

Crecimiento *in vitro* de filodendro xanadu por efecto de la concentración y relación nutrimental en el medio de cultivo

In vitro growth of philodendron xanadu by effect of the concentration and nutrimental ratio in the culture medium

Moisés Lara-Ascencio¹ , María Andrade-Rodríguez^{1*} , Oscar Gabriel Villegas-Torres¹ , Héctor Sotelo Nava¹ , José Luis Viveros-Ceballos² 

¹Posgrado en Ciencias Agropecuarias y Desarrollo Rural, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Av. Universidad 1001, 62209. Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos. México.

²Centro de Investigaciones Químicas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Av. Universidad 1001, 62209. Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos. México.

*Autor para correspondencia: maria.andrade@uaem.mx

RESUMEN

El filodendro (*Philodendron xanadu* Croat) es una planta ornamental con alto precio de venta; sin embargo, en México no se dispone de suficiente material vegetal para los productores, por lo que es necesario propagarlo *in vitro* para obtener en poco tiempo las plantas necesarias; de ahí que el objetivo de esta investigación fue evaluar varios medios de cultivo, para determinar cuál generó el mejor crecimiento de las plantas de filodendro xanadu *in vitro*, y cuál es el de menor costo que el medio Murashige y Skoog (MS). La composición nutrimental afectó el potencial osmótico, la conductividad eléctrica y el pH de los medios de cultivo y generó crecimiento variable de las plantas. El medio de cultivo 7, compuesto con macroelementos: NO_3^- , 14; H_2PO_4^- , 0.75; SO_4^{2-} , 5.25; K^+ , 8.27; Ca^{2+} , 7 y Mg^{2+} , 4.73 (me L^{-1}), microelementos: Fe, 5; B, 0.5; Mn, 0.5; Zn, 0.05; Cu, 0.045 y Mo, 0.01 (me L^{-1}) y vitaminas del medio MS (1962), generó brotes con mayor altura (4.1 cm), con 1.8 raíces, similar al medio de cultivo MS (2.03), adecuado número de hojas (8.3), acumulación de materia seca (8.8 mg) y mayor contenido relativo de clorofila (35.16 U. Spad), por lo que podría usarse para el cultivo *in vitro* de filodendro xanadu en producción comercial.

PALABRAS CLAVE

Medio Murashige y Skoog, composición nutrimental, macroelementos, microelementos.

ABSTRACT

Philodendron (*Philodendron xanadu* Croat) is an ornamental plant with a high selling price; however, in Mexico there is not enough plant material for horticulturists, so it is necessary to propagate it *in vitro* to obtain the plants required in a short time. The objective of this study was to evaluate various culture media and determine which one generated the best growth of *Philodendron xanadu* plants *in vitro*, and which one involved a lower cost than with the Murashige and Skoog (MS) medium. The nutritional composition affected the osmotic potential, electrical conductivity and pH of the culture media, and it generated variable plant growth. The culture medium consisted of seven macroelements, NO_3^- , 14; H_2PO_4^- , 0.75; SO_4^{2-} , 5.25; K^+ , 8.27; Ca^{2+} , 7 and Mg^{2+} , 4.73 (me L^{-1}); the following microelements, Fe, 5; B, 0.5; Mn, 0.5; Zn, 0.05; Cu, 0.045, and Mo, 0.01 (me L^{-1}), and vitamins of the MS medium (1962). It generated shoots with greater height (4.1 cm), with 1.8 roots, similar to those obtained with MS culture medium (2.03), an adequate number of leaves (8.3), dry matter accumulation (8.8 mg), and higher relative chlorophyll content (35.16 U. Spad), which makes it suitable for the *in vitro* cultivation of *philodendron xanadu* in commercial production.

KEYWORDS

Murashige and Skoog media, nutritional composition, macroelements, microelements.

Fecha de recepción:

26 de abril de 2022

Fecha de aceptación:

26 de abril de 2022

Disponible en línea:

26 de mayo de 2023

Este es un artículo en acceso abierto que se distribuye de acuerdo a los términos de la licencia Creative Commons.



Reconocimiento-

NoComercia-

CompartirIgual 4.0

Internacional

INTRODUCCIÓN

El filodendro es una de las especies ornamentales más importantes cultivadas en el estado de Morelos, México, donde se produce una amplia variedad de estas plantas, mismas que son utilizadas como elementos de ornato en casas y jardines; también se usan como follaje para complemento de arreglos florales (Moya-Hernández et al. 2015). La propagación de plantas para cultivo en vivero generalmente se realiza mediante semillas, esquejes, estacas, hijuelos, entre otros. Sin embargo, para la propagación de filodendro xanadu estos métodos de propagación resultan lentos e inconsistentes (Seeni et al. 2001). El filodendro xanadu se propaga *in vitro* con éxito, al igual que otras especies de este género. Además, esta técnica de propagación vegetal ofrece provisión de plantas de alta calidad y sanidad con la periodicidad deseable (Alawaadh et al. 2020; Ramírez-Rojas et al. 2016).

La formulación del medio de cultivo adecuada es esencial para el éxito en la propagación *in vitro*, debido a que éste suministra los nutrientes necesarios (minerales, vitaminas, reguladores del crecimiento, entre otros) para el desarrollo apropiado de la planta; por lo que el medio debe prepararse con la cantidad de nutrientes necesaria para satisfacer los requerimientos de cada especie (Hameg et al. 2018; Ibrahim et al. 2008). El medio de cultivo MS (Murashige y Skoog 1962) es el más utilizado porque ha generado buenos resultados para la micropropagación de diversas especies (George et al. 2008); éste es considerado como un medio alto en sales (Bell et al. 2009), por lo que su potencial osmótico es más negativo. La composición del medio de cultivo afecta la fisiología de los tejidos y órganos que se cultivan *in vitro* porque algunos elementos pueden ser tóxicos, como el nitrógeno (Alanagh et al. 2014; Gago et al. 2011; Hameg et al. 2018). Con relación a esto, Parada y Villegas (2009) indican que el cloruro de calcio es considerado tóxico para especies leñosas, motivo por el cual reformularon una modificación al medio WPM para el cultivo de *Prunus* spp., el cual carece de cloruro de calcio.

En la propagación de cualquier especie, por lo general se usa sólo un tipo de medio de cultivo para las diferentes fases de la micropropagación, aunque la formulación puede ser inadecuada para alguna de las etapas de crecimiento y desarrollo del explante

(Adelberg et al. 2013), debido a que cada órgano de la planta tiene diferentes requerimientos de nutrientes durante su crecimiento (El-Hawaz et al. 2015). Mesa (2003) y Ružić et al. (2000) mencionan que la disminución de los procesos morfogénicos y la toxicidad se deben, entre otros factores, a los desbalances iónicos y relaciones nutricionales del medio de cultivo. Además, la respuesta de los tejidos y las células a los reguladores del crecimiento se ve afectada por estos desequilibrios nutricionales (Kothari et al. 2004; Ramage y Williams 2002).

Actualmente, se han propuesto distintos protocolos para la micropropagación de algunas especies del género *Philodendron*, que incluyen el establecimiento del cultivo aséptico, la multiplicación y el enraizamiento, donde el medio de cultivo más utilizado es el MS (Alanagh et al. 2014; Alawaadh et al. 2020; Chen et al. 2012; Hassan et al. 2016). No obstante, para algunas especies, el medio MS se ha considerado inadecuado (Greenway et al. 2012; Nezami-Alanagh et al. 2017).

Las plantas que crecen en ambientes naturales absorben los nutrientes a través de las raíces, en tanto que las plantas cultivadas *in vitro* por lo general carecen de un sistema radical, por lo que se nutren únicamente por medio de células no especializadas para la absorción de nutrientes (Leifert et al. 1995). Por lo anterior, es importante tener un balance y concentración nutrimental adecuado y fácilmente disponible para propiciar la absorción mineral. La formulación nutrimental propuesta por Steiner (1984) señala que las características químicas de una solución nutritiva, tales como: la relación mutua de cationes, la relación mutua de aniones, la concentración iónica total, la conductividad eléctrica y el pH, tienen alto efecto en el crecimiento, rendimiento y calidad de las plantas. Estas características también se presentan en los medios de cultivo que se preparan para la propagación *in vitro*, por lo que podría considerarse también como una modalidad de hidroponía, pero en condiciones asépticas. Esta forma de propagación implica costos más elevados en comparación con la propagación convencional, pues se requiere de equipo especializado y una formulación de medio de cultivo específico, que en la mayoría de plantas ornamentales es el medio Murashige y Skoog (1962), cuyo costo por concepto de macro y micronutrientes es de aproximadamente 36 pesos (2 dólares) por litro de medio de cultivo.

Con base en la importancia del filodendro y el interés de generar medios alternativos para su cultivo *in vitro*, el objetivo de esta investigación fue evaluar los efectos del medio de cultivo elaborado con diferentes relaciones y concentraciones de nutrimentos, empleando la metodología propuesta por Steiner (1984), para identificar combinaciones de minerales *in vitro* que promuevan buen crecimiento de plantas de filodendro xanadu y a la vez sean de menor costo que el medio MS.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron plantas de filodendro xanadu cultivadas *in vitro* con longitud de 20 ± 2 mm, tres hojas jóvenes, sin brotes, sin raíces y de tamaño uniforme entre ellas. Se prepararon once medios de cultivo; nueve de ellos se generaron modificando la concentración y relación de macro y micro nutrimentos, tomando como base la metodología de Steiner (1984); los otros dos medios fueron Murashige y Skoog (1962; MS) a 100 y 50 por ciento de concentración de macro y micronutrientes (Cuadro 1 y 2).

Los nueve medios de cultivo diseñados a partir de la metodología de Steiner se prepararon con fertilizantes comerciales altamente solubles para hidroponía: $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, KNO_3 , K_2SO_4 , KH_2PO_4 y $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, con agua destilada. Los microelementos fueron: H_3BO_3 , $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{H}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, grado reactivo en las concentraciones (me L^{-1})

siguientes: Fe, 5; B, 0.5; Mn, 0.5; Zn, 0.05; Cu, 0.045 y Mo, 0.01; el Fe se proporcionó como Fe-EDTA del producto comercial Librel FeLo® (Ciba Especialidades Químicas México, S.A. de C.V.). Los once medios de cultivo fueron suplementados con tiamina, glicina, piridoxina, ácido nicotínico (0.5 mg L^{-1}) y mioinositol (100 mg L^{-1}). El pH fue ajustado a 5.7; como agente gelificante se usó 0.75 por ciento de agar Merck® (Alemania). Se usaron frascos de 100 mL de capacidad con 20 mL de medio de cultivo en cada uno. El medio se esterilizó durante 18 min en autoclave vertical (sin marca, fabricación mexicana) a 1.2 kg cm^{-2} y $120 \text{ }^\circ\text{C}$.

Una vez que el medio estuvo preparado, en cada uno de los frascos de los once medios de cultivo se colocaron cinco brotes de filodendro xanadu. Los frascos de cultivo se establecieron en una cámara de crecimiento con temperatura de $28 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, fotoperiodo de 16 h de iluminación y 8 de oscuridad, e intensidad luminosa de $32 \text{ } \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, por 50 días.

Potencial osmótico (PO), conductividad eléctrica (CE) y pH

En cada medio de cultivo se determinó la conductividad eléctrica (potenciómetro Hanna HI 8424, Hanna Instruments, Ciudad de México, México) y el potencial osmótico (Osmómetro Löser Messtechnik® Tipo 6, Berlín, Alemania), tanto al finalizar la preparación del medio de cultivo, como después de la esterilización en la autoclave (Cuadro 3).

Cuadro 1. Composición química de los medios de cultivo para crecimiento *in vitro* de filodendro xanadu.

Medio de cultivo	Concentración relativa de iones ($\text{me} \times \text{L}^{-1}$)							
	NO_3^-	H_2PO_4^-	SO_4^{2-}	Cl^-	K^+	Ca^{2+}	Mg^{2+}	NH_4^+
1	10.00	1.25	8.75	-	8.27	7.00	4.73	-
2	10.00	1.25	8.75	-	7.00	9.00	4.00	-
3	10.00	1.25	8.75	-	5.73	11.00	3.27	-
4	12.00	1.00	7.00	-	8.27	7.00	4.73	-
5	12.00	1.00	7.00	-	7.00	9.00	4.00	-
6	12.00	1.00	7.00	-	5.73	11.00	3.27	-
7	14.00	0.75	5.25	-	8.27	7.00	4.73	-
8	14.00	0.75	5.25	-	7.00	9.00	4.00	-
9	14.00	0.75	5.25	-	5.73	11.00	3.27	-
MS 100 %	39.40	1.00	1.50	3.00	19.80	3.00	1.50	20.60
MS 50 %	19.70	0.50	0.75	1.50	9.90	1.50	0.75	10.30

Cuadro 2. Concentración nutrimental (mg L⁻¹) de once medios de cultivo para el crecimiento in vitro de filodendro xanadu.

Nutrientos	MS 100%	MS 50%	1	2	3	4	5	6	7	8	9
NH ₄ NO ₃	1650	825	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ca (NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	-	-	257	338	360	257	338	419	257	338	419
KNO ₃	1900	950	148	32	-	266	149	32	383	266	149
K ₂ SO ₄	-	-	271	315	271	164	209	253	58	102	147
MgSO ₄	370	185	200	166	131	200	166	131	200	166	131
KH ₂ PO ₄	170	85	146	146	146	117	117	117	88	88	88
CaCl ₂ ·7H ₂ O	440	220	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	37.2	18.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FeEDTA	-	-	5	5	5	5	5	5	5	5	5
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.8	13.9	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H ₃ BO ₃	6.2	3.1	2.88	2.88	2.88	2.88	2.88	2.88	2.88	2.88	2.88
H ₂ MoO ₄	-	-	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
MnSO ₄ · 4H ₂ O	22.3	11.15	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	8.6	4.3	0.22	0.22	0.22	0.22	0.22	0.22	0.22	0.22	0.22
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.250	0.125	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.025	0.012	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.025	0.012	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KI	8.3	4.15	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MnCl ₂ · 4H ₂ O	-	-	1.81	1.81	1.81	1.81	1.81	1.81	1.81	1.81	1.81
Total (mg)	4640.7	2320.349	1032.11	1007.11	918.11	1014.11	989.11	962.11	996.11	970.11	944.11
Costo(\$)/L	42	21	0.102	0.101	0.097	0.090	0.089	0.088	0.078	0.077	0.076

MS: medio Murashige & Skoog (1962), \$: pesos mexicanos

Diseño experimental

Se estudiaron once tratamientos con seis repeticiones en un diseño experimental completamente al azar. La unidad experimental estuvo conformada por un frasco de 100 mL de capacidad con 20 mL de medio de cultivo y cinco brotes por frasco.

Variables morfológicas

Transcurridos 50 días del establecimiento del experimento, se evaluó la altura de brotes (desde la base hasta la parte superior, con hoja milimétrica), hojas por planta, raíces por planta, longitud de raíz (con hoja milimétrica) y materia seca (mg) (balanza analítica); los brotes se colocaron en bolsas de papel estraza en un horno con circulación forzada de aire a una temperatura de 70 °C durante 72 h, para posteriormente pesar

en balanza analítica (LUZEREN FA2204B, Chemical Guilps S.A. de C.V., México).

Contenido de clorofila y carotenoides

El contenido de clorofila se determinó por dos métodos: contenido relativo de clorofila en unidades Spad (SPAD 502DL Plus Spectrum®, Spectrum Technologies Inc., Reino Unido), tomando el valor promedio de tres hojas de vida intermedia); con el segundo método se determinaron la clorofila *a*, *b* y carotenoides; se utilizaron las mismas hojas, en las cuales se determinó la clorofila con el SPAD; asimismo, se usó un espectrofotómetro GENESYS 10S UV (Thermo Scientific, Madison, Estados Unidos) y se empleó la metodología propuesta por Rodés-García y Collazo-Ortega (2006), modificada de acuerdo con el volumen final del extracto filtrado. De cada tratamiento se tomó una muestra de 0.1 g de

tejido fresco de hojas, se adicionaron 10 mL de acetona a 80 por ciento fría y se maceró por 30 s a 14,000 rpm con un homogeneizador ULTRA TURRAX T8 (IKA®, IKA, Wilmington, Estados Unidos). Las muestras se pasaron por papel filtro y se almacenaron en viales ámbar hasta su evaluación. El espectrofotómetro se ajustó a 645, 663 y 440.5 nm para medir la clorofila *a*, clorofila *b* y carotenoides, respectivamente. Como blanco se utilizó acetona a 80 por ciento y celdas de cuarzo rectangulares de 10 mm (Thomas Scientific, Swedesboro, Estados Unidos), las cuales se limpiaron con agua destilada entre cada muestra evaluada.

La concentración de pigmentos en mg L⁻¹ se obtuvo mediante las siguientes ecuaciones:

$$\begin{aligned} \text{Ca (mg L}^{-1}\text{)} &= 12.7 (A_{663}) - 2.69 (A_{645}), \\ \text{Cb (mg L}^{-1}\text{)} &= 22.9 (A_{645}) - 4.68 (A_{663}), \\ \text{C a+b (mg L}^{-1}\text{)} &= 20.2 (A_{645}) + 8.02 (A_{663}), \\ \text{Ccar (mg L}^{-1}\text{)} &= 4.695 (A_{440.5}) - 0.268 (C \text{ a+b}) \end{aligned}$$

Donde: A_{645} = Absorbancia a 645 nm; A_{663} = Absorbancia a 663 nm; $A_{440.5}$ = Absorbancia a 440.5 nm; Ca = Concentración de clorofila *a*; Cb = Concentración de clorofila *b*; C a+b = Concentración total de clorofila; Ccar = Concentración de carotenoides.

Los datos del experimento se estudiaron mediante análisis de varianza (ANOVA) y en las variables donde hubo efecto de tratamientos se realizó la prueba de comparación de medias DMS ($P \leq 0.05$) con el paquete estadístico SAS System versión 9.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Potencial osmótico (PO), conductividad eléctrica (CE) y pH

La composición nutrimental de los medios de cultivo repercutió en el potencial osmótico, conductividad eléctrica y potencial de hidrogeno, antes y después del proceso de esterilización (Cuadro 3). El PO de los medios de cultivo fue menos negativo después de esterilizar el medio; los medios de cultivo 5 y MS 100% tuvieron el PO más negativo antes y después de ser esterilizados. Los valores observados después de la esterilización son los que tendrán efecto en el crecimiento de los brotes. El cambio en PO puede deberse a que los azúcares disacáridos como la sacarosa, se hidrolizan en monosacáridos (glucosa y fructuosa) durante la esterilización, y éste tiende a ser más negativo conforme se aumenta la concentración de alguna fuente de carbono como sacarosa, glucosa, manitol, sorbitol o mioinositol (Cárdenas y Villegas 2002). De acuerdo con estos autores, el PO menos negativo y la alta disponibilidad de agua pueden causar hiperhidratación. Sin embargo, en las plantas cultivadas en el medio 8 con el PO menos negativo de todos (-0.177 MPa) (Cuadro 3) no se observaron problemas de hiperhidratación.

De acuerdo con Pierik y Steegmans (1975), el crecimiento y organogénesis *in vitro* se detienen si el potencial osmótico es más negativo que -0.3 Mpa,

Cuadro 3. PO, CE y pH de once medios de cultivo, evaluados en el crecimiento de filodendro xanadu.

Medio de cultivo	Antes de esterilizar			Después de esterilizar		
	PO (MPa)	CE (mV)	pH	PO (MPa)	CE (mV)	pH
1	-0.223	64.8	5.7	-0.215	64.6	6.0
2	-0.220	66.0	5.7	-0.211	55.2	6.0
3	-0.303	65.0	5.7	-0.288	61.7	6.0
4	-0.303	64.0	5.7	-0.296	57.2	6.0
5	-0.406	62.8	5.7	-0.402	66.0	5.9
6	-0.294	62.6	5.7	-0.283	63.0	6.0
7	-0.206	51.4	5.7	-0.195	46.0	6.1
8	-0.188	50.9	5.7	-0.177	63.0	6.0
9	-0.215	54.9	5.7	-0.211	59.8	6.0
(MS 100%)	-0.345	72.0	5.7	-0.335	97.0	5.4
(MS 50%)	-0.299	68.0	5.7	-0.288	67.0	5.8

PO: potencial osmótico, CE: conductividad eléctrica, pH: potencial de hidrógeno.

porque la planta absorbe poca agua del medio de cultivo. No obstante, en esta investigación se observó que con el potencial osmótico más negativo (medios de cultivo 5 y MS 100% con -0.402 y -0.335 Mpa, respectivamente), el crecimiento de las plantas no se detuvo. Al respecto, Raya et al. (2009) reportan que el mejor enraizamiento (97%) de plantas de *Vitis* sp. se obtuvo en un medio de cultivo con PO de -0.69 MPa.

El PO es uno de los componentes del potencial del agua que varía en función del cambio de las propiedades físicas y químicas debido a la presencia de solutos (Larque-Saavedra y Trejo-López 1990) y fuentes de carbono (Cárdenas y Villegas 2002). Molinos et al. (2004) indican que el potencial osmótico del medio de cultivo también es determinante para la morfogénesis *in vitro*, aunque no se considera en la mayoría de las investigaciones realizadas con esta técnica de cultivo.

La CE varió de 46 a 97 mV en los medios MS 100 y 50% y fue mayor que la de los nueve medios formulados con base en la metodología de Steiner (1984), antes y después del autoclaveo. Después de la esterilización, la CE de los medios 1, 2, 3, 4, 7 y MS 50% fue menor, mientras que en los medios 5, 6, 8, 9 y MS 100% se incrementó (Cuadro 3). La menor CE de los nueve medios diseñados con base en Steiner (1984) indica que la cantidad de sales que se les añadió fue menor, incluso que las usadas para el medio MS 50%. Bell et al. (2009) han definido al medio MS como rico en sales, de ahí que su potencial osmótico es más negativo. Navarro et al. (2000) mencionan que la salinidad reduce el transporte de agua y asimilación de nutrientes.

Respecto al pH, después de la esterilización, éste tendió a elevarse en la mayoría de los medios; sin embargo, en el medio MS 100% disminuyó (Cuadro 3). Estos resultados concuerdan con Chen et al. (2014), quienes mencionan que el pH en el medio por lo general tiende a elevarse después de la esterilización, lo que se atribuye a los componentes del medio, los cambios que ocurren por el proceso de calentamiento (autoclave), intercambio iónico y condiciones ambientales; también informan que la necrosis puede ser causada por deficiencia nutrimental inducida por un pH bajo. En esta investigación, el pH del medio tuvo efectos significativos importantes en el crecimiento de los brotes de filodendro xanadu; la mayor altura de brotes y número de raíces ocurrió en el medio de cultivo 7 que tuvo pH final de 6.1. Estos resultados son similares a los obtenidos por Sharma et al. (2018), quienes observaron que hubo mayor crecimiento y multiplicación de brotes de *Saccharum officinarum* L. en medios de cultivo MS ajustados a pH 6.0. Por su parte, Yaacob et al. (2014) reportaron que para la regeneración *in vitro* de *Citrus assamensis* S.Dutta & S.C.Bhattacharya fue adecuado el pH 5.8 en medio MS. George et al. (2008) mencionan que esta característica del medio de cultivo está relacionada con la absorción de nutrientes, porque el pH facilita o inhibe la disponibilidad en el medio.

Con base en los resultados obtenidos en este trabajo, y de acuerdo con Sharma et al. (2018) y Chen et al. (2014), se ha demostrado que el pH del medio de cultivo es muy importante para muchos aspectos del desarrollo y crecimiento de explantes, y que la tolerancia a determinado valor de pH varía según la especie. Chen et al. (2014) sugieren subcultivar cada 21 días, para tener medio de cultivo fresco, pH estable y crecimiento del explante adecuado.

Con base en los resultados obtenidos en este trabajo, y de acuerdo con Sharma et al. (2018) y Chen et al. (2014), se ha demostrado que el pH del medio de cultivo es muy importante para muchos aspectos del desarrollo y crecimiento de explantes, y que la tolerancia a determinado valor de pH varía según la especie. Chen et al. (2014) sugieren subcultivar cada 21 días, para tener medio de cultivo fresco, pH estable y crecimiento del explante adecuado.

VARIABLES MORFOLÓGICAS

La composición de los medios de cultivo tuvo efecto significativo ($P \leq 0.05$) en el número de hojas y formación de raíces, y altamente significativo para la altura de brotes y para el crecimiento en longitud de las raíces de filodendro xanadu; lo anterior puede atribuirse a la variación en balance y relación iónica, y con ello también al PO y pH de los medios de cultivo. Las plantas que crecieron en el medio de cultivo 7 fueron las de mayor altura (41.8 mm) (Figura 1), seguidas por aquellas cultivadas en el medio 9 (38 mm); las plantas de estos dos medios tuvieron 22.5 y 15.8 por ciento mayor crecimiento que las cultivadas en el medio MS 100%; en contraste, las plantas cultivadas en el medio de cultivo 1 fueron las de menor altura (26.9 mm) (Cuadro 4).

