

Efecto de la concentración del hipoclorito de sodio sobre la contaminación y oxidación de meristemas en la micropropagación de banano

Effect of sodium hypochlorite concentration on contamination and oxidation of meristems in banana micropropagation

Maura Isabel Díaz-Lezcano^{1,*}, Karen Denisse Pereira-Báez¹, Jorge Ramón Brítez -Moreira¹, Jazmín Yerutí Mongelós-Franco¹ & Carlos Emilio Mussi-Cataldi¹

¹Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Agrarias, San Lorenzo, Paraguay

*Autor correspondiente: maura.diaz@agr.una.py.

Resumen: El experimento se realizó en el Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Asunción, con el objetivo de evaluar dos tratamientos de desinfección de explantes para la micropropagación del banano (*Musa* spp.) variedad Nanaico. Se utilizaron 80 hijuelos de 30 - 40 cm de los cuales se extrajeron los ápices meristemáticos que fueron sembrados en medios MS (Murashige y Skoog 1962) con el agregado de 1 g.l⁻¹ de carbón activado como antioxidante. Los tratamientos consistieron en dos concentraciones de NaClO (5 y 10 %) durante cinco minutos. El diseño experimental utilizado fue completamente al azar. Las variables evaluadas fueron: porcentaje de supervivencia, grado de oxidación y porcentaje de contaminación de plántulas. Los datos obtenidos fueron sometidos al análisis de varianza al 5 % de probabilidad de error. No se registraron diferencias significativas entre los tratamientos de desinfección aplicados relacionados a la sobrevivencia de explantes de banano cultivados *in vitro*, aunque existieron diferencias significativas con respecto al grado de oxidación y contaminación microbiana. Se logró una regeneración de 12,5% de los segmentos nodales de banano sembrados. En conclusión, al incrementar la concentración de hipoclorito de sodio, el porcentaje de explantes contaminados con hongos y bacterias fue menor, sin embargo, esto se tradujo en un incremento del grado de oxidación de explantes de *Musa* spp variedad Nanaico.

Palabras clave: *Cultivo in vitro, contaminación, desinfección, establecimiento, propagación.*

Abstract: The experiment was carried out in the Biotechnology Laboratory of the Facultad de Ciencias Agrarias of the Universidad Nacional de Asunción, with the objective of evaluating two explant disinfection treatments for the micropropagation of banana (*Musa* spp.) variety Nanaico. Eighty shoots of 30 - 40 cm were used, from which the meristematic apices were extracted and planted in MS media (Murashige and Skoog 1962) with the addition of 1 g.l⁻¹ of activated carbon as an antioxidant. The treatments consisted of two concentrations of NaClO (5 and 10%) for five minutes. The experimental design used was completely randomized. The variables evaluated were: percentage of survival, degree of oxidation and percentage of contamination of seedlings. The data obtained were subjected to variance analysis at 5% probability of error. No significant differences were recorded between the applied disinfection treatments related to the survival of banana explants cultivated *in vitro*, although there were significant differences with respect to the degree of oxidation and microbial contamination. A regeneration of 12.5% of the planted banana nodal segments was achieved. In conclusion, by increasing the concentration of sodium hypochlorite, the percentage of explants contaminated with fungi and bacteria was lower, however, this translated into an increase in the degree of oxidation of *Musa* spp variety Nanaico.

Key words: *Contamination, disinfection, establishment, in vitro culture, propagation.*

Introducción

El consumo mundial *per cápita* de banana asciende a 16 kg/habitante/año y las exportaciones mundiales de banano ocupan el primer lugar entre las frutas frescas, tanto en volumen como en valor, de acuerdo con la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación (FAO 2017). Según

la FAO (2022), el comercio mundial de banano se vio afectado por varios factores en 2021, tanto del lado de la oferta como de la demanda, entre otros: la persistencia de la pandemia del COVID 19, las perturbaciones relacionadas con el clima, las preocupaciones sobre el agravamiento de la propagación de enfermedades de las plantas, las

Recibido: 31/07/2022 Aceptado: 28/09/2023



normas más estrictas sobre los niveles máximos de residuos en algunos mercados importantes, además una demanda inferior en varios mercados de importación; por lo tanto, los datos comerciales relativos a ese año indican que el volumen de exportaciones a nivel mundial se redujo en alrededor de 1,7 millones de toneladas en 2021.

