

Establecimiento *in vitro* de ocumo blanco (*Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott)¹

In vitro establishment of white cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott)

J. Vilchez², N. Albany³, L. Martínez², M. Molina³,
C. Alvarez⁴, E. Leal⁴ y L. Bermúdez⁴

²Depto. de Botánica, ³Depto. de Química y Laboratorio de Biotecnología "Profa. Silvia León de Sierralta". Facultad de Agronomía, Universidad del Zulia, AP 15205, Maracaibo, estado Zulia (4005ZU), República Bolivariana de Venezuela.

Resumen

El ocumo blanco, *Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott, es una Aráceas que crece en zonas tropicales. Es importante por su alto valor nutricional. Su propagación se realiza a través de hijuelos lo que conlleva a una baja tasa de multiplicación y diseminación de enfermedades que afectan el rendimiento. El cultivo *in vitro* garantiza plantas sanas libres de patógenos. El objetivo del trabajo fue evaluar dos experimentos de desinfección para el establecimiento *in vitro* de ocumo blanco. El primero con una doble desinfección empleando NaClO y electroterapia (10 y 20 V) durante 5 min. El segundo experimento con tres métodos de desinfección de explantes de ocumo blanco: desinfección sencilla con NaClO al 3% por 20 min; una segunda desinfección con NaClO al 2% por 15 min y doble desinfección más aplicación de 20 min de ultrasonido durante la segunda desinfección por 15 min. Los explantes fueron sembrados en tubos de ensayo con 12 mL de medio de cultivo líquido MS suplementados con 0,05 mg.L⁻¹ de AIB, 1 mg.L⁻¹ de BAP y 15 g.L⁻¹ de sacarosa. La electroterapia a 10 V proporcionó los mayores porcentajes de explantes establecidos (87,5). La desinfección doble más ultrasonido por 15 minutos proporcionó los mayores porcentajes de explantes vivos (77,8) y menores de explantes contaminados (22,2). Se concluyó que la desinfección doble más la aplicación de ultrasonido es un método de desinfección adecuado para el establecimiento *in vitro* de ocumo blanco.

Palabras clave: Cultivo *in vitro*, ultrasonido, desinfección.

Recibido el 30-6-2010 • Aceptado el 5-9-2011

Autor de correspondencia e-mail: jvilchezp@fa.luz.edu.ve

¹Proyecto autofinanciado registrado en el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico, Universidad del Zulia. VAC-CONDES- CC-0092-08.

Abstract

The white cocoyam, *Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott, is a Aracea that grows in tropical areas. It is important for its high nutritional value. The spread is through tiller which leads to a low rate of multiplication and dissemination of diseases that affect the yield. *In vitro* culture ensures healthy plants free of pathogens. The objective was to evaluate two disinfection experiments for in vitro establishment of white cocoyam. The first with a double disinfection using NaClO and electrotherapy (10 and 20 V) for 5 min. The second experiment with three methods of disinfection of white cocoyam explants: simple disinfection with 3% NaClO for 20 min, a second disinfection with 2% NaClO for 15 min and double disinfection over 20 min application of ultrasound during the second disinfection for 15 min. The explants were grown in test tubes with 12 mL of MS liquid medium supplemented with 0.05 mg.L⁻¹ IBA, 1 mg.L⁻¹ BAP and 15 g.L⁻¹ sucrose. Electrotherapy to 10 V provided the largest percentage of explants established (87.5). Double disinfection plus ultrasound for 15 minutes gave the highest percentages of live explants (77.8) and less contaminated explants (22.2). It was concluded that twice as disinfection application of ultrasound is an appropriate disinfection method for setting white cocoyam *in vitro*.

Keywords: *in vitro* culture, ultrasonic, disinfection

Introducción

El ocumo blanco, *Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott, es una Arácea comestible que crece en zonas tropicales (Blanco y Valverde, 2004). Su propagación se realiza por vía vegetativa a través de separación de hijuelos o por secciones de cormo, lo que conlleva a una baja tasa de multiplicación y alta tasa de diseminación de enfermedades (Omokolo 2003). Una alternativa para la propagación acelerada de propágulos sanos en este cultivo, es la propagación *in vitro* de yemas axilares y ápices caulinares (Vilchez *et al.*, 2009; Saucedo *et al.*, 2008).

Entre los principales problemas para el establecimiento *in vitro* de ocumo blanco, está la contaminación causada por bacterias, debido a que las plantas madres generalmente vie-

Introduction

White cocoyam, *Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott, is an eatable Aracea that grows in tropical areas (Blanco and Valverde, 2004). Its propagation is done vegetative through the separation of tillers or by sections of the corm, which carries to a low multiplication rate and a high dissemination rate of diseases (Omokolo, 2003). An alternative for the accelerate propagation of healthy propagule in this culture is the propagation *in vitro* of axilar buds and caulinar apex (Vilchez *et al.*, 2009; Saucedo *et al.*, 2008).

Among the main problems for the establishments in vitro of white cocoyam is the pollution caused by bacteria, since mother plant are generally infected from the field with

nen infectadas desde el campo con estos patógenos, lo cual dificulta el establecimiento *in vitro* de este cultivo. De allí la importancia de estudiar diferentes métodos de desinfección en la etapa de establecimiento, con el fin de mejorar el protocolo de micropropagación de este cultivo. En este sentido en otros cultivos, se ha reportado el empleo de la electroterapia en explantes, para la eliminación de virus (Bayati *et al.*, 2011; Igarza *et al.*, 2001) y del ultrasonido para estimular su crecimiento (Ananthkrishnan *et al.*, 2006), tratamientos que pudieran mejorar el establecimiento de ocumo blanco. Por ello se planteo como objetivo de esta investigación evaluar el empleo electroterapia y de ultrasonido en la desinfección con NaClO de explantes de ocumo blanco para su establecimiento *in vitro*.

Materiales y métodos

Se seleccionaron plantas de ocumo blanco (*Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott) en activo crecimiento y visualmente sanas, de dos meses de edad y de 0,8 m de altura. Estas plantas se cosecharon, se eliminaron sus hojas, raíces y se redujo su tamaño hasta 20 cm de altura, teniendo cuidado de dejar aproximadamente 60 cm³ de tejido del cormo ($\varnothing=4$ cm y altura= 5). Luego se trasladaron al Laboratorio de Biotecnología «Profa. Silvia León de Sierralta» de la Facultad de Agronomía, LUZ y allí se lavaron con jabón líquido (ia: fenilsulfonato de sodio y alcanos secundario sulfonato) y agua de chorro de forma meticulosa, a fin

these pathogens, which makes difficult the establishment *in vitro* of this culture, thus, the importance of studying the different the disinfection methods in the establishing phase, with the aim of improving the micropropagation protocol of this culture. On this matter, it has been reported the employment of electrotherapy in explants for the elimination of the virus (Bayati *et al.*, 2011; Igarza *et al.*, 2001) and the ultrasound for stimulating the growth (Ananthkrishnan *et al.*, 2006), treatments that might improve the establishment of white cocoyam. Therefore, the objective of this research was to evaluate the employment of electrotherapy and ultrasound in the disinfection with NaClO of explants of white cocoyam for the establishment *in vitro*.

Materials and methods

Plants of white cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott) in active growth and visibly healthy of two months old and 0.8 m of height were selected. These plants were harvested, their leaves were eliminated as well as the roots, their sizes reduced until reach 20 cm of height, taking care of leaving approximately 60 cm³ of the corm tissue ($\varnothing=4$ cm and height= 5). Later, were taken to the Biotechnology laboratory «Prof. Silvia León Sierralta» of the Agronomy Faculty of LUZ, there, were washed with liquid soap (ex: phenisulphonate of sodium and secondary sulphonate alkane) and water, with the aim of eliminate any rest of the soil. Subsequently, the

de eliminar cualquier resto de suelo. Seguidamente, se redujo su tamaño a 10 cm de altura, y de esta manera se prepararon los explantes.

Experimento 1. Empleo de la electroterapia para la obtención de explantes libres de contaminantes visibles en ocumo blanco

A los explantes se le aplicó una doble desinfección. La primera desinfección se realizó bajo condiciones no estériles, utilizando una solución de NaClO al 3% por 20 min; luego se enjuagaron tres veces con agua destilada. Seguidamente, se eliminó el tejido dañado por el desinfectante y se redujo el tamaño de los explantes a 4-6 cm de altura.

Con el fin de evaluar la electroterapia en el establecimiento *in vitro* de explantes de ocumo, se probaron dos voltajes (10 y 20 V) durante 5 min y un control sin la aplicación de corriente eléctrica. Los tratamientos de electroterapia se aplicaron a 5 explantes simultáneos; esto en función de la capacidad de la cámara de electroterapia. Se utilizó una fuente de poder Gelman Instrument Co. modelo 38206.

Luego de aplicados los tratamientos se realizó una segunda desinfección bajo condiciones asépticas, sumergiendo los explantes en una solución de NaClO al 2% más 2 gotas. 100 mL^{-1} de Tween-20 (Miller *et al.*, 1982) por 15 min. Seguidamente, se enjuagaron tres veces con agua destilada esterilizada.

Experimento 2. Métodos de desinfección en el establecimiento *in vitro* de explantes de ocumo blanco.

Para evaluar la efectividad de la desinfección de vástagos de ocumo

size reduced to 10 cm of height and like this, the explants were prepared.

Experiment 1. Employment of electrotherapy for obtaining explants free of visible contaminants in white cocoyam

A double disinfection was applied to the explants. The first disinfection was done under non sterile conditions using a NaClO solution at 3% for 20 min, then, were washed three times with distilled water. Later, the damages tissue was eliminated by the disinfectant and was reduced the size of the explants from 4-6 of height.

With the aim of evaluating the electrotherapy in the establishment *in vitro* of explants of cocoyam, were tasted voltages (10 and 20 V) for 5 min and a control without the application of electrical power. The electrotherapy treatments were applied to 5 explants simultaneously, in function of the capacity of the electrotherapy chamber. A power source Gelman Instrument Co Model 38206 was used.

After applied the treatments, a second disinfection was done under aseptic conditions, immersing the explants in a NaClO solution at 2% plus 2 drops. 100 mL^{-1} of twee-20 (Miller *et al.*, 1982) for 15 min. Consequently, were washed three times with sterilized distilled water.

Experiment 2. Disinfection methods in the establishment *in vitro* of white cocoyam explants

To evaluate the effectiveness on the disinfection of white cocoyam shoots in the establishment *in vitro*, were evaluated: a control treatment

blanco en el establecimiento *in vitro*, se evaluó: un tratamiento control que consistió en la desinfección sencilla de los explantes. Para lo cual éstos se sumergieron en una solución de NaClO al 3% más 2 gotas. 100 mL⁻¹ de Tween-20 por 20 min, bajo condiciones de asepsia. Desinfección doble, que consistió en una primera inmersión de los explantes en una solución de NaClO al 3% por 20 min bajo condiciones no estériles, seguidamente se enjuagaron los éstos tres veces con agua destilada. Luego, se redujo el tamaño de los explantes a 4-6 cm de altura. Se realizó una segunda desinfección bajo condiciones asépticas, sumergiendolos en una solución de NaClO al 2% más 2 gotas. 100 mL⁻¹ de Tween-20 por 15 min. Posteriormente, se enjuagaron tres veces con agua destilada esterilizada. Doble desinfección más aplicación de 20 min de ultrasonido durante la segunda desinfección, para lo cual se procedió de la misma manera que en la desinfección doble, pero durante la aplicación de la segunda desinfección los explantes fueron sonicados por 15 min.

Para ambos experimentos una vez aplicados los tratamientos, los explantes se redujeron de tamaño hasta 2 cm de altura, 1 cm² de base (cormelo) y se sembraron en tubos de ensayo con puente Heller de papel de filtro. Cada tubo contenía 12 mL de medio de cultivo líquido constituido por las sales y vitaminas MS (Murashige y Skoog, 1962); 0,05 mg.L⁻¹ de AIB (ácido indolbutírico), 1 mg.L⁻¹ de BAP (N⁶-bencilaminopurina), 15 g.L⁻¹ de sacarosa y el pH fue ajustado a 5,8 con NaOH 1N y HCl 1N antes de la esterilización en autoclave a

that consisted in the simple disinfection of explants. For it, explants were immersed in a NaClO solution at 3% plus 2 drops. 100 mL⁻¹ of Tween-20 for 20 min, under aseptic conditions. Double disinfection, which consisted on a first immersion of explants in a NaClO solution at 3% for 20 min under non sterile conditions, later, were soaked these three with distilled water. Then, the size of explants reduced from 4-6 of height. A second disinfection was done under aseptic conditions, immersing them in a NaClO solution at 2% plus 2 drops. 100 mL⁻¹ of Tween-20 for 15 min. Subsequently, were washed three times with distilled sterile water. Double disinfection plus application of 20 min of ultrasound during the second disinfection, for which was proceeded the same way than the double disinfection, but during the second disinfection, the explants were sonicated for 15 min.

For both experiments, once applied the treatments, the explants reduced their sizes until 2 cm of height, 1 cm² of base (corm) and were sowed in test tube in Heller of filter paper. Each tube had 12 mL of the liquid culture media constituted by salts and vitamins MS (Murashige and Skoog, 1962); 0.05 mg.L⁻¹ of AIB (indolbutyric acid), 1 mg.L⁻¹ of BAP (N⁶- benzyladenine), 15 g.L⁻¹ of sucrose and pH was adjusted to 5.8 with NaOH 1N and HCl 1N before the sterilization in autoclave at 121°C and 1.2 Kg·cm⁻² of pressure for 20 min. All tubes were put at 27±2°C under a continuous white fluorescent light (150 μmol. m⁻² s⁻¹).

121°C y 1,2 kg.cm⁻² de presión por 20 min. Todos los tubos fueron colocados a 27±2°C bajo luz continua blanca fluorescente (150 μmol. m⁻² s⁻¹). En ambos experimentos las condiciones de asepsia se garantizaron realizando la manipulaciones del material vegetal dentro de una cámara de flujo laminar horizontal (filtro HEPA de 0,22μm) y el instrumental (pinzas y bisturí) fue desinfectado con una solución de NaClO al 1,0% (v/v) durante 15 minutos. Se emplearon capsulas de Petri esterilizadas en autoclave a 121°C y 1,2 kg.cm⁻² de presión por 1 h.

Los experimentos se evaluaron estadísticamente empleando diseño estadístico aleatorizado con 20 explantes por tratamiento para el experimento 1 y de 40 para el experimento 2. Luego de tres semanas se evaluó el porcentaje de explantes vivos, contaminados y establecidos. Para el momento de la evaluación se tomó como explante vivo, aquel material con o sin crecimiento activo, libre de contaminantes visibles; explante contaminado aquel con crecimiento activo o no que presentó crecimiento de microorganismos contaminantes sobre el mismo o sobre la superficie del medio de cultivo y explante establecido aquel libre de contaminantes visibles, que había emitido al menos una hoja. Para calcular el porcentaje de explantes contaminados vivos se tomó del total de explantes cultivados por repetición, cuantos sobrevivieron y contaminaron; mientras que el porcentaje de explantes establecidos se calculó en base al total de explantes vivos. Se utilizó una prueba de proporciones complementada con la prueba exacta

In both experiments, the aseptic conditions were guaranteed manipulating the vegetal material inside horizontal laminar flow chamber (filter HEPA of 0.22μm) and the instruments (tweezers and scalpel) were disinfected with a NaClO solution at 1.0% (v/v) for 15 min. Sterile petri capsules in autoclave were employed at 121°C and 1.2 Kg ·cm⁻² of pressure for 1 h.

The experiments were evaluated statistically employing a statistical randomized design with 20 explants per treatment for the experiment 1 and 40 for the experiment 2. After three weeks, was evaluated the percentage of alive explants, contaminated and established. For the moment of the evaluation was considered as alive explant the material with or without active growth, free of visible contaminants; contaminant explants the one with an active or inactive growth that presented a growth in the contaminant microorganisms on it or on the surface of the culture media, and established explants, the one free of visible contaminants, that had at least had, one leaf. In order to calculate the percentage of alive contaminated explants were take from the total of the cultivated explants per replication the ones that survived and contaminated, meanwhile, the percentage of the established explants were calculated in based of the alive explants. A test of proportions complimented with the exact Fisher test was used, to determine the existence of statistical differences among the evaluated treatments.

de Fisher, para determinar la existencia de diferencias estadísticas entre los tratamientos evaluados.

Resultados y discusión

Experimento 1. Empleo de la electroterapia para la obtención de explantes libres de contaminantes visibles en ocumo blanco

Después de dos semanas de cultivo el análisis estadístico detectó diferencias significativas entre los voltajes probados para las variables porcentaje de explantes contaminados y establecidos (cuadro 1). El valor promedio del experimento para el porcentaje de explantes vivos fue de 76,6.

El mayor porcentaje de explantes contaminados se registró en el testigo, resultados que difirieron estadísticamente de la aplicación de los tratamientos de electroterapia, los cuales fueron estadísticamente similares entre sí. La aplicación de una corriente eléctrica de 20 V. durante 5

Results and discussion

Experiment 1. Employment of electrotherapy for obtaining explants free of contaminants visible in white cocoyam

After two weeks of culture, the statistical analysis detected significant differences among the tested voltages for the variables: percentages of contaminated explants and established explants (table 1). The average value of the experiment for the percentage of alive explants was of 76.6

The higher percentage of contaminated explants was registered in the witness, results that differ statistically of the application of the electrotherapy treatment, which were statistically similar among them. The application of electrical power of 20V for 5 min allowed the lower percentage of contaminated explants (10%).

In Other species such as

Cuadro 1. Efecto del voltaje de la electroterapia sobre el establecimiento *in vitro* de brotes de de ocumo blanco (*Xanthosoma sagittifolium* L. Schott).

Table 1. Voltage effect of the electrotherapy on the establishment *in vitro* in buds of white cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium* L. Schott).

Tratamiento (V)	Porcentaje de explantes		
	Vivos	Contaminados	Establecidos
0	70 ns	30 ^a	57,1 ^c
10	80 ns	20 ^b	87,5 ^a
20	80 ns	10 ^b	62,5 ^b

Los valores indicados con distintas letras difieren estadísticamente para una probabilidad $P < 0,05$ según la prueba de proporciones complementada con la prueba exacta de Fisher.

min permitió el menor porcentaje de explantes contaminados (10%).

En otras especies como *Philodendron* sp. (Blanco y Valverde, 2004) y Aloe (Albany *et al.*, 2006), se han encontrado porcentajes de explantes contaminados similares a los de este experimento pero sin la aplicación de la electroterapia.

El mayor valor de porcentaje de explantes establecidos se obtuvo con la aplicación de 10 V, siendo este valor diferente estadísticamente del tratamiento control (0 V) y de la aplicación de 20 V. Se ha señalado que el voltaje estimula el crecimiento de células y la movilización de sustancias nutritivas en los explantes (Wagele, 1978; Hernández *et al.*, 1997; García y Noa, 1998; Igarza *et al.*, 2001), lo cual pudiera explicar las diferencias encontradas entre el porcentaje de explantes establecidos con la aplicación de 10 V y el tratamiento control (cuadro 1).

El porcentaje de explantes establecidos con la aplicación de 20 V de corriente eléctrica fue inferior al de la aplicación de 10 V, lo cual pudiera ser debido a que la aplicación de corriente eléctrica en tejidos vegetales genera calor como producto de su resistencia al flujo de energía y en algunos casos, este calor puede generar la muerte de los tejidos u órganos cuando ellos están en crecimiento (García y Noa, 1998). Con la aplicación de 20 V de corriente eléctrica se registró un 10% de explante que murieron por causas diferentes a la contaminación. Un corte longitudinal de los mismos evidenció la muerte del meristemo y de sus zonas meristemáticas, probablemente debi-

Philodendron sp. (Blanco and Valverde, 2004) and Aloe (Albany *et al.*, 2006), have been found percentages of contaminated explants similar to the ones of this experiment but without the application of electrotherapy.

The highest percentage value of established explants was obtained with the application of 10 V, being this value different statistically of the control treatment (0V) and of the application of 20 V. It has been said that the voltage stimulates the growth of cells and the mobilization of nutritious substances in the explants (Wagele, 1978; Hernández *et al.*, 1997; García and Noa, 1998; Igarza *et al.*, 2001), which may explain the differences found among the percentage of explants established with the application of 10 V and the control treatment (table 1).

The percentage of explants established with the application of 20 V of electrical power was inferior to the application of 10 V, which may be due to the application of electrical power in vegetal tissues generate heat as a product of its resistance to the flow of energy and in some cases, this heat may cause the death of some tissues or organs when they are growing (García and Noa, 1998). With the application of 20 V of electrical power, was registered 10 % of explants that died by different causes rather than contamination. A longitudinal cut of these showed the death of the meristem and the meristematic areas, probably due to the excess of the electrical power. For this reason, when it is applied the electrotherapy, it is necessary to

do a un exceso de corriente eléctrica. Por esta razón, cuando se aplica la electroterapia es necesario establecer el límite de sobrevivencia de los explantes o progámulos a la corriente eléctrica. Para explantes de yemas apicales de ocumo blanco, Igarza *et al.* (2001) estimaron un límite corriente eléctrica entre 5 y 20 V por 5 min.

Experimento 2. Comparación de tres métodos de desinfección en el establecimiento *in vitro* de explantes de ocumo blanco.

Al finalizar el periodo de evaluación el análisis estadístico detectó diferencias ($P>0,05$) entre los tratamientos de desinfección evaluados, para las variables porcentaje de explantes vivos y contaminados (cuadro 2). Los mayores valores de explantes vivos (77,8%) y los menores de explantes contaminados (22,2) se obtuvieron con la desinfección doble más sonicación por 15 min. El porcentaje de explantes establecidos fue de 100%, en todos los tratamientos.

establish the survival limit of explants to the electrical power. For explants of apical buds of white cocoyam, Igarza *et al.*, (2001) estimated a limit of electric power from 5 to 20 V for 5 min.

Experiment 2. Comparison of three disinfection methods in the establishment *in vitro* of white cocoyam explants

At the end of the evaluation period, the statistical analysis detected differences ($P>0.05$) among the disinfection treatment evaluated for the variables: percentage of alive and contaminated explants (table 2). The highest values of alive explants (77.8%) and the lowest contaminated explants (22.2) were obtained with the double disinfection plus sonication for 15 min. The percentage of explants established was of 100% in all treatments.

In the last years, the employment of the ultrasound in the protocols of disinfection has increased.

Cuadro 2. Efecto de métodos de desinfección sobre el establecimiento *in vitro* de brotes de ocumo blanco (*Xanthosoma sagittifolium* L. Schott).

Table 2. Effect of disinfection methods on the establishment *in vitro* of buds of white cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium* L. Schott).

Tratamiento	Porcentaje de explantes		
	Vivos	Contaminados	Establecidos
Desinfección sencilla	33,3 ^b	77,7 ^a	100 ^a
Doble desinfección	40,75 ^b	59,25 ^a	100 ^a
Doble desinfección + aplicación de ultrasonido	77,8 ^a	22,2 ^b	100 ^a

Los valores indicados con distintas letras difieren estadísticamente para una probabilidad $P<0,05$ según la prueba de proporciones complementada con la prueba exacta de Fisher.

En los últimos años el empleo del ultrasonido dentro de los protocolos de desinfección ha aumentado. Blume and Neis (2001), demostraron que la eficiencia del NaClO como agente desinfectante puede ser mejorada con el empleo del ultrasonido, debido a una mayor dispersión del anión hipoclorito en el medio acuoso, lo que mejora la acción bactericida de NaClO.

Ananthakrishnan *et al.*, (2006) indicó que el ultrasonido provoca la ablación de la cutícula de semillas de la calabaza, lo cual permite una captación reforzada de agua, nutrientes, y reguladores de crecimiento. De una manera similar, el ultrasonido en explantes de aloe podría dañar la superficie y eliminar la cera de la cutícula que permite una entrada reforzada de NaOCl.

Conclusión

El empleo de electroterapia a un voltaje de 10 V para la obtención de explantes libres de contaminantes visibles de ocumo blanco, influyó favorablemente en la obtención del mayor porcentaje de explantes establecidos.

La desinfección doble más de aplicación de ultrasonido por 15 min. es el método de desinfección más adecuado para lograr el mayor porcentaje de explantes vivos y menor de explantes contaminados de ocumo blanco.

Literatura citada

Albany N., J. Vilchez, S. León de Sierralta, M. Molina y P. Chacín. 2006. Una metodología para la propagación *in vitro* de *Aloe vera* L. Revista de la Facultad de Agronomía (LUZ) 23: 213-222.

Blume and Neis (2001) showed that the efficiency of NaClO as a disinfectant agent can be improved using the ultrasound, due to a higher dispersion of the hypochlorite anion in the aqueous media, which improves the bacteria action of NaClO

Ananthakrishnan *et al.*, (2006) indicated that the ultrasound provoked the ablation of the seed's cuticle of pumpkin, which allows a reinforced capitation of water, nutrients and growth regulator. Likewise, the ultrasound of aloe vera explants may damage the surface and eliminate the wax of the cuticle that allows a reinforce entrance of NaOCl.

Conclusion

The employment of the electrotherapy at a voltage of 10 V for obtaining explants free of visible contaminants of white cocoyam influenced favorably in the obtaining of a higher percentage of established explants.

The double disinfection plus the application of the ultrasound for 15 min is the most adequate method to fulfill the highest percentage of alive explants and lower contaminated explants of white cocoyam.

End of english version

Ananthakrishnan G, Xiaodi X, Amutha S., Singer S., Muruganantham M., Yablonsky S., Fischer E. y V. Gaba. 2006. Ultrasonic treatment stimulates multiple shoot regeneration and explant enlargement in recalcitrant squash cotyledon explants *in vitro*. Plant Cell Reports 26(3):267-276.

- Bayatil Sh., M. Shams-Bakhsh1 y A. Moienil. 2011. Elimination of Grapevine Virus A (GVA) by Cryotherapy and Electrotherapy. *J. Agr. Sci. Tech.* (13): 443-450.
- Blanco M. y R. Valverde. 2004. Micropropagación de *Philodendron* sp. (posiblemente *P. corcovadense*). *Agronomía Costarricense* 28: 39-46.
- Blume T. y U. Neis. 2001. Improved wateswater disinfection by ultrasonic pre-treatment. Conferencia applications of power ultrasound in physical y chemical prossing. Paris, Diciembre 13-14. Consultado el 22-02-2011. http://www.tesisenxarxa.net/TESES/UB/AVAILABLE/TDX-1027106-115930/TBEH_THESIS.pdf
- García L. y J. Noa. 1998. Obtención de plantas libres de patógenos. En: PROPAGACIÓN Y MEJORA GENÉTICA DE PLANTAS POR BIOTECNOLOGÍA. Compilado por: Pérez J. primera edición. Santa Clara, Cuba. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de las Villas, p. 134-149.
- Hernández R., J. Fontanella, J.C. Noa, T. Pichardo, R. Manzo y H. Cárdenas. 1997. Electroterapia, nuevo método para el saneamiento del virus en *Allium sativum* L. con optimización del diagnostico por UM-ELISA. *Centro Agrícola (Cuba)* 24:92-93.
- Igarza J., R. Hernández y B. Cruz. 2001. La electroterapia como alternativa para la eliminación del virus DMV en malanga. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)* 60:57-60.
- Miller G., C. Coston, E. Denny M. Romeoe. 1982. In vitro Propagation of «Nemaguard» Peach Rootstock. *HortScience* 17(2): 194.
- Murashige T. y F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Omokolo, N., T. Boudjeko y J. Tsafack Takadong. 2003. In vitro tuberization of *Xanthosoma sagittifolium* L. Schott: effects of phytohormones, sucrose, nitrogen and photoperiod. *Scientia Horticulturae* 9(4):337-345.
- Saucedo S., L. Ramos y T. Reyes. 2008. Efecto de los reguladores de crecimiento para la micropropagación in vitro de la malanga (*Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott). *Ciencia y Tecnología* 1:17-21.
- Vilchez J., Y. Rivas, N. Albany, M. Molina y L. Martínez. 2009. Efecto de la N⁶ bencilaminopurina sobre la multiplicación in vitro de ocumo criollo (*Xanthosoma sagittifolium* L. Schott). *Rev. Fac. Agron. (LUZ)* 26(3): 212-222.
- Wagele R. 1978. Procedimiento para influir en el crecimiento de células e individuos bacterianos, animales y vegetales. *Patentans Piiche* 28(41): 933.