

Uso de distintos desinfectantes superficiales para el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de *Grevillea robusta*.

Surface disinfectants for the in vitro establishment of Grevillea robusta nodal segments

BOGADO F¹; VERA BRAVO C²; AYALA P³; SANSBERRO P^{1,3}; LUNA C^{1,3} * exaequo

¹Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Nordeste, CC N° 209, C.P. W3402BKG, Corrientes, Argentina. Tel.: +54 379 4427589 ext. 118/156.

²Estación Experimental INTA Bella Vista, CC N° 5. CP 3432, Corrientes, Argentina.

³Instituto de Botánica del Nordeste (IBONE-CONICET).

*Autor para correspondencia: e-mail: cluna@agr.unne.edu.ar; claudiaverluna@gmail.com

Resumen

La contaminación microbiana es un problema constante que compromete el desarrollo de todas las técnicas *in vitro*. Las pérdidas causadas por microorganismos contaminantes principalmente hongos y bacterias constituyen un serio problema a escala mundial en los numerosos laboratorios. Por ello para determinar un protocolo de desinfección de segmentos nodales de *Grevillea robusta* provenientes de brotes recolectados de plantas mantenidas en invernadero, se ensayaron diferentes soluciones de desinfectante (hipoclorito de sodio, peroxosulfato ácido de potasio, peróxido de hidrogeno, y dos fungicidas, oxiclóruo de cobre y carbendazim), en distintas concentraciones (de 0,5 a 10 g. L⁻¹) y tiempos de exposición (15, 30 o 60 minutos). Los explantes fueron cultivados en un medio basal de Murasghige y Skoog. A los 28 días de cultivo, se determinó porcentaje de contaminación, oxidación y supervivencia/establecimiento de los explantes. Si bien todos los tratamientos ensayados han permitido el establecimiento de los cultivos entre un 36,67± 5,77 y un 90,00±10 %; los mejores resultados se obtuvieron con un pretratamiento de NaClO 0,25 g. L⁻¹ y Carbendazim 0,75 g. L⁻¹ por 15 minutos recomendándolo para un establecimiento exitoso, con un porcentaje de contaminación mínimo y un efecto fitotóxico en cuanto a ennegrecimiento u oxidación de los tejidos, dentro de los parámetros razonables.

Palabras claves: Roble sedoso - micropropagación - fungicidas.

Introducción

Grevillea robusta A. Cunn., es una especie originaria de Australia, perteneciente a la familia Proteaceae (Muchiri, 2004); su madera se utiliza como materia prima para paneles decorativos, compensados y producción de muebles como camas, mesas y sillas debido a su brillo natural y apariencia atractiva; recomendada también para sistemas agroforestales por su baja competitividad con cultivos agrícolas o para proteger plantaciones por ser de hoja perenne, crecimiento rápido y no muy denso; además posee un importante potencial melífero (Trianoski, 2010).

La recolección de semillas de *Grevillea* es extremadamente difícil, ya que sus frutos son dehiscentes antes de su maduración y además, ésta generalmente es irregular. Las semillas no presentan latencia, pero pierden su viabilidad rápidamente (Martins *et al.*, 2004). Por ello una alternativa para su propagación es el cultivo de tejidos o micropropagación, que ofrece la posibilidad de obtener gran cantidad de plantas de un genotipo seleccionado; a partir de partes aisladas en un ambiente artificial; el cual posee dos características: la asepsia y el control de los factores que afectan el crecimiento (Roca y Mroginski, 1993; Orozco-

Summary

Microbial contamination is a constant problem, which often compromises development of all *in vitro* techniques. The losses caused by contaminating microorganisms, mainly fungi and bacteria, are a serious worldwide problem in numerous laboratories. Thereby, to determine a protocol for the disinfection of nodal segments of *Grevillea robusta* from sprouts collected from greenhouse plants, different disinfectant solutions were tried (sodium hypochlorite; potassium hydrogen persulfate; hydrogen peroxide; and two fungicides, copper oxychloride and carbendazim), using different concentrations (between 0.5 and 10 g. L⁻¹) and times of exposure (15, 30, and 60 minutes). The explants were cultivated in a basal medium of Murasghige and Skoog. At 28 days of culture, the percentages of contamination, oxidation and survival/establishment of all the explants were determined. Even though all treatments tested allowed establishment between 36.67± 5.77 and 90.00±10 %, the best results were obtained with a pretreatment using NaClO 0.25 g. L⁻¹ and Carbendazim 0.75 g. L⁻¹ for 15 minutes. Thus, this pre-treatment is recommended for a successful establishment, with a minimum percentage of contamination, and phytotoxic effects of blackening or tissue oxidation within reasonable parameters.

