

Medio de cultivo y reguladores de crecimiento en la multiplicación *in vitro* *Psidium guajava* L.

Jorge Vilchez^{1*}, Leonardo Martínez¹, Carlos Álvarez¹, Angel Alborno¹, Nilca Albany², Miguel Molina², Leyanis García-Águila³. *Autor para correspondencia.

¹Departamento de Botánica. Facultad de Agronomía, Universidad del Zulia. AP 15 205, Maracaibo. Zulia. (4005ZU). República Bolivariana de Venezuela.

²Departamento de Química. Facultad de Agronomía. Universidad del Zulia. AP 15 205, Maracaibo. Zulia. (4005ZU). República Bolivariana de Venezuela.

³Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central Marta Abreu de Las Villas, Carretera a Camajuaní km 5.5 Santa Clara, Villa Clara. Cuba. CP 54 830. e-mail: jvilchezp@fa.luz.edu.ve, jvilchez@luz.edu.ve

RESUMEN

El guayabo (*Psidium guajava* L.) cultivar 'Enana Roja Cubana EEA 18-40' tiene altos rendimientos. Para su propagación a gran escala, la micropropagación es una posible solución. El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de dos medios de cultivo, dos citoquininas y un análogo de brasinoesteoides (DI-31), en la multiplicación *in vitro* de este cultivar. Se evaluaron dos medios de cultivo (MS y WPM), tres concentraciones de bencilaminopurina (BAP) (0.5, 1.0, 1.5 mg l⁻¹), tres de Kinetina (0.5, 1.0, 1.5 mg l⁻¹) y dos de DI-31 (0.01 y 0.02 mg l⁻¹). Las variables evaluadas fueron: número de brotes, número de nudos, longitud del brote y coeficiente de multiplicación. Se comprobó que el tipo de medio de cultivo influyó en la multiplicación de brotes de guayabo. El número de brotes, la longitud de los brotes y el coeficiente de multiplicación estuvieron determinados por el tipo de citoquinina y la concentración de esta añadida al medio de cultivo. Con el empleo del medio de cultivo WPM con 1 mg l⁻¹ de BAP se obtuvieron los mayores valores de las variables evaluadas. El uso de DI-31 promovió el crecimiento de los brotes sin afectar el coeficiente de multiplicación.

Palabras clave: bencilaminopurina, DI-31, fase de multiplicación, guayabo, kinetina, micropropagación

Culture medium and growth regulators on *in vitro* multiplication of *Psidium guajava* L.

ABSTRACT

Guava (*Psidium guajava* L.) cultivar 'Dwarf Cuban Red 18-40 EEA' has high yields. For large-scale propagation, micropropagation is a possible solution. The aim of this study was to determine the effect of two culture media, two cytokinins and an analog brasinoesteoides (DI-31) in the *in vitro* multiplication of this cultivar. Two culture media (MS and WPM), three concentrations of benzylaminopurine (BAP) (0.5, 1.0, 1.5 mg l⁻¹), three of kinetin (0.5, 1.0, 1.5 mg l⁻¹) and two DI-31 (0.01 and 0.02 mg l⁻¹) were evaluated. The variables evaluated were: number of shoots, number of leaves, shoot length and multiplication coefficient. It was found that the type of culture medium influenced the shoot multiplication of guava. The number of shoots, shoot length and multiplication coefficient were determined by the type and concentration of cytokinin added to the culture medium. With the use of WPM culture medium with 1 mg l⁻¹ BAP It was obtained the highest values of the variables evaluated. The use of DI-31 promoted the shoot growth without affecting the multiplication coefficient.

Key words: benzylaminopurine, DI-31, kinetin, guava, micropropagation, multiplication phase

INTRODUCCIÓN

La familia *Myrtaceae*, cuenta con más de 3 800 especies pertenecientes a 133 géneros. La mayoría de estas son de interés forestal, otras de importancia medicinal y pocas especies producen frutos comestibles. El guayabo (*Psidium guajava* L.) es la especie más valiosa

del género *Psidium* y representa una importante inversión para el agronegocio. Además, posee una gran aceptación como fruta fresca debido a su contenido nutricional en términos de alto contenido en vitamina C, carbohidratos, fibra y sales minerales y por su posibilidad de industrializarse (Aular y Casares, 2011). Este cultivo, puede ser consumido en forma de

jugos, néctares, jaleas, pasta, dulces tradicionales como los cascotes de guayaba y bocadillos. Además, en los últimos años sus frutos y hojas se han estudiado para su uso en el campo de la medicina natural y tradicional en el tratamiento de enfermedades como gastroenteritis y disenterías.

