

Establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de guayabo (*Psidium guajava* L.)

In vitro establishment of guava (*Psidium guajava* L.) nodal segments

Maribel Ramírez¹
Efraín Salazar²

Resumen

A fin de propagar plantas de guayabo (*Psidium guajava* L.) *in vitro*, se probó inicialmente el efecto del tiempo de exposición al hipoclorito de sodio (5.25 %) y al hipoclorito de calcio (10 %) en el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de guayabo Tipo 'Criolla Roja' provenientes de plantas regeneradas *in vitro* cultivadas en condiciones de macetas, o de plantas cultivadas en el campo. Después de seleccionar la concentración adecuada de benciladenina (BA) para la inducción de brotación de yemas axilares, se evaluó el efecto de tratamientos con sulfato de gentamicina, benomil y solución de ácido cítrico + ácido ascórbico como antioxidante, en el establecimiento y brotación de explantes provenientes de plantas de campo. El hipoclorito de calcio al 10 % resultó más eficiente que el hipoclorito de sodio en el control de la contaminación al utilizarlo por 15 min. Los segmentos uninodales provenientes de plantas adultas lograron establecerse *in vitro*, mediante el uso del antibiótico, fungicida y antioxidantes en el medio de cultivo y/o mediante un lavado de los explantes inmediatamente antes de la siembra. El uso de BA a 4 mg L⁻¹ indujo un mayor porcentaje de explantes brotados (88 %).

Palabras claves: *Psidium guajava*, segmento nodal, *in vitro*, desinfección, benciladenina.

Abstract

To improve propagation *in vitro* of guava (*Psidium guajava* L.), the effect of exposure to sodium hypochlorite (5.25 % a.i.) and to calcium hypochlorite (10 %) on *in vitro* establishment of nodal segments of the 'Criolla Roja' guava Type were tested. Nodal segments came either from pot-cultured *in vitro* regenerated plants or from field grown adult plants. The effect of BA on the induction of bud development was also tested. Finally, the effect of gentamicine sulfate, benomyl and

Recibido el 02-09-1996 • Aceptado: 19-06-1997

1. Trabajo realizado durante la Práctica Profesional de Posgrado. Postgrado de Fruticultura Tropical. Facultad de Agronomía. Universidad del Zulia (LUZ). Apartado 15205. Maracaibo, 4005.

2. Departamento de Biotecnología. Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (CENIAP). Apartado 4653. Maracay 2101.

citric acid + ascorbic acid as an antioxidant solution on the establishment and bud development of nodal segments from field grown adult plants were studied. Calcium hypochlorite (10 %) was more efficient than sodium hypochlorite (5.25 %) on the contamination control when it was used during 15 min. Uninodal segments of adult plants could be established *in vitro* with the use of antibiotic, fungicide and antioxidants in the culture medium, and/or through washing the explants immediately prior to *in vitro* culture. BA (4 mg L^{-1}) induced bud development (88 %).

Key words: *Psidium guajava*, nodal segment, *in vitro*, surface sterilization, benzyladenine.

Introducción

El guayabo (*Psidium guajava* L.) es un árbol propagado masivamente por semillas, lo cual genera una variabilidad genética que se manifiesta en fenotipos diferentes, por ende, en los rendimientos y en la calidad de los frutos de las plantaciones comerciales. Algunas técnicas de propagación vegetativa, tales como la injertación (20) y el acodado (24) se han utilizado con resultados satisfactorios, sin embargo, en el estaquillado (4, 17) esta especie presenta un bajo porcentaje de éxito debido posiblemente a la baja capacidad regenerativa de estos materiales, sobretudo en estacas o esquejes de madera leñosa (22) y a la pudrición por invasión de microorganismos patogénicos (4).

La multiplicación *in vitro*, se presenta como una alternativa viable para la propagación masiva de progenies sanas genéticamente uniformes, además hace posible la recuperación de caracteres morfológicos juveniles mediante la ruptura de las relaciones existentes entre el explante y el conjunto de la planta (8). El establecimiento *in vitro* del guayabo se ha caracterizado por un bajo porcentaje

de explantes asépticos y un alto porcentaje de explantes oscurecidos (25). La presencia de microorganismos contaminantes ocurre sobretudo cuando la planta donante crece directamente en el campo y está expuesta a plagas, enfermedades, polvo y otros agentes, sin ningún tipo de control ambiental. El porcentaje de oscurecimiento en su mayoría, es posiblemente, la consecuencia de la oxidación de compuestos fenólicos presentes en los tejidos del explante, por reacción de las polifenoloxidasas, esto produce exudados oscuros en el medio y el oscurecimiento del explante. Wilson (26) señaló que el contenido de polifenoles puede variar con el estado de desarrollo de la planta y de las condiciones ambientales bajo las cuales se desarrolla. En este sentido, la edad de la planta y la localización del material vegetal en la misma pueden afectar su establecimiento *in vitro* (6, 7).