Keywords: Silk oak – micropropagation - fungicides.

Castillo, 2004; Castillo, 2008; Mroginski *et al* 2010). La propagación de muchas especies forestales se ha optimizado con esta técnica, géneros como *Pinus*, *Thuja*, *Quercus*, *Picea*, *Abies*, *Sequoia*, *Pawlonia*, *Ulmus*, *Eucalyptus* etc. (Nehra *et al.*, 2005).

Para lograr el establecimiento del material vegetal de manera exitosa, libre de contaminación se utilizan agentes desinfectantes como el hipoclorito de sodio (NaClO), hipoclorito de calcio (CaClO), peróxido de hidrogeno (H₂O₂), etanol (C₂H₅OH), y bicloruro de mercurio (HgCl₂), entre otros; de los cuales el hipoclorito de sodio ha sido el más usado por los investigadores en el establecimiento *in vitro* de tejidos vegetales (Mroginski y Roca, 1993). Por otra parte existen otras técnicas para el control de la contaminación *in vitro*, tales como el uso de fungicidas y antibióticos en la planta madre, el explante y/o el medio de cultivo (Pierik, 1987; Phillips *et al.*, 1981; Pariani, 2015).

Aun cuando se han desarrollado algunos protocolos de micropropagación para distintas especies de *Grevillea* (Gorst *et al.*, 1978; Watad *et al.*, 1992; Bunn y Dixon, 1992; Rajasekaran, 1994;

Leonardi *et al.*, 2001; Santi *et al.*, 2006; Vera Bravo, 2007) es necesario ajustarlos, ya que cada genotipo presenta un comportamiento diferente en el establecimiento.

Materiales y métodos

Material vegetal: Se trabajó con plantas injertadas de *G. robusta* de aproximadamente 2 años, que crecieron en macetas (4 L) en condiciones de invernadero. El germoplasma fue cedido por INTA-EEA Bella Vista y Pomera Maderas S.A. (en el marco del Proyecto PIA BIRF 7520 AR). Los explantes introducidos fueron segmentos nodales de 1,5-2 cm de longitud conteniendo una yema axilar, extraídos de ramas jóvenes no lignificadas.

Tratamientos de desinfección: En todos los casos primeramente se realizó un pre-tratamiento consistente en un cepillado fuerte y firme con solución acuosa de NaOCl al 5 %, para luego ser transferidos a distintos tratamientos con agentes desinfectantes o fungicidas: hipoclorito de sodio (NaOCl), peróxido de hidrogeno (H₂O₂), peroxosulfato ácido de potasio o persulfato de potasio (KHSO₅), oxícloruro de cobre (OXI) 50% granulado dispersable y Carbendazim (CBZ) suspensión concentrada 500g. L⁻¹; en diferentes concentraciones y tiempos de exposición en agitación constante con agitador orbital (Tabla 1). Una vez finalizado el tratamiento de desinfección, los explantes fueron enjuagados tres veces con agua destilada estéril.

Considerando lo antes mencionado, el objetivo del presente trabajo es evaluar el uso de distintos desinfectantes superficiales en el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de *Grevillea robusta*. A. Cunn.

Medio de cultivo: se utilizó un medio de cultivo compuesto por las sales y vitaminas de Murashige y Skoog (1962), en su concentración original (MS), semisólido (agar SIGMA® A-1296, 0.65 %), enriquecido con sacarosa 30 gr·L⁻¹ y libre de reguladores del crecimiento. El pH del medio de cultivo se ajustó a 5,8 con KOH o HCl antes de la adición del agente gelificante; esterilizándose por calor húmedo mediante autoclave a 1.46 kg·cm⁻² durante 20 minutos.

Siembra de los explantes y condiciones de cultivo: Los segmentos nodales se colocaron obedeciendo a la polaridad de la planta a razón de un explante por tubo bajo cabina de flujo laminar en condiciones asépticas y fueron incubados durante 28 días en condiciones de luz (fotoperiodo 14 hs., 116 μmol m⁻² s⁻¹ luz PAR) y temperatura (27±2°C) controlados. Se cultivaron 10 explantes por tratamiento en cámara de flujo laminar, efectuándose 3 repeticiones.

