

MICROPROPAGACIÓN DE *Philodendron* sp. (POSIBLEMENTE *P. corcovadense*)¹

Mónica Blanco*, Roberto Valverde^{2/*}

Palabras clave: *Philodendron*, *P. corcovadense*, propagación *in vitro*, aclimatización.

Keywords: *Philodendron*, *P. corcovadense*, *in vitro* propagation, acclimatization.

RESUMEN

Para lograr la micropropagación de esta planta, fueron desarrollados protocolos tanto para el crecimiento y multiplicación *in vitro* como para su aclimatización en el invernadero. El establecimiento *in vitro* se logró en forma exitosa en el medio de Murashige y Skoog (MS) (1962), suplementado con 0,8 mg l⁻¹ de N⁶-benciladenina (BA), 2 mg l⁻¹ de ácido-3-indol-acético (AIA), 30 g l⁻¹ de sacarosa y 8 g l⁻¹ de agar. Para la multiplicación los explantes fueron cultivados en un MS suplementado con 160 mg l⁻¹ de sulfato de adenina, 170 mg l⁻¹ de NaH₂PO₄·H₂O y 53 combinaciones de BA, 6-furfurylamino purina (KIN), N⁶-(2-isopentenyl) adenina (2-ip), AIA y ácido α-naphtalen acético (ANA). La tasa de multiplicación más alta fue de 3 brotes cada 4 semanas y se obtuvo en un MS que contenía 160 mg l⁻¹ de sulfato de adenina, 170 mg l⁻¹ de NaH₂PO₄·H₂O, 7 mg l⁻¹ de BA y 3 mg l⁻¹ de KIN. El enraizamiento *in vitro* ocurrió en un medio desprovisto de reguladores de crecimiento. Finalmente, las plántulas fueron aclimatizadas en forma exitosa en el invernadero.

ABSTRACT

Micropropagation of *Philodendron* sp. (Probably *P. corcovadense*). Protocols for *in vitro* growth and multiplication, as well as for greenhouse acclimatization of this plant, were developed. *In vitro* establishment was successfully achieved in a Murashige and Skoog (MS)(1962) medium supplemented with 0.8 mg l⁻¹ of N⁶-benciladenine (BA), 2 mg l⁻¹ of 3-indol-acetic acid (IAA), 30 g l⁻¹ of sucrose and 8 g l⁻¹ of agar. For multiplication, the explants were cultured on MS medium supplemented with 160 mg l⁻¹ of adenine sulfate, 170 mg l⁻¹ of NaH₂PO₄·H₂O and 53 combinations of BA, 6-furfurylamino purine (KIN), N⁶-(2-isopentenyl) adenine (2-ip), IAA, and α-naphtalene acetic acid (NAA). The highest rate of shoot multiplication, 3 shoots every four weeks, was achieved on MS medium containing 160 mg l⁻¹ of adenine sulfate, 170 mg l⁻¹ of NaH₂PO₄·H₂O, 7 mg l⁻¹ of BA, 3 mg l⁻¹ of KIN. *In vitro* rooting occurred on a hormone-free medium. Plantlets were successfully acclimatized in the greenhouse.

1/ Recibido el 08 de octubre de 2003. Aceptado el 22 de enero de 2004.

2/ Autor para correspondencia. Correo electrónico: robertov@cariari.ucr.ac.cr

* Biotecnología de Plantas, Centro de Investigaciones Agronómicas. Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica.

INTRODUCCIÓN

La familia Araceae está formada por 108 géneros y 3750 especies. El género *Philodendron* es, después del género *Anthurium*, el segundo más grande en esta familia con aproximadamente 700 especies.

De este género se han encontrado 119 especies en Centro América. En Panamá y Costa Rica la diversidad y distribución de las especies es mayor que en otros países, con un 80% y 49% del total de especies, respectivamente. Además, en Costa Rica se han encontrado 56 especies hasta el momento de las cuales 7 son endémicas de este país (Croat 2002).

Algunas de las especies de esta familia son cultivadas con fines alimenticios, tal es el caso de los géneros *Xanthosoma* y *Colocasia*. Sin embargo, la mayoría de ellas son para uso ornamental, principalmente las especies pertenecientes a los géneros *Philodendron*, *Aglonema*, *Phos*, *Spathiphyllum*, *Anthurium*, *Caladium* y *Dieffenbachia*, entre otras. Estas plantas por lo general son utilizadas en ambientes interiores pues requieren de poca luz y alta humedad, además muchas de ellas poseen inflorescencias de gran belleza (Barahona 1977). En el caso de *Philodendron*, su uso ornamental se debe principalmente al llamativo verde brillante de sus hojas. Hasta hace muy poco tiempo la mayoría de los *Philodendrons* eran considerados plantas ornamentales de follaje; sin embargo, debido a la belleza, consistencia y forma de las hojas de algunas de las especies su uso se ha extendido a la industria de los arreglos florales.

Para poder incursionar en el mercado de los follajes de corta se requiere de grandes cantidades de plantas. Con esta especie, los métodos de propagación de plantas convencionales han resultado ineficientes, por lo que el cultivo de tejidos se perfila como una herramienta de gran utilidad, no solo para la micropropagación clonal y masiva de esta planta, sino también para asegurar un follaje de calidad, pues las plantas reproducidas *in vitro* se encuentran libres de plagas y enfermedades. Por otro lado, generar un protocolo para la propagación *in vitro* de esta especie, sería de gran utilidad en futuros trabajos de mejoramiento genético (De Fossard 1986, Debergh y Read 1991).

Según Hyndman y Bickell (2003), la primera arácea cultivada *in vitro* en forma exitosa fue *Amorphophallus konjac*, posteriormente se ha continuado el cultivo principalmente con especies para fines ornamentales. Como en cualquier proceso productivo, para que la micropropagación sea de utilidad en programas de producción y venta de plantas, es preciso que los protocolos de: 1.-establecimiento del cultivo *in vitro*; 2.-multiplicación; 3.- desarrollo de raíces y 4.- aclimatización, sean rápidos y generen plantas vigorosas. De esta forma, el objetivo de este trabajo fue establecer un protocolo para la micropropagación de este *Philodendron*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Biotecnología de Plantas, del Centro de Investigaciones Agronómicas de la Universidad de Costa Rica.

Material vegetal

Se utilizó yemas apicales y laterales de plantas sembradas en condiciones de invernadero (Figura 1). Estas yemas fueron separadas del tallo, se les eliminó las hojas y el tejido externo hasta obtener un explante de aproximadamente 5 cm de longitud. Cada planta poseía de 1-5 yemas de utilidad (yemas menos expuestas en la planta).



Fig. 1. Planta del *Philodendron* sp. en estudio. En la fotografía de la derecha se muestra la ubicación de la yema apical.

Establecimiento

Desinfección. Los ápices caulinares y secciones del tallo con yemas laterales, inicialmente, fueron sumergidos en una solución con Benlate (2 g l^{-1}) y Agrimicin (2 g l^{-1}) por 30 min. Posteriormente, fueron enjuagados brevemente, colocados en etanol al 95% por 1 min. y luego transferidos a una solución de hipoclorito de sodio (NaOCl) al 3,5% con 1 gota de Tween 20 por 10 min. Acto seguido fueron realizados 2 lavados con agua destilada estéril para continuar con 15 min. en una solución de NaOCl al 1% con 1 gota de Tween 20, todos los pasos se realizaron en agitación constante. Finalmente, dentro de una cámara de flujo laminar, los explantes fueron lavados 3 veces con agua destilada estéril. Luego de la desinfección, los brotes de 3-5 cm, fueron disectados en la cámara de flujo laminar, el explante final inoculado en el medio de cultivo tuvo un tamaño de 0,5-2 cm de longitud y una base de aproximadamente 1 cm (Figura 2).

Medio de cultivo. Se utilizó el medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS) (1962), suplementado con $0,4\text{-}3,0 \text{ mg l}^{-1}$ de N^6 -benciladenina (BA), 2 mg l^{-1} de ácido 3-indol-acético (AIA), 30 g l^{-1} de sacarosa y 8 g l^{-1} de agar. Además se utilizó 1 mg l^{-1} de pantotenato de calcio y $0,1 \text{ mg l}^{-1}$ de biotina.

El pH del medio fue ajustado a 5,8 antes del autoclavado, el cual se realizó a 121°C por 25 min. Se dispensó 15 ml de medio de cultivo en tubos de $25 \times 150 \text{ mm}$.

Multiplicación

Para la multiplicación se utilizó nuevamente el medio básico de Murashige y Skoog (MS) (1962), suplementado con 30 g l^{-1} de sacarosa y 8 g l^{-1} de agar. Los reguladores de crecimiento fueron aplicados como combinaciones de auxinas y citoquininas o de 2 citoquininas juntas. Las citoquininas utilizadas fueron: BA en concentraciones de $0,1\text{-}9,0 \text{ mg l}^{-1}$, 6-furfurylamino-purina (KIN) de $0,5\text{-}3,5 \text{ mg l}^{-1}$ y N^6 -(2 -isopen-tenyl) adenina (Zip) de $0,8\text{-}20 \text{ mg l}^{-1}$. Como auxinas se utilizó AIA en concentraciones de $0,15\text{-}1,0 \text{ mg l}^{-1}$ y ácido α -naftalen-acético (ANA) a una concentración de $0,1 \text{ mg l}^{-1}$. También se utilizó sulfato de adenina en concentraciones de 80 y 160 mg l^{-1} y $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ a una concentración de 170 mg l^{-1} . Las diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento generaron 53 tratamientos, el número de repeticiones varió de 20 a 50 por tratamiento, dependiendo de la disponibilidad de yemas.

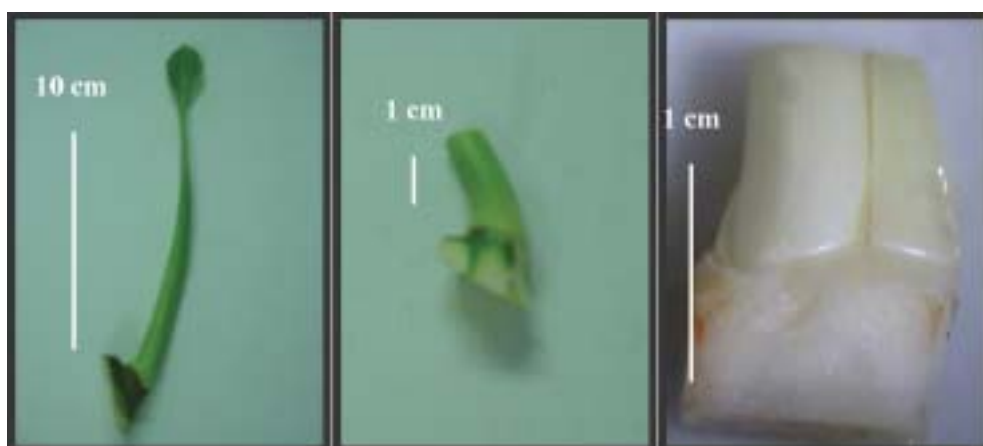


Fig. 2. Tamaño inicial del explante de *Philodendron* sp. para su establecimiento *in vitro*.

También se realizó una prueba adicional para determinar si el gelificante seleccionado así como su concentración eran óptimos para la micropropagación de esta especie. La prueba consistió de 5 tratamientos: medio de cultivo líquido (sin gelificante), semisólido (6 g l⁻¹ de agar o 1,8 g l⁻¹ de Phytigel) y sólido (8 g l⁻¹ de agar o 2 g l⁻¹ de Phytigel). Para esta evaluación se utilizó 2 de los medios de cultivo seleccionados para la multiplicación de esta especie:

- MS suplementado con 160 mg l⁻¹ de sulfato de adenina, 170 mg l⁻¹ de NaH₂PO₄·H₂O, 7 mg l⁻¹ de BA y 3 mg l⁻¹ de KIN.
- MS suplementado con 160 mg l⁻¹ de sulfato de adenina, 170 mg l⁻¹ de NaH₂PO₄·H₂O, 0,1 mg l⁻¹ de BA, 5 mg l⁻¹ de KIN y 0,16 mg l⁻¹ de 2ip.

Debido a problemas de contaminación fue realizada una prueba con PPM (Plant Preservative Mixture) (2 ml l⁻¹) al medio de cultivo.

El medio de cultivo fue renovado a las 2, 3 y 4 semanas, momento en que se evaluó la tasa de multiplicación de los explantes.

Enraizamiento

Los brotes producidos en el mejor medio de multiplicación, fueron separados de los explantes de donde se originaron, y transferidos a medios suplementados con 2,4-D en concentraciones que variaron de 0,1-2,0 mg l⁻¹ y AIA en concentraciones de 10-50 mg l⁻¹.

