex system of roots in all the treatments.

Results of rooting indicated that *A. schlechtendalii* showed capacity for regenerating roots in MS medium even without addition of auxins. This response also has been commonly observed in regeneration systems of cultivars of *A. andraeanum* plants (Teixeira da Silva et al., 2015). For the phylogenetic relationship between the species of the *Anthurium* genus, rooting responses obtained in *A. schlechtendalii* were similar to those in *A. andraeanum*.

Plants acclimatization.

Plants survival rate in the process of acclimatization was 98% in peat moss and perlite (1:1) substrate after six weeks (Figure 1i). In literature, it has been reported that this stage of the *in vitro* propagation process of *Anthurium*, and specifically of *A. andraeanum*, can be performed on various substrates as mixtures of vermicompost and sand (1:3), vermiculite and perlite (1:1), soil and organic humus (1:1) with survival rates of 60% to 98% (Atak y Çelik, 2012). The mixture of peat moss and perlite (1:1) resulted efficient for the acclimatization of 95% of the plants of *A. schlechtendalii*. Nevertheless, changing plants to another substrate allowing a better airing of roots is necessary for plants to keep growing, considering it is a species presenting epiphyte growing habits.

Conclusion

A protocol for *in vitro* propagation of *Anthurium schlechtendalii* subsp. *schlechtendalii* was developed. *In vitro* germination is feasible in MS medium with 50 and 100% concentration of salts. Seeds viability can be maintained for five months maximum. Regeneration via organogenesis is established from micro-cutting of *in vitro* germinated seedlings. Shoots induction and multiplication was achieved with 7.5 µM of BAP and 1 µM of IAA. Plants elongation and rooting was obtained in MS medium with 50 and 100% concentration of salts and 1 µM of IBA. Survival rate of acclimatized plants (95%) was obtained in a mixture of peat moss and perlite (1:1) after six weeks of culture in greenhouse conditions.

References

Atak, C. & Ö. Çelik (2012) Micropropagation of *Anthurium* spp. In: Plant Science. N. Kumar D. and S. Charan S. (eds.). InTech Press, Rijeka, Croatia. pp: 241-254. <http://dx.doi.org/10.5772/51426>

1h). El enraizamiento inició a partir de la primera semana de cultivo y a la cuarta semana mostraron un sistema de raíces completo en todos los tratamientos.

Los resultados de enraizamiento indican que *A. schlechtendalii* mostró capacidad para regenerar raíces en el medio de cultivo MS aún sin la adición de auxinas. Esta respuesta también se ha observado de forma común en los sistemas de regeneración de plantas de cultivares de *A. andraeanum* (Teixeira da Silva et al., 2015). Por la relación filogenética entre las especies del género *Anthurium* es que las respuestas de enraizamiento obtenidas en *A. schlechtendalii* son similares con las de *A. andraeanum*.

Aclimatación de plantas. La supervivencia de las plantas en el proceso de aclimatación fue de 98 % en sustrato de turba (peat moss) y perlita (1:1) después de seis semanas de aclimatación (Figura 1i). En la literatura se reporta que esta etapa del proceso de propagación *in vitro* de anturios, específicamente de *A. andraeanum*, puede llevarse a cabo en varios sustratos como mezclas de vermicomposta y arena (1:3), vermiculita y perlita (1:1), suelo y humus orgánico (1:1) con tasas de supervivencia de 60% a 98% (Atak y Çelik, 2012). En *A. schlechtendalii* se observó que la mezcla de turba (peat moss) y perlita (1:1) resultó eficiente para la aclimatación de 95 % de las plantas. Sin embargo, para continuar el crecimiento es necesario cambiar las plantas a otro sustrato que permita mayor aireación de las raíces, porque se debe tomar en cuenta que es una especie de hábito de crecimiento epífita.

Conclusiones

Se desarrolló un protocolo para la propagación *in vitro* de *Anthurium schlechtendalii* subsp. *schlechtendalii*. La germinación *in vitro* es factible en medio MS con 50 y 100 % de las sales. La viabilidad de las semillas se puede mantener por un máximo de cinco meses. La regeneración vía organogénesis se establece a partir de microesquejes de plántulas germinadas *in vitro*. La inducción y multiplicación de brotes se logra con 7.5 µM de BAP y 1 µM de IAA. El alargamiento y enraizamiento de plantas se alcanza en medio MS con 50 y 100 % de concentración de sales y 1 µM de IBA. La supervivencia de plantas aclimatadas (95 %) se obtiene en mezcla de turba y perlita (1:1) después de seis semanas en invernadero.