En Venezuela hay pocos cultivares de guayabo y los principales son el 'Criolla Roja', que se utiliza también como porta injerto, el 'San Miguel' y el 'Rio Chiquito' (Aular y Casares, 2011). En el año 2007 en el marco del Convenio de Cooperación Cuba-Venezuela se introdujo desde la República de Cuba el cultivar 'Enana Roja Cubana EEA 18-40', el cual tiene un rendimiento de 70 ton ha⁻¹ año⁻¹, con densidades superiores a las 800 plantas por ha, a los 5 años de plantada (Vento, 2011), este se sembraron en el país lotes pruebas para su producción agrícola y propagación. La introducción de este cultivar plantea la necesidad de desarrollar protocolos de propagación.

En general la propagación convencional presenta limitaciones relacionadas con el número de esquejes o vástagos que puede proveer un individuo elite. Este aspecto limita la diseminación de nuevos cultivares introducidos a escalas productivas. Teniendo en cuenta estos problemas y el significado que tiene este frutal tropical en la producción y exportación de alimentos, se han dedicado numerosos esfuerzos y recursos a aplicar técnicas biotecnológicas en este grupo de plantas. La mayoría de éstos trabajos estuvieron dirigidos a desarrollar procedimientos para la micropropagación, utilizando organogénesis a partir de segmentos nodales y brotación axilar (Mishra *et al.*, 2007; Ocampo y Nuñez, 2007; Meghwal *et al.*, 2010).

Dentro de los factores determinantes en la multiplicación *in vitro* están el medio de cultivo y el balance hormonal. El medio de cultivo usado en la mayoría de los trabajos publicados sobre micropropagación del guayabo es el propuesto por Murashige y Skoog (1962) (Meghwal *et al.*, 2010). Por otra parte, se mencionan entre los reguladores del crecimiento empleados a N⁶-bencilaminopurina (BAP) usada sola (Meghwal *et al.*, 2010) o en combinación con otras citoquininas o auxinas (Ocampo y Nuñez, 2007), en el balance hormonal de la fase de multiplicación *in vitro*.

En los últimos diez años se han venido probando nuevos reguladores de crecimiento en la micropropagación, como son los análogos de brasinoesteroides. Estos son sustancias estimuladoras del crecimiento vegetal con las cuales se han desarrollado diferentes investigaciones que han permitido evaluar su actividad como biorreguladores de la morfogénesis *in vitro* de especies vegetales (Plana *et al.*, 2002). Aunque existen informes del empleo de análogos de brasinoesteroides en la germinación de embriones somáticos de guayabo (Vilchez *et al.*, 2001) no se ha descrito su utilización en la micropropagación de este cultivo. Su adición al medio de cultivo de multiplicación pudiera ser una alternativa para mejorar la eficiencia de esta fase.

En base a lo anteriormente expuesto, se propuso como objetivo de esta investigación, determinar el efecto del medio de cultivo, de dos citoquininas y un análogo de brasinoesteroides, en la multiplicación *in vitro* de guayabo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Esta investigación se realizó en las instalaciones del laboratorio de Biotecnología Profa. Silvia León de Sierralta de la Facultad de Agronomía de la Universidad del Zulia en Maracaibo, Venezuela.

Material vegetal

Se emplearon microesquejes de guayabo del cultivar 'Enana Roja Cubana EEA 18-40' de 1 cm de longitud con un solo nudo, obtenidos mediante un proceso de regeneración vía embriogénesis somática, a partir de embriones cigóticos inmaduros de acuerdo con la metodología descrita por Vilchez *et al.* (2001).

