

Desinfección de ápices de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) cv. 'Querepa Rosada' con hipoclorito de sodio

Disinfection of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) shoots cv. 'Querepa Rosada' with sodium hypochlorite

José Alberto Laynez Garsaball* y María Claudia Sánchez Cuevas

Escuela de Ingeniería Agronómica. Núcleo Monagas. Universidad de Oriente. Avenida Universidad. Campus Los Guaritos. Maturín, 6201. Monagas, Venezuela. E-mails: jalaynezg@yahoo.es y mariaclaudia@cantv.net

* Autor para correspondencia

Recibido: 09/06/2006

Fin de arbitraje: 22/08/2006

Revisión recibida: 24/10/2006

Aceptado: 26/11/2006

RESUMEN

Esta investigación tuvo por objetivo determinar un protocolo de desinfección de ápices de yuca del cultivar Querepa Rosada, con soluciones de hipoclorito de sodio bajo tres concentraciones y tres tiempos de inmersión. Se emplearon ápices meristemáticos de 1 mm de longitud provenientes de brotes recolectados en una plantación comercial, en Jusepín, estado Monagas. El diseño estadístico fue completamente aleatorizado, con 11 tratamientos, 10 repeticiones, un explante por repetición y por tubo de ensayo. Los tratamientos estuvieron conformados por tres concentraciones de hipoclorito de sodio (i.a. 5,25%): 10, 20 y 30 % (C10, C20 y C30, respectivamente), combinadas con tres tiempos de inmersión: 10, 20 y 30 min (T10, T20 y T30, respectivamente). Se incluyeron dos testigos: Etanol 70 % por 5 segundos y Biclورو de mercurio por 10 minutos. Se empleó el medio de Murashige y Skoog (1962), suplementado con sacarosa (20 g/L), Tiamina.HCl (0,4 mg/L), m-Inositol (100 mg/L), BAP (0,05 mg/L), AG (0,05 mg/L), ANA (0,02 mg/L), agar (7 g/L), y pH 5,8. Los explantes se mantuvieron en cámara de crecimiento a temperatura entre 27 y 30 °C, y 16 horas de luz artificial. El efecto de los tratamientos se evaluó a los 8, 16 y 24 días después de la siembra mediante el porcentaje de ápices vivos y no contaminados. Las diferencias entre los porcentajes se establecieron mediante la prueba de t al 0,05 %. El mejor tratamiento de desinfección a los 24 dds fue el de inmersión en solución al 10 % (v/v) de hipoclorito de sodio por 10 minutos.

Palabras Claves: Contaminación, cultivo de tejidos, yuca, desinfectante, cloro

ABSTRACT

This research was conducted in order to develop a disinfection protocol for apical shoots of cassava, cultivar "Querepa Rosada", using three dilutions of sodium hypochlorite and three immersion periods. Meristems, 1mm long, from apical shoots collected in a commercial cassava plantation located in Jusepin, Monagas State, were used. The statistical design was completely randomized, with 11 treatments, 10 repetitions, one explant per repetition and for test tube. Treatments used were three sodium hypochlorite concentrations (a.i. 5.25%): 10, 20, and 30% (C10, C20 Y C30, respectively), combined with three immersion times: 10, 20 y 30min (T10, T20 and T30, respectively). Two control treatments were included: ethanol 70% for 5 sec and mercury chloride for 10min. Murashige and Skoog (1962) culture medium was used, supplemented with sucrose (20 g/L), thiamine-HCl (0,4 mg/L), m-Inositol (100 mg/L), BAP (0,05 mg/L), AG (0,05 mg/L), ANA (0,02 mg/L), agar (7 g/L), and a 5.8 pH. Explants were maintained in a growth chamber at a 27-30°C and 16hr of artificial light. The percent of alive and not contaminated shoots was evaluated 8, 16 and 24 days after planting. Treatment differences were established using t-student at 0.05%. The best disinfection treatment, 24 days after planting, was the 10% (v/v) solution of sodium hypochlorite during 10 min.

Key words: Contamination, cassava, tissue culture, disinfectant, chlorine

INTRODUCCIÓN

La yuca ha adquirido importancia en los últimos años, debido a los distintos usos que pueden darse a la misma (Industrial: obtención de almidón y alcohol; consumo humano: raíces frescas, casabe, hojuelas, gofio, naiboa, mañoco y cerveza; y consumo animal: sustituto de cereales). Sin embargo, el

incremento del área de cultivo se ha visto limitado por la insuficiencia de semilla, ya que la producción de propágulos es limitada. Esto obedece a que el sistema tradicional de propagación es por estacas y el factor de multiplicación planta/año varía entre 10 y 20, es decir, una planta madura produce entre 10 y 20 estacas de 20 cm al año, dependiendo de la variedad. Esto representa una tasa de propagación muy baja, la

cual también está afectada por las pérdidas que se presentan por efecto del material enfermo (CIAT, 1980a).

Se ha demostrado que la técnica del cultivo de tejidos es apropiada para la rápida y masiva propagación de plantas. La regeneración de plantas enteras a partir de ápices meristemáticos de yuca es una técnica bien establecida con beneficios adicionales a la propagación, como lo son: la eliminación de patógenos, almacenamiento *in vitro* y el intercambio internacional de germoplasma. Uno de los mayores inconvenientes en el cultivo de tejidos es la contaminación, la cual puede tener origen en diversas fuentes: el material vegetal, el área de trabajo, los instrumentos o herramientas, la vidriería, e inclusive, el propio investigador. Los tallos o estacas de la yuca, expuestos a la contaminación durante el largo ciclo de desarrollo del cultivo, están generalmente infectados de patógenos fungos, bacterianos y virales, especialmente cuando la plantación de donde se tomaron está afectada (CIAT, 1982). Para el establecimiento de los explantes en condiciones *in vitro*, la limpieza del material es de primordial importancia. En el caso de los tejidos, los contaminantes que llevan las yemas sobre su superficie se eliminan con la desinfección. Si por el contrario se encuentran dentro del tejido, su eliminación es muy difícil, y en estos casos, es recomendada la inclusión de fungicidas y bactericidas en el medio de cultivo, o bien, el tratamiento de las plantas donantes de ápices meristemáticos con altas temperaturas (CIAT, 1980b).

El éxito de las plantaciones rentables de yuca se inicia con la utilización de semilla de alta calidad, que represente fielmente la variedad, que sea vigorosa y especialmente libre de plagas y enfermedades (Mantilla, 1993). Algunas metodologías de desinfección de explantes de yuca proponen el corte de los brotes entre 1 y 2 cm de longitud, su lavado por tres veces en agua destilada, remoción de las hojas visibles, repetición del lavado y su inmersión en etanol al 70 % por 60 segundos, seguido de tres enjuagues en agua doblemente destilada (Kartha, 1984). Lavados de jabón detergente durante 5 min, alcohol absoluto 95 % durante 10 min, y posteriormente, con hipoclorito de sodio comercial 2,5 % v/v durante 10 min, seguido de tres lavados con agua destilada estéril (González *et al.*, 2005). O bien, la desinfección de las yemas en etanol por no más de 5 segundos y su posterior inmersión en una solución de hipoclorito de calcio o de sodio durante 2 ó 3

minutos, y por último su enjuague 4 ó 5 veces con agua destilada esterilizada (CIAT, 1980b). Tomando en consideración que uno de los principales problemas que afectan el método del cultivo *in vitro* es la contaminación por hongos y bacterias y que a su vez, la literatura es muy diversa en cuanto a métodos de desinfección en el caso de la yuca. La limpieza o desinfección del material vegetal es de vital importancia, especialmente si este proviene del campo donde los brotes de yuca están expuestos a la contaminación durante el largo ciclo de desarrollo del cultivo, se requiere entonces mejorar las metodologías hacia el uso de reactivos fáciles de adquirir y manipular, efectivos y económicos. Entre estos compuestos útiles como germicidas y agentes oxidantes para la desinfección de explantes se encuentra la solución de hipoclorito de sodio (NaOCl), que presenta las ventajas de que se enjuaga fácilmente, se consigue en presentación comercial de uso doméstico (Suárez, 1997) y es muy económico.

Sobre estas bases, el objetivo planteado en el presente trabajo, fue evaluar el efecto de la desinfección de ápices de yuca del cultivar "Querepa Rosada", con tres concentraciones de hipoclorito de sodio y tres tiempos de inmersión.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad de Oriente, *Campus* Juanico, Maturín, estado Monagas, Venezuela.

Obtención del material vegetal, corte, lavado y desinfección de los brotes

Se utilizaron brotes terminales de tallo de 3 ó 5 cm de longitud del cultivar Querepa Rosada recolectados en una plantación comercial de yuca, localizada en Jusepín, estado Monagas. Los brotes se cortaron todos a un mismo tamaño (2 cm), sometiéndose luego a un lavado con agua corriente (30 min), posteriormente se lavaron con una solución jabonosa por 5 min, en agitación constante (detergente antibacterial Axion), para luego enjuagarlos con abundante agua corriente. Una vez efectuado el lavado, los brotes fueron colocados en una solución de Kumulus DF (fungicida inorgánico a base de 80 % de azufre), 3 g/L por 30 min y enjuagados con agua corriente. Luego los brotes fueron llevados a la cámara de flujo laminar para proceder a la desinfección del material y posterior

aislamiento de los explantes, tal cual como se describe a continuación: Las soluciones se prepararon realizando diluciones de hipoclorito de sodio (i. a. 5,25 %) hasta las concentraciones deseadas. Los brotes fueron sumergidos en las tres concentraciones del desinfectante por los períodos de tiempo establecidos y luego se lavaron tres veces con agua destilada estéril. Los brotes meristemáticos se mantuvieron en agua destilada estéril hasta el momento del aislamiento de los ápices.

Aislamiento, siembra e incubación de los ápices

En la cámara de flujo laminar se removieron las estípulas hasta disponer de un ápice de 1 mm el cual se cortó y adherido al bisturí se transfirió rápidamente al tubo de ensayo con medio de cultivo. La siembra se realizó en tubos de ensayo de 10 cm de largo y 2,5 cm de diámetro, con 10 ml de medio MS (Murashige y Skoog, 1962), suplementado con sacarosa (20 g/L), Tiamina.HCl (0,4 mg/L), m-Inositol (100 mg/L), BAP (0,05 mg/L), AG (0,05 mg/L), ANA (0,02 mg/L), agar (7 g/L), y pH 5,8. Los explantes se mantuvieron en una cámara de crecimiento con temperaturas que fluctuaron entre los 27 y 30 °C y 16 horas de luz artificial.

Diseño Experimental, variables evaluadas y análisis estadístico

Se utilizó un diseño estadístico completamente aleatorizado con 11 tratamientos, cada

uno con 10 repeticiones, un explante por repetición y por tubo de ensayo. Los tratamientos estuvieron conformados por la combinación de las concentraciones 10, 20 y 30 % de cloro comercial, para 0,525; 1,05 y 1,575 % de hipoclorito de sodio (C10, C20 y C30, respectivamente), y los tiempos de inmersión: 10, 20 y 30 min (T10, T20 y T30, respectivamente). Se incluyeron además dos testigos: Etanol 70 % por 5 segundos y HgCl₂ por 10 minutos. El efecto de los tratamientos se determinó a los 8, 16 y 24 días después de la siembra (dds), a través de la determinación del porcentaje de ápices vivos y no contaminados (sanos). Las diferencias entre los porcentajes en cada fecha de evaluación se determinaron mediante la prueba para comparar dos porcentajes en una misma evaluación, descrita en Sokal y Rohlf (1969), al 0,05 % de probabilidad.

RESULTADOS

Porcentaje de ápices vivos y no contaminados a los 8 dds

En la Figura 1 se puede observar que los tratamientos con el mayor porcentaje de explantes vivos y no contaminados fueron: C10-T20, C20-T10, C30-T10 y C30-T20 (100; 90; 90 y 90 %, respectivamente), los cuales estadísticamente superaron al resto de los tratamientos y a los testigos, cuyos valores fueron de 60% para el caso del bicloruro de mercurio y del 20% para el etanol. Este último estadísticamente inferior al primero.



Figura 1. Porcentaje de ápices de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) cv. 'Querepa Rosada' vivos y no contaminados a los 8 días después de la siembra, luego de su desinfección con hipoclorito de sodio bajo tres concentraciones y tres tiempos de inmersión.

Porcentaje de ápices vivos y no contaminados a los 16 dds

En la Figura 2 se observa que los mayores porcentajes de explantes vivos y no contaminados se alcanzaron en los tratamientos: C10-T10, C10-T20, C20-T10, C20-T20 Y C30-T10 (80; 80; 90; 70; y 80 %, respectivamente), los cuales fueron estadísticamente superiores al resto de los tratamientos y a los testigos bicloruro de mercurio y etanol con 30 y 10%, respectivamente. Este último estadísticamente inferior al anterior.