Condiciones de cultivo

En las 3 fases antes descritas, los tejidos fueron cultivados a una temperatura de 24±1°C, con un fotoperíodo de 16 h y luz fluorescente a 46 μmol m⁻²s⁻¹.

Aclimatización

Brotes enraizados, de aproximadamente 3 cm, fueron removidos de los frascos de cultivo y

el medio adherido a las raíces fue eliminado totalmente mediante lavado. Las plántulas fueron mantenidas por 30 min. en una solución de Benlate (2 g l⁻¹) y Agrimicin (2 g l⁻¹).

Las plántulas fueron sembradas en un sustrato compuesto por suelo y fibra de coco en proporción 1:1. Una vez en las bandejas las plántulas fueron colocadas por 1 semana en un túnel cubierto por plástico. Durante la semana siguiente el plástico fue levantado paulatinamente hasta que se eliminó en forma total, quedando las plantas al descubierto.

El riego se aplicó por aspersión 2 veces por semana; en adición, 3 veces por semana las plántulas fueron fertilizadas con: Raizal (2 g l⁻¹), Multiminerales (2 ml l⁻¹), Urea 12-60-0 (2 g l⁻¹) y 20-20-20 (5 g l⁻¹) aplicados en forma alterna. Cada 3 semanas fue aplicado el fungicida Daconil (5 ml l⁻¹) y 1 vez por semana, en forma alterna, los insecticidas: Basudín (2 ml l⁻¹), Lorsban (2 ml l⁻¹), Vydate (5 ml l⁻¹) y Decis (2 ml l⁻¹).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Establecimiento

Durante el establecimiento se observó que con el sistema de desinfección utilizado hubo una sobrevivencia del 90%. Además, el tamaño inicial del explante que se utilizó resultó ser el apropiado para el desarrollo posterior de la plántula (Figura 2). Explantes muy pequeños se necrosaron con facilidad.

El medio de cultivo en el que se observó un mejor crecimiento de los explantes fue el medio suplementado con 0,8 mg l⁻¹ de BA y 2 mg l⁻¹ de AIA, donde a las 3 semanas se observaba un crecimiento activo de los explantes, tal y como se muestra en la figura 3. Las otras concentraciones de BA y suplementos al medio de cultivo no promovieron el desarrollo de los explantes.

El uso de la BA en combinación con alguna auxina para promover el crecimiento del explante, durante el establecimiento, es una práctica común en algunos cultivos. Sin embargo, no se debe utilizar citocininas en esta etapa en aquellos cultivos en los que se usa explantes



Fig. 3. Crecimiento de los explantes de *Philodendron* sp. en la tercera semana de cultivo.

muy pequeños. Esto debido a que el explante en lugar de crecer inicia su fase de multiplicación, obteniéndose brotes muy pequeños y en poca cantidad, cuyo desarrollo posterior es muy lento (Swartz y Lindstrom 1986).

Multiplicación

En esta etapa fueron evaluados diferentes aspectos con el objetivo de lograr la multiplicación de esta especie. Uno de estos fue el estado físico del medio de cultivo, para lo cual se utilizó los 2 medios de cultivo descritos anteriormente.

Los resultados mostraron que cuando se utilizó como gelificante agar en una concentración de 8 g l^{-1} se obtuvo en promedio 3 brotes por explante. Con los otros 4 tratamientos evaluados (6 g l^{-1} de agar, $1,8$ y 2 g l^{-1} de Phytigel y medio líquido), solo hubo indicios de multiplicación y los brotes no crecieron. En este estudio no se utilizó concentraciones de agar mayores a 8 g l^{-1} , ya que en otros trabajos ha sido reportada una disminución en el crecimiento y la proliferación de brotes conforme aumenta la cantidad de agar en el medio (Yadav *et al.* 2003). Por otro lado, en trabajos con otros cultivos como el ñame, se ha encontrado que el Phytigel favorece el crecimiento, desarrollo y multiplicación de los explantes, sin embargo, algunos cultivos pueden presentar signos de vitrificación con este gelificante (Chacón *et al.* 2000).

Durante la prueba del estado físico del medio de cultivo, simultáneamente, se probó el efecto del PPM en el control de una bacteria endógena, presente en los explantes. Como resulta-

do de la aplicación de este producto, se logró la eliminación total de la bacteria. Este compuesto es conocido por prevenir de forma efectiva y a la vez reducir la contaminación por cualquier patógeno microbiano en el cultivo de tejidos asépticos. Su uso se facilita ya que se conserva estable a altas temperaturas de forma que puede ser mezclado con el medio de cultivo a la hora de su preparación sin ningún problema. Su capacidad biocida es de amplio espectro debido principalmente a la presencia de ingredientes activos como el methylisothiazolinone, el cloruro de magnesio, el nitrato de magnesio, el benzoato de sodio y el sorbato de potasio. Estas sales inorgánicas actúan inactivando enzimas fundamentales del ciclo de Krebs y afectando las cadenas de transporte de electrones de los organismos patogénicos. De esta forma, el PPM inhibe el crecimiento de microorganismos mientras que ejerce un mínimo efecto en la planta cultivada *in vitro*. Según Compton y Koch (2001), el efecto del PPM varía de acuerdo con el tejido que se cultive, *i.e.* explantes de cotiledones que producen callos y embriones somáticos, la producción de estos se reduce al utilizar concentraciones de PPM mayores a 5 ml l^{-1} , en organogénesis se requiere de cantidades menores a los 2 ml l^{-1} , por el contrario, para cultivos de anteras las concentraciones mayores a 10 ml l^{-1} no producen efectos secundarios. En nuestro trabajo, el PPM fue utilizado a una concentración de 2 ml l^{-1} lo que impidió la aparición de patógenos, sin intervenir en los procesos de crecimiento y multiplicación del *Philodendron*.

De los 53 diferentes tratamientos de reguladores de crecimiento utilizados, inicialmente fueron seleccionados los 3 que presentaron las mejores tasas de multiplicación; además de características cualitativas deseables como color, forma y desarrollo de las plántulas. Finalmente, de los 3 tratamientos antes mencionados, fue seleccionado un medio MS suplementado con 7 mg l^{-1} de BA, 3 mg l^{-1} de KIN, 160 mg l^{-1} de sulfato de adenina, 170 mg l^{-1} de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y 8 g l^{-1} de agar, por ser donde se obtuvo la mayor tasa de multiplicación con 3 brotes por explante a las 4 semanas (Cuadro 1).

Cuadro 1. Tasa de multiplicación en los tratamientos seleccionados para la micropropagación de *Philodendron* sp.

Tratamiento	Número de brotes		T.M.
	Iniciales	Finales	
MS1	48	139	2,89
MS2	48	72	1,5
1/2 MS3	48	60	1,25

MS1: MS, 160 mg l⁻¹ sulfato de adenina, 170 mg l⁻¹ NaH₂PO₄·H₂O, 7,0 mg l⁻¹ de BA, 3,0 mg l⁻¹ de KIN.

MS2: MS, 160 mg l⁻¹ sulfato de adenina, 170 mg l⁻¹ NaH₂PO₄·H₂O, 0,1 mg l⁻¹ de BA, 0,5 mg l⁻¹ de KIN, 1,6 mg l⁻¹ 2ip.

1/2MS3: Mitad de macro y micronutrientes, 160 mg l⁻¹ sulfato de adenina, 170 mg l⁻¹ NaH₂PO₄·H₂O, 8,0 mg l⁻¹ de BA, 3,5 mg l⁻¹ de KIN, 0,2 mg l⁻¹ AIA.

TM= Tasa de multiplicación= brotes finales / brotes iniciales

Nótese que los 3 medios de cultivo son bastante diferentes en cuanto a las concentraciones y tipo de los reguladores de crecimiento utilizados. En el primer medio se utilizó una combinación de 2 citoquininas, mientras que en el segundo medio fueron combinadas 3 citoquininas. En el tercer medio de cultivo se utilizó las sales del MS al 50% y además de las citoquininas se introdujo una auxina. Sriskandarajahí y Skirvin (1991) reportan que en la multiplicación de *Philodendron* es indispensable el uso de citoquininas en el medio, principalmente BA. Mientras que Zaghoul *et al.* (1996) utilizaron una combinación de citoquininas y auxinas (BA y ANA) para estimular la multiplicación de esta especie.

El sulfato de adenina se ha utilizado en diversos estudios, donde se reporta que puede inducir la formación de brotes. Este, es conocido por tener una actividad semejante a la de las citoquininas, sin embargo debe ser utilizado en mayor concentración para producir resultados semejantes. Es utilizado principalmente junto con otro tipo de citoquinina como la kinetina o la BA (George 1993). Su uso ha sido reportado en el cultivo *in vitro* de: *Plumbago* sp. (Das y Rout 2002), *Mussaenda* sp. (Cramer y Bridgen 1997), *Curcuma longa* (Salvi *et al.* 2002) y *Helianthus annuus* (Yordanov *et al.* 2002), entre otros.

Por otra parte, el NaH₂PO₄·H₂O en una concentración de 150 mg l⁻¹ se utiliza como par-

te de los macronutrientes en el medio de cultivo B5 (Fossard 1976). Fue utilizado inicialmente para el cultivo de suspensiones celulares en soya; sin embargo, posteriormente ha sido utilizado para el cultivo *in vitro* de diversos cultivos especialmente especies ornamentales (George 1993). Según Miller y Murashige (1976) tanto el NaH₂PO₄·H₂O como el sulfato de adenina se pueden utilizar para la propagación de plantas tropicales con éxito. En nuestro caso, una concentración de 170 mg l⁻¹ de NaH₂PO₄·H₂O estimuló junto con los reguladores de crecimiento, la multiplicación de los explantes.

En los medios de cultivo no seleccionados, tanto los explantes como los brotes inducidos presentaron características que limitaron su uso, entre ellas: poco crecimiento, alteraciones en la forma de los brotes (anchos y pequeños), en la textura de las hojas (quebradizas, débiles, fruncidas), en la forma del tallo (muy delgado, muy grueso o delgado en la parte basal y grueso en la apical) o tasas de multiplicación muy bajas.

Con respecto a la renovación del medio de cultivo y a la tasa de multiplicación, se encontró que el período de 4 semanas fue el óptimo para la multiplicación y separación de los explantes. A las 2 semanas los brotes son muy pequeños y a las 3 semanas aun cuando ya han crecido, su tamaño no es suficiente como para ser separados del explante.

La figura 4 muestra el desarrollo de brotes en uno de los explantes y la separación de las plántulas para continuar con la multiplicación.

Enraizamiento

Los resultados mostraron que esta especie no requiere del estímulo de reguladores de crecimiento para la inducción de raíces, ya que la proliferación de raíces ocurrió tanto en los tratamientos antes mencionados como en el tratamiento control, desprovisto de auxinas. En el control y en los otros medios fue posible enraizar brotes individuales o grupos de brotes. La aparición de las raíces se observó en un periodo de 3 a 4 semanas luego de poner el brote en el medio. Las raíces fueron finas y largas, y en algunos casos ramificadas (Figura 5).



Fig. 4. Explantes de *Philodendron* sp. en la fase de multiplicación.

Una vez llevadas las plántulas al invernadero, se observó que las raíces producidas en todos los tratamientos seguían un crecimiento normal y que además eran funcionales, propiciando el crecimiento de las plántulas. De esta forma, el enraizamiento ocurre en un medio desprovisto de reguladores de crecimiento, lo que reduce los costos de producción de esta especie.

Aclimatización

Para la aclimatización se siguió los procedimientos regulares del laboratorio, utilizados en la aclimatización de aráceas comestibles. Los resultados mostraron que a partir de las 1300 plántulas llevadas al invernadero, a las 4 semanas 1181 se encontraban creciendo satisfactoriamente, lo que implica un 91% de sobrevivencia. Este porcentaje puede aumentar casi al 100% si el tamaño de las plántulas es ≥ 3 cm. En nuestro caso muchas de las plántulas que no sobrevivieron tenían

un tamaño ≤ 2 cm. El éxito obtenido en la aclimatización de esta especie es un indicativo de que la mezcla de suelo:fibra de coco, así como la frecuencia de riegos y la fertilización resultan apropiados para esta etapa. Además, el uso de túneles de plástico cumple su objetivo de mantener una alta humedad relativa que impide la deshidratación de las plántulas. También, el plástico transparente permite el paso de luz en una cantidad suficiente para que las plántulas empiecen a fotosintetizar.

Durante el crecimiento de las plántulas no se observó ninguna alteración morfológica (Figura 6).



Fig. 5. Enraizamiento de *Philodendron* sp.



Fig. 6. Vitroplantas *Philodendron* sp. aclimatizadas en condiciones de invernadero.

