

Efecto de diferentes métodos de desinfección en el establecimiento *in vitro* de *Guadua angustifolia* Kunth

Misterbino Borges García^{1*}, Carlos Ros Araluce¹, Yaritza Castellanos Rubio¹, Silvio Milanes Rodríguez² y Roberto Velásquez Fera². *Autor para correspondencia

¹Centro de Estudios de Biotecnología y Medio Ambiente.

²Departamento Agroforestal

Facultad de Ciencias Agrícolas. Universidad de Granma. Carretera Bayamo-Manzanillo Km 17, Apdo 21, Bayamo 85 100, Granma, Cuba. e-mail:borges@udg.co.cu

RESUMEN

El bambú es una planta que posee múltiples usos con un enorme impacto económico, social, cultural y ambiental. El presente trabajo de investigación se desarrolló con el objetivo de determinar el efecto de distintos métodos de desinfección en el establecimiento y crecimiento *in vitro* de Bambú (*Guadua angustifolia* Kunth). Se utilizaron dos métodos de desinfección: uno simple basado en el uso de hipoclorito de sodio al 1.0%, 2.0% y 3.0% durante 20 minutos, y uno doble en el cual se utilizó hipoclorito de sodio al 2.0% a 5, 10 y 15 minutos con repetición de la desinfección a las 24 horas. Al cabo de una, dos y tres semanas se evaluaron las siguientes variables: porcentaje de contaminación, fenolización, muerte y brotación, número y longitud de los brotes por explante. Se aplicó un diseño completamente aleatorizado con análisis de varianza de clasificación simple y prueba de comparación de medias de mínima diferencia significativa. Los resultados demostraron que el método de desinfección doble basado en la utilización de hipoclorito de sodio al 2% durante 5 minutos con repetición a las 24 horas fue el más adecuado para el establecimiento *in vitro* de explantes primarios de *Guadua angustifolia* Kunth.

Palabras clave: bambú, cultivo *in vitro*, hipoclorito de sodio, contaminación, explantes primarios

ABSTRACT

The bamboo is a plant that possesses multiple uses with an enormous economic, social, cultural and environmental impact. The present research work was developed with the objective of determining the effect of different disinfection methods in the establishment and growth *in vitro* of Bamboo (*Guadua angustifolia* Kunth.). Two disinfection methods were applied: a simple method based on the use of sodium hypochlorite at 1.0%, 2.0% and 3.0% during 20 minutes, and a double method in which sodium hypochlorite was employed at 2.0% during 5, 10 and 15 minutes with repetition from the disinfection at 24 hours. At one, two and three weeks the following variables were evaluated: percentage of contamination, phenolization, death and budding, number and length of the buds for explant. A design totally randomized with one way analysis of variance and means comparison test of minimum significance difference were applied. The results demonstrated that the method of double disinfection based on the use of sodium hypochlorite at 2% during 5 minutes with repetition at 24 hours is the most appropriate for the *in vitro* establishment of primary explants of *Guadua angustifolia* Kunth.

Key words: bamboo, plant tissue culture, sodium hypochlorite, contamination, primary explants

INTRODUCCIÓN

Durante el transcurso de la historia el hombre ha empleado el Bambú para múltiples usos. Existen países donde esta planta desempeña un papel esencial en las tradiciones culturales al constituir este material una vía de sustento económico para gran parte de la población. Esta planta, además de su enorme importancia económica, social y cultural, juega un papel determinante desde el punto de vista medio ambiental, por la cobertura que brinda al medio donde crece, así como, por su contribución al embellecimiento y descontaminación de la atmósfera (Catasús, 2000).

Los bambúes son plantas tan bellas como importantes desde el punto de vista económico. Son endémicos de las regiones tropicales y subtropicales del planeta, y han jugado un papel fundamental en el desarrollo de muchos pueblos. Este papel protagónico no se ha visto disminuido con el impacto de las nuevas tecnologías, como es la multiplicación *in vitro*, comúnmente denominada micropropagación, la que contempla diferentes técnicas, dentro de las cuales se encuentra la proliferación de brotes axilares (Catasús, 2003).

Se han empleado principalmente dos métodos para la multiplicación *in vitro* en bambú, propagación por yemas

axilares y microestacas (Ramanayake *et al.*, 2001) y embriogénesis somática (Lin *et al.*, 2004).