Porcentaje de ápices vivos y no contaminados a los 24 dds

En la Figura 3 se observa que los tratamientos con mayores porcentajes de explantes vivos y no contaminados fueron: C10-T10, C10-T20, C20-T10, C20-T20 Y C30-T10 (50; 50; 50; 50 y 60 %, respectivamente), los cuales superaron estadísticamente al resto de los tratamientos y a los testigos bicloruro de mercurio y etanol con 20 y 10%, respectivamente. Este último estadísticamente inferior al anterior.

Porcentaje de ápices contaminados a los 8, 16 y 24 dds

La prueba de comparación de porcentajes detectó que el tratamiento con mayor contaminación a

los 8, 16 y 24 dds fue el testigo etanol 70 % (60, 90 y 100 % de explantes contaminados, respectivamente), el cual fue estadísticamente superior al resto de los tratamientos en los que únicamente se observó contaminación en C10-T20 y C20-T10 (10 % y 10 % de explantes contaminados, respectivamente) a los 16 y 24 dds (Datos no mostrados).

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos muestran que el proceso de desinfección con hipoclorito de sodio se vio afectado por la concentración y el tiempo de inmersión, apreciándose que la solución al 10 % por 20 min, pasó de un 100 % de ápices vivos y no contaminados a los 8 dds a un 50 % a los 24 dds, siendo estadísticamente igual en esta fecha al tratamiento con solución al 10 % por 10 min (80 % a los 8 dds y 50 % a los 24 dds). Por lo tanto, este último tratamiento puede ser considerado una técnica de desinfección aceptable basado en que, desde el punto de vista práctico, se escoge el de menor concentración por menor tiempo, con la intención de que el tejido sufra el menor daño posible dada la fitotoxicidad del cloro, logrando conseguir una metodología de desinfección efectiva y a la vez económica, de material donante proveniente directamente del campo.

La variación existente entre las distintas metodologías de desinfección, aun con el empleo de



Figura 2. Porcentaje de ápices de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) cv. 'Querepa Rosada' vivos y no contaminados a los 16 días después de la siembra, luego de su desinfección con hipoclorito de sodio bajo tres concentraciones y tres tiempos de inmersión.

el mismo producto, (González *et al.*, 2005; CIAT, 1980b), posiblemente se deba al nivel de contaminación que presenta el material vegetal de yuca de acuerdo con su procedencia. Al respecto, CIAT (1980b), señaló que la concentración de microorganismos contaminantes presentes en el tejido depende de las condiciones de crecimiento de las plantas donantes, y que mayor número de microorganismos se encontrará en tejidos provenientes del campo que del invernadero, y menos aun en tejidos provenientes de una cámara de crecimiento controlado. Por consiguiente, es necesaria la determinación de un protocolo de desinfección considerando las condiciones particulares del material que se empleará como donante del explante.

Concentraciones de hipoclorito de sodio y tiempos de inmersión semejantes a los empleados en este trabajo han sido utilizadas en la desinfección de otras especies. Al respecto, Sánchez-Cuevas y Salaverría (2004) al estudiar el control de la oxidación y la contaminación en el cultivo *in vitro* de fresa cv. Fresno, utilizando los mismos tratamientos descritos para la desinfección de los ápices de yuca, encontraron que mayor efectividad con 20 % de hipoclorito de sodio durante 20 min, ya que redujo la contaminación a 10 % y obtuvieron la mayor sobrevivencia (90 %) de los explantes. Concentraciones más altas o períodos de inmersión más prolongados causaron necrosis en el tejido. En igual forma, Guerra y Otahola (2005) trabajaron en la

desinfección de ápices de alpinia (*Alpinia purpurata* (Vieill) K. Schaum), lavando los explantes con abundante agua de chorro durante 10 minutos, sumergiéndolos en alcohol puro (98 % de pureza) durante un minuto, para después colocarlos en tres concentraciones de cloro comercial (5,25 % de hipoclorito de sodio en soluciones de agua:cloro 2:1, 3:1 y 4:1), combinados con tres tiempos de inmersión (10, 20 y 30 minutos). En las primeras evaluaciones realizadas observaron mayor sobrevivencia de los explantes en el tratamiento donde se utilizó la menor concentración de cloro y tiempos de inmersión de 10 y 20 minutos; mientras que en la mayor concentración la sobrevivencia disminuyó indicando toxicidad del cloro sobre los explantes. Estos trabajos señalan un efecto perjudicial del cloro sobre los explantes producto del aumento de la concentración, o bien, del incremento en el tiempo de inmersión. En la presente investigación fue posible observar que los periodos de inmersión de 10 y 20 minutos en combinación con las concentraciones de hipoclorito de sodio de 10 y 20%, así como también la combinación 10 minutos de inmersión a concentración de 30%, presentaron los mayores porcentajes de explantes vivos y no contaminados a los 16 y 24 dds, sugiriendo que la disminución en este porcentaje estuvo determinada por el tiempo de inmersión más que por las concentraciones de hipoclorito de sodio.