El número de hojas por planta fue mayor en el medio MS 50%, seguido por las de los medios 3, 4, 5 y 6, sin diferencias estadísticas entre ellos; en contraste, el menor número de estos órganos ocurrió en las plantas del medio 1 (Cuadro 4), donde las hojas de los brotes cultivados en los medios 7, 8 y 9 fueron cualitativamente de color más verde, que las de los otros tratamientos.

También se observaron diferencias significativas en el número de raíces por planta. Los medios MS 100%, 3 y 7 generaron el mayor número de raíces,

en tanto que los medios de cultivo 2, 5, 6 y MS 50% produjeron valores estadísticamente iguales entre sí y similares a las de los tres medios anteriores. En contraste, las plantas cultivadas en el medio 8 produjeron



Figura 1. Plántula de filodendro xanadu cultivada en medio de cultivo elaborado con fertilizantes comerciales grado no reactivo.

la menor cantidad de raíces. En cuanto a la longitud de raíz, ésta se vio favorecida en el medio MS 100%, seguida de las plantas cultivadas en el medio MS 50%; la menor longitud se observó en los medios 6 y 8. El medio de cultivo que propició mayor crecimiento de la raíz en cuanto a número y longitud fue el MS 100%, seguido por el MS 50% (Cuadro 4). Estos resultados coinciden parcialmente con Jirakiattikul y Limpradithtanont (2006), quienes reportan que el desarrollo de raíz en brotes de filodendro xanadu ocurre bien en el medio de cultivo MS en su concentración total o a 50 por ciento, ya sea con la suplementación de auxinas o en ausencia de éstas. No obstante, emplear el medio de cultivo a una menor concentración puede ocasionar aporte de cantidades inadecuadas de nutrientes indispensables para el desarrollo y crecimiento del explante (Adelberg et al. 2013).

Raya et al. (2009) reportan resultados similares en plantas *in vitro* de *Vitis* sp., donde el mayor enraizamiento (97%) ocurrió en el medio de cultivo con el PO más negativo (-0.69 MPa), sin indicar anomalías en las raíces; sin embargo, un PO tan negativo podría ser perjudicial para el crecimiento y desarrollo (Pierik y Steegmans 1975). Los resultados obtenidos en esta investigación — así como lo reportado por otros investigadores — muestran que la tolerancia de explantes a ciertas características de los medios de cultivo varía según la especie en cuestión.

Cuadro 4. Efecto de la composición del medio de cultivo en el crecimiento de plantas de filodendro xanadu.

Medio de cultivo	Concentración relativa de iones ($\text{me}\times\text{L}^{-1}$)								Características de brotes			
	NO_3^-	H_2PO_4^-	SO_4^{2-}	Cl^-	K^+	Ca^{2+}	Mg^{2+}	NH_4^+	Altura (mm)	Hojas (núm.)	Raíces (núm.)	Long. Raíz (cm)
1	10.0	1.25	8.75	-	8.27	7.0	4.73	-	26.9 d	7.2 c	1.53 abc	20.1 cd
2	10.0	1.25	8.75	-	7.00	9.0	4.00	-	34.3 bc	7.7 bc	1.76 ab	21.2 bc
3	10.0	1.25	8.75	-	5.73	11.0	3.27	-	33.8 bc	8.9 ab	1.83 a	17.7 cde
4	12.0	1.00	7.00	-	8.27	7.0	4.73	-	33.4 c	8.8 ab	1.53 abc	17.4 cde
5	12.0	1.00	7.00	-	7.00	9.0	4.00	-	32.6 c	8.9 ab	1.60 ab	15.5 de
6	12.0	1.00	7.00	-	5.73	11.0	3.27	-	32.0 c	8.6 ab	1.60 ab	14.8 e
7	14.0	0.75	5.25	-	8.27	7.0	4.73	-	41.8 a	8.3 abc	1.83 a	16.9 cde
8	14.0	0.75	5.25	-	7.00	9.0	4.00	-	31.3 c	8.3 abc	1.13 c	15.0 e
9	14.0	0.75	5.25	-	5.73	11.0	3.27	-	38.0 ab	7.6 bc	1.33 bc	16.9 cde
MS 100%	39.4	1.00	1.50	3.0	19.80	3.0	1.50	20.6	32.4 c	8.3 abc	2.03 a	35.8 a
MS 50%	19.7	0.50	0.75	1.5	9.90	1.50	0.75	10.3	30.8 cd	9.7 a	1.73 ab	25.6 b
DMS ($P \leq 0.05$)									0.38	0.24	0.20	1.81

DMS: diferencia mínima significativa. Medias con letras iguales en una columna no son estadísticamente diferentes de acuerdo con la prueba LSD ($P \leq 0.05$).

Ibrahim et al. (2008), quienes evaluaron el efecto de los minerales del medio MS en diferentes niveles sobre el crecimiento y desarrollo de *Stevia* sp., sugieren que el mejor medio de cultivo fue el MS 100% o modificando la cantidad (mg L^{-1}) de varios componentes (NH_4NO_3 a 1237.5, KNO_3 a 950, Mg SO_4 a 185, $\text{CaCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ a 440 y KH_2PO_4 a 85); asimismo, indican que la concentración de cloruro de calcio es muy importante para disminuir o prevenir la necrosis de la punta del brote. De acuerdo con estos autores, el paso más importante para obtener un medio de cultivo adecuado para tejidos vegetales es la selección de iones macronutrientes en una concentración y equilibrio correctos. Los elementos secundarios o mesos (CaCl_2 , MgSO_4 y KH_2PO_4) también ejercen efectos importantes en el crecimiento. Al respecto, Poothong y Reed (2015) estudiaron el crecimiento y desarrollo de brotes de cinco cultivares de frambuesa roja y determinaron que la mejor concentración de estos compuestos fue 2.5 o 3.0 veces la concentración de MS.