AGRADECIMIENTO

Los autores desean agradecer a la compañía SEANDA S.A por el suministro del material madre y su apoyo durante esta investigación.

LITERATURA CITADA

- BABAOGLU M., YORGANCILAR M. 2000. TDZ- specific plant regeneration in salad burnet. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 63(1): 31-34.
- BARAHONA M.E. 1977. Estudio morfológico comparativo de las inflorescencias de dos especies de Araceae: *Anthurium denudatum* Engler y *Philodendron radiatum* Schott. Tesis de Grado. Escuela de Biología. Universidad de Costa Rica. p. 64.
- CAPELLADES-QUERALT M., BERUTO M., VANDERS-CHAEGHE A., DEBERGH P.C. 1991. Ornamentals. *In: Micropropagation. Technology and application.* Kluwer. Netherlands. 484 p.
- COMPTON M., KOCH J. 2001. Influence of plant preservative mixture (PPM)TM on adventitious organogenesis in melon, petunia, and tobacco. *In vitro Cell. Dev. Biol.* 37: 259-261.
- CRAMER C., BRIDGEN M. 1997. Somatic embryogenesis and shoot proliferation of *Mussaenda* cultivars. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 50(2): 135-138.
- CROAT T. 2003. A revision of *Philodendron* subgenus *Philodendron* (Araceae) of Central America. <http://www.aroid.org/genera/Philodendron/Contents.htm>
- CHACON A.G., SABORIO F., GOMEZ L., TORRES S., VALVERDE R. 2000. El tipo de gelificante en el desarrollo *in vitro* y la aclimatización de plantas de yampi (*Dioscorea trifida*) y ñame (*Dioscorea alata*). *Agronomía Costarricense* 24(2): 57-64.
- DAS G., ROUT G.R. 2002. Direct plant regeneration from leaf explants of *Plumbago* species. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 68(3): 311-314.
- DEBERGH P., READ P.E. 1991. Micropropagation. *In: Micropropagation. Technology and application.* Kluwer. Netherlands. 484 p.
- DE FOSSARD. 1986. Principles of plant tissue culture. *In: Tissue culture as a plant production system for horticultural crops.* Martinus Nijhoff. EE.UU. 371 p.
- DE FOSSARD. 1976. *Tissue culture for plant propagators.* University of New England, New England. 408 p.
- GEORGE E. 1993. *Plant propagation by tissue culture.* Exegetics Ltd., England. p. 555.
- HYNDMAN S., BICKELL A. 2003. Micropropagation of aroids. <http://www.aroid.org/horticulture/tculture.html>
- MURASHIGE T., SKOOG F. 1962. A revised medium for a rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-479.
- SALVI N., GEORGE L., EAPEN S. 2002. Micropropagation and field evaluation of micropropagated plants of turmeric. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 68(2): 143-151.
- SRISKANDARAJAHI S., SKIRVIN R.M. 1991. Effect of NH_4NO_3 level on *Philodendron* root development *in vitro*. *Hort Technology Oct./Dec.*: 37-38.
- SWARTZ H.J., LINDSTROM J.T. 1986. Small fruit and grape tissue culture from 1980 to 1985: commercialization of the technique. *In: Tissue culture as a plant production system for horticultural crops.* R:H: Zimmerman, R.J. Griesbach, F.A. Hammerschlag, R.h. Lawson (Eds.). Martinus Nijhoff EE.UU. 371 p.
- VINAS A., LANE J., DAVIS C., HORN M., HOOD E. 2002. The effect of PPM (Plant Preservative Mixture) on *Agrobacterium*- mediated maize transformation. Congress on *in vitro* biology. *Journal of the Society for in vitro Biology.* Vol. 38: 141.
- YADAV M.K., GAUR A.K., GARG G.K. 2003. Development of suitable protocol to overcome hyperhydricity in carnation during micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 72(2): 153-156.
- YORDANOV Y., YORDANOVA E., ATANASSOV A. 2002. Plant regeneration form interspecific hybrid and back-cross progeny of *Helianthus eggertii* X *Helianthus annuus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 71(1): 7-14.
- ZAGHLOUL M., ATTA-ATTA H., WALY A.K., KHATTAB S.H. 1996. Micropropagation of some ornamental plants. *Annals of Agricultural Science* 34(2): 711-725.