- Atta-Alla, H., McAister, B.G. and van Staden, J. (1998) In vitro culture and establishment of *Anthurium parvispathum*. *South African Journal of Botany* 64: 296-298. https://www.researchgate.net/publication/279579277_In_vitro_culture_and_establishment_of_Anthurium_parvispathum
- Berjak, P. & Pammenter, N. W. (2008) From *Avicennia* to *Zizania*: Seed recalcitrance in perspective. *Annals of Botany* 101: 213–228. <http://dx.doi.org/10.1093/aob/mcm168>
- Bewley, J. D., Bradford, K. J., Hilhorst, H. W. and Nonogaki, H. (2013) Seeds: Physiology of development, germination and dormancy. 3rd Ed. Springer. U.S.A. 392 p. <http://www.springer.com/la/book/9781461446927>
- Croat, T. B. (1983) A revision of the genus *Anthurium* (Araceae) of Mexico and Central America. Part I: Mexico and Middle America. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 70(2): 211-420. <https://www.jstor.org/stable/pdf/2399049.pdf>
- Croat, T. B. & Acebey, A. (2015) Araceae. Flora de Veracruz. Fascículo 164. Instituto de Ecología, A.C. y Centro de Investigaciones Tropicales. Veracruz, México. 211 p. <http://www1.inecol.edu.mx/publicaciones/resumeness/FLOWER/164-AraceaeFloraVer.pdf>
- Deb, C. R. & Pongener, A. (2011) Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw.: a multipurpose orchid. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology* 20: 90–95. <http://dx.doi.org/10.1007/s13562-010-0031-4>
- George, E. F. & Debergh, P. C. (2008) Micropropagation: Uses and methods. In: Plant Propagation by Tissue Culture. Vol. 1 The Background. E. F. George, M. A. Hall and G. J. De Klerck (eds.). Springer, The Netherlands. pp: 29-64. https://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-1-4020-5005-3_2
- Johnson, T. R., Kane, M. E., and Perez, H. E. (2011) Examining the interaction of light, nutrients and carbohydrates on seed germination and early seedling development of *Bletia purpurea* (Orchidaceae). *Plant Growth Regulation* 63: 89–99. <http://dx.doi.org/10.1007/s10725-010-9516-3>
- Kamemoto, H. & Kuehne, A. R. (1996) Breeding anthuriums in Hawaii. University of Hawai'i Press. USA. 168 p.
- Kuehne, A. R., Chen, F.C. and Sugii, N. C. (2001) Transgenic *Anthurium*. In: Transgenic Crops III. Biotechnology in Agriculture and Forestry Vol. 48. Bajaj Y.P.S. (ed.) pp 3-15. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-10603-7>
- Maira, O., Alexander, M. and Vargas, T.E. (2010) Micropropagation and organogenesis of *Anthurium andraeanum* Lind cv. Rubrun. In: Jain, S.M., Ochat, S.J. (Eds.) Protocols for *in vitro* propagation of ornamental plants. Methods in Molecular Biology Vol. 589. Humana Press, New York, U.S.A. pp. 3–14. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-114-1_1
- Mayo, S., Bogner, J. and Boyce, P.C. (1997) The genera of Araceae. Royal Botanic Gardens. Kew. 370 pp. <http://cate-araceae.myspecies.info/sites/cate-araceae.myspecies.info/files/Mayo%20et%20al%201997%20ARACEAE.pdf>
- Murashige, T. & Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-493. http://priede.bf.lu.lv/grozs/AuguFiziologijas/Augu_audu_kulturas_MAG/literatura/03_Murashige%20Skoog1962.pdf
- Murillo-Gómez, P.A., Naranjo, E., Callejas, R., Atehortúa, L. and Urrea, A. (2014) Micropropagation of the native species *Anthurium antioquiense* Engl. for conservation purposes. *Agronomía Colombiana* 32(3): 334-340. <https://doi.org/10.15446/agron.colomb.v32n3.46809>
- Oliveira De Freitas, R.M., Da Silva Neto, R. V., Dallabona Dombroski, J. L., Teixeira De Oliveira, M. K., Walessa Nogueira, N. and Alves Câmara, F. A. (2010) *In vitro* germination of *Anthurium affine* Schott at half-MS strength. *Journal of New Seeds* 11: 183-189. <http://dx.doi.org/10.1080/1522886X.2010.486110>
- SAS (La Sociedad por Acciones Simplificada). (2003) The SAS system for windows. Release 9.1. SAS Institute. Cary, N.C., U.S.A.
- Teixeira da Silva, J.A., Dobránszki, J., Zeng, S., Winarto, B., Lennon, A. M., Jaufeerally-Fakim, Y. and Christopher, D. A. (2015) Genetic transformation and molecular research in *Anthurium*: progress and prospects. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 123: 205-219. <http://dx.doi.org/10.1007/s11240-015-0832-1>
- Udomdee, W., Wen, P., Lee, C., Chin, S. and Chen, F. (2014) Effect of sucrose concentration and seed maturity on *in vitro* germination of *Dendrobium nobile* hybrids. *Plant Growth Regulation* 72: 249-255. <http://dx.doi.org/10.1007/s10725-013-9856-x>
- Yaseen, M., Ahmad, T., Sablok, G., Standardi, A. and Hafiz, I. A. (2013) Review: role of carbon sources for *in vitro* plant growth and development. *Molecular Biology Report* 40: 2837-2849. <http://dx.doi.org/10.1007/s11033-012-2299-z>