Las especies asiáticas, se han propagado *in vitro* con mayor facilidad, (Saxena y Dhawan, 1999); donde muchas de ellas se han logrado producir a gran escala con fines principalmente comerciales (Marulanda *et al.*, 2005). Sin embargo, en especies americanas, como la *Guadua angustifolia*, aún no existen sistemas de propagación eficientes. Los principales problemas que se han presentado en la micropropagación, son los derivados de varios factores como: la presencia de contaminantes microbianos endógenos; la necrosis apical; la hiperhidricidad; la oxidación fenólica; el enraizamiento; la disponibilidad y repuesta estacional de los explantes, y la supervivencia *ex vitro*. Además, la edad y estado de desarrollo de la planta madre, representan aún hoy significativas limitaciones para la multiplicación masiva (Fajardo, 2006).

En Cuba los recursos maderables son escasos, por ello se hace imprescindible la búsqueda de recursos rápidamente renovables. Problemática que puede resolverse mediante el establecimiento de una metodología eficiente para la propagación acelerada del cultivo del bambú en condiciones *in vitro* principalmente para *Guadua angustifolia* Kunth. Especie de mayor utilidad y aprovechamiento con fines constructivos, de manera que esta vía garantice elevar los niveles poblacionales de esta planta en el mercado, tanto nacional como internacional. Una de las fases importantes para el logro de dicha metodología es el establecimiento *in vitro* del material vegetal. Es por ello que el presente trabajo tuvo como objetivo determinar el efecto de distintos métodos de desinfección en el establecimiento *in vitro* de explantes primarios de la especie de Bambú *Guadua angustifolia* Kunth.

MATERIALES Y MÉTODOS

Técnicas y procedimientos generales

Se utilizó la especie *Guadua angustifolia* Kunth. Los fragmentos de culmos de 40 cm de longitud fueron sembrados en condiciones de macetas (Catasús y Lorenzo, 2002) dando lugar a plantas completas. A partir de los tres meses de edad se establecieron *in vitro* segmentos nodales de 6.0 - 8.0 mm de longitud

Establecimiento *in vitro* de explantes primarios de *Guadua angustifolia* Kunth

Método de simple desinfección con hipoclorito de sodio

Se cortaron segmentos uninodales de 6.0 – 8.0mm de longitud, los cuales fueron sometidos a una desinfección simple para eliminar los microorganismos contaminantes. Se sumergieron en solución de detergente comercial al 1.0% durante 30 minutos, después se realizaron tres enjuagues en agua destilada

no estéril. Posteriormente en condiciones asépticas en la cabina de flujo laminar se introdujeron en una solución de hipoclorito de sodio (NaOCl) al 1.0, 2.0 y 3.0 % durante 20 minutos (tratamientos 1.1, 2.1 y 3.1 respectivamente) seguido de tres enjuagues con agua destilada estéril.

Método de doble desinfección con hipoclorito de sodio

Se tomaron segmentos uninodales de 6.0 – 8.0mm de longitud, los cuales fueron sometidos a una doble desinfección para eliminar los microorganismos contaminantes. Se sumergieron en solución de detergente comercial al 1.0% durante 30 minutos, después se realizaron tres enjuagues en agua destilada no estéril. Posteriormente en condiciones asépticas en la cabina de flujo laminar se introdujeron en una solución de hipoclorito de sodio (NaOCl) al 2.0 % durante 5, 10 y 15 minutos (tratamientos 2.1, 2.2 y 2.3 respectivamente), después se realizaron tres enjuagues en agua destilada estéril. Posteriormente se colocaron en frascos biotecnológicos con agua destilada estéril por un período de 24 horas a temperatura ambiente en la cabina del flujo laminar, luego se sumergieron nuevamente en los distintos tratamientos, seguido de tres enjuagues con agua destilada estéril.

Inoculación de los explantes

La inoculación de los explantes se realizó con la polaridad correcta (con la zona apical hacia arriba y la radical sobre el medio de cultivo) en frascos biotecnológicos (ancho de 2.8 cm y una altura de 6.3 cm con un diámetro de la abertura de 2.5 cm) con 10 ml de medio de cultivo sólido de Murashige y Skoog (1962) a razón de un explante por frasco en la cabina de flujo laminar en condiciones asépticas.

Condiciones del cultivo

Las condiciones del cultivo se llevaron a cabo con una temperatura de 25 ± 1 °C, humedad relativa de 76-80% y la iluminación de $60 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$

Evaluación

A las 72 horas del establecimiento del cultivo se determinó el porcentaje de contaminación microbiana y semanalmente hasta las tres semanas se evaluaron las demás variables expresadas en porcentaje:

- Número de explantes fenolizados
- Número de explantes brotados
- Número de explantes muertos
- Número de explantes vivos (supervivencia)
- Números de brotes por explante

Así como la longitud del vástago (medición con regla graduada en cm).

