

## Micropropagación de *Dieffenbachia picta*

Yulién Miguélez Sierra\*<sup>1</sup>, Reinaldo Trujillo Sánchez<sup>2</sup>, Marcos Daquinta Gradaille<sup>2</sup>, Oscar Concepción Laffite<sup>2</sup>, Lelurlys Nápoles. \*Autor para correspondencia

<sup>1</sup>Facultad de Agronomía, Centro Universitario de Guantánamo, Carretera a Santiago de Cuba Km 2½, Guantánamo, Cuba  
e-mail: yulien@mailcug.cug.edu.cu

<sup>2</sup>Centro de Bioplasmas, Universidad de Ciego de Avila, Carretera a Morón Km 9½, Ciego de Avila, Cuba.  
e-mail: mdaquinta@bioca.unica.cu

### RESUMEN

*Dieffenbachia picta* es una aráceas ornamental de follaje con alto valor comercial. Con el propósito de lograr un protocolo de micropropagación se desarrollaron experimentos en la etapa de establecimiento, multiplicación y adaptación *ex vitro*. Se determinó que las yemas axilares inactivas son adecuadas como explante según su porcentaje de contaminación, supervivencia y crecimiento. El establecimiento de estas yemas resultó efectivo a los 120 días con combinaciones de BAP (0.5 y 1.0 mg.l<sup>-1</sup>) y AIA (0.1 y 1.9 mg.l<sup>-1</sup>). La multiplicación se obtuvo en el segundo subcultivo con alto nivel de citoquinina (16 mg.l<sup>-1</sup> de 2iP) y decapitación de los explantes. Los brotes enraizaron en la fase II y se adaptaron adecuadamente a las condiciones *ex vitro*.

Palabras clave: araceae, citoquininas, multiplicación, ornamental, yemas axilares

### ABSTRACT

*Dieffenbachia picta* is an ornamental aroid of foliage with high commercial value. With the purpose of achieving a micropropagation protocol, experiments were developed in the establishment stage, multiplication and adaptation *ex vitro*. It was determined that the inactive axillary buds are adapted as explant according to their percentage of contamination, survival and growth. The establishment of these buds was effective to the 120 days with combinations of BAP (0.5 and 1.0 mg.l<sup>-1</sup>) and AIA (0.1 and 1.9 mg.l<sup>-1</sup>). The multiplication was obtained in the second reculture with high citoquinina level (16 mg.l<sup>-1</sup> of 2iP) and tipped of the explants. The shoots took root in the phase II and they adapted appropriately to the conditions *ex vitro*.

Key words: araceae, axillary buds, cytokinins, multiplication, ornamental

### INTRODUCCIÓN

Las plantas de la familia *Araceae* son ampliamente cultivadas por el valor ornamental de su follaje y de sus flores. Algunas de sus especies ocupan lugares importantes en la industria de plantas ornamentales (Jones, 1986; Matsumoto y Kuehnle, 1997). En esta familia se destaca el género *Dieffenbachia* al cual pertenecen especies cultivadas extensivamente, en especial, *D. picta* cv. 'Exótica' o 'Perfection' (Conover, 1998).

En los inicios de su propagación comercial, el género fue afectado por virus, hongos y bacterias sistémicas causantes de enfermedades en las plantaciones que conllevaron a considerables pérdidas económicas. Este hecho propició la aplicación de las técnicas biotecnológicas para lograr el saneamiento y multiplicación rápida de este tipo de plantas (Zettler y Hartman, 1987).

Los contaminantes endógenos aparecen en el cultivo *in vitro* lo cual hace difícil la obtención de explantes

axénicos (Brunner *et al.*, 1995; Zenkteler *et al.*, 1997; Paek *et al.*, 1998). No obstante, existen algunos trabajos con éxito en la micropropagación de varias especies y cultivares del género *Dieffenbachia*. En ellos se señala el cultivo de ápices y yemas axilares de reducido tamaño para inducir brotes múltiples (Knauss, 1976; Taylor y Knauss, 1978; Voyiatzi y Voyiatzis, 1989; Maity *et al.*, 1994).

El objetivo del presente trabajo fue lograr la micropropagación de *Dieffenbachia picta* a través del estudio de algunos aspectos que determinan su cultivo *in vitro*.