Microestacas con yemas apicales y/o axilares, han sido señalados como los explantes más recomendables para la propagación masiva de plantas y se han reportado diferentes metodologías para el establecimiento aséptico de

segmentos nodales tanto de material juvenil como adulto (2, 3, 5, 9, 10, 11, 13, 15). Sin embargo, Viloría (25) señala problemas de contaminación y oscurecimiento en segmentos nodales de guayabo durante la evaluación de varios métodos de desinfección utilizados en plantas leñosas.

El objetivo del presente trabajo

fue establecer una metodología para el establecimiento aséptico de segmentos nodales de guayabo provenientes de vitroplantas cultivadas en macetas y de plantas cultivadas en el campo. Así mismo, estudiar el efecto de la benciladenina en la brotación de yemas de segmentos nodales cultivados *in vitro*.

Materiales y métodos

Experimento 1. Evaluación del hipoclorito de sodio y hipoclorito de calcio en el establecimiento aséptico de segmentos nodales guayabo cultivados *in vitro*.

Se utilizaron plantas de guayabo (*Psidium guajava* L.) del Tipo 'Criolla Roja', de tres años de edad, cultivadas en condiciones de campo y plantas regeneradas *in vitro* (vitroplantas), de tres años de edad cultivadas en macetas con 5 kg de mezcla de arena, tierra y turba en proporciones iguales. Se seleccionaron segmentos binodales, con dos pares de yemas axilares, correspondientes al tercer y cuarto nudo en sentido descendente desde la parte apical del brote. Las hojas fueron eliminadas, dejando la base de los pecíolos a fin de evitar daños a las yemas axilares. Los explantes se sometieron por 30 min en agua jabonosa, 30 en min Benomil® (14 g L⁻¹) y 1 min en Alcohol etílico 75 % antes de aplicar los tratamientos con Cloro comercial (hipoclorito de sodio 5.25 % i.a.) o de Hipoclorito de calcio (10 %) durante 0, 2, 4, 8, 15 y 30 min. Luego se realizaron tres enjuagues con agua destilada esterilizada e inmediatamente se sumergieron por 15 min en

una solución antioxidante (1), antes de la siembra en tubos de ensayo de 150 mm x 25 mm, con medio de cultivo provisto de las sales de Murashige y Skoog (MS) (18), suplementado con 1 mg L⁻¹ de las siguientes vitaminas: tiamina, piridoxina y ácido nicotínico, 100 mg L⁻¹ mioinositol y 30 g L⁻¹ sacarosa. Se utilizó un testigo, al cual no se le aplicó ningún tratamiento con hipoclorito. El medio se solidificó con agar Sigma (7 g L⁻¹) después de ajustar el pH a 5.8 ± 0.02 . El medio se esterilizó en autoclave a 121 °C y 1.1 kg cm⁻² por 20 min. Una vez concluida la esterilización, se agregó 250 mg L⁻¹ de sulfato de gentamicina. Los explantes se cultivaron a 26 ± 2 °C, bajo irradiación de 16.5 W m⁻² provista por lámparas fluorescentes y un fotoperíodo de 16 horas. Se utilizó un diseño totalmente al azar con 5 observaciones y 4 explantes como unidad experimental. Las variables de estudio fueron porcentajes de explantes: asépticos, contaminados, contaminados por hongos y contaminados por bacterias.

Experimento 2. Efecto de la benciladenina (BA) en la brotación de segmentos binodales cultivados *in vitro* a partir de vitroplantas de

guayabo.

Se utilizaron segmentos binodales con el tercer y cuarto nudo de brotes de vitroplantas de 3 años cultivadas en macetas. Los explantes se desinfectaron con hipoclorito de calcio 10 % por 15 min en función de los resultados del experimento 1. Los tratamientos consistieron en aplicar 0, 1, 2, 4 y 8 mg L⁻¹ de BA al medio MS. Las variables de estudio fueron porcentaje de explantes brotados y porcentaje de supervivencia.