Condiciones experimentales

Se utilizaron tubos de ensayo de vidrio (15 x 2.5 cm) y frascos de vidrio de 250 ml de capacidad. En todos experimentos, el pH del medio de cultivo se ajustó a 5.8 con NaOH 1N o HCl 1N, antes de la esterilización en autoclave a 121°C y 1.2 kg cm⁻² durante 20 min. Todas las manipulaciones de los explantes se realizaron bajo condiciones de asepsia en una cabina de flujo laminar horizontal (ESCO®) con un flujo constante de aire de 0.5 PSI. El instrumental (pinzas y bisturí) fueron

desinfectado con una solución de NaClO al 1% (v/v) durante 15 min. El manejo del material vegetal en la cabina de flujo laminar se realizó sobre placas de Petri (10 cm de diámetro) esterilizadas en autoclave a 121°C y 1.2 kg cm⁻² de presión durante 30 min y secadas en estufa a 70°C.

Los cultivos *in vitro* se mantuvieron en un cuarto de crecimiento, a 26 ± 1°C, bajo luz blanca fluorescente continua con una radiación fotosintéticamente activa (PAR) de 200 μmol⁻¹m⁻²s⁻¹ y humedad relativa promedio de 46%.

Efecto del medio de cultivo

Con el objetivo de determinar el efecto del medio de cultivo en la multiplicación de microesquejes de guayabo cultivar 'Enana Roja Cubana EEA 18-40' se incluyeron dos medios de cultivo, WPM (*Woody Plant Medium*) para plantas leñosas (McCown y Lloyd, 1981) y MS propuesto por Murashige y Skoog (1962), con 1 mg l⁻¹ de BAP, 3% de sacarosa y 6 g l⁻¹ de Agargel.

Se emplearon 40 microesquejes, por tratamiento, los que se colocaron en tubos de ensayo con 12 ml de medio de cultivo. Después de seis semanas de cultivo se evaluaron el número de brotes (NB), número de nudos (NN), longitud de los brotes (cm) (LB) y coeficiente de multiplicación (CM). El CM se calculó mediante la siguiente fórmula: (NB-1)*NNT, donde NNT es el número de nudos totales. El diseño experimental utilizado fue totalmente al azar.

Efecto de dos citoquininas

Para determinar el efecto de dos citoquininas sobre la multiplicación de microesquejes de guayabo cultivar 'Enana Roja Cubana EEA 18-40', se añadieron al medio de cultivo tres concentraciones de BAP (0.5, 1, 1.5 mg l⁻¹) y dos concentraciones de Kinetina (0.5, 1, 1.5 mg l⁻¹), para un total de seis tratamientos. El medio de cultivo utilizado fue el WPM con 3% de sacarosa y 6 g l⁻¹ de Agargel.

Por cada tratamiento se evaluaron 40 microesquejes los cuales se colocaron en tubos de ensayo con 12 ml de medio de cultivo. Las variables evaluadas después de seis

semanas de cultivo fueron: NB, NN, LB y CM. El diseño experimental utilizado fue factorial 2³.

Efecto de un análogo de brasinoesteroides

Para determinar el efecto de un análogo de brasinoesteroides sobre la multiplicación de microesquejes de guayabo cultivar 'Enana Roja Cubana EEA-1840', se evaluaron dos concentraciones del DI-31 (control, 0.01 y 0.02 mg l⁻¹), el cual es un análogo de brasinoesteroides semisintético obtenido por la Facultad de Química de la Universidad de La Habana, Cuba.

Para cada tratamiento se utilizaron 20 repeticiones, constituidas por cinco microesquejes por frasco, con 25 ml de medio de cultivo. El medio de cultivo utilizado fue el WPM, con 1 mg l⁻¹ de BAP, 3% de sacarosa y 6 g l⁻¹ de Agargel. Las variables evaluadas después de seis semanas de cultivo fueron: NB, NN, LB y CM. El diseño experimental utilizado fue totalmente al azar.

Análisis estadístico

Para el procesamiento de los datos se utilizó el software analítico Statistix® versión 8.0. Para determinar la significancia de los efectos de los factores de estudio se utilizó el Análisis de la Varianza simple (ANOVA) y en aquellos casos donde el efecto del factor de estudio y/o su interacción resultó significativa estadísticamente se realizó la comparación de medias mediante la prueba de Tukey.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto del medio de cultivo

Se detectaron diferencias significativas de las variables evaluadas en la multiplicación de microesquejes en dos medios de cultivos (Tabla 1). Se obtuvieron valores superiores en las variables NB (2.26), NN (3.22), CM (3.8) y LB (1.1 cm) cuando se empleó el medio de cultivo WPM en comparación con MS. Resultados similares fueron descritos por Ocampo y Nuñez (2007), quienes evaluaron en varios cultivares de guayabo los mismos medios de cultivo estudiados en este experimento. En otras especies leñosas como *Myrica esculenta* (Bhatt y Dhar, 2004) también se han informado resultados similares a los aquí presentados.