La inclusión como testigo del $HgCl_2$ (inmersión 10 minutos) no resultó ser un buen



Figura 3. Porcentaje de ápices de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) cv. 'Querepa Rosada' vivos y no contaminados a los 24 días después de la siembra, luego de su desinfección con hipoclorito de sodio bajo tres concentraciones y tres tiempos de inmersión.

tratamiento de desinfección al evaluar la mejor combinación del bajo porcentaje de explantes contaminados y una alta sobrevivencia, ya que aun cuando no se presentó contaminación en ninguno de los explantes tratados en las tres fechas de evaluación con este producto, los porcentajes de sobrevivencia a los 24 dds fueron muy bajos (20 %). Esto demostró su alta toxicidad, aspecto que reafirma Contreras (1991), al señalar que dentro de los desinfectantes más comunes, el cloruro de mercurio y el nitrato de plata son unos de los menos usados por su toxicidad, y en relación a efectividad, los mejores son los hipocloritos y el agua de bromo, seguidos por el peróxido de hidrógeno y el nitrato de plata. Por otra parte, Suárez (1997) indicó que cualquiera sea la metodología seguida para el proceso de desinfección, los tratamientos con soluciones desinfectantes que se usen, deben permitir retener la capacidad biológica de los tejidos y al mismo tiempo destruir cualquier contaminante fúngico o bacteriano.

El tratamiento con hipoclorito de sodio mostró ser muy efectivo para la desinfección superficial, es decir, para el control de los microorganismos contaminantes externos del material vegetal, en todas las concentraciones y tiempos de inmersión en estudio, ya que no se apreció la aparición de microorganismos en un lapso de 8 días después de la siembra, tiempo suficiente para el crecimiento de bacterias y hongos. La poca contaminación observada en las evaluaciones posteriores (16 y 24 dds) puede atribuirse a infecciones internas de los tejidos, no controlables por los tratamientos aplicados. Esto se corresponde con el CIAT (1982), al señalar que los tallos o estacas de yuca se encuentran expuestos a la contaminación durante el largo ciclo de desarrollo del cultivo, por lo que están generalmente infectados de patógenos fúngicos y bacteriales, y que algunas bacterias y casi todos los virus son sistémicos en la planta. Así mismo, el CIAT (1980b) afirmó que en el caso de los tejidos, los contaminantes que llevan las yemas sobre su superficie se eliminan con la desinfección, pero si los contaminantes se encuentran dentro del tejido, su eliminación es muy difícil y en estos casos se recomienda la inclusión de fungicidas o bactericidas en el medio de cultivo; aunque Suárez (1997) indicó que generalmente se considera que los tejidos de las plantas intactas y sanas son asépticos internamente y que la principal tarea de limpieza esta limitada a la desinfección superficial.

En este trabajo se pudo observar también que en la medida en que se incrementó el tiempo de inmersión de los explantes en las distintas concentraciones de hipoclorito de sodio, disminuyó la sobrevivencia. Esto puede ser debido a dos efectos. Uno directo relacionado con la toxicidad del producto a nivel celular; y uno indirecto porque el tejido se torna gomoso al incrementar la concentración de cloro, dificultando su manipulación, y por ende, el deterioro del explante. En este sentido, Díaz (2000) observó que todos los explantes de especies del género *Pasiflora* tratados con hipoclorito de sodio por 30 minutos estaban necrosados después de tres días de la siembra. Igualmente Sánchez-Cuevas y Salaverría (2004) al tratar explantes de fresa con hipoclorito de sodio al 30% (30 minutos), evidenciaron la ausencia de contaminación, pero no recomendaron su utilización porque la sobrevivencia fue baja indicando que este tratamiento fue tóxico para los explantes.

CONCLUSIONES

1. Para lograr un 50% de explantes vivos y no contaminados a los 24 dds, fue necesario que previo a la desinfección, los brotes se lavaran con agua corriente (30 min), luego fueron sumergidos en una solución de detergente líquido (5 minutos en agitación constante) y finalmente en fungicida Kumulus DF (3g/L por 30 min); posteriormente en la cámara de flujo laminar se desinfectaron con una solución al 10 % (v/v) de hipoclorito de sodio comercial (5,25%) durante 10 min, y se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril, manteniendo los brotes hidratados hasta el momento de aislar los explantes.
2. El testigo $HgCl_2$ (inmersión 10 min) no resultó ser un buen tratamiento, porque a pesar de que controló en 100% la contaminación, los porcentajes de sobrevivencia a los 24 dds fueron muy bajos (20 %).
3. Incrementos del tiempo de inmersión de los explantes en las distintas concentraciones de hipoclorito de sodio, redujo el porcentaje de sobrevivencia, ya que afectaron la consistencia del explante, al tornar su tejido gomoso, lo cual dificultó su manipulación.

AGRADECIMIENTO

Al Instituto de Investigaciones Agropecuarias y al Postgrado en Agricultura Tropical del Núcleo Monagas de la Universidad de Oriente.

LITERATURA CITADA

- Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). 1980a. Sistema de propagación rápida de la yuca. Serie 05-06-01. Cali, Colombia. 20 pp.
- Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). 1980b. El Cultivo de meristemas de yuca. Serie 04SC-02.02. Cali, Colombia. 40 pp.
- Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). 1982. Primer Taller Latinoamericano sobre Intercambio de Germoplasma de Papa y Yuca. (Memorias). Serie 03SC-6(82). Cali, Colombia. 295 pp.
- Contreras, I. 1991. Biotecnología vegetal. Universidad de los Andes. Facultad de Ciencias Forestales. Laboratorio de cultivos *in vitro*. Mérida, Venezuela. p. 37-39.
- Díaz, G., M. J. 2000. Regeneración de dos especies del género *Pasiflora* en cultivo de tejidos *in vitro* utilizando dos tipos de explantes de plantas adultas. Trabajo de Grado. Escuela de Ingeniería Agronómica. Universidad de Oriente. Maturín, Venezuela. p. 14.
- Guerra, D. y V. Otahola, 2005. Desinfección de ápices de alpinia (*Alpinia purpurata* (Vieill) K. Schaum) para establecimiento de cultivo *in vitro*. *In: J. Mayz; N. Alcorcés y A. Lárez* (Eds.). Memoria del XVI Congreso Venezolano de Botánica. Maturín, del 15 al 20 de mayo del 2005. Revista Saber (Suplemento) 17: 131-133.
- González, O.; J. Albarrán; G. De Martino y F. Fuenmayor. 2005. Propagación y conservación *in vitro* de clones de yuca a partir de diferentes tipos de explantes. *In: J. Mayz; N. Alcorcés y A. Lárez* (Eds.). Memoria del XVI Congreso Venezolano de Botánica. Maturín, del 15 al 20 de mayo del 2005. Revista Saber (Suplemento) 17: 127-130.
- Kartha, K. K. 1984. Cassava tissue culture. *In: Micropropagation of selected rootcrops, palms, citrus and ornamental species*. FAO/NORWAY. Roma. p. 50-67.
- Mantilla, J. E. 1993. Aspectos agronómicos del cultivo de yuca en Venezuela. *In: VIII Encuentro Nacional de Productores e Investigadores del Cultivo de la Yuca*. Convenio FEDEAGRO-CECOTUP-FCA. Alcaldía del Municipio Maturín, Edo. Monagas. 13 y 14 de Mayo 1993. p. 1-3.
- Murashige T. and F. Skoog. 1962. A revised médium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15: 473 – 493.
- Sánchez-Cuevas, M. y J. Salaverría. 2004. Control de la oxidación y la contaminación en el cultivo *in vitro* de fresa (*Fragaria X ananassa* Duch.). *UDO Agrícola* 4 (1): 21-26.
- Sokal, R. y J. Rohlf .1969. *Biometría: Principios y métodos estadísticos en la investigación biológica*. H. Blume. Madrid, España. p. 127-129.
- Suárez, A. E. 1997. Métodos de asepsia y esterilización. *In: M. Perea y J. Cedeño* (Eds.). *Cultivo de Tejidos Vegetales y sus Aplicaciones en la Agricultura*. Curso: UDO-OIEA, Maturín, Venezuela. p. 33-40.