Análisis estadístico: Los resultados fueron expresados en porcentaje de contaminación, oxidación y supervivencia/ establecimiento de los explantes. Determinándose Análisis de la Varianza Multivariado (ANAVAM) y Test de comparaciones múltiples de Hotelling.

Tabla 1: Agentes desinfectantes utilizados en el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de *G. robusta*

Pre-tratamiento (g. L ⁻¹)	Tratamientos		Concentración (g. L ⁻¹)	Tiempo de exposición (min.)
	Nº	Agente		
NaOCl 0,25	T1	NaOCl	1,5	30
	T2	NaOCl	3	30
	T3	H ₂ O ₂	9	30
	T4	KHSO ₅	10	30
	T5	KHSO ₅	5	30
	T6	OXI	0,5	15
	T7	OXI	0,5	30
	T8	OXI	0,5	60
	T9	CBZ	0,5	15
	T10	CBZ	0,5	30
	T11	CBZ	0,5	60
	T12	CBZ	0,75	15

Referencias: NaOCl: Hipoclorito de Sodio; KHSO₅: Peroxosulfato ácido de Potasio; H₂O₂: Peróxido de Hidrogeno; CBZ: Carbendazim; OXI: Oxícloruro de cobre.

Resultados y discusión

En las especies forestales se presentan una serie de dificultades que hacen que las primeras etapas de la micropropagación *in vitro* sean más dispendiosas, por ejemplo: es más difícil desinfectar un tejido leñoso (lignificado) que un tejido joven (suculento), los explantes provenientes de tejidos lignificados liberan sustancias tóxicas (fenoles) que matan al explante o impiden la inducción de brotes, la obtención de explantes a partir de árboles adultos imposibilitan en muchos casos, las respuestas también de brotación múltiple (Carrizosa *et al.*, 1994).

Sin embargo, en la literatura se encuentran abundantes estrategias que ayudan a solucionar estas dificultades, como la combinación de tratamientos de desinfección superficial con fungici-

das o agentes microbianos en las plantas donantes de explantes, utilización de sustancias que previenen o minimizan la producción y liberación de fenoles como lo son los antioxidantes, etc. Por ello en la actualidad, el establecimiento y estandarización del protocolo de desinfección en especies leñosas se consideran fundamentales para procesos de micropropagación masiva (Martínez Montaña, 2009; Quintero García, 2011).

Los fungicidas y los bactericidas son agentes químicos usados para la prevención y/o eliminación de agentes patógenos o contaminantes dentro del cultivo de tejidos y es muy común incluirlos en el protocolo de desinfección (Villamar Flores, 2014; Pariani, 2015); en la Tabla 2 se presentan los resultados de por-

Tabla 2: Porcentaje de contaminación, oxidación y supervivencia/establecimiento de los explantes de *G. robusta*.

Tratamientos	Contaminación (%)	Oxidación (%)	Supervivencia/Establecimiento (%)
T1	50,0±10,00	3,33±5,77	46,67± 11,55 c
T2	53,3±5,77	10 ± 10,00	36,67± 5,77 bc
T3	36,7±5,77	16,67±5,77	46,67± 5,77 bc
T4	56,7±5,77	6,67± 5,77	36,67± 5,77 b
T5	43,3±15,28	20,0±10,00	40,00± 0,00 bc
T6	56,7±5,77	6,67± 5,77	36,67± 5,77 bc
T7	46,7±11,55	13,33±5,77	40,00± 10,00 bc
T8	43,3±5,77	10 ± 0,00	46,67± 5,77 bc
T9	50,0±10,00	3,33± 5,77	46,67±11,55 c
T10	20,0±1,00	0,00± 0,00	80,00 ±10,00 a
T11	40,0±20,00	6,67± 5,77	53,33± 15,28 c
T12	3,33± 5,77	6,67±11,55	90,00±10,00 a

Los valores expresan el promedio de tres repeticiones ± SD (n= 30). Análisis de la Varianza Multivariado (ANAVAM), letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($P > 0,05$, Test de comparaciones múltiples de Hotelling).