Tabla 1. Efecto del medio de cultivo en la multiplicación *in vitro* de microesquejes de guayabo cultivar 'Enana Roja Cubana EEA-1840'.

Variables	Medios de cultivo	
	WPM	MS
Número de brotes	2.26 a	1.85 b
Número de nudos	3.22 a	1.85 b
Coefficiente de multiplicación	3.80 a	1.40 b
Longitud de brotes (cm)	11.00 a	6.30 b

Valores con letras distintas en una fila difieren significativamente ($P < 0.05$) según la prueba de comparación de medias de Tukey. WPM medio de cultivo para plantas leñosas (McCown y Lloyd, 1981) y MS: medio de cultivo propuesto por Murashige y Skoog (1962).

El tipo de sales y su concentración tienen una influencia directa sobre la inducción de brotes. El medio de cultivo MS es el más utilizado para la propagación *in vitro* de muchas especies de plantas, pero no siempre es el más adecuado, debido a la alta concentración de sales. El WPM tiene menor concentración de sales minerales en comparación con el MS y es ampliamente empleado para el cultivo de tejidos de plantas leñosas o sensibles a la salinidad (Cardoza, 2008). Además, en el MS el contenido de nitrógeno amoniacal y nítrico es mayor que en el WPM y las fuentes de nitrógeno nítrico son diferentes, para el MS es el KNO_3 y en el WPM es $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$. Sin embargo, la proporción nitrógeno nítrico-amoniacal es mayor en el WPM. Es de destacar que el nitrato representa una de las formas más asimilables de nitrógeno por parte de la planta, que promueve la formación de hojas y nuevos brotes. En este sentido, Barwale *et al.* (1986) señalaron que las deficiencias de nitrógeno pueden afectar la brotación, provocan disminución en el número de brotes por explante y favorecen el crecimiento de brotes con tallos finos y cortos con hojas pequeñas.

Efecto de dos citoquininas

Los mayores valores de NB se obtuvieron con la adición de BAP al medio de cultivo a concentraciones de 0.5 y 1 mg l⁻¹ (1.82 y 2.20 brotes, respectivamente) las que difirieron significativamente de los demás tratamientos. Estos resultados fueron similares a los informados por Shah *et al.* (2008) quienes señalaron que cuando se añadió al medio de cultivo el BAP solo o en combinación con

otras citoquininas se obtuvieron mayores valores promedios de NB. La eficacia de BAP en la estimulación de la multiplicación de brotes en guayabo se ha descrito por varios investigadores (Loh y Rao, 1989).

Los resultados de esta investigación indicaron que la concentración de 1.5 mg l⁻¹ de BAP resultó inhibitoria de la brotación. Ello está en concordancia con lo referido por Loh y Rao (1989) quienes señalaron que una baja concentración de BAP es efectiva en la proliferación de brotes adventicios en guayabo, pero difieren de lo referido por Mishra *et al.* (2007), que observaron que la adición de 2 mg l⁻¹ de BAP al medio de cultivo, produjo los máximos valores de número de brotes axilares en guayabo cv. 'Allahabad Safeda'. Otros autores han destacado que la respuesta de la brotación *in vitro* en guayabo es dependiente del genotipo (Loh y Rao, 1989).

Los valores de LB fueron más de dos veces superiores cuando se utilizó 0.5 y 1 mg l⁻¹ de kinetina en comparación con los obtenidos en el medio de cultivo con BAP (Tabla 2). También se observó que la concentración de 1.5 mg l⁻¹ de las dos citoquininas estudiadas fue inhibitoria para esta variable. Una respuesta similar de los explantes ha sido observada por Bhatt y Dhar (2004) quienes encontraron que en *Myrica esculenta* concentraciones de kinetina inferiores a 1 mg l⁻¹ aumentaron la LB, pero redujo significativamente el NB. En este sentido, Shah *et al.* (2008), mencionaron que con concentraciones de BAP mayores a 1 mg l⁻¹ los brotes de guayabo no se alargaron más de 1 cm.

Tabla 2. Efecto de dos citoquininas sobre la multiplicación *in vitro* de microesquejes de guayabo cultivar 'Enana Roja Cubana EEA-1840'.

Citoquinina	Concentración (mg l ⁻¹)	NB	NN	CM	LB (cm)
BAP	0.5	1.82 ab	3.43 a	2.79 b	7.37 b
	1.0	2.20 a	3.44 a	4.13 a	7.73 b
	1.5	1.45 b	2.48 bc	1.88 bc	5.15 c
Kinetina	0.5	1.50 b	2.53 bc	1.44 c	14.40 a
	1.0	1.68 b	2.79 ab	1.71 bc	14.34 a
	1.5	1.44 b	2.00 c	0.95 c	7.34 b

Valores con letras distintas en una columna difieren significativamente ($P < 0.05$) según la prueba de comparación de medias de Tukey. BAP: N⁶-bencilaminopurina, NB: número de brotes, NN: número de nudos, CM: coeficiente de multiplicación y LB: longitud de brotes.

La menor LB se observó en los explantes cultivados en el medio de cultivo con 1.5 mg l⁻¹ de BAP o Kinetina. Esta respuesta pudo ser causada por un desvío de la producción de biomasa hacia la formación de brotes en detrimento de su desarrollo, lo cual se ha descrito para otras especies (Vilchez *et al.*, 2011).

Valores superiores para el NN y el CM, se observaron en los explantes cultivados en el medio de cultivo con 1 mg l⁻¹ de BAP. Aunque no se encontraron informes de la evaluación de estas variables en esta especie, ellas son determinantes para medir la eficiencia de la fase de multiplicación en la micropropagación del guayabo. Muchos autores utilizan como explante en la fase de multiplicación de guayabo microesquejes de un solo nudo (Loh y Rao, 1989), por lo que es de esperar que mientras mayor sea el NN separables de cada brote, mayor será el CM y más eficiente la multiplicación de los brotes.

Usualmente en los meristemos y ápices la citoquinina endógena es baja debido a que el principal sitio de síntesis son las raíces, por lo que la adición exógena de citoquininas en los medios de multiplicación es generalizada. BAP es la citoquinina más empleada para la inducción de yemas axilares, se ha utilizado en muchos de los medios de cultivo empleados en la fase de multiplicación.

Efecto de un análogo de brasinoesteroides

A las seis semanas de cultivo, solo se observaron diferencias para la variable LB en los explantes cultivados con diferentes

concentraciones de DI-3 con respecto al control y sin diferencias entre ellos ($p < 0.01$, prueba de comparación de medias de Tukey). Los valores del LB fueron superiores (10.0 cm para 0.01 y 0.02 mg l⁻¹ y 9.6 cm para 0.03 mg l⁻¹), en comparación con el control (7.6 cm).

Entre las respuestas fisiológicas de las plantas a los brasinoesteroides, se incluyen efectos sobre la elongación, la división celular y el desarrollo vascular (Jordán y Casaretto, 2008).

Los microesquejes iniciaron la brotación temprana (7 días de cultivo) cuando se añadió DI-31 al medio de cultivo. En la literatura científica consultada no se ha descrito el empleo de análogos de brasinoesteroides en la fase de multiplicación *in vitro* de guayabo. En otros cultivos como tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) (Plana *et al.*, 2002), el empleo de análogos de brasinoesteroides ha incrementado el NB por explante y el CM, en comparación con los tratamientos controles. Sin embargo, los resultados fueron similares a los mencionados por De la Fe *et al.* (1998) que al realizar la sustitución parcial o total de BAP por diferentes concentraciones de Biobras-6 y Biobras-16 (análogos de brasinoesteroides) en la micropropagación de la caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) observaron brotación, pero los valores del NB y CM se redujeron aproximadamente un 50%.

CONCLUSIONES

El tipo de medio de cultivo influyó en la multiplicación de brotes de guayabo. El número de brotes, la longitud de los brotes y el

coeficiente de multiplicación estuvieron determinados por el tipo de citoquinina y la concentración de esta añadida al medio de cultivo. De igual forma, el empleo del análogo de brasinoesteroide DI-31, que no se había utilizado antes para la multiplicación *in vitro* de guayabo, estimuló el crecimiento de los brotes sin afectar el coeficiente de multiplicación. El medio de cultivo WPM con 1 mg l⁻¹ de BAP promovió la inducción de nuevos brotes en la multiplicación *in vitro* de guayabo cultivar 'Enana Roja Cubana EEA-1840'.

AGRADECIMIENTOS

Este proyecto de investigación fue cofinanciado por el Consejo de desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico de la Universidad del Zulia, VAC-CONDES-0576-10.

REFERENCIAS

- Aular J, Casares M (2011) Consideraciones sobre la producción de frutas en Venezuela. Revista Brasileira de Fruticultura. Volumen Especial: 187-198
- Barwale U, Kerns H, Widholm M (1986) Plant regeneration from callus culture of several soybean genotypes via embryogenesis and organogenesis. *Planta* 167: 473-481
- Bhatt D, Dhar U (2004) Factors controlling micropropagation of *Myrica esculenta* buch. – Ham. ex D. Don: a high value wild edible of Kumaun Himalaya. *African Journal of Biotechnology* 3 (10): 534-540
- Cardoza V, (2008) Tissue culture: The manipulation of plant development. En: Stewart, CN, Wiley J (Ed). *Plant biotechnology and genetic: principles, techniques, and applications*, pp. 113-134. Inc. Knoxville, Tennessee
- De la Fe C, Ortiz R, Jiménez M (1998) Aportes a la tecnología de micropropagación de la caña de azúcar aplicada en Cuba. II. Efecto de análogos de brasinoesteroides en la multiplicación, el enraizamiento y la adaptación de las vitroplantas. *Cultivos Tropicales* 19(3): 45-48
- Jordán M, Casaretto J (2008) Hormonas y reguladores del crecimiento: etileno, ácido abscísico En: Squeo F, Cardemil (Eds) *Fisiología vegetal brasinoesteroides, poliaminas, ácido salicílico y ácido jasmónico*, pp. 2113-2123. Ediciones Universidad de La Serena, La Serena
- Loh C, Rao AN (1989) Clonal propagation of guava (*Psidium guajava*) from seedlings and grafted plants and adventitious shoot formation *in vitro*. *Scientia Horticulturae* 39: 31-39
- McCown B, Lloyd G (1981) Woody plant medium (WPM) a revised mineral formulation for micro-culture of woody plant species. *HortScience* 16:453
- Meghwal PR, Sharma HC, Singh SK (2010) Micropropagation studies on guava. *Indian Journal of Horticulture* 67(4): 55-58
- Mishra, M, Chandra R, Pati R, Bajpai A (2007) Micropropagation of guava (*Psidium guajava* L.). *Acta Horticulturae* 735: 155-158
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15(3): 473-497
- Ocampo F, Nuñez V (2007) Propagación *in vitro* de (*Psidium guajava* L.) mediante organogénesis directa a partir de segmentos nodales. *Revista Corpoica – Ciencia y Tecnología Agropecuaria* 8(1): 22-27
- Plana D, Álvarez M, Florido M, Lara R, Núñez M (2002) Efecto del Biobras-6 en la morfogénesis *in vitro* del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) var. Amalia. *Cultivos Tropicales* 23(2): 21-25
- Shah TR, Zamir J, Ali ZH, Lutfullah G (2008) *In vitro* regeneration of plantlets from seedlings explants of guava (*Psidium guajava* L.) cv. Safeda. *Pakistan Journal of Botany* 40(3): 1195-1200
- Vento Y (Ed) (2011) Instructivo técnico para el cultivo de la guayaba. Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical. Cuba. [En línea] En: <http://www.innovacion.gob.sv/inventa/attachments/article/4330/index.pdf>. Consultado: 07 de abril de 2013
- Vilchez J, Albany N, Gómez R, García L, Agramonte D (2001) Germinación de embriones somáticos de *Psidium guajava* L. cv. 'Enana Roja Cubana EEA 18-40' en sistemas de inmersión temporal. *Biotecnología Vegetal* 1(2): 67-69
- Vilchez J, Albany N, Martínez L, Molina M, Pirela C, Molina M, Álvarez C, Chirinos J (2011) Multiplicación en sistemas de inmersión temporal y enraizamiento *ex vitro* de ocumo blanco (*Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott). *Revista Colombiana de Biotecnología* 13(1): 94-102

Recibido: 15-12-2013
Aceptado: 25-01-2014