Se utilizó un tamaño de muestra de 25 explantes con dos réplicas por cada tratamiento.

Diseño y análisis estadístico

Se aplicó un diseño completamente aleatorizado con un análisis de varianza de clasificación simple y prueba de comparación múltiples de medias de mínima diferencia significativa para determinar el efecto de los diferentes métodos de desinfección sobre el establecimiento y crecimiento de explantes primarios de bambú. Los datos de porcentaje de contaminación, muerte y brotación fueron transformados por arcoseno de raíz cuadrada. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el paquete "Statistica for WINDOWS", versión 6.0 (StatSoft, 2001).

RESULTADOS Y DISCUSION

Método de simple desinfección con hipoclorito de sodio

La tabla 1 muestra los resultados de la influencia del método de simple desinfección con hipoclorito de sodio al 1.0, 2.0 y 3.0% durante 20 minutos sobre el porcentaje de contaminación y muerte de explantes primarios de *Guadua angustifolia* Kunth durante su establecimiento *in vitro* donde se presentan altos porcentajes de contaminación (sin diferencias significativas para $P < 0.05$ entre los distintos tratamientos estudiados) comprendidos entre 45% y 50% los cuales fueron ocasionados principalmente por la presencia de hongos filamentosos y de algunas bacterias. En este aspecto Biasi *et al.* (1994) señalaron que la presencia de microorganismos contaminantes, hongos y bacterias, es uno de los elementos que puede limitar el establecimiento *in vitro* de explantes procedentes de plantas leñosas. También corroboran dichos resultados los obtenidos por Ramírez *et al.*

(1999), quienes determinaron que la contaminación por hongos es uno de los principales problemas que limitan el establecimiento aséptico de segmentos nodales de material adulto de guayabo, y Das y Pal (2005) para *Bambusa balcoa*, donde el principal problema encontrado durante el establecimiento, fue la presencia de contaminantes fúngicos visibles.

Por otra parte también se ilustra en la tabla 1 que el resto de los explantes evaluados (no contaminados), murieron. Esto pudo deberse a que los explantes presentaron una necrosis continua de sus tejidos, la cual condujo de manera paulatina a la muerte de los mismos. Todo ello podría estar dado principalmente al efecto fitotóxico de las distintas concentraciones de hipoclorito (1.0, 2.0, 3.0%) por un tiempo de 20 minutos sobre el material vegetal que ocasiona la muerte del mismo. También se observó que la acción fitotóxica del desinfectante provocó una liberación importante de compuestos fenólicos en el 100% de los explantes. Estos compuestos fueron alterando la composición química del medio de cultivo y deteriorando progresivamente el material vegetal hasta causar su muerte. En este sentido se corrobora lo señalado por varios autores como: Dalal *et al.* (1992) quienes determinaron que en este proceso intervienen dos factores importantes, las pérdidas por contaminación microbiana y oxidación fenólica, y George (1996) quien demostró que la acumulación de sustancias fenólicas liberadas por el tejido vegetal en el medio de cultivo, son con frecuencia inhibidores del crecimiento y constituyen uno de los problemas más frecuentes asociados con la propagación clonal rápida, los cuales imponen serios problemas en el establecimiento de cultivos primarios.

Tabla 1. Influencia del método de simple desinfección con hipoclorito de sodio durante 20 minutos sobre el porcentaje de contaminación y muerte de explantes primarios de *Guadua angustifolia* Kunth durante su establecimiento *in vitro*.

Tratamientos	Porcentaje de contaminación	Porcentaje de muerte
NaOCl 1%		
1.0	0.8 (50%)	0.8 (50%)
2.0	0.7 (45%)	0.86 (55%)
3.0	0.7 (45%)	0.86 (55%)
DE	0.23	0.26

Medias transformadas por columnas no difieren significativamente para $P < 0.05$ según prueba de mínima diferencia significativa; entre paréntesis se coloca la media original, DE: desviación estándar.

Por otro lado Agramonte *et al.* (2001) obtuvieron un alto porcentaje de muerte durante el empleo de concentraciones de hipoclorito de sodio al 2.0% para el establecimiento de explantes primarios de *Eucalytus grandis* y Fajardo (2006) durante el establecimiento *in vitro* de *Guadua angustifolia* señaló que específicamente en esta especie los principales problemas de micropropagación son, la contaminación endógena y la necrosis de los explantes, donde demostró la presencia de polifenoles tanto en yemas axilares muertas establecidas *in vitro* como en el medio de cultivo donde éstas crecieron.