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### Material vegetal, medios de cultivo, condiciones de crecimiento y análisis estadístico de los resultados

Se utilizaron plantas de *Dieffenbachia picta* Schott mantenidas bajo condiciones semicontroladas en casa

de cultivo. El medio base para todos los experimentos estuvo compuesto por las Sales Murashige y Skoog (1962), mio-inositol 100.0 mg.l<sup>-1</sup>, tiamina 0.4 mg.l<sup>-1</sup>, ácido nicotínico (0.5 mg.l<sup>-1</sup>), piridoxina HCl (0.5 mg.l<sup>-1</sup>), glicina (2.0 mg.l<sup>-1</sup>), sacarosa 30.0 g.l<sup>-1</sup>, y agar 7.0 g.l<sup>-1</sup> según Knauss (1976). Los cultivos se mantuvieron a 25±27° C de temperatura, fotoperíodo de 16 horas luz y 8 de oscuridad, iluminación de 3000 lux (37.5 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>). El análisis estadístico se realizó con el Programa Statgraphics Plus versión 2.1. Se utilizó la Prueba LSD (Mínima Diferencia Significativa) para la comparación múltiple de medias con p≤0.05. Los datos expresados en porcentaje se transformaron con la expresión  $2\arccos(\sqrt{(n/100)})$  para su procesamiento.

### Desinfección de los explantes

Se evaluó el efecto del Hipoclorito de calcio (2.0% p/v) a tres tiempos de exposición: 15, 20 y 25 minutos, en tres tipos de explante: ápices caulinares, yemas axilares activas (brotadas) y yemas axilares inactivas. Se extrajeron los ápices y yemas de 3-4 mm, se colocaron en tubos de ensayo con medio base más BAP (bencilaminopurina) 0.1 mg.l<sup>-1</sup> y AIA (ácido-3-indolacético) 0.1 mg.l<sup>-1</sup>, según Knauss (1976). Los parámetros evaluados fueron el porcentaje de contaminación a los 3 y 7 días y el porcentaje de explantes necróticos a los 7 días.

### Selección del tamaño del explante inicial

Se utilizaron yemas axilares inactivas como explante. La desinfección se hizo con Hipoclorito de calcio (2.0% p/v), 20 minutos. Se evaluaron tres tamaños de explante. 1-2 mm, 3-4 mm y 5-6 mm. Se empleó medio base más BAP (0.1 mg.l<sup>-1</sup>) y AIA (0.1 mg.l<sup>-1</sup>). Se asignaron 20 explantes por tratamiento. Los parámetros evaluados fueron el porcentaje de contaminación y el de necrosis a los 3, 30 y 60 días. A los 60 días se realizó un test en Agar nutriente según Borrás *et al.*, (1996) para detectar contaminación endógena.

### Evaluación del BAP y AIA en el desarrollo de yemas axilares inactivas

Se emplearon yemas axilares inactivas de 3-4 mm. La desinfección se realizó igual que en el epígrafe anterior. Se evaluaron cuatro concentraciones de BAP (0, 0.5, 1.0 y 1.5 mg.l<sup>-1</sup>), cuatro de AIA (0, 0.1, 1.0, 1.9 mg.l<sup>-1</sup>) y sus combinaciones. Se realizó una evaluación a los 120 días del porcentaje de supervivencia, longitud del brote y número de hojas. Los explantes se subcultivaron cada 30 días.

### Evaluación de las combinaciones del 2iP (2-isopentiladenina) y el AIA en la inducción de brotes axilares

Se utilizaron como explantes brotes provenientes de yemas axilares inactivas. Se evaluaron cuatro concentraciones de 2iP (0, 8.0, 16.0 y 24.0 mg.l<sup>-1</sup>) combinadas con AIA (0 y 2.0 mg.l<sup>-1</sup>). A los 30 días (subcultivo 1) se evaluó el número de brotes por explante y cada brote inicial se decapitó. Las siguientes evaluaciones y subcultivos se realizaron cada 30 días hasta llegar a cuatro subcultivos. Se evaluó el número de brotes por explante y éstos se seccionaron según el tamaño para determinar cuántos explantes podían obtenerse a partir de uno (coeficiente de multiplicación).

### Comparación de dos tamaños de vitroplantas en la adaptación a las condiciones *ex vitro*

Se utilizaron brotes con raíces que crecían en medios de cultivo de multiplicación. Estos se distribuyeron en dos grupos según su tamaño: 1.3-1.8 cm y 2-3.5 cm. El experimento se basó en comparar el crecimiento y desarrollo de estos dos grupos de vitroplantas bajo condiciones *ex vitro*. Se determinó, además de la longitud del tallo, el número de hojas y el número de raíces, datos que constituyeron los valores iniciales del experimento. Las vitroplantas se sembraron en recipientes plásticos que contenían un sustrato compuesto por una mezcla de cachaza + zeolita (1:1 v/v) el cual se esterilizó previamente en estufa a 180°C durante dos horas. Se colocaron bajo cobertores en forma de túnel, dentro de una casa protegida por malla de sombreo (70.0%). El riego se realizó por microaspersión con 60 segundos de riego cada 30 minutos de intervalo durante las primeras dos semanas; después de este tiempo, durante 10 minutos dos veces al día. A los 45 días se evaluaron los mismos parámetros iniciales y se determinó el incremento.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Desinfección de los explantes

Los explantes de ápices y yemas axilares en crecimiento activo presentaron 100.0% de contaminación a los tres días de cultivo en las tres variantes de tiempos de exposición al hipoclorito de calcio (2.0%). Este hecho indicó que estos explantes estaban altamente expuestos a la contaminación por bacterias las cuales existen en las plantas donadoras sin provocar síntomas de infección pero que resultan perjudiciales en el cultivo *in vitro*.

Las yemas axilares inactivas presentaron menores porcentajes de contaminación (Tabla 1). Esto puede ser consecuencia de su escasa comunicación con la corriente de savia que porta los microorganismos sistémicos. En este sentido, algunos autores plantean que las yemas laterales tienen poco desarrolladas las conexiones vasculares de los elementos del xilema y

el floema lo cual las mantiene prácticamente aisladas del flujo circulatorio que ocurre en el tallo principal, mientras que, el meristemo apical, es una región de gran actividad metabólica que recibe sustancias de todas partes de la planta (Vázquez y Torres, 1995). Según Barceló (1992), esta falta de conexión puede estar determinada por el flujo de auxinas procedente de la yema apical que ejerce un efecto inhibitorio en la diferenciación del tejido

vascular. En adición, las auxinas producidas por el ápice pueden controlar la dirección en la que se transportan los nutrientes y los demás factores que determinan el crecimiento del ápice en detrimento de las yemas laterales. En estas yemas no se presentaron explantes muertos en los tres tiempos de desinfección evaluados a los 7 días lo cual indicó que la exposición al desinfectante no causó daños al tejido interno de los explantes.

Tabla 1. Respuesta de yemas axilares inactivas de *Dieffenbachia picta* a tres tiempos de desinfección con hipoclorito de calcio (2% p/v).

Tiempo de desinfección (minutos)	Contaminación microbiana (%)	
	3 días	7 días
15	35	40
20	25	30
25	20	30
ESX(±)	0.04 ns	0.06 ns

ns = no significativo ( $p \leq 0.05$ ; LSD). ES = error estándar.

### Selección del tamaño de los explantes

Al analizar el porcentaje de contaminación después de tres días de cultivo, se observó que se incrementó al aumentar el tamaño del explante. En todos los casos los contaminantes fueron bacterianos. A los 30 días, en los dos grupos de explantes de mayor tamaño, aumentó la contaminación y fue más notable

en los de 5-6 mm. Estos valores se mantuvieron hasta los 60 días y existieron diferencias significativas entre ellos. El test que se realizó a los explantes aparentemente sanos mostró que los explantes más grandes contenían bacterias en su totalidad y que la reducción del tamaño propició la disminución del número de explantes contaminados (Tabla 2).

Tabla 2. Porcentaje de contaminación microbiana y de necrosis en tres tamaños de explante de yemas axilares inactivas de *Dieffenbachia picta*.

Tamaño de explante (mm)	Contaminación microbiana (%)			Necrosis (%)		No. explantes 60 días	Explantes Test + (%)
	3 días	30 días	60 días	30 días	60 días		
5-6	50	70	70 a	0	0 b	6	100
3-4	20	30	30 b	5	5 b	13	23.1
1-2	5	5	5 c	35	45 a	10	0
ESX(±)			0.23*		0.18*		

\* Medias con letras iguales no difieren significativamente ( $p \leq 0.05$ ; LSD).