Experimento 3. Establecimiento *in vitro* de segmentos uninodales de guayabo procedentes de plantas adultas cultivadas en el campo.

Se utilizaron plantas de tres años de edad cultivadas en el campo. Los explantes consistieron de segmentos uninodales defoliados, con un par de yemas axilares, correspondientes al tercer o cuarto nudo. El procedimiento de desinfección fue similar al experimento 1, excepto por la adición de 300 mg L⁻¹ de Rifampicina® a la solución de 14 g L⁻¹ de benomil, se usó hipoclorito de calcio 10% por 15 min. Las variables de estudio fueron porcentaje de explantes: contaminados, oscurecidos, brotados, porcentaje de supervivencia y de medios oscurecidos. Los tratamientos con antibiótico, fungicida

y antioxidantes fueron los siguientes:

T₁: Medio líquido MS + 4 mg L⁻¹ BA. Posterior a la esterilización del medio se agregó 250 mg L⁻¹ de sulfato de gentamicina, 250 mg L⁻¹ de benomil, 75 mg L⁻¹ de ácido cítrico y 50 mg L⁻¹ de ácido ascórbico.

T₂: Medio sólido MS + 4 mg L⁻¹ BA, 250 mg L⁻¹ de sulfato de gentamicina y 2 g L⁻¹ de benomil antes de la esterilización. Previo a la siembra, los explantes se dejaron 15 min en una solución antioxidante (10) y 250 mg L⁻¹ de sulfato de gentamicina.

T₃: Igual a T₂, excluyendo el antioxidante y el sulfato de gentamicina antes de la siembra.

T₄: Medio líquido MS + 4 mg L⁻¹ BA.

T₅: Medio sólido MS + 4 mg L⁻¹.

Las condiciones de incubación de los explantes, medio nutritivo, pH, esterilización del medio y diseño estadístico de los experimentos 2 y 3 fueron iguales a las del experimento 1, aunque la unidad experimental para estos últimos fue de 5 explantes.

Las variables se procesaron a través del programa SAS (Statistical Analysis System) versión 6.04 (1987) del SAS Institute INC. Cary, NC, USA. Cuando hubo significancia se aplicó la prueba de Tukey.

Resultados y discusión

Experimento 1. En el cuadro 1 se resume el efecto del tiempo de exposición en hipoclorito de sodio 5.25 % y hipoclorito de calcio 10 % en el establecimiento aséptico de segmentos binodales de guayabo. Según el cuadro

1, la incidencia de hongos fue predominante, independientemente de la procedencia de los explantes. Los tiempos de exposición a la solución desinfectante menores o iguales a 4 min no controlaron el desarrollo de

Cuadro 1. Efecto del tiempo de exposición en hipoclorito de sodio y hipoclorito de calcio sobre el establecimiento aséptico de segmentos nodales de guayabo, 8 días después de la siembra *in vitro*.

Tratamiento	Porcentaje de contaminación					
	Asépticos*		Hongos		Bacterias	
	Maceta	Campo	Maceta	Campo	Maceta	Campo
Testigo	0	0	100	100	70	100
1 min NaClO	0	0	100	100	70	100
2 min NaClO	0	0	100	100	100	100
4 min NaClO	0	0	100	100	60	100
8 min NaClO	0	0	80	100	80	100
15 min NaClO	10	0	90	100	60	100
30 min NaClO	60	20	40	80	20	80
1 min Ca(ClO) ₂	0	0	100	100	70	100
2 min Ca(ClO) ₂	0	0	100	100	70	100
4 min Ca(ClO) ₂	10	0	90	100	90	100
8 min Ca(ClO) ₂	25	15	75	85	50	85
15 min Ca(ClO) ₂	90	60	10	40	10	10
30 min Ca(ClO) ₂	100	100	0	0	0	0

*Sólo se consideró la ausencia de microorganismos, independientemente del grado de oscurecimiento del explante. Algunos tubos presentaron ambos tipos de microorganismos, por lo que se consideró la presencia individual de cada uno de ellos, por eso la suma de porcentajes puede ser mayor que el 100%.