El éxito del cultivo se basa fundamentalmente en la implantación de mudas libres de patógenos, por consiguiente, en banano, cuya multiplicación es asexual, se han desarrollado diferentes técnicas de propagación para obtener los propágulos en volumen y calidad adecuada, entre las cuales el cultivo *in vitro* surge como una opción interesante.

Actualmente, la propagación *in vitro* de plantas de *Musa*, vía organogénesis a partir de ápices se mantiene como el método más utilizado (Cejas *et al.*, 2011). Esto se debe, principalmente, a la posibilidad de multiplicar gran cantidad de plantas de calidad, libres de patógenos, en períodos de tiempo y espacio físico reducidos, sin interrupción estacional. Uno de los principales problemas que se han presentado en la micropropagación es la presencia de contaminantes microbianos endógenos (Fajardo, 2006). Al respecto, la desinfección de los explantes es fundamental para esta técnica, y la concentración del desinfectante puede ser determinante para su éxito (Díaz Lezcano *et al.*, 2016).

Bogado *et al* (2015) refieren que 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.

Hernández y González (2010) afirman que entre los microorganismos fungos comúnmente introducidos al cultivo de tejidos *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Penicilium*, *Fusarium* y *Curvularia*. Asimismo, manifiestan que las bacterias gram negativas como *Azospirillum* y *Xanthomonas* son contaminantes frecuentes en el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales.

Para lograr el establecimiento del material vegetal de manera exitosa, libre de contaminación

microbiana se utilizan agentes desinfectantes como el hipoclorito de sodio (NaClO), hipoclorito de calcio (CaClO), peróxido de hidrógeno (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 (Angarita & Perea, 1991).

Según Muñoz Castellano *et al* (2022), el NaClO y su ingrediente activo, el ácido hipocloroso (HClO), son desinfectantes a base de cloro más utilizados a nivel mundial. El HClO es un antimicrobiano de acción rápida que interactúa con muchas biomoléculas, como aminoácidos, lípidos, ácidos nucleicos y componentes de la membrana que contienen azufre, causando daño celular. El NaClO puede estar relacionado con un efecto directo sobre el crecimiento del micelio fúngico (Márquez *et al*, 2016). El cloro puede inhibir hongos (Zoffoli *et al*, 2005) y puede ser letal en bacterias (Owoseni y Okoh 2017).

Según López Gómez *et al* (2011), la susceptibilidad de los explantes al hipoclorito de sodio está asociada al sodio, el mismo es un nutriente no esencial para los tejidos vegetales además de ser altamente tóxico para muchas plantas.

Por ello, resulta necesaria la realización de más investigaciones sobre el tema con el fin de disipar las interrogantes de este método. El objetivo del trabajo fue evaluar los efectos de la concentración del hipoclorito de sodio sobre la propagación *in vitro* del banano (*Musa* spp.) variedad Nanicao.

Materiales y métodos

El experimento se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Asunción en San Lorenzo, Paraguay.

Medio de cultivo

En tubos de vidrio (75 x 10 mm), se cargó 2,5 ml del Medio Basal MS suplementado con 15 g/l de sacarosa y gelificado con 4 g/l de ágar, además del agregado de 1 g.l⁻¹ de carbón activado, 50 mg.l⁻¹ de mioinositol y 10 mg.l⁻¹ de glicina, el pH del medio

fue ajustado a 5,8, posteriormente autoclavados a 121 °C, 1 atm de presión durante 20 minutos. El protocolo fue propuesto por Díaz Lezcano *et al.* (2016) para la micropropagación de *Musa* spp. variedad Nanicao.

Material vegetal y explantes

Los materiales vegetales fueron adquiridos del campo experimental de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Asunción, ubicado en latitud y longitud 25° 21' 54.80" S y 57° 30' 8.77" O.

Se utilizaron 80 ápices provenientes de hijuelos de banano, *Musa* sp. variedad Nanicao, de 30 - 40 cm de altura que fueron obtenidos de la planta madre. Se procedió a la separación del pseudotallo realizando cortes con machete a una altura aproximada de 10 cm por encima de las raíces. Inmediatamente, se procedió a la remoción de las hojas del pseudotallo y los tejidos blancos de la base del cormo. Con ayuda del microscopio estereoscópico, los semicormos fueron sometidos a reducciones hasta obtener un cono aproximadamente de 1 cm, formado por el meristema central y un mínimo del tejido de rizoma para facilitar la manipulación. A medida que iban siendo reducidos, fueron colocados en un frasco que contenía agua destilada para evitar su oxidación.

Desinfección del material vegetal

En la cámara de flujo laminar, previamente desinfectada con alcohol etílico al 70 % y 30 minutos de luz ultravioleta, el explante fue sometido a dos tratamientos de desinfección, propuestos por Ramírez *et al.* (2002):

Tratamiento uno

Sumergir los explantes por 30 segundos en alcohol etílico al 70 %, posteriormente a hipoclorito de sodio al 5 % durante 5 minutos para luego realizarse el triple enjuague con agua destilada estéril.

Tratamiento dos

Sumergir los explantes por 30 segundos en alcohol etílico al 70 %, posteriormente a hipoclorito de so-

dio al 10 % durante 5 minutos para luego realizarse el triple enjuague con agua destilada estéril.

Establecimiento *in vitro* de plántulas

En la cámara de flujo laminar, posterior a la desinfección, con ayuda de una pinza previamente flammada fue establecido un explante por tubo, además se aseguró que la base del explante quedara en contacto con el medio, seguidamente fueron sellados los tubos con papel aluminio y parafinado e introducidos en bolsas plásticas negras para finalmente ser trasladados a una sala de crecimiento a 25 °C, 70 % de humedad relativa, en condiciones de fotoperiodo 16:8 horas luz y oscuridad.

Evaluación de variables

Los explantes se observaron a los 15 días posteriores a su inoculación en el medio de cultivo. Las variables medidas fueron:

- **Porcentaje de supervivencia:** se realizó mediante la observación del desarrollo de brotes, siendo considerados como tales si presentan un tamaño aproximado de 2 mm con una coloración blanca verdusca.
- **Grado de oxidación:** se midió considerando las paredes y parte aérea de cada ápice meristemático, mediante la utilización de la escala de cinco grados (Tabla 1) adaptada de Drew & Smith (1990). Seguidamente, se calculó el grado de oxidación de acuerdo a la fórmula propuesta por French y Hebert (1980):

$$GO = \frac{n(0) + n(1) + n(2) + n(3) + n(4) + n(5)}{\sum n \times 5}$$

GO: grado de oxidación.

N: frecuencia de la severidad observada correspondiente a la nota.

Σn : sumatoria de las observaciones.

- **Porcentaje de contaminación:** se basó en la identificación visual del crecimiento micelial de los hongos o la apariencia lechosa de color blanquecino o amarillo, característico de las bacterias, pudiéndose manifestar ambos pató-

Tabla 1. Escala utilizada para la evaluación del grado de oxidación adaptada de Drew & Smith (1990).

Grado	Descripción
0	No hubo oxidación, coloración del explante de blanco-amarillo crema.
1	Incipiente coloración parda sin llegar a la necrosis del tejido.
2	25 % oxidación levemente visible, ¼ del explante oxidado.
3	50 % oxidación media, ½ del explante oxidado.
4	75 % oxidación alta, ¾ del explante oxidado.
5	100 % de tejido necrótico.

genos: dentro del medio de cultivo, alrededor del explante en contacto con el medio de cultivo o saliendo de la meristemo del explante.

Diseño experimental y análisis estadístico

Se evaluaron dos concentraciones de hipoclorito de sodio para determinar la eficiencia en la desinfección de ápices de *Musa* spp. con la finalidad de realizar el establecimiento *in vitro*. Los resultados obtenidos fueron analizados mediante análisis de varianza (ANOVA) utilizando el programa estadístico INFOSTAT para un diseño completamente al azar. Cada tratamiento contó con ocho unidades experimentales y con una repetición en el tiempo. La diferencia de medias entre tratamientos fue analizada mediante el test de Tukey al 5 % de probabilidad de error ($P < 0,05$).

Resultados y discusión

No se registraron diferencias significativas entre los tratamientos de desinfección aplicados relacionados a la sobrevivencia de explantes de banano cultivados *in vitro*, aunque existieron diferencias significativas con respecto al grado de oxidación y contaminación microbiana. En este sentido, para el Tratamiento 2 (NaClO al 10%) se observó oxidación de los explantes levemente visible y 25,7 % de contaminación bacteriana. El tratamiento (T1) con hipoclorito de sodio al 5 % presentó incipiente coloración parda sin llegar a la necrosis del tejido y 34,3 % de explantes contaminados con hongos y bacterias.

Al cabo de 60 días de experimentación se logró regenerar 12,5% de los explantes originalmente sembrados, provenientes de ambos tratamientos, registrándose formación de hojas y raíces completas. De lo antes referido, se observó el T1 (NaClO al 5%) fue más efectivo en el control de la oxidación de los explantes de *Musa* spp pero que el T2 (NaClO al 10%) fue más eficiente en la prevención de la contaminación microbiana. Los resultados obtenidos con los tratamientos de desinfección se detallan en la Tabla 2.

Uno de los problemas en la supervivencia fue relacionado con los efectos de toxicidad causados por la alta concentración del hipoclorito de sodio, seguido por la contaminación microbiana. En ese sentido, según Montano *et al.* (2004), la concentración de hipoclorito de sodio ideal, para desinfectar sumergiendo los explantes de banana durante 10 minutos es del 3 %.

Por su parte, Ramírez *et al.* (2014) registraron que con aplicación 2 % de hipoclorito de sodio, durante 15 minutos, se produce la mejor desin-

Tabla 2. Resultado de tratamientos de desinfección de explantes de banana (*Musa* spp.).

Tratamiento	Sobrevivencia (%)	Grado de oxidación	Contaminación (%)	Agente causal
T1	24,8 a	1,29 a	34,3 a	hongo y bacteria
T2	20,8 a	2,43 b	25,7 b	bacteria
CV (%)	58,39	27,56	22,77	

fección de los explantes de *Guadua angustifolia*, además de la mayor sobrevivencia. Ancasi *et al.* (2014) y Marulanda *et al.* (2005) mencionan que, en general, la concentración del hipoclorito de sodio a ser utilizada debe ser del 1 al 3 % para activar la diferenciación celular de los explantes y lograr una buena desinfección.

Aguilera Arango *et al.* (2021) concluyeron que el uso de hipoclorito de sodio al 2,5 % por 10 minutos resultó ser el mejor tratamiento de desinfección de segmento uninodales de *Manihot esculenta* Crantz variedad Corpoica La Francesa y, Menegazzo *et al.* (2019), sostienen que el control de la contaminación microbiana en el cultivo *in vitro* de *Manihot esculenta* se debe en gran parte a la acción superficial del hipoclorito de sodio como agente desinfectante.

De lo antes mencionado, las concentraciones superiores al 3 % ocasionan daños fitotóxicos a los tejidos del explante, lo que se traduce en explantes muertos (Marulanda *et al.* 2005). De acuerdo con varios autores (Abdelnour *et al.* 2011; Borges *et al.* 2004 y Del Ángel *et al.* 2014), el hipoclorito de sodio es un producto recomendado normalmente para la desinfección *in vitro* de explantes, pero para algunas especies este compuesto puede ser tóxico.

Además, Del Ángel *et al.* (2014) han reportado que semillas esterilizadas con dicho compuesto, pueden retener suficientes cantidades del agente reactivo como para interferir con la germinación y que, aun lavando el tejido varias veces con agua no se elimina por completo, de esta manera, el cloro residual es absorbido por el tejido.

En ese contexto, el cloro residual afecta la permeabilidad celular de las células vegetales, impidiendo el adecuado desarrollo celular de las células meristemáticas y por lo tanto no genera la brotación del explante (Borges *et al.* 2004).

Los resultados obtenidos en este experimento, se ajustan a los obtenidos por Alvarenga *et al.* (2007), quienes observaron que a mayores porcentajes de hipoclorito de sodio se ocasionaban mayores daños o muerte de explantes debido a los efectos tóxicos casi inmediatamente después de la aplicación.

Contrariamente a los resultados obtenidos en la presente investigación, Laynez Garsaball y Sánchez

Cuevas (2006), sostienen que las menores concentraciones de hipoclorito de sodio inducen a mayores porcentajes de sobrevivencia de los explantes, mientras que el porcentaje de sobrevivencia disminuyó en los tratamientos con altas concentraciones de este desinfectante, evidenciando el efecto tóxico del hipoclorito en los tejidos.