A pesar de los resultados alcanzados por el método de simple desinfección, se seleccionó la concentración de 2.0% de hipoclorito de sodio para continuar los estudios de desinfección para el establecimiento *in vitro* de explantes primarios de *Guadua angustifolia* Kunth.

Método de doble desinfección con hipoclorito de sodio

En la tabla 2 se muestran los valores alcanzados del efecto del método de la doble desinfección con hipoclorito de sodio al 2.0% durante 5, 10 y 15 minutos sobre el porcentaje de contaminación y supervivencia de explantes primarios de *Guadua angustifolia* Kunth durante su establecimiento en condiciones *in vitro*. Se aprecia que no existieron diferencias significativas para $p < 0.05$ entre los distintos tratamientos estudiados. No obstante, a diferencia de los resultados del método de simple desinfección, en este experimento todos los explantes que no se contaminaron sobrevivieron (no se presentó muerte de los explantes). Esto puede deberse a que el material vegetal empleado se expuso a un menor tiempo de desinfección con repetición a las 24 horas. Todo ello permitió en ese período que las

esporas que no pudieron ser destruidas inicialmente pasaran a formas vegetativas y durante la doble desinfección fueran eliminadas fácilmente de los explantes primarios trayendo consigo un menor porcentaje de contaminación. Esto unido al menor tiempo de exposición de los explantes al desinfectante condujo al establecimiento y supervivencia de todo el material vegetal no contaminado.

Sin duda la contaminación microbiana representa uno de los problemas fundamentales en la propagación de plantas *in vitro*. En este sentido Mantell *et al.* (1985) reflejaron que la presencia de microorganismos contaminantes representa una de las afectaciones más importantes encontradas de manera ocasional y con frecuencia serias, durante la micropropagación a gran escala de algunas plantas las cuales generan grandes pérdidas de material vegetal. Por otro lado, Alvarado *et al.* (1998) señalaron que la contaminación microbiana es una de las principales causas de pérdidas en los sistemas de cultivo *in vitro* de plantas, puesto que producen daños muy severos, y Folgueras *et al.* (2001) plantearon que la misma constituye uno de los principales problemas que afecta la propagación masiva de plantas tropicales a escala comercial.

Por otra parte es necesario señalar que los resultados de supervivencia alcanzados para *Guadua angustifolia* Kunth (75 a 80%) fueron superiores a los alcanzados por Sierra *et al.* (1999) durante la optimización de la metodología de desinfección de yemas apicales de *Philodendron xanadu* donde llevaron a cabo dos tratamientos: el primero con hipoclorito de calcio al 2.0% y el segundo con bicloruro de mercurio (0.01%), donde los mayores resultados lo alcanzaron con hipoclorito de calcio (2.0%) durante 35 minutos, para un 35% de explantes supervivientes.

Tabla 2. Influencia del método de doble desinfección con hipoclorito de sodio al 2.0% sobre el porcentaje de contaminación y supervivencia de explantes primarios de *Guadua angustifolia* Kunth durante su establecimiento en condiciones *in vitro*.

Tratamientos	Porcentaje de contaminación	Porcentaje de supervivencia
5	0.43 (20%)	1.13 (80%)
10	0.51 (25%)	1.03 (75%)
15	0.51 (25%)	1.03 (75%)
DE	0.19	0.15

Medias transformadas por columnas no difieren significativamente para $P < 0.05$ según prueba de mínima diferencia significativa; entre paréntesis se coloca la media original; DE: desviación estándar.

En este sentido se destaca que estos resultados no son similares a los obtenidos por Santiago (1999) al estudiar tres agentes desinfectantes formados por hipoclorito de calcio al 2.0%, hipoclorito de sodio al 3.0% y bicloruro de mercurio al 0.1% durante 10 minutos en el establecimiento *in vitro* de explantes primarios de cuatro especies de bambú (*Bambusa vulgaris*, *Guadua angustifolia*, *Bambusa longispiculata* y *Dendrocalamus asper*) donde los mayores porcentajes de supervivencia fueron alcanzados con el bicloruro de mercurio. Sin embargo, son similares a los alcanzados por Fajardo (2006) durante la utilización de diferentes tiempos de desinfección (5, 10 y 20 minutos) con hipoclorito de sodio al 1.0% en el establecimiento *in vitro* de *Guadua angustifolia*, donde arrojó que el tiempo de desinfección no mostró diferencias estadísticas entre los tratamientos para las variables porcentaje de contaminación y supervivencia de los explantes.