El medio de cultivo más utilizado en la propagación *in vitro* es el Murashige y Skoog (1962). Sin embargo, este medio fue diseñado para un desarrollo óptimo de callos de tabaco (George et al. 2008). De acuerdo con los resultados obtenidos en esta investigación, y tras evaluar el efecto que tiene el medio MS y los medios de cultivo diseñados con base en la relación mutua entre cationes y aniones y la concentración de éstos sobre el crecimiento de brotes de filodendro

xanadu, se puede decir que el medio MS genera amplia variación de efectos en función de la especie: desde plantas que crecen bien, hasta aquellas que presentan efectos de toxicidad o desordenes fisiológicos. Los resultados de este trabajo también demuestran que los medios de cultivo con menor concentración de nutrientes, pero con una relación mutua entre cationes y aniones no limitaron el crecimiento de brotes de filodendro xanadu y que éstos pueden crecer bien en medio de cultivo preparado con nutrimentos grado no reactivo, lo cual podría disminuir los costos de producción mediante esta técnica de propagación.

Respecto a la acumulación de materia seca, las plantas cultivadas en el medio de cultivo 2 tuvieron la mayor acumulación (11 mg), seguidas de aquellas cultivadas en el MS 100% (10 mg); en contraste, la menor acumulación de materia seca (50% menos) ocurrió en aquellas cultivadas en el medio 8. Los brotes cultivados en los medios 3, 4 y 7 tuvieron crecimiento similar entre ellos y fue de 16 a 25 por ciento menor que el obtenido en las plantas cultivadas en el medio 2 (Figura 2). Molinos et al. (2004) obtuvieron resultados parcialmente similares: la mayor cantidad de biomasa seca de *Vitis* sp. se obtuvo en las plantas cultivadas en el medio de cultivo cuyo PO fue menos negativo, aunque en esta investigación el PO del medio de cultivo 2 fue el tercero menos negativo (-0.211), al igual que en el medio de cultivo 9.

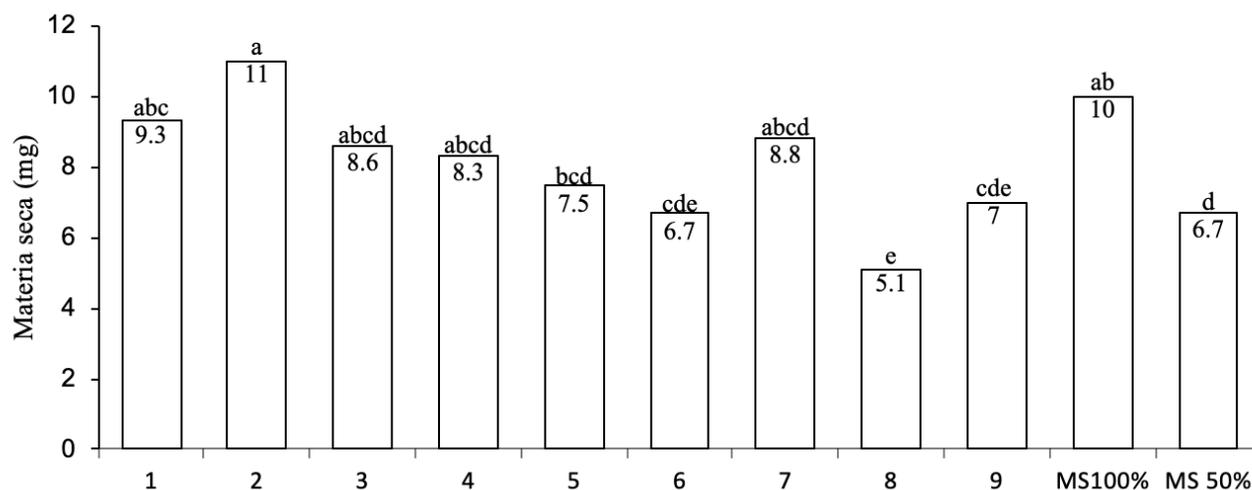


Figura 2. Efecto de medio de cultivo en la acumulación de materia seca de plantas de filodendro xanadu.

Contenido de clorofila y carotenoides

Los brotes de filodendro xanadu presentaron diferencias en la producción de pigmentos por efecto de la composición del medio de cultivo. Las plantas cultivadas en el medio 7 y 8 tuvieron el mayor contenido relativo de clorofila (CRC) en las hojas, con 35 y 36 unidad SPAD, respectivamente, seguidas de las plantas cultivadas en los medios 4, 5 y 6 que fueron estadísticamente iguales entre sí, con 33.33, 34.33 y 34.83 unidades; el menor contenido de clorofila se cuantificó en las plantas cultivadas en los medios 1, 2 y 3 (Cuadro 5).

En la cuantificación de pigmentos mediante cromatografía, las plantas cultivadas en el medio MS 100% fueron las que tuvieron la mayor concentración de clorofila *a* y clorofila total con 15.75 y 23.04 mg respectivamente, mientras que las plantas que crecieron en el medio MS 50% tuvieron mayor concentración de clorofila *b*. La mayor concentración de carotenoides (3.80 mg) se cuantificó en las plantas que crecieron en el medio de cultivo 2, seguidas por las de medio MS 100% con 3.66 mg; por el contrario, las plantas que tuvieron la menor concentración fueron aquellas cultivadas en el medio de cultivo 1 (2.09 mg) (Cuadro 5). La cloro-

fila *a* se presentó en mayor cantidad que la clorofila *b* y carotenoides.

Respecto al contenido relativo de clorofila determinado mediante Spad y clorofilas mediante cromatografía, se pudo observar que, a medida que se incrementó la cantidad de nitrógeno de 10 a 12 $\text{me}\times\text{L}^{-1}$ de NO_3^- , en los medios de cultivo formulados con base en la formulación de Steiner (1984), se cuantificó mayor cantidad de pigmentos en el tejido, pues, al aumentar a 14 $\text{me}\times\text{L}^{-1}$, la cantidad de clorofilas fue menor. Los medios de cultivo con menor contenido de nitrato (10 $\text{me}\times\text{L}^{-1}$) y ausencia de amonio produjeron menor cantidad de clorofila *a* y clorofila total (por los dos métodos), a consecuencia del menor contenido de nitrógeno, mismo que forma parte de la molécula de clorofila (George et al. 2008).

Aunque el medio de cultivo MS 100% fue sobresaliente en el número de raíces, longitud de raíz, clorofila *a* y *b*, así como en contenido de carotenoides, no promovió un crecimiento adecuado porque las plantas establecidas en este medio presentaron poca altura, amarillamiento temprano en hojas maduras, peciolo compactos y engrosamiento de la base del tallo. De acuerdo con algunos autores, estas características se deben probablemente al efecto tóxico generado por la

Cuadro 5. Efecto de medio de cultivo en la producción de pigmentos en plantas de filodendro xanadu.