Por otro lado, una de las dificultades para el establecimiento de cultivos *in vitro*, es la presencia de microorganismos contaminantes tanto endógenos como exógenos que afectan la viabilidad y el desarrollo de los explantes una vez que se han establecido *in vitro*, por lo tanto se requiere establecer tratamientos que conlleven a minimizar o eliminar dichos microorganismos sin afectar la viabilidad de los explantes (Angarita & Perea, 1991).

A este respecto, Pereira *et al.* (2003) mencionan que la contaminación fúngica en el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales procede principalmente del ambiente, mientras que las bacterias generalmente acompañan al explante y son un indicador de una desinfección deficiente. Así mismo, estos autores afirman que la contaminación bacteriana es más perjudicial, ya que no se detecta de forma temprana y los agentes contaminantes pueden ser transferidos durante los sub cultivos.

A este respecto, García *et al.* (2015) registraron los porcentajes más altos de contaminación, al utilizar hipoclorito de sodio al 5 %, principalmente por la aparición de hongos. Asimismo, resultados similares fueron obtenidos por Arbeláez *et al.* (2016), quienes evaluaron diferentes tratamientos de desinfección para el establecimiento *in vitro* de meristema apical de *Musa spp.*, y constataron que la probabilidad de contaminación por hongos y bacterias es 8,65 veces mayor cuando se utiliza hipoclorito de sodio al 5 %, en contraste con la utilización de hipoclorito de sodio al 10 %.

Mongelós Franco *et al.* (2020) obtuvieron resultados similares en el proceso de desinfección de explantes de banano, siendo el tratamiento con NaClO al 10% durante 5 minutos fue el más efectivo para la desinfección y establecimiento *in vitro* de meristema apical de *Musa sp.*

Por su parte, Díaz Lezcano *et al.* (2016), refieren

que en la micropropagación de *Musa* spp. variedad Nanicao los meristemas fueron sometidos a un procedimiento de desinfección por 20 minutos con hipoclorito de sodio al 5 %, resultado un porcentaje de contaminación de los ápices de 39,06 % en la fase de establecimiento, y de 22,39 % en el primer subcultivo, en tanto que la oxidación en la fase de establecimiento fue de 9,37 % y en el primer subcultivo fue de 8,85 %.

En ese sentido, Sánchez *et al.* (2009) mencionan que las soluciones de hipoclorito de sodio que contienen 5 % disponible de cloro, se descomponen rápidamente a 24 °C, por lo cual se pudieron presentar altos niveles de contaminación fúngica.

Por el contrario, en el T2, no se registraron hongos contaminantes, este resultado se puede explicar porque el hipoclorito de sodio contribuye a la desinfección de los explantes ya que el mecanismo de acción del compuesto permite la deshidratación de los microorganismos, no obstante se registró mayor grado de oxidación.

Sin embargo, en el mencionado tratamiento, se observó finas películas de crecimiento bacteriano a partir del explante formando camino y rodeando el borde del frasco. En ese marco, la contaminación microbiana y la oxidación del tejido donador han sido los problemas más severos que se han enfrentado en la micropropagación de plantas (Castro *et al.*, 1993). En experimentos realizados por Viloria (1993) con varios métodos de desinfección de plantas *in vitro* no tuvieron éxito y concluyó que la diversidad de la microbiota presente en el material vegetal seleccionado, así como el grado de contaminación que caracteriza a las plantas cultivadas en el campo, dificulta la esterilización exitosa de los explantes y su establecimiento *in vitro*.

Resultados similares fueron reportados por Díaz Lezcano *et al.* (2021) quienes mencionan que el tratamiento de desinfección de ápices meristemáticos de banano para su establecimiento *in vitro*, el cual consistió en la inmersión en una solución de NaClO (10 %) durante cinco minutos, registró aproximadamente 21 % de sobrevivencia y 26 % de contaminación microbiana se atribuye a hongos pertenecientes a los géneros *Aspergillus*,

Penicillium, *Fusarium*, y bacterias Gram negativas.