Los resultados reflejaron que las bacterias endógenas en *Dieffenbachia picta* no siempre se expresan en el medio para el cultivo de las plantas. Es necesario realizar pruebas con medios de cultivo específicos de microorganismos debido a que algunas bacterias no crecen bien en los medios para cultivo de plantas o mantienen un crecimiento lento que les permite permanecer latentes hasta después de algunas semanas o meses de subcultivos (George, 1993; Reed y Tanprasert, 1995). Resultados similares fueron obtenidos por Knauss (1976) en *Dieffenbachia picta* 'Perfection' al utilizar yemas laterales y ápices en los

cuales realizó un test con caldo nutriente y de 82 plántulas que no mostraban signos visibles de contaminación, 32 contenían bacterias y hongos.

El porcentaje de necrosis se incrementó a medida que disminuyó el tamaño de los explantes. El 45.0% de pérdidas por muertes obtenido para 1-2 mm podría considerarse aceptable porque estos explantes presentan un nivel bajo de contaminación. Sin embargo, crecen lentamente de forma que a los 60 días presentaban un ligero crecimiento con relación a su tamaño inicial. En los otros dos grupos de explantes

se observó crecimiento vigoroso y más notable. El balance de contaminación, necrosis y crecimiento indicó que los explantes de 3-4 mm fueron los más adecuados para el cultivo *in vitro*. La relación directa entre estos tres aspectos está bien demostrada según Hartmann *et al.* (1990) y Pierik (1990). Sandoval y Müller (1985) plantearon que en *Musa sp.* al utilizar tamaños de explante pequeños (1-2 mm) se minimizaba el problema de infección del material; sin embargo, después que el tejido adquiere cierto desarrollo detiene su crecimiento, sin lograrse diferenciación de plántulas.

### Efecto del BAP y el AIA en el establecimiento de las yemas axilares inactivas

Al analizar el efecto de las combinaciones evaluadas resultó que en ausencia de reguladores del crecimiento todos los explantes murieron y que en los tratamientos con al menos uno de ellos hubo 100.0% de

supervivencia. Este resultado indicó que el contenido interno de reguladores del crecimiento propio de las yemas axilares inactivas no es suficiente para activar su crecimiento aún después de separarlas de la influencia del ápice (dominancia apical). La tabla 3 muestra la respuesta inducida por los diferentes tratamientos, analizados como interacciones con efecto significativo en el análisis factorial de los datos. A los 120 días la combinación de BAP (1.0 mg.l<sup>-1</sup>) más AIA (1.9 mg.l<sup>-1</sup>) presentó el mayor valor de longitud del brote que no difirió significativamente de las combinaciones de esa misma concentración de BAP con el AIA a 0.1 y 1.0 mg.l<sup>-1</sup>, ni con los tratamientos de 0.5 mg.l<sup>-1</sup> de BAP más el AIA 1 y 1.9 mg.l<sup>-1</sup> respectivamente. El mismo comportamiento se obtuvo en el número de hojas pero con una mayor similitud entre las combinaciones mencionadas. Los tratamientos de composición diferente a las señaladas fueron significativamente inferiores en los dos parámetros evaluados.

Tabla 3. Efecto de la interacción BAP-AIA en el crecimiento y desarrollo de yemas axilares inactivas de *Dieffenbachia picta*.

BAP (mg.l <sup>-1</sup> )	Longitud del brote (cm)				BAP (mg.l <sup>-1</sup> )	Número de hojas			
	AIA (mg.l <sup>-1</sup> )					AIA (mg.l <sup>-1</sup> )			
	0	0.1	1.0	1.9		0	0.1	1.0	1.9
0	n	0.54 f	1.24 de	1.06 def	0	n	0 e	1.0 cde	0.6 de
0.5	1.46 de	1.36 de	2.04 abc	2.26 ab	0.5	1.60 cd	1.60 cd	2.80 ab	3.20 a
1.0	1.22 de	2.08 abc	2.38 a	2.40 a	1.0	1.60 cd	3.20 a	2.80 ab	3.20 a
1.5	0.90 ef	1.48 cd	1.28 de	1.54bcd	1.5	1.0 cde	1.80 bc	2.0 bc	2.0 bc
ESX(±)		0.40*			ESX(±)		0.53*		

\* Medias con letras iguales no difieren significativamente ( $p \leq 0.05$ ; LSD).

n = necrosis

Los resultados obtenidos mostraron que para inducir el desarrollo de yemas axilares inactivas es necesario un balance auxina-citoquinina en el rango de 0.5 a 1.0 mg.l<sup>-1</sup> de BAP y 0.1 a 1.9 mg.l<sup>-1</sup> de AIA. Al respecto, Tisserat (1991) y Hartman *et al.* (1990) plantean que para el cultivo de ápices y yemas axilares se requieren niveles moderados de auxinas y citoquininas, importantes para dirigir la respuesta de desarrollo del propágulo. En *Dieffenbachia picta* 'Perfection' se han empleado niveles bajos de BAP o 2iP (0.1 mg.l<sup>-1</sup>) combinados con AIA (0.1 mg.l<sup>-1</sup>) para establecer ápices y yemas axilares (Knauss, 1976). En las aráceas el BAP se ha empleado con igual propósito (Scaramuzzi *et al.*, 1992; Ramírez, 1994). Las yemas crecieron lentamente independientemente de la superioridad de unos tratamientos sobre otros; fueron necesarios 120 días para que desarrollaran brotes con un nivel de crecimiento adecuado para transferirlos a medios de cultivo de multiplicación.

### Evaluación de las combinaciones del 2iP y el AIA en la inducción de brotes axilares

La tabla 4 muestra el número de brotes inducido por las combinaciones de los diferentes niveles de 2iP y AIA en cuatro subcultivos, dado que las interacciones presentan un efecto significativo en el análisis factorial.

La respuesta en el primer subcultivo fue una baja proliferación de brotes. Este comportamiento se debió a la fuerte dominancia apical que ejerce el ápice y coincide con un crecimiento notable del mismo en los tratamientos con citoquinina. La decapitación de los explantes permitió que en el segundo subcultivo aumentara el número de brotes. La combinación de 16.0 mg.l<sup>-1</sup> de 2iP más 2.0 mg.l<sup>-1</sup> de AIA presentó el mayor número de brotes por explante y el mayor coeficiente de multiplicación (Tablas 4 y 5). El hecho de que la concentración

intermedia de 2iP (16.0 mg.l<sup>-1</sup>) tuvo los máximos valores y que con una menor o mayor concentración la respuesta fue significativamente inferior, indicó que la especie en estudio responde a niveles altos de citoquinina para la brotación axilar pero que 24.0 mg.l<sup>-1</sup> resulta un nivel excesivo.

En el tercer subcultivo la proliferación de nuevos brotes axilares y los coeficientes de multiplicación se redujeron (Tabla 4 y 5). Este comportamiento se mantuvo en el cuarto subcultivo. Los brotes más desarrollados volvieron a dominar aunque con menor fuerza por el efecto de la alta concentración de citoquinina.

Tabla 4. Efecto de la interacción 2iP-AIA en la inducción de brotes axilares en *Dieffenbachia picta*.

Combinación (mg.l <sup>-1</sup> )		Número de subcultivos			
2iP	AIA	1	2	3	4
0	0	0.06 bc	0.26 e	1.40 a	1.47 a
0	2	0 c	0.20 e	0.66 b	0.86 b
8	0	0.20 bc	1.66 cd	1.36 a	1.36 ab
8	2	0.13 ab	1.53 d	1.26 a	1.26 ab
16	0	0.46 ab	2.40 b	1.60 a	1.53 a
16	2	0.86 a	3.20 a	1.50 a	1.36 a
24	0	0.40 bc	2.26 bc	1.46 a	1.31ab
24	2	0.46 ab	2.33 b	1.29 a	1.29 ab
ESX(±)		0.05*	0.11*	0.04*	0.03*

\* Medias con letras iguales no difieren significativamente ( $p \leq 0.05$ ; LSD).

Tabla 5. Efecto de la interacción 2iP-AIA en el coeficiente de multiplicación de los brotes de *Dieffenbachia picta*.

Combinación (mg.l <sup>-1</sup> )		Número de subcultivos		
2iP	AIA	2	3	4
0	0	1.0 d	1.10 b	1.05 ab
0	2	1.0 d	1.0 b	1.0 ab
8	0	1.26 cd	1.0 b	1.15 ab
8	2	1.13 d	1.0 b	1.21 ab
16	0	1.73 bc	1.10 b	1.18 a
16	2	2.80 a	1.33 a	1.10 ab
24	0	1.66 bc	1.11 b	1.10 ab
24	2	1.80 b	1.0 b	1.0 b
ESX(±)		0.07*	0.02*	0.02*

\* Medias con letras iguales no difieren significativamente ( $p \leq 0.05$ ; LSD).

El hecho de que la brotación obtenida proviene de las yemas axilares preexistentes explica la reducción en el número de brotes después de dos subcultivos porque la mayoría de las yemas crecieron hasta formar brotes y es necesario entonces que se formen nuevas yemas. Estos resultados fueron similares a los obtenidos por Voyiatzi y Voyiatzis (1989) con el cultivar 'Marianna' de *Dieffenbachia exotica* en el cual los brotes de yemas axilares se decapitaron para obtener brotación. En este caso la combinación de 2iP (16.0 mg.l<sup>-1</sup>) más AIA (2.0 mg.l<sup>-1</sup>) indujo el mayor número de brotes en el tercer subcultivo y se presentó una disminución drástica en el cuarto subcultivo hasta un valor cercano a cero. Además, Maity *et al.* (1994) al cultivar *D. picta* 'Exotica' realizaron sólo dos subcultivos en la multiplicación.

### Comparación de dos tamaños de vitroplantas en la aclimatización

Las vitroplantas cultivadas durante 45 días en condiciones *ex vitro* presentaron 100% de supervivencia independientemente de su tamaño. Se observó que estas plántulas poseían un color verde intenso, hojas erectas y turgentes con la coloración típica de la especie. No se observaron plantas con malformaciones o cambios en su patrón de coloración ni afectaciones por plagas o enfermedades.

Los resultados de la evaluación del crecimiento y desarrollo de las vitroplantas se muestran en la tabla 6. El análisis estadístico realizado a los valores del

incremento de los parámetros evaluados a los 0 y 45 días, reflejó que en cuanto a la altura de la planta las vitroplantas de mayor tamaño fueron

significativamente superiores. En el número de hojas y el número de raíces no existieron diferencias significativas.

Tabla 6. Respuesta a la aclimatización de vitroplantas de *Dieffenbachia picta* de dos tamaños diferentes.

Tamaño de las vitroplantas (cm)	Longitud del tallo (cm)			Número de hojas			Número de raíces		
	I	F	F-I	I	F	F-I	I	F	F-I
2.0-3.5	2.23	3.82	1.59 a	4.65	6.42	1.77	3.15	6.47	3.32
1.3-1.8	1.61	2.93	1.31 b	3.95	5.42	1.57	2.67	4.72	2.55
ESX(±)			0.04*			0.15ns			0.63ns

I-inicial, F- final (45 días), F-I – incremento

\* Medias con letras iguales no difieren significativamente ( $p \leq 0.05$ ; LSD) ns = no significativo

La favorable respuesta de las vitroplantas a la transferencia directa desde el medio de cultivo de multiplicación hacia el ambiente *ex vitro* demostraron la factibilidad de la adaptación *ex vitro* en esta especie sin necesidad de una preparación *in vitro* o una fase III. El éxito de esta forma de aclimatización estuvo en las condiciones bajo las cuales se mantuvieron las plantas. En primer lugar, un sustrato con buenas propiedades de aireación, drenaje y contenido nutritivo como la mezcla cachaza-zeolita; humedad adecuada garantizada por la frecuencia y tipo de riego así como por los cobertores de túnel; iluminación moderada a través de una malla de sombreado.

Estos resultados coincidieron con los trabajos sobre aclimatización de *Dieffenbachia* en los cuales se plantea la eliminación de la etapa de enraizamiento *in vitro* debido a que los explantes desarrollan raíces en el medio de multiplicación o directamente en sustratos compuestos por suelo, medios orgánicos y minerales (Taylor y Knauss, 1978; Voyatzi y Voyatzis, 1989; Maity *et al.*, 1994). Las condiciones que utilizaron estos autores fueron muy similares a las del presente experimento.