Medio de cultivo	CRC (U. Spad)	Clorofila <i>a</i>	Clorofila <i>b</i>	Clorofila total	Carotenoides
		(mg L ⁻¹)			
1	26.23 d	4.98 d	2.53 c	7.51 d	2.09 c
2	26.00 d	5.13 d	0.44 d	5.57 d	3.80 a
3	27.00 d	10.00 c	5.63 ab	15.64 c	2.27 bc
Promedio	26.61	6.70	2.86	9.57	2.72
4	33.33 ab	13.16 b	7.04 ab	20.20 ab	3.08 abc
5	34.33 ab	11.62 bc	5.62 ab	17.24 bc	2.90 abc
6	34.83 ab	12.91 b	6.29 ab	19.20 abc	2.22 bc
Promedio	34.16	12.56	6.31	18.88	2.73
7	35.16 a	12.18 bc	6.08 ab	18.26 bc	3.13 abc
8	36.83 a	11.36 bc	5.45 b	16.81 bc	2.81 abc
9	30.16 bcd	12.45 bc	5.75 ab	18.19 bc	3.14 abc
Promedio	34.05	11.99	5.76	17.75	3.02
MS 100%	32.83 abc	15.75 a	7.29 ab	23.04 a	3.66 ab
MS 50%	28.00 cd	11.09 bc	7.47 a	18.57 bc	2.31 bc
DMS ($P \leq 0.05$)	4.64	2.55	1.98	3.96	1.46

DMS: diferencia mínima significativa. Medias con letras iguales en una columna no son estadísticamente diferentes de acuerdo con la prueba LSD ($P \leq 0.05$).

captación y acumulación de iones (Mesa 2003), como resultado del alto contenido de solutos en el medio (Alanagh et al. 2014), desbalance iónico e inapropiadas relaciones de nutrimentos, así como por el estrés hídrico debido al potencial osmótico más negativo (Mesa 2003; Molinos et al. 2004; Ružić et al. 2000), lo cual puede contribuir a que el metabolismo vegetal estimule la liberación de compuestos fitotóxicos capaces de oxidar (Türkan y Demiral 2009).

Como se observó en esta investigación, el medio de cultivo MS 100%, de manera general, no favoreció el crecimiento del tallo de las plantas de filodendro xanadu, aunque algunos autores reportan la utilización de este medio sin mencionar algún tipo de problema fisiológico o de crecimiento en otras especies del mismo género (Alawaadh et al. 2020; Chen et al. 2012; Hassan et al. 2016); de acuerdo con los resultados, el medio MS podría ser una buena alternativa para la fase de enraizamiento de especies de este género que presenten poco desarrollo de raíz.

Como se observó en los resultados, el crecimiento de filodendro xanadu fue similar o mejor al que se obtuvo en el medio MS, pero con al menos 95.8 por ciento menor costo, por concepto de macro y micronutrimentos. Esto es importante, pues en la producción comercial permitirá tener mayor margen de ganancia en la propagación *in vitro*.

CONCLUSIONES

El uso de medios de cultivo elaborados con diferentes relaciones y concentraciones de nutrimentos de la solución Steiner permitió el crecimiento *in vitro* de plantas de filodendro xanadu con la misma o mayor eficiencia que el medio de cultivo convencional Murashige y Skoog, de tal modo que el medio 7 (14, 0.75, 5.25, 8.27, 7 y 4.73 me L⁻¹) y medio 2 (10, 1.25, 8.75, 7, 9 y 4 me L⁻¹) de NO₃⁻, H₂PO₄⁻, SO₄²⁻, K⁺, Ca²⁺ y Mg²⁺, microelementos Fe, 5; B, 0.5; Mn, 0.5; Zn, 0.05; Cu, 0.045 y Mo, 0.01 me L⁻¹, y vitaminas del medio MS podrían ser una alternativa al medio MS. La sustitución de nutrimentos grado reactivo por el uso de fertilizantes comerciales para la preparación del medio de cultivo permitió el crecimiento *in vitro* de filodendro xanadu y redujo los costos de producción de esta técnica de propagación.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al CONACyT el apoyo proporcionado al primer autor mediante la beca de doctorado número 702278/584433.

LITERATURA CITADA

- Adelberg J, Driesse T, Halloran S, Bridges WC. 2013. Relationships between nutrients and plant density in liquid media during micropropagation and acclimatization of turmeric. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 49: 724-736 <https://doi.org/10.1007/s11627-013-9576-y>
- Alanagh EN, Garoosi GA, Maleki RS, Landín M, Gallego PP. 2014. Design of tissue culture media for efficient *Prunus* rootstock micropropagation using artificial intelligence models. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 117: 349-359. <https://doi.org/10.1007/s11240-014-0444-1>
- Alawaadh AA, Dewir YH, Alwihibi MS, Aldubai AA, El-Hendawy S, Naidoo Y. 2020. Micropropagation of lacy tree *Philodendron* (*Philodendron bipinnatifidum* Schott ex Endl.). *HortScience* 55: 294-299. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI14612-19>
- Bell RL, Srinivasan C, Lomberk D. 2009. Effect of nutrient media on axillary shoot proliferation and preconditioning for adventitious shoot regeneration of pears. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 45: 708-714. <https://doi.org/10.1007/s11627-009-9196-8>
- Cárdenas MA, Villegas Á. 2002. Potencial osmótico del medio de cultivo con diferentes componentes para la propagación *in vitro*. *Revista Fitotecnia Mexicana* 25: 213-217.
- Chen CC, Bates R, Carlson J. 2014. Effect of environmental and cultural conditions in medium pH and plant growth performance of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) shoot culture. *F1000Research* 3: 298. <https://doi.org/10.12688/f1000research.5919.1>
- Chen FC, Wang CY, Fang JY. 2012. Micropropagation of self-heading *Philodendron* via direct shoot regeneration. *Scientia Horticulturae* 141: 23-29. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2012.04.011>
- El-Hawaz RF, Bridges WC, Adelberg JW. 2015. *In vitro* growth of *Curcuma longa* L. in response to five mineral elements and plant density in fed-batch culture systems.