Díaz Lezcano *et al.* (2023) concluyeron que no existen diferencias significativas atribuibles al tiempo de inmersión de explantes de banano (*Musa* spp.) sumergidos por 30 segundos en alcohol etílico al 70 %, posteriormente en hipoclorito de sodio al 5 % durante 5 y 10 minutos, en cuanto a contaminación microbiana u oxidación fenólica lo que indica que tanto la concentración del hipoclorito de sodio (5%) y los tiempos empleados en la desinfección son recomendables. Al mismo tiempo, lograron identificar la presencia de los géneros *Penicillium* y *Aspergillus* como agentes causales de la contaminación fúngica de los explantes, en ambos tratamientos.

Las investigaciones Pérez Pascual *et al.* (2023) manifestaron que el protocolo de desinfección de explantes de *Brachiaria humidicola* se optimizó al utilizar una mezcla de fungicida y bactericida además de la utilización de hipoclorito de sodio al 20 % y etanol al 70 % no es suficiente para la desinfección del tejido; sin embargo, se incrementó el porcentaje de necrosis de los segmentos nodales. Esto último se debe al efecto fitotóxico del que produce el hipoclorito de sodio y el etanol.

Finalmente, una desinfección eficaz es aquella en la que los explantes que han sido expuestos a una baja concentración desinfectante, presentan tasas reducidas de contaminación microbiana y oxidación permitiendo el desarrollo de los explantes (Alves *et al.* 2010), aspectos que no fueron observados en este experimento, con ambos tratamientos.

Conclusión

En las condiciones de los ensayos aplicados se observó que al incrementar la concentración de hipoclorito de sodio, el porcentaje de explantes contaminados con hongos y bacterias fue menor, sin embargo, esto se tradujo en un incremento del grado de oxidación de explantes de *Musa* spp.

Contribución de los autores

Todos los autores contribuyeron de manera equitativa en la elaboración de este artículo.

Conflictos de interés

Los autores declaran no tener conflictos de interés.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Asunción por el apoyo financiero para la realización de los ensayos.

Literatura citada

- Abdelnour, A., Aguilar, M & Valverde, L. (2011). Micropropagación de Pílon (*Hieronyma alchorneoides*). *Agronomía Costarricense*, 35(2): 9–19.
- Aguilera Arango, G.A., Puentes Díaz, C.L. & Rodríguez Henao, E. (2021). Métodos de desinfección para el establecimiento in vitro de dos variedades de yuca para uso agroindustrial. *Revista de Investigación e Innovación Agropecuaria y de Recursos Naturales*, 8(3): 21–30.
- Alvarenga, V., Abdelnour, E. & Villalobos, A. (2007). Conservación in vitro de chayote (*Sechium edule*). *Agronomía Mesoamericana*, 18(1): 65–73.
- Alves, M.R., Rodrigues, M.D., de Oliveira, A. & da Rocha, F. (2010). In vitro establishment and callogenesis in shoot tips of Peach Palm. *Revista Caatinga*, 23(1): 40–44.
- Arbeláez, L.M.A., Montoya, J.L. & Saavedra, S.A.R. (2016). Evaluación de protocolos para el establecimiento y desinfección in vitro de meristemas de plátano *Musa* spp. *Vitae*, 23(Supl. 1): 391–395.
- Borges, M., Ros, C., Castellanos, C. & Velásquez, R. (2004). Efecto de diferentes métodos de desinfección en el establecimiento in vitro de *Guadua angustifolia* Kunth. *Biotecnología Vegetal*, 4(4): 237–242.
- Borges, M., Estrada, E., Pérez, I. & Meneses, 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.
- Castro, D., Jiménez, C., Ríos, D., Restrepo, A. & Giraldo, C. (1993). Utilización de las técnicas de cultivo de tejidos vegetales in vitro para la propagación y conservación de germoplasma de cuatro especies vegetales en vías de extinción en el oriente antioqueño: Comino (*Aniba perutilis*), Abarco (*Cariniana pyriforme*) y Guayacán (*Tabebuia serratifolia*). *Documento Divulgativo del CONARE*, 8: 1–44.
- Cejas, I., Capote, I., Aragón, C., Escalona, M., Pino, C., González, J., Rodríguez, R., Noceda, C., Cañal, M.D.J., Sandoval, J., Roels, S. & Debergh, P. (2011). Optimización del protocolo de propagación del plátano cv. CEMSA ¾ en Biorreactores de Inmersión Temporal. *Agrociencia Uruguay*, 15(1): 13–18.
- Del Ángel, O., Gilber, A., Gómez, M. & García, H. (2014). Desinfección y regeneración eficiente de chayote in vitro (*Sechium edule* Jacq. Sw.). Pp. 23–32 in Ramos, M., & Aguilera, V. (Eds.). *Congreso Interdisciplinario de Cuerpos Académicos: Ciencias Agropecuarias, Handbook T-II*. Valle de Santiago: ECORFAN. x + 240 pp.
- Díaz Lezcano, M.I., Flor Benítez, B.A., Enciso Garay, C.R. & González Segnana, L.R. (2016). El carbón activado y las condiciones de oscuridad en la micropropagación de banana variedad Nanicão. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 18(2): 140–146.
- Díaz Lezcano, M.I., Pereira Báez, K.D., Benítez Vera, S.G., Brítez Moreira, J.R., Alegre, C.E., Duarte Ovejero, N.N., Mongelós Franco, J.Y., Mussi Cataldi, C.E. & Batte Martínez, H.D. (2021). Identificación de agentes causales de la contaminación microbiana durante la micropropagación de *Musa* spp. *Steviana*, 13(2), 21–29.
- Díaz Lezcano, M.I., Quiroz, M.I., Espínola, V., Britos, M.J. & Romero, J.A. (2023). Tiempo de inmersión en hipoclorito de sodio en la desinfección de meristemas de banano para su propagación clonal. *Revista de Investigación Científica y Tecnológica*, 7 (1): 131–139.