## REFERENCIAS

Barceló, JC, Rodrigo GN, Sabater B, Sánchez R (1992) Fisiología Vegetal. Ediciones Pirámide. Madrid

Borrás, O, González R, Concepción O, Cid M, Nápoles L, Recio M I, Escalante D, Escalona M, Trujillo R, Borroto CG (1996) Metodología para el control de las contaminaciones en el cultivo *in vitro* de plantas ornamentales. Cuadernos de Fitopatología (51): 138-141

Brunner, I, Echegaray A, Rubluo A (1995) Isolation and characterization of bacterial contaminants from *Dieffenbachia amoena* Bull, *Anthurium andraeanum* Linden and *Spathiphyllum* sp. Schoot cultured *in vitro*. Scientia Horticulturae 62: 103-111

Conover, CA (1998) Foliage plants. En: Ball Vic (Ed). Ball Redbook. pp. 273-294. Ball Publishing

George, EF (1993) Plant Propagation by tissue culture. 2<sup>nd</sup> ed, Part 1. Exegetics Ltd

Hartman, RD, Kester DE, Davies FT (1990) Plant Propagation, Principles and Practices. Englewood Cliffs

Jones, JB (1986) Determining markets and market potencial of horticultural crops. En: Zimmerman, RH, Griesback RJ, Hammerschlag FA, Lawson RH (Eds) Tissue culture as a plant production system for horticultural crops, pp. 175-200

Knauss, JF (1976) A tissue culture method for producing *Dieffenbachia picta* cv.'Perfection' free of fungi and bacteria. Proceedings Florida State Horticulture Society 89: 293-296

Maity, I, Ghosh P-D, Jana, BK, Bose T (1994) Micropropagation of some house plants. En: Prakash, J, Bhandary KR (Eds) Floriculture. Technology, Trades and Trends, pp. 357-366. Oxford & IBH Publishing

Matsumoto, TK, Kuehnle AR (1997) Micropropagation of *Anthurium*. En: Bajaj, YPS (Ed) Biotechnology in Agriculture and Forestry. High Technology and Micropropagation, pp. 14-29. Springer-Verlag

Murashige, T y Skoog T (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Plant Physiol 5:173-197

Paek, K-Y, Hwang J-K, Han B-H (1993) Perspective and handicaps for commercial application of micropropagation in Korea. En: Korean Society of Plant Tissue Culture (Ed) pp. 38-70. Advances in Developmental Biology and Biotechnology of Higher Plants

Pierik, RLM (1990) Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid

Ramírez, M (1994) Producción *in vitro* de plántulas de *Anthurium andraeanum* Lin. En: Mejía, JM, Manzo A, Rodríguez JL (Eds) La biotecnología en la horticultura, pp. 87-92. Universidad Autónoma del Estado de México

Reed, BM, Tanprasert P (1995) Detection and control of bacterial contaminants of plant tissue cultures. A review of recent literature. Plant Tissue Culture and Biotechnology 1(3): 137-142

Sandoval, J, Müller L (1985) Influencia del tamaño de explante en la propagación *in vitro* de cuatro cultivares de *Musa*. Memorias VII Reunión, ACORBAT' 85. Brasil

- Scaramuzzi, F, Apollonio G, Giodice L (1992) Propagation *in vitro* de deux especes de la famille des *Araceae*, *Syngonium podophyllum* Schott et *Scindapsus aureus* Engl., par culture et repiquages repetes de divers explants vegetatifs. *Society Biology* 186:125-138
- Taylor, ME, Knauss JF (1978) Tissue culture multiplication and subsequent handling of known pathogen-free *Dieffenbachia maculata* cv.'Perfection'. *Proceedings Florida State Horticulture Society* 91: 233-234
- Tisserat, B (1991) Embryogenesis, organogenesis and plant regeneration. En: Dixon, RA (Ed) *Plant Cell Culture. A practical approach*, pp 79-104.
- Voyatzi, C, Voyatzis DG (1989) *In vitro* shoot proliferation rate of *Dieffenbachia exotica* cultivar 'Marianna' as affected by cytokinins, the number of recultures and the temperature. *Scientia Horticulturae* 40: 163-169
- Vázquez, E, Torres S (1995) *Fisiología Vegetal*. Editorial Pueblo y Educación.
- Zenkter, E, Włodarczak K, Klosowska M (1997) The application of antibiotics and sulphonamide for eliminating *Bacillus cereus* during the micropropagation of infected *Dieffenbachia picta* Schott. En: Cassells, AD (Ed) *Pathogen and microbial contamination management in micropropagation*, pp. 183-191. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht.
- Zettler, FW, Hartman RD (1987) Dasheen Mosaic Virus as a pathogen of cultivated aroids and control of the virus by tissue culture. *Plant Disease* 71(11): 958-962