Los resultados del efecto del método de desinfección doble con hipoclorito de sodio al 2.0% (5, 10 y 15 minutos con repetición a las 24 horas) sobre el número de brotes y la longitud del vástago por explantes primarios de *Guadua angustifolia* Kunth a una, dos y tres semanas de su establecimiento en condiciones

in vitro, se muestra en la tabla 3 y 4. Se observa que los mayores valores para las distintas semanas evaluadas correspondieron al tratamiento de exposición de los explantes con hipoclorito de sodio al 2% durante 5 minutos los que difieren significativamente para $p < 0.05$ del resto de los tratamientos.

Los mayores resultados para los principales parámetros de crecimiento *in vitro* (número de brotes y longitud del vástago) correspondieron al menor tiempo de exposición doble al desinfectante hipoclorito de sodio al 2.0% (5 minutos). Esto puede ser debido a que bajo estas condiciones los explantes sufren un menor daño fitotóxico en sus tejidos facilitándose de esta forma una regeneración *in vitro* más rápida y eficiente. Estos resultados coinciden para el número de brotes con los obtenidos por Fajardo (2006) durante la utilización de diferentes tiempos de desinfección (5, 10 y 20 minutos) con hipoclorito de sodio al 1.0% en el establecimiento *in vitro* de *Guadua angustifolia*, donde demostró que a los cinco minutos de exposición al desinfectante se logra el mayor número de yemas brotadas por explante, el cual difiere estadísticamente del resto de los tratamientos (10 y 20 minutos).

Tabla 3. Efecto del método de doble desinfección con hipoclorito de sodio al 2.0% sobre el número de brotes por explantes primarios de *Guadua angustifolia* Kunth a una, dos y tres semanas de establecimiento en condiciones *in vitro*.

Tratamientos tiempo (min)	Semana 1	Semana 2	Semana 3
5	2.25a	2.5a	2.6a
10	1.33b	1.5b	1.7b
15	1.2b	1.4b	1.5b
DE	0.63	0.77	0.74

Medias por columnas con letras distintas difieren significativamente para $P < 0.05$ según prueba de mínima diferencia significativa; DE: desviación estándar.

Tabla 4. Efecto del método de doble desinfección con hipoclorito de sodio al 2% sobre la longitud del vástago de los explantes primarios de *Guadua angustifolia* Kunth a una, dos y tres semanas de establecimiento en condiciones *in vitro*.

Tratamientos tiempo (min)	Semana 1	Semana 2	Semana 3
5	1.7a	2.3a	2.85a
10	1.1b	1.5b	2b
15	1b	1.4b	1.92b
DE	0.51	0.53	0.91

Medias por columnas con letras distintas difieren significativamente para $P < 0.05$ según prueba de mínima diferencia significativa; DE: desviación estándar.

De forma general se puede plantear que el método de desinfección doble ofrece los resultados más apropiados para el establecimiento *in vitro* de explantes primarios de *Guadua angustifolia* Kunth, en relación al método de desinfección simple. Resultados semejantes para el método de doble desinfección fueron alcanzados por Izquierdo *et al.* (1996) en el establecimiento de una metodología de desinfección del ajo (*Allium sativum* L.) para su posterior siembra *in vitro*, los cuales compararon diferentes concentraciones y tiempos de desinfección utilizando el bicloruro de mercurio (HgCl_2), hipoclorito de sodio (NaOCl) e hipoclorito de calcio (Ca_2OCl) como agentes desinfectantes, donde obtuvieron que la desinfección doble con hipoclorito de calcio (Ca_2OCl) fue la más eficiente para los cinco clones que se estudiaron.

CONCLUSIONES

El método de desinfección doble basado en la utilización de hipoclorito de sodio al 2% durante 5 minutos con repetición a las 24 horas resultó el más adecuado para el establecimiento *in vitro* de explantes primarios de *Guadua angustifolia* Kunth.