microorganismos. Los tratamientos con hipoclorito de sodio, permitieron el control de microorganismos a tiempos de exposición mayores de 15 min en explantes procedentes de plantas cultivadas en macetas, mientras que el hipoclorito de calcio, comenzó a ejercer su efecto a tiempos por encima de 4 min, aunque, la exposición de los segmentos nodales por más de 8 min en hipoclorito de sodio y por más de 15 min en hipoclorito de calcio, ocasionó el oscurecimiento total de los explantes, lo que evidencia su efecto tóxico. Sin embargo, ninguna de los tratamientos por sí solo pudo eliminar por completo los microorganismos y mantener el

explante en buenas condiciones. Al comparar la procedencia de los explantes se aprecia que hubo mayor porcentaje de explantes asépticos, en aquellos provenientes de vitropiantas cultivadas en macetas, tal vez por el origen de las plantas y por las condiciones bajo las cuales se desarrollaron que permiten una menor incidencia de contaminantes sobre las mismas. Se realizó la identificación de las bacterias presentes y correspondieron a *Erwinia hervicola*, una bacteria gram⁺ no identificada y una levadura.

Experimento 2. En el cuadro 2 se presentan los resultados obtenidos al añadir BA al medio de cultivo. Puede

Cuadro 2. Efecto de la benciladenina en los porcentajes de supervivencia y de explantes brotados cultivados *in vitro* de segmentos binodales de vitroplantas de guayabo.

BA mg L ⁻¹	Porcentaje de supervivencia		Porcentaje de explantes brotados	
	4 días	8 días	4 días	8 días
0	100	76 ^c	0	0 ^c
1	100	64 ^d	0	0 ^c
2	100	88 ^{ab}	0	20 ^b
4	100	96 ^a	28	88 ^a
8	100	60 ^d	0	0 ^c

a, b, c, d: Medias con letras distintas difieren significativamente ($P < .05$).

observarse el efecto inductor en la brotación al adicionar 4 mg L⁻¹ de la citocinina. Las concentraciones por debajo de 2 mg L⁻¹ parecen no ser suficientes para impulsar la brotación de las yemas porque se observó una respuesta más tardía y baja. Con esta concentración a los 8 días de la siembra *in vitro*, se obtuvo un 20 % de explantes brotados, resultados que alcanzan el 88 % al duplicarse la concentración de la citocinina. La concentración 8 mg L⁻¹ no indujo la brotación de los explantes, lo cual hace suponer un efecto inhibitorio, como efecto de una concentración por encima del óptimo requerido para la brotación de las yemas. Estos resultados concuerdan con lo establecido por Skoog y Miller (23), quienes plantearon que un balance favorable a las citocininas impulsa el desarrollo de los brotes foliados. Del mismo modo, se observa que los resultados no coinciden con los reportados en otras experiencias similares. Papadatau *et al.* (19) obtuvieron la mayor tasa de regeneración de brotes foliados al cultivar material juvenil en el medio Rugini para olivo (OM) con 2 mg L⁻¹ de BA. Amin y Jaiswal (3)

reportan la brotación de yemas de plantas adultas de guayabo al suplementar el medio de cultivo con 1 mg L⁻¹ de BA, mientras que Loh y Rao (15) determinaron un efecto óptimo de la BA en la brotación de yemas al suplementar el medio con 0.1 mg L⁻¹ de la misma citocinina. Lo anterior indica que el nivel de requerimiento de BA podría estar estrictamente relacionado con la edad de la planta progenitora, constitución genética de las plantas y el efecto del medio ambiente en donde se desarrolla el individuo. El porcentaje de supervivencia disminuyó muy poco a los 8 días con un 60% en el menor de los casos.

Experimento 3. En el cuadro 3 puede observarse que los tratamientos aplicados al medio de cultivo y/o antes de la siembra de los explantes mostraron diferencias significativas en el porcentaje de explantes contaminados, oscurecidos y de supervivencia, no así en el de explantes brotados y medios oscurecidos. Los tratamientos T₁, T₂ y T₃ resultaron ser los mejores en el control de la contaminación, T₄ y T₅ presentaron los mayores valores de

Cuadro 3. Efecto de tratamientos en el medio de cultivo y/o antes de la siembra *in vitro* de segmentos binodales de guayabo sobre el porcentaje de contaminación, explantes y medios oscurecidos, supervivencia y explantes brotados.

Tratamiento	Porcentaje de contaminación	Porcentaje de explantes oscurecidos	Porcentaje de medios oscurecidos	Porcentaje de supervivencia	Porcentaje de explantes brotados
T ₁	42 ^d	16 ^b	68 ^{ab}	84 ^a	84 ^a
T ₂	50 ^{cd}	12 ^b	72 ^a	88 ^a	88 ^a
T ₃	56 ^c	24 ^a	68 ^{ab}	76 ^b	80 ^{ab}
T ₄	62 ^b	24 ^a	60 ^{ab}	76 ^b	88 ^a
T ₅	88 ^a	28 ^a	74 ^a	72 ^b	80 ^{ab}

a, b, c, d: Medias con letras distintas difieren significativamente ($P < .05$).

contaminación lo cual podría ser debido a que estos no contemplaban el uso de antibiótico y fungicida en el medio y/o antes de la siembra, sin embargo, al compararlos se aprecia que la aparición de microorganismos es más tardía en T_4 , medio líquido, posiblemente por la condición anaeróbica del medio.

Los tratamientos que incluyen la aplicación de sulfato de gentamicina y fungicida al medio y/o antes de la siembra de los explantes redujeron la aparición de bacterias y hongos en el medio de cultivo, esto demuestra que el contacto prolongado de los explantes con el fungicida y antibiótico contribuye al establecimiento de cultivos asépticos. Otro aspecto importante es que el porcentaje de contaminación mas bajo (42 %) se alcanzó al adicionar el fungicida y el antibiótico después de esterilizar el medio, resultados que sugieren la conservación de sus propiedades al no ser sometidos a temperatura de 120 °C.

El porcentaje de explantes oscurecidos fue menor en T_1 y T_2 por lo que se podría inferir en que el uso de los antioxidantes en el medio de cultivo y/o antes de la siembra disminuyó el

oscurecimiento de los explantes que de alguna manera favoreció o incrementó el porcentaje de supervivencia en estos tratamientos. Al comparar los tratamientos T_2 y T_3 , se nota que T_3 presenta el mayor porcentaje de explantes oscurecidos tal vez por la ausencia de los antioxidantes. El oscurecimiento de los tejidos del explante o emisión exudados por el mismo en el medio de cultivo pueden ocurrir como consecuencia de la liberación de compuestos fenólicos, en las heridas realizadas al explante, lo que desencadena reacciones de oxidación reguladas por enzimas del tipo polifenoloxidasas (7, 21). Jaworski y Brown (12) demostraron que el grado de oscurecimiento está directamente relacionado con el contenido fenólico y la actividad enzimática, coincidiendo con lo establecido previamente por Kahn (14) y Luh y Phithalcpol (16). En cuanto a la brotación de las yemas se mantiene el efecto inductor de BA, efecto que resultó beneficioso en todos los tratamientos. El porcentaje de explantes brotados estuvo entre 80 y 88 % y no se vió afectado por los tratamientos evaluados.

Conclusiones

El hipoclorito de calcio al 10 % resultó mas eficiente que el hipoclorito de sodio (5.25 %) en el control de la contaminación al utilizarlo por 15 min, aunque afecto la viabilidad de los explantes.

El cultivo aséptico de segmentos binodales de guayabo fue afectado por las condiciones de cultivo de la planta progenitora, resultando mejor el precedente de vitroplantas cultivadas

en macetas.

El uso de BA a 4 mg L⁻¹ indujo el mayor porcentaje de explantes brotados.

Los segmentos uninodales provenientes de planta adultas cultivadas en el campo lograron establecerse asépticamente, mediante uso el sulfato de gentamicina, benomil y antioxidantes en el medio de cultivo y/o antes de la siembra del explante.