centaje de contaminación, oxidación y supervivencia/ establecimiento de los explantes; como puede observarse si bien todos los tratamientos ensayados han permitido el establecimiento exitoso de los cultivos entre un 33,33±5,77 y un 90,00±10,00 % (Figura 2 D y E); los mejores resultados se lograron con un pre-tratamiento de NaClO 0,25 g. L⁻¹ y CBZ 0,75 g. L⁻¹ por 15 minutos (T 12), que no solo posibilitó el mayor porcentaje de establecimiento presentando diferencias significativas ($P \leq 0,01$) con respecto a los demás tratamientos; sino que también registró uno de los menores valores de oxidación en los tejidos (6,67±11,55 %) y logró controlar más eficazmente la contaminación con solo un 3,3±0,58%. No así de efectivo han resultado los tratamientos con oxiclورو de cobre, donde se registraron niveles de contaminación de entre 46,7±1,15 y 56,7±0,58 %; aunque existen antecedentes de su uso para la desinfección de yemas axilares con una combinación de fungicidas y bactericidas con posterior sumergimiento de los explantes en hipoclorito de sodio en *Gua-dua angustifolia* (Jiménez *et al.*, 2006); mientras que en segmentos nodales de la misma especie, fue muy efectiva la inmersión durante 30 y 60 minutos en soluciones de oxiclورو de cobre, registrando los menores índices de contaminación por hongos luego de establecido el material (López, 2012).

En la micropropagación de algunas especies leñosas, se ha comprobado que el empleo de fungicidas con otros agentes desinfectantes como el hipoclorito de sodio, ha permitido lograr niveles de asepsia mayores al 70% (Chung y Carrasco, 2002; Marulanda e Isaza, 2004; Pedroza-Manrique *et al.*, 2007); en *Eucalyptus grandis* existen reportes tanto del uso de oxiclورو de cobre como fungicida preventivo de contacto, pero utilizado en plantas donantes eliminando muy eficazmente los hongos de su microbiota; como de carbendazim (CBZ) en concentraciones variables logró controlar el crecimiento de los contaminantes del cultivo *in vitro* más frecuentes (Hernández y González, 2010); y sobre todo en la fase de establecimiento de varias especies el empleo de este fungicida para el control de la contaminación fungosa está muy bien documentado (Vieira *et al.*, 1988 ; Danby *et al.*, 1994; Carrazana *et al.*, 1997, Cruz Martín *et al.*, 2003).

Si bien a nivel local, uno de los protocolos utilizados para el establecimiento de material de campo de *G. robusta*, es el propuesto por Vera Bravo (2007) que incluye como agente desinfectante en distintas concentraciones al hipoclorito de sodio

(NaOCl); el cual presenta una serie de ventajas como germicida (bacterias y hongos) (Mateos, 2005; Flores García *et al.* 2008) y agente oxidante para la desinfección de explantes, que se enjuaga fácilmente, se consigue en presentación comercial de uso doméstico y es muy económico (Suárez, 1997; Borges García *et al.*, 2009); en este caso fue necesario ajustarlo al genotipo con el que se trabajó; ya que si bien ha sido complementario al incluirlo en el pre-tratamiento no así como tratamiento desinfectante presentando entre un 50,0±1,00 y 53,3±0,58 % de cultivos contaminados (T 1 y T2 respectivamente) (Tabla 2, Figura 2A).

En cuanto a la utilización del peróxido de hidrógeno (H₂O₂) como agente desinfectante; si bien ha sido empleado exitosamente en especies del género *Pinus* como antimicrobiano previniendo la proliferación de algunos hongos (Muñoz López *et al.*, 2009; Mas I Gisbert *et al.*, 2011); su acción desinfectante se centraría en su capacidad de actuar como un agente oxidante energético, disociándose en agua y oxígeno molecular, sin dejar residuos tóxicos (Iáñez, 1998); a la vez que favorecería la absorción en los tejidos del hipoclorito de sodio desinfectantes que se utilicen en combinación (Mas I Gisbert *et al.*, 2011); en el ensayo éste compuesto (T3) no ha demostrado una alta eficiencia en su acción, ya que se observó un 36,7±0,58 % de cultivo contaminado y un 46,67± 5,77% de establecimiento exitoso (Tabla 2).

El peroxosulfato ácido de potasio o persulfato de potasio (KHSO₅) es un agente oxidante del grupo químico de los peróxidos, utilizado para la limpieza y desinfección por vía química de barricas de roble empleadas en la elaboración y crianza de los vinos para evitar contaminaciones microbiológicas o químicas (Remírez y Palacios, 2012; Palacios *et al.*, 2011). Este producto demuestra un alto poder oxidativo, se han informado múltiples aplicaciones como ser: bactericida, fungicida, esporicida y viricida muy usado en limpieza profunda de áreas críticas y semicríticas de hospitales (instrumental odontológico, quirúrgico, dispositivos médicos, tubuladuras, cánulas, material de vidrio, endoscopios) y ámbitos sanitarios; manufactura de jabones, reductora en fotografía, reactivo analítico, promotor de polimerización, productos farmacéuticos, modificación de almidón, agente de maduración de harinas, desfibrilador de papel resistente a la humedad, desaprestado textil (Palacios *et al.*, 2011); pero no existen registros de su utilización en el cultivo de tejidos como agentes desinfectante; si bien no ha resultado

exitoso su uso en el control de la contaminación; entre un 43,3±1,53% (T5) y 56,7±0,58 % (T4) de cultivo contaminado (Figura 2 B), se logró valores de establecimiento del cultivo del 36,67±5,77 % (T4), similares sino mejores que otros agentes desinfectantes habitualmente utilizados en el cultivo de tejidos vegetales, como ser el hipoclorito de sodio; aunque por otra parte también presentó uno de los porcentajes más altos de oxidación de los tejidos (Tabla 2, Figura 2 C).

En la Figura 1 se muestra la representación gráfica del Análisis de Coordenadas Principales (ACP) de las diferentes soluciones de desinfección de segmentos nodales de *Grevillea robusta*. Dichas soluciones fueron agrupadas en cuadrantes distintos en la gráfica Biplot, en función de dos primeros componentes principales, representando el 100% de la variabilidad total de los resul-

tados. En el primer componente principal (CP1), que representa el 70,3% de la variabilidad, se puede ver de forma evidente las desinfecciones que se correlacionan en forma positiva y significativa, siendo T12 y T10 debido a su mayor asociación con respecto al porcentaje de brotes establecidos. En tanto T 8, T1, T9 y T11 no tienen inercia sobre la CP1, ya que la proyección sobre el eje "x" es muy próximo a cero. Mientras que los segmentos de T7, T6, T2 y T5 que se encuentran hacia la izquierda del gráfico Biplot, están más correlacionados con los mayores porcentajes de infección y oxidación. Sin embargo para la CP2, que responde por 29,7% de la variación, contribuciones significativas positivas fueron determinadas en su mayor medida para T4 y T3 debido a que se vieron más asociados en cuanto al porcentaje de segmentos oxidados.

Figura 1: Biplot resultante del ACP de las distintas soluciones de desinfección de segmentos nodales de *Grevillea robusta*, en función de los dos primeros componentes principales.

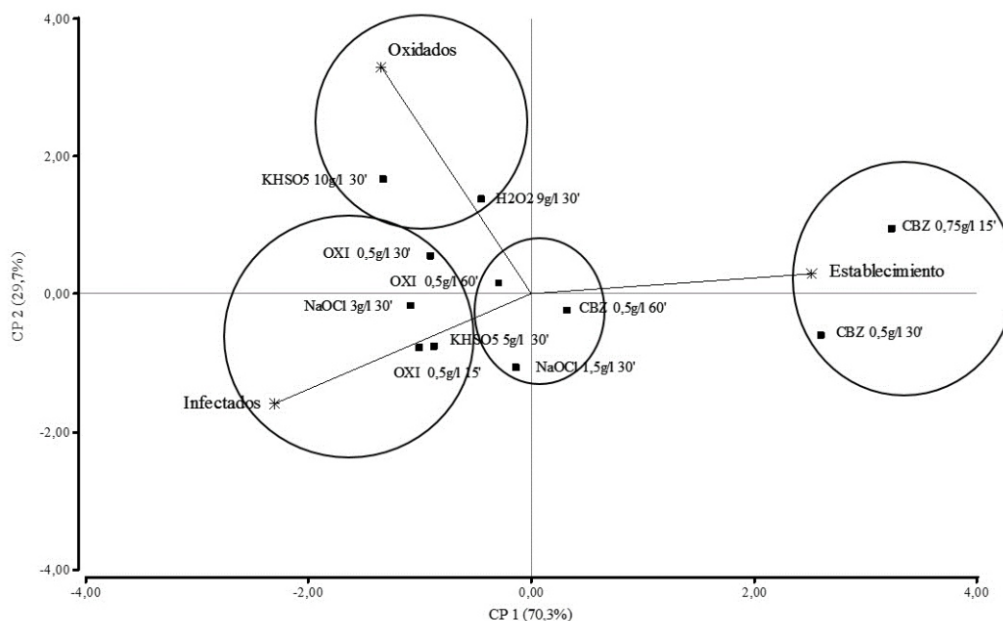
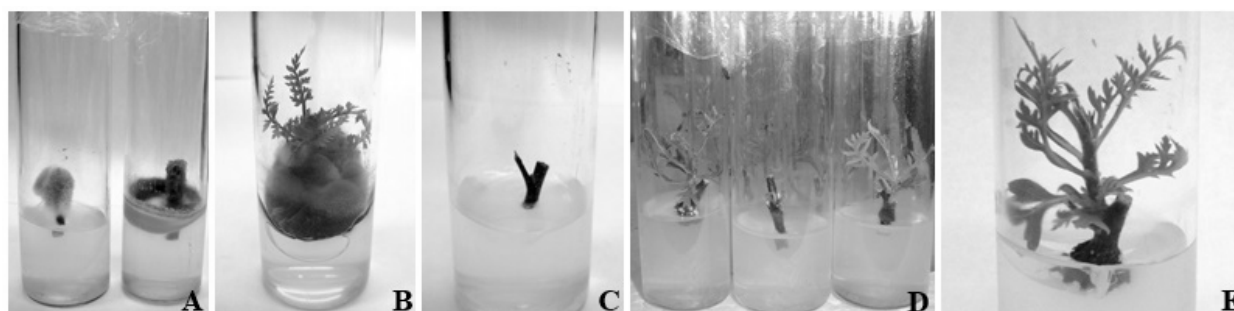


Figura 2: Segmentos nodales de *G. robusta* contaminados (A y B); oxidados (C) y establecidos exitosamente (D y E).



Conclusión

La contaminación microbiana es un problema constante que compromete el desarrollo de todas las técnicas *in vitro*. Las pérdidas causadas por microorganismos contaminantes principalmente hongos y bacterias constituyen un serio problema a escala mundial en los numerosos laboratorios. Por ello se recomienda para el cultivo *in vitro* de segmentos nodales de *G. robusta*, como

procedimiento de desinfección el empleo de un pre-tratamiento de NaClO 0,25 g. L⁻¹ y Carbendazim 0,75 g. L⁻¹ por 15 minutos; para un establecimiento exitoso, con un porcentaje de contaminación mínimo y un efecto fitotóxico en cuanto a ennegrecimiento u oxidación de los tejidos, dentro de los parámetros razonables.

Agradecimientos

A la Secretaría General de Ciencia y Técnica, UNNE (PI N° 014/10, 001/14) y Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (PICTO N° 0213-2011) y Proyecto PIA 10070.