REFERENCIAS

- Agramonte D, Delgado L, Trocones A, Pérez M, Ramirez D y Gutiérrez O (2001) Micropropagación del *Eucalyptus grandis* (Hill ex Maiden) a partir de segmentos nodales. *Biología Vegetal* 2: 109-114
- Alvarado, Y, Z Sarria y N Portal (1998). Control de la contaminación bacteriana en el cultivo *in vitro* de plantas por la aplicación de métodos de detección temprana. Libro de Resúmenes. REDBIO' 98. La Habana p 39
- Biasi, LA; Koller OC y Kämpf AN (1994) Micropropagação do abacateiro Ouro verde a partir de segmentos nodais. *Pesq. Agrop. Brazil*. 29 (7): 1051-1058
- Catasús, L (2000) Guía para la colecta y determinación de Bambúes. Hábitat-Cuba, La Habana, 20 pp.
- Catasús, L y Lorenzo MA (2002) Manual Técnico para la producción del Bambú. Ed. ACTAF, 24 pp.
- Catasús, L (2003) Estudio de los bambúes Arborescentes cultivados en Cuba. Ed. ACTAF, 56 pp.
- Dalal, MA, Sharma BB y Srinivasa RM (1992) Studies on stock plant treatment and initiation culture mode in control of oxidative browning *in vitro* cultures of grapevine. *Scientia Horticulturae* 51: 35-4
- Das, Malay y Pal Amita (2005) *In vitro* regeneration of *Bambusa balcoa* Roxb. Factors affecting changes of morphogenetic competence in axillary buds. *Planta Cell Tissue and Organ Culture* 81(1): 109-112
- Fajardo, L (2006). Establecimiento *in vitro* de yemas axilares de *Guadua angustifolia* Kunth. Tesis en Opción al Título de Master en Biotecnología Vegetal. IBP. UCLV. 80 pp.
- Folgueras, M., L. Herrera y D. Carrazana (2001) La contaminación microbiana en la micropropagación *in vitro* de las raíces y tubérculos tropicales. En: Libro de reportes cortos. Taller internacional BioVeg' 2001, Ciego de Avila, p. 183
- George, E.F (1996) Plant propagation by tissue culture. 2nd ed. Part 1. Exogenetics Ltd
- Izquierdo, H J Betancourt y R Disotuar (1996) Metodología de desinfección del ajo (*Allium sativum* L.) para su posterior siembra *in vitro*. IV Coloquio Internacional de Biotecnología de las Plantas. Resúmenes. Santa Clara, Cuba, p.2
- Lin, C-S, Lin C-C y Chang W-C (2004) Effect of thidiazuron on vegetative tissue-derived somatic embryogenesis and flowering of bamboo *Bambusa edulis*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 76:75 – 82
- Mantell S H, J A Matthews RA McKee (1985) Principles of Plant Biotechnology. An introduction to Genetic Engineering in Plants. pp. 146-147 Blackwell Scientific Publications
- Marulanda, Marta; Gutiérrez LG y Márquez María del Pilar (2005) Micropropagación de *Guadua angustifolia* Kunt. *Revista Colombiana de Biotecnología Vegetal*, 27 (82) [en línea] En: <http://matematicas.udea.edu.co/~actubiol/Vol27-82Resumen.htm> [Consulta: 10 diciembre 2005]
- Murashige T y Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Plant Physiol* 15: 473-497
- Ramanayake, SM, Wanniarachchi WA, Tennakoon TM (2001) Axillary shoot proliferation and *in vitro* flowering in an adult giant bamboo, *Dendrocalamus giganteus* Wall. Ex Munro. *In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant* 37: 667 – 671
- Ramírez, M, Sierralta S y Urdaneta A (1999) Evaluation of surface disinfectants on the *in vitro* establishment of *Psidium guajava* L. and *Psidium friedrichsthalianum* (Berg) Nierdz. *Plant Science*, 156 (2):125-135
- Santiago Y (1999) Micropropagación de especies de Bambú de interés comercial. En: HABITAT-CUBA(Ed.) Primeras experiencias del programa de Uso y Desarrollo del Bambú, pp. 47-53. Holguín, Cuba
- Saxena, S y Dhawan V (1999) Micropropagation research in south Asia. Constraints to production of bamboo and rattan. INBAP Technical Report 5 (Delhi), pp.101 –113 INIBAP
- Sierra, A, O Concepción R Trujillo y M Daquinta (1999) Optimización de la metodología de desinfección de yemas apicales de *Philodendron xanadu*. Taller Internacional de Biotecnología Vegetal. Bioveg' 2001, Libro de Reportes Cortos, Ciego de Avila, Cuba. p. 99
- StatSoft, Inc. Statistica for Windows. Release 6.0 Tulsa, OK. 2001