Literatura citada

1. Alvarado, M., E. Salazar y J. G. Tejera. 1994. Cultivo *in vitro* de yemas apicales de guayaba (*Psidium guajava* L.). En resúmenes: V Congreso Nacional de Frutales. Maracay, Venezuela.
2. Amin, M. N. and V. S. Jaiswal. 1987. Rapid clonal propagation of through *in vitro* shoot proliferation on nodal explants of mature trees. *Plan Cell Tiss Org Cult* 9: 235-243.
3. Amin, M. N. and V. S. Jaiswal. 1988. Micropropagation as an aid to rapid cloning of a guava cultivar. *Sci Horticultural* 36: 89-95.
4. Antoni, M. G. y F. Leal. 1976. Propagación de estacas de guayaba (*Psidium guajava* L.). Universidad Central de Venezuela (Maracay). Instituto de Agronomía. Sección Fruticultura. 9 pp.
5. Broochijk, M. 1989. New sterilization method for the *in vitro* culture of guavas (*Psidium guajava* L.). *Information Bulletin Citrus and Subtropical Fruit Research Institute, South Africa* 202: 1-2.
6. Challide, J. S. 1973. Phenolic compounds of genus *Pyrus*. VI Distribution of phenols amongs the various tissues of the *Pyrus* stem. *J. Sci Food Agric* 224: 285-293.
7. Comptop, M. E. and J. E. Prece. 1986. Exudation and plant Establishment. *Newsletter International Association for plant tissue* 50: 9-18.
8. Dublin, P. 1991. Multiplicación vegetativa de café, hevea y cacao. En: W. R. Roca y L. A. Mroginski (Eds). *Cultivo de tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones*. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) 151: 577-620.
9. Fitchet, P. M. 1989. Tissue culture of guava. *Information Bulletin, Citrus and Subtropical Fruit Research Institute, South Africa* 201: 4-5.
10. Fitchet, P. M. 1990. Dimple guava established in tissue culture. *Inligtingsbulletn Navorsinginstituut vir Sitrus en Subtropiese Vrugte* 212: 5.
11. Jaiswal, V. S. and M. N. Amin 1987. *In vitro* propagation of guava from shoot cultures of mature trees. *J. of Plant Physiology* 130: 7-12.
12. Jaworski, W. and S. Brown. 1990. Enzymatic browning in relation to phenolic compounds and polyphenol-oxidase activity various Peach cultivars. *J. Agric Food Chem* 38: 99-101.
13. Khattak, M. S., M. N. Malik and M. A. Khan. 1990. Effect of surface sterilization agents on *in vitro* culture guava (*Psidium guajava* L.) cv Safeda tissue. *Sarhad Jornal of Agriculture* 6 (2): 151-154.
14. Kahn, V. 1977. Some biochemical properties of polyphenoloxidase from two avocado varieties differing in their browning rates. *Rev J. of Food Science* 42: 38-43.
15. Loh, C. S. and A. N. Rao. 1989. Clonal propagation of guava (*Psidium guajava* L.) from seedlings and grafted plants and adventitious shoots formation *in vitro*. *Scientia Horticulturae* 39 (1): 31-39.
16. Luh, B. S. and B. Phithalcpol. 1972. Characteristics of polyphenoloxidase related to browning in cling peachs. *J. Food Sci* 37: 264.
17. Marco, C. M., E. Kersten and J. G. C. da Silva. 1996. Influência do ethephon e do ácido indolbutírico (AIB) no enraizamento do estacas de ramas de goaibeira (*Psidium guajava* L.). En resúmenes: XIV Congresso Brasileiro de Fruticultura. 42ª Reunião Interamericana de Horticultura Tropical. *Simpósio Internacional de Mirtáceas*. Curitiba, Brasil.
18. Murashige, T. and B. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tabaco tissue. *Phys. Plant.* 15 (3): 473-493.

19. Papadatau, P., C. A. Pontikis, E. Epthimiadou and M. Lydaki. 1990. Rapid multiplication of guava seedlings by *in vitro* shoot tip culture. *Scientia Horticulturae* 45: 99-103.
20. Ramírez, M., A. Urdaneta, C. Rivas, A. Parra and R. Villalobos. 1996. Genotypes and stocks of *Psidium guajava* and *P. friedrichsthalianum* behavior and the interaction in the top budding scioning method in guava. 1996. En resúmenes: XIV Congresso Brasileiro de Fruticultura. 42ª Reunión Interamericana de Horticultura Tropical. Simpósio Internacional de Mirtáceas. Curitiba, Brasil.
21. Ramírez, M. and B. S. Luh. 1973. Phenolic compounds in frozen avocado. *J. Sci Food Agric* 24: 219.
22. Sen, P. K. 1970. Physiological studies and use of chemicals for improvement of methods of rooting hard to root tree fruits. College of Agriculture Calcuta University. Final Technical Report.
23. Skoog, F. and C. D. Miller. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. *Symp Soc Exp Biol* 11: 118-131.
24. Vilchez, J.; N. Albany, J. Gadea, Z. Viloría y C. Castro. 1997. Propagación asexual de *Psidium guajava* L. mediante la técnica del acodo aéreo. En resúmenes: VI Congreso Nacional de Fruticultura. Barquisimeto, Venezuela.
25. Viloría, Z. 1993. Cultivo *in vitro* de nudos de guayabo (*Psidium guajava* L.). Fase I. La Universidad del Zulia. Facultad de Agronomía. Trabajo de Ascenso 34 pp. Maracaibo, Venezuela.
26. Wilson, M. F. and C. A. Blunden. 1983. Changes in three pear varieties during bud development. *J. Sci Food Agric* 34: 973-975.