Bibliografía

- BORGES GARCÍA M., ESTRADA ABEAL E., PÉREZ RODRÍGUEZ I., MENESES RODRÍGUEZ S.** (2009). Uso de distintos tratamientos de desinfección en el cultivo *in vitro* de *Dioscorea alata* L. clon caraqueño. Revista Colombiana de Biotecnología. 11 (2): 127-135.
- BUNN E., DIXON K.** (1992). *In Vitro* Propagation of the Rare and Endangered *Grevillea scapigera* (Proteaceae). Hortscience 27(3):261-262.
- CARRAZANA D., LEÓN A., HERRERA L., ALVARADO Y., QUIÑONES R.** (1997) Efecto de diversos fungicidas comerciales sobre hongos contaminantes en biofábricas. Centro Agrícola. 1: 61-66.
- CARRIZOSA M. S., RAMÍREZ C., GUERRERO E., SANTAMARÍA L. M., HODSON DE JARAMILLO E.** (1994). Cultivo de tejidos para la propagación y mejoramiento de especies forestales. En: II Congreso. La investigación en la Universidad Javeriana. Santafé de Bogotá, D.C. (Colombia) 1: 547-559.
- CHUNG P., CARRASCO B.** (2002). Micropropagación de *Salix* spp a través de meristemos folia-res. Ciencia e Investigación Forestal – Instituto Forestal/Chile. 12 (1): 63-77.
- CRUZ MARTÍN M., ACOSTA SUÁREZ M., CAPOTE A, LEIVA M, ALVARADO Y** (2003). Efecto del carbendazim para el control de *Colletotrichum* sp., contaminante del establecimiento *in vitro* de callos de café. Biotecnología vegetal 3(2): 111 - 113.
- DANBY S, BERGER F, HOWTT D, WILSON A** (1994) Fungal contaminants in *Primula*, *Coffea*, *Musa* and *Iris* tissue culture. En: Lumdsen, P, Nicholas J y Davies B (Eds) Physiology growth and development of plant in culture. pp 397-403. Dordrecht.
- FLORES GARCÍA A, ÁLVAREZ MOCTEZUMA J, RODRÍGUEZ DE LA OJ, CORONA AMBRIS A** (2008). Germinación *in vitro* de semillas de *Nolina parviflora* (H.B.K.) Hemsl. Foresta Veracruzana 10: 27-33.
- GORST JR, BOURNE RA, HARDAKER SE, RICHARDS AE, DIRCKS S, DE FOSSARD RA** (1978). Tissue culture propagation of two *Grevillea* hybrids. Procedure International Plant Propagation Society 28: 435-446.
- SANTI K, JOHNSTONAM, WILLIAMS R, BEVERIDGE C** (2006). Adventitious root formation in *Grevillea* (Proteaceae), an Australian native species. Scientia Horticulturae 10: 171–175.
- HERNÁNDEZ Y, GONZÁLEZ M** (2010). Efectos de la contaminación microbiana y oxidación fenólica en el establecimiento *in vitro* de frutales perennes. Cultivos Tropicales 31(4). pp. 00-00 [citado 2015-12-15] Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-59362010000400015&lng=es&nrm=iso.
- IAÑES P** (1998). Metabolismo energético. In: Curso de microbiología general. Facultad de Ciencia Agrarias. Universidad Nacional del Nordeste. Corriente República, Arg. [Fecha de consulta: 12 de Diciembre 2015]. Disponible en: http://fai.unne.edu.ar/biologia/microgeneral/15_micro.htm
- JIMÉNEZ V, CASTILLO J, TAVARES E, GUEVARA E, MONTIE M** (2006). *In vitro* propagation of the neotropical giant bamboo, *Guadua angustifolia* Kunth, through axillary shoot proliferation. Plant Cell Tissue and Organ Culture 86: 389 - 395.
- LEONARDI C, RUGGERI A, LA MALFA S** (2001). Hormone effects on *in vitro* proliferation and rooting of *Grevillea* explants. Scientia Horticulturae 90: 335–341.
- LÓPEZ R** (2012). Efecto predesinfectante del oxiclورو de cobre sobre hongos contaminantes en segmentos nodales de *Guadua angustifolia* Kunth, para su establecimiento *in vitro*. Revista de Investigaciones - Universidad del Quindío. 23(2): 120-126.
- MARTÍNEZ MONTAÑO O** (2009). Control químico *in vitro* de hongos contaminantes de nardo (*Polianthes tuberosa* L.). Tesis para optar al grado de Ingeniero Agrónomo con especialidad en Parasitología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez”. México. 52pp.
- MARULANDA ML, ISAZA LV** (2004). Establecimiento *in vitro* de heliconias con fines de producción masiva. Scientia et Technica. 26: 193-197.
- MAS I GISBERT H, PÉREZ-LAORGA ARIAS E, PITXER M, VEINTIMILA P, CAMPOS E** (2011). Influencia del tratamiento por inmersión en peróxido de hidrógeno para el control químico de *Fusarium circinatum* en la viabilidad y el almacenamiento de las semillas del género *Pinus*. Acta de II Reunión de Sanidad Forestal de la Sociedad Española de Ciencias Forestales. 20 p.
- MATEOS P** (2005). Control de las poblaciones microbianas: Esterilización y desinfección. Departamento de Microbiología y Genética. Universidad de Salamanca. Salamanca. Boletín Biología (13): 7-10.
- MUCHIRI M** (2004). *Grevillea robusta* in agroforestry systems in Kenya. Journal of Tropical Forest Science, 16(4), 396-401.
- MUÑOZ LÓPEZ C, CUERVO SÁNCHEZ E, AMPUDIA DÍAZ M, GASTÓN GONZÁLEZ A, PEÑUELAS RUBIRA J, IGLESIAS SAUCE S, HERRERO SIERRA N** (2009). Control químico de *Fusarium circinatum* Nirenberg & O'Donnell en semillas del género *Pinus*. 5º Congreso Forestal Español. Ref: 5CFE01-503. 12 p.
- NEHRA NS, BECWAR MR, ROTTMANN WH, PEARSON L, CHOWDHURY K, CHANG S, WILDE HD, KODRZYCKI RJ, ZHANG C, GAUSE KC, PARKS DW, HINCHEE MA** (2005). Forest biotechnology: innovative methods, emerging opportunities. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant, 41: 701-717.
- PALACIOS A, CHATONNET P, GHEZZI G** (2011). Higiene de recipientes de madera para el envejecimiento del vino. La Semana Vitivinícola. SeVi (3.345): 438-443.
- PARIANI S** (2015). La incubadora: Condiciones ambientales de cultivo-Asepsia. En: Plantas de probeta: manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos *in vitro* / Marianelen Cedrés Gazo ... [et al.] ; coordinación general de Sandra Sharry ; Marina Adema ; Walter Abedini. - 1a ed. adaptada. - La Plata: Universidad Nacional de La Plata.
- PEDROZA-MANRIQUE J, GONZALEZ-MOLINA S, TELLEZ-ORTIZ D** (2007). Micropropagación de *Dodonea viscosa* (L) Jacq: una especie en vías de extinción. Revista Colombiana de Biotecnología IX (2): 33-44.
- PHILLIPS R, ARNOTT SM, KAPLAN SE** (1981). Antibiotics in Plant Tissue Culture: Rifampicin effectively controls bacterial contaminants without affecting the growth of short-term explant culture of *Helianthus tuberosus*. Plant Science Letters 21: 235-240.
- PIERIK RL** (1987). *In Vitro* Culture of Higher Plants. Martinus Nijhoff Publishers. Dordrecht (Netherlands). 343 p.
- QUINTERO GARCÍA O** (2011). Avances en el establecimiento *in vitro* de cuatro especies de Magnolia. En: Avances en la estrategia para la conservación de las especies de la familia Magnoliaceae en jurisdicción de CORANTIOQUIA. Boletín Técnico Biodiversidad (6): 100p.