- PLoS ONE 10: e0118912. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118912>
- Gago J, Pérez-Tornero O, Landín M, Burgos L, Gallego PP. 2011. Improving knowledge of plant tissue culture and media formulation by neurofuzzy logic: A practical case of data mining using apricot databases. *Journal of Plant Physiology* 168: 1858-1865. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2011.04.008>
- George EF, Hall MA, De Klerk GJ. 2008. The Components of plant tissue culture media I: Macro- and micro-nutrients. In: George EF, Klerk GJDe, editores. *Plant Propagation by Tissue Culture*. Nueva York, Springer. P. 65-113.
- Greenway MB, Phillips IC, Lloyd MN, Hubstenberger JF, Phillips GC. 2012. A nutrient medium for diverse applications and tissue growth of plant species *in vitro*. In *Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 48: 403-410. <https://doi.org/10.1007/s11627-012-9452-1>
- Hameg R, Arteta T, Gallego PP, Barreal ME. 2018. Selecting an efficient proliferation medium for *Actinidia arguta* 'Issai' explants. *Acta Horticulturae* 1218: 565-572. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2018.1218.77>
- Hassan HMS, Ali MAM, Soliman DA. 2016. Effect of low cost gelling agents and some growth regulators on micropropagation of *Philodendron selloum*. *Journal of Plant Production* 7: 169-176.
- Ibrahim IA, Nasr MI, Mohammedm BR, El-Zefzafi MM. 2008. Nutrient factors affecting *in vitro* cultivation of *Stevia rebaudiana*. *Sugar Tech* 10: 248-253. <https://doi.org/10.1007/s12355-008-0044-7>
- Jirakiattikul Y, Limpradithanont P. 2006. Shoot multiplication and rooting of *Philodendron xanadu* cultured *in vitro*. *Songklanakarin Journal Science Technology* 28: 79-86.
- Kothari SL, Agarwal K, Kumar S. 2004. Inorganic nutrient manipulation for highly improved *in vitro* plant regeneration in finger millet - *Eleusine coracana* (L.) gaertn. In *Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 40: 515-519. <https://doi.org/10.1079/IVP2004564>
- Larque-Saavedra A, Trejo-López C. 1990. El agua en las plantas. Trillas. Distrito Federal, México.
- Leifert C, Murphy KP, Lumsden PJ. 1995. Mineral and carbohydrate nutrition of plant cell and tissue cultures. *Critical Reviews in Plant Sciences* 14: 83-109. <https://doi.org/10.1080/07352689509701923>
- Mesa D. 2003. Obtención de plantas resistentes a la salinidad para los suelos salinos cubanos. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola* 37: 217-226.
- Molinos C, Villegas Á, Sánchez P, Alcantar G, Rodríguez MN, Ruíz LDM. 2004. Efecto del potencial osmótico y contenido de Ca en el medio de cultivo sobre la distribución de Ca²⁺ y K⁺, producción de biomasa y necrosis apical de vid "R110." *Interciencia* 29: 384-388.
- Moya-Hernández SL, Rodríguez-Mejía ML, Espinosa-Mendoza M. 2015. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* causante de manchas foliares del filodendro (*Philodendron scadens* subsp. *oxycardium*) en Cuautla, Morelos, México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 6: 391-397.
- Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Navarro JM, Botella MÁ, Cerdá A, Martínez V. 2000. Effect of salinity x calcium interaction on cation balance in melon plants grown under two regimes of orthophosphate. *Journal of Plant Nutrition* 23: 991-1006. <https://doi.org/10.1080/01904160009382076>
- Nezami-Alanagh E, Garoosi G-A, Maleki S, Landín M, Gallego PP. 2017. Predicting optimal *in vitro* culture medium for *Pistacia vera* micropropagation using neural networks models. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 129: 19-33. <https://doi.org/10.1007/s11240-016-1152-9>
- Parada DM, Villegas M Á. 2009. Propagación *in vitro* del híbrido almendro x durazno H1. *Revista Fitotecnia Mexicana* 32: 103-109.
- Pierik RLM, Steegmans HHM. 1975. Analysis of adventitious root formation in isolated stem explants of *Rhododendron*. *Scientia Horticulturae* 3: 1-20. [https://doi.org/10.1016/0304-4238\(75\)90031-X](https://doi.org/10.1016/0304-4238(75)90031-X)
- Poothong S, Reed BM. 2015. Increased CaCl₂, MgSO₄, and KH₂PO₄ improve the growth of micropropagated red raspberries. In *Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 51: 648-658. <https://doi.org/10.1007/s11627-015-9720-y>
- Ramage CM, Williams RR. 2002. Mineral nutrition and plant morphogenesis. In *Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 38: 116-124. <https://doi.org/10.1079/IVP2001269>
- Ramírez-Rojas S, Osuna-Canizalez F J, García-Pérez F, Canul-Ku J, Palacios-Talavera V. 2016. Identificación molecular de bacterias asociadas a plantas ornamentales producidas *in vitro*. *Revista Mexicana de Fitopatología* 34: 173-183. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1511-3>

- Raya YA, Villegas Á, Arellano G. 2009. Cinética de enraizamiento *in vitro* de portainjertos de vid en respuesta a la fuente y concentración de azúcar. *Revista Fitotecnia Mexicana* 32: 111-117.
- Rodés-García R, Collazo-Ortega M. 2006. Manual de prácticas de fotosíntesis. Las prensas de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad Universtaria, México.
- Ružić D, Sarić M, Cerovic R, Čulafić L. 2000. Relationship between the concentration of macroelements, their uptake and multiplication of cherry rootstock Gisela 5 *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 63: 9-14. <https://doi.org/10.1023/A:1006412901992>
- Seeni S, Sreekumar S, Mukunthakumar S. 2001. Morphogenetic response of six *Philodendron* cultivars *in vitro*. *Indian Journal of Experimental Biology* 39: 1280-1287
- Sharma M, Chaudhary R, Kureel R, Sengar R. 2018. Effects of culture media pH on *in vitro* shoot multiplication in sugarcane. *International Journal of Chemical Studies* 6: 1308-1310.
- Steiner AA. 1984. The universal nutrient solution. *International Congress on Soilless Culture*. Lunterren. 633-649.
- Türkan I, Demiral T. 2009. Recent developments in understanding salinity tolerance. *Environmental and Experimental Botany* 67: 2-9. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2009.05.008>
- Yaacob JS, Mahmud N, Mat Taha R, Mohamed N, Mad Yussof AI, Saleh A. 2014. Optimization of culture conditions (Sucrose, pH, and Photoperiod) for *in vitro* regeneration and early detection of somaclonal variation in ginger lime (*Citrus assamensis*). *The Scientific World Journal* 2014: 262710. <https://doi.org/10.1155/2014/262710>