- Drew, R.A. & Smith, M.K. (1990). Field evaluation of tissue-cultured bananas in south-eastern Queensland. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 30(4): 569–574.
- FAO [Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura]. 2017. Situación del mercado del banano 2015-16. Roma: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. iv + 10 pp. [Consulted: 26.v.2018]. <<https://www.fao.org/3/i7410s/i7410s.pdf>>.
- FAO [Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura]. (2022). Banano. Análisis del mercado 2021. Roma: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. vi + 14 pp. [Consulted: 26.vii.2022]. <<https://www.fao.org/3/cc1610es/cc1610es.pdf>>.
- Fajardo, L. (2006). *Establecimiento in vitro de yemas axilares de Guadua angustifolia Kunth*. (Tesis de Maestría). Santa Clara: Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. 80 pp.
- French, E. & Hebert, T. (1980). *Métodos de investigación fitopatológica*. San José: Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas. 289 pp.
- García, D., Mesa, N., & Ocampo, M. (2015). Estandarización del protocolo de desinfección para la micropropagación de *Aspidosperma polyneuron* (en línea). *Revista Colombiana de Biotecnología*, 2(17): 75–84.
- García, N., Giraldo, D. & Castro-Ríos, K. (2016). Eficiencia de tratamientos para el control de hongos competidores, durante la producción comercial de *Pleurotus* spp. @*limentech: Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 14(1): 27-37.
- Hernández, Y., & González, M.E. (2010). Efectos de la contaminación microbiana y oxidación fenólica en el establecimiento in vitro de frutales perennes. *Cultivos Tropicales*, 31(4): 1–19.
- Layne Garsaball, J.A., & Sánchez Cuevas, M.C. (2006). Desinfección de ápices de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) cv. 'Querepa Rosada' con hipoclorito de sodio. *Revista Científica UDO Agrícola*, 6(1): 60–66.
- López Gómez, P., Iracheta Donjuan, L., Castellanos Juárez, M., Méndez López, I., Aguirre Medina, J.F., Gutiérrez Díez, A., Ojeda Zacarías, M.C. & Pérez Pérez, B.R. (2011). Variación en la tolerancia a desinfectantes de genotipos élite de *Coffea* spp. cultivados in vitro. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 2(5): 645–657.
- Marulanda, M., Gutiérrez, L., Uribe, M. & Márquez, M. (2005). Micropropagación de *Guadua angustifolia* (en línea). *Actualidades Biológicas*, 27(82): 5–15.
- Muñoz Castellanos, L.N., Borrego Loya, A., Villalba Bejarano, C.V., González Escobedo, R., Orduño Cruz, N., Villezcas Villegas, G.P., Rodríguez Roque, M.J., Avila Quezada, G.D. & Vargas Arispuro, I. (2021). El cloro y su importancia en la inactivación de bacterias, ¿Puede inactivar virus? *Revista Mexicana de Fitopatología*, 39(Especial): 198–206.
- Bogado, F.A., Vera Bravo, C., Ayala, P.G., Sansberro, P.A. & Luna, C.V. (2015). Uso de distintos desinfectantes superficiales para el establecimiento in vitro de segmentos nodales de *Grevillea robusta*. *Ciencias Agronómicas*, 16(27): 11–16.
- Menegazzo, R.F., Rickli, M.E., Menegazzo, A.W., Lopes, A.D., Manfio, C.E. & Koefender, J. (2019). In vitro multiplication of cassava varieties. *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR*, 22(4): 101–107.
- Mongelós Franco, Y., Mussi Cataldi, C.E., Duarte Ovejero, N.N. & Díaz Lezcano, M.I. (2020). Protocolo de desinfección para establecimiento in vitro de meristema apical de banano *Musa* spp. *CEDAMAZ*, 10(2): 47–50.
- Montano, N., Reynaldo, D., López, J., Torres, M., Otero, E., Gutiérrez, V. & Martínez, M. (2004). Nueva metodología para la implantación in vitro del plátano y el banano en biofábricas. Pp. 2–8, in *XVI Forum de Ciencia y Técnica Municipal*. Santo Domingo, Villa Clara.
- Murashige, T., & Skoog, F.A. (1962). Revised

- Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3): 473–497.
- Owoseni, M.C., & Okoh, A.I. (2017). Assessment of chlorine tolerance profile of *Citrobacter* species recovered from wastewater treatment plants in Eastern Cape, South Africa. *Environmental Monitoring and Assessment*, 189(4)201: 1–12.
- Zoffoli, J.P., Latorre, B.A., Daire, N. & Viertel, S. (2005). Effectiveness of chlorine dioxide as influenced by concentration, pH, and exposure time on spore germination of *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum* and *Rhizopus stolonifer*. *Ciencia e Investigacion Agraria*, 32(3): 142–148.
- Pereira, J.E.S., Mattos, M.L. & Fortes, G.R. (2003). Identificação e controle com antibióticos de bactérias endofíticas contaminantes em ex-plantas de batata micropropagadas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 38(7): 827–834.
- Pérez Pascual D., Jiménez Guillén D., Ramos Jiménez S., Zúñiga Aguilar J. & Monroy Hernández R. (2023). Características de frutos, semillas y crecimiento de cedro de plantaciones de cacao, en la Chontalpa, Tabasco. Pp. 12–18, in Sánchez Gutiérrez, F. Monroy Hernández, R. Sol Sánchez, A. Guevara Hernández, F. Medina Meléndez, J.A. Bautista Gálvez, A. Ávalos Lázaro, A.A. & Gerónimo Torres, J.C. (Eds.). *Aplicaciones del conocimiento científico agropecuario, forestal y acuícola con enfoque sustentable: aportaciones desde el Sur-Sureste mexicano*. Tuxtla Gutiérrez: Universidad Autónoma de Chiapas. 239 pp.
- Ramírez, M., Urdaneta, A. & León, S. (2002). Establecimiento In vitro de explantes adultos del guanábano (*Annona muricata* L.) tratados con hipoclorito de sodio. *Revista de La Facultad de Agronomía*, 19(1): 48–55.
- Ramírez, L., Granados, J. & Carreño, N. (2014). Evaluación del efecto de tratamientos de desinfección con hipoclorito de sodio sobre segmentos nodales de *Guadua angustifolia* Kunth para el establecimiento del cultivo in vitro. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 5(1): 155–169.
- Angarita, A. & Perea, M. (1991). Micropropagación de Plátanos y Bananos. Pp. 495–512, in Roca, W.M., Mroginski, L.A. (Eds.). *Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones*. Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Publicación CIAT, 151: 969 pp.
- Sánchez, F., Taketoshi, A., Arroniz, S., Gómez, A. & Gómez, L. (2009). Comparación de la acción bactericida de hipoclorito de sodio y Microcyn 60. *Revista Odontológica Mexicana*, 13(1): 9-16.