29. **RAJASEKARAN P** (1994). Production of clonal plantlets of *Grevillea robusta* in *in vitro* culture via axillary bud activation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 39(3): 277-279.
30. **REMÍREZ E, PALACIOSA** (2012). Limpieza y desinfección de barricas a través de microondas de alta frecuencia. *INNERBARREL. Revista "Enólogos" Suplemento "Investigación y Ciencia" XIV (75):34-38.*
31. **ROCA W, MROGINSKI L** (1993). Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Colombia. 969 pp.
32. **SUÁREZ AE** (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.
33. **TRIANOSKI R** (2010). Avaliação do potencial de espécies florestais alternativas, de rápido crescimento, para produção de painéis de madeira aglomerada. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia Florestal, Área de Concentração de Tecnologia e Utilização de Produtos Florestais. Universidade Federal do Paraná. Curitiba. Brasil. 262 pp.
34. **VERABRAVO C** (2007). Establecimiento *in vitro* de *Grevillea robusta* Cunn. Resumen ejecutivo PE1203 E.E.A. Bella Vista. Corrientes. Resultados proyectos específicos 2006-2007. Pág. 20.
35. **VIEIRA S, PEREIRA T, LUZ E** (1988) Propagação do Guaraná *in vitro*. I. Seleção de fungicidas. *Fitopatologia brasileira* 13(3): 183-185.
36. **VILLAMAR FLORES L** (2014). Estandarización de las etapas de micropropagación *in vitro* de la Guaba (*Inga insignis*) endémica de la provincia de Imbabura. Tesis para optar al grado de Ingeniera en Biotecnología. Sangolquí. Ecuador. 145 pp.
37. **WATAD AA, BEN-JAACOV J, TAL E, SOLOMON H** (1992). *In vitro* propagation of *Grevillea* species. *Acta Horticulturae (ISHS)* 316:51-54.