

ESTABLECIMIENTO Y MULTIPLICACIÓN *IN VITRO* DE EMBRIONES CIGÓTICOS DE GUANÁBANA (*Annona muricata* L.)

Milagros Basail Pérez*, Adrián Rubio Cabrera, Yadenys Torres Núñez, Arletys Santos Pino y Aymé Rayas Cabrera.

Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT). Apartado 6, Santo Domingo CP. 53000, Villa Clara, Cuba.

*Autora para la correspondencia: sit.biotech@inivit.cu.

RESUMEN

El cultivo de la guanábana (*Annona muricata* L.) ha estado limitado por su método de propagación por semillas. La propagación masiva *in vitro* constituye una alternativa que permitirá incrementar la disponibilidad de plantas para su rápido desarrollo. El trabajo fue realizado en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales con el objetivo de evaluar el efecto de diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio (0; 0,5; 1 y 2 %) para el establecimiento *in vitro* de embriones cigóticos procedentes de semillas de frutos maduros de plantas *plus* y estudiar la influencia de diferentes concentraciones de 6-bencilaminopurina (6-BAP): 0; 0,5; 1; 1,5 y 2,0 mg.L⁻¹ y ácido naftalenacético (ANA): 0; 0,5; 1 y 1,5 mg.L⁻¹ adicionado al medio de cultivo basal de Murashige y Skoog en la etapa de multiplicación. Como resultado se obtuvo que al utilizar el hipoclorito de sodio a una concentración del 1 % y un tiempo de desinfección de 10 minutos se logró que el 92 % de los embriones sobrevivieran y se desarrollaran plantas completas, mientras que al utilizar una concentración de 0,5 % de hipoclorito de sodio no se controló la presencia de contaminantes (hongos y bacterias) y cuando se utilizó una concentración del 2 %, produjo la muerte de todos los embriones. A los 35 días de haber realizado el subcultivo a medio de cultivo de multiplicación, se logró un coeficiente de multiplicación de 1,8 con una concentración de 1,5 mg.L⁻¹ de 6-BAP y 1,0 mg.L⁻¹ de ANA.

Palabras clave: bacterias, desinfección, hipoclorito de sodio, semillas.

IN VITRO ESTABLISHMENT AND MULTIPLICATION OF SOURSOP (*Annona muricata* L.) CIGOTIC EMBRYOS

ABSTRACT

The soursop (*Annona muricata* L.) cultivation has been limited because of its seeds propagation method. *In vitro* massive propagation is an alternative that will increase the plants availability for its rapid development. This work was carried out at the vegetable Biotechnology Laboratory of the Research Institute of Tropical Root and Tuber Crops (INIVIT) with the objective of evaluating different of sodium hypochlorite (0, 0,5, 1 and 2 %) concentrations effect for *in vitro* establishment of cigotic embryos from mature fruits seeds of plus plants and to study the different concentrations influence of 6-benzylaminopurine (6-BAP): 0; 0,5; 1,0; 1,5 and 2,0 mg.L⁻¹ and naphthaleneacetic acid (ANA): 0; 0,5; 1,0 and 1,5 mg.L⁻¹ added to the Murashige and Skoog basal crop means in the multiplication stage. As a result, it was obtained that through using sodium hypochlorite at 1 % concentration and 10 minutes of disinfection time it was achieved that the 92 % of the embryos survived and whole plants were developed. On the

contrary while using 0,5 % of sodium hypochlorite concentration, it did not control contaminants presence (fungi and bacteria) and when a 2 % concentration was used, it produced all embryos death. After 35 days of subcrop to multiplication crop medium it was obtained 1,8 multiplication coefficient with 1,5 mg.L⁻¹ of 6-BAP and 1,0 mg.L⁻¹ of ANA concentration.

Keywords: bacteria, disinfection, sodium hypochlorite, seeds.

INTRODUCCIÓN

El cultivo de la guanábana (*Annona muricata* L.) es originario de América tropical y perteneciente a la familia *Annonaceae*. Este frutal tuvo una amplia expansión en tiempos prehispánicos y no se conoce en estado silvestre (Martínez, 2011). La creciente demanda e interés por el cultivo de la guanábana por parte del consumidor e industrias, hacen que esta sea muy apreciada por sus propiedades alimenticias y excelente sabor, lo que le da un gran valor comercial para la elaboración de jugos, helados, néctares, mermeladas, dulces y pulpa congelada.

En Cuba, la siembra de este cultivo ha estado limitada a patios y jardines de viviendas (Rodríguez *et al.*, 2010). Su método natural de propagación es a través de semillas, las cuales presentan una germinación irregular por poseer diferentes niveles y tipos de dormancia. Esto hace que el tiempo requerido para formar una planta sea muy largo (Pinto *et al.*, 2005). En la actualidad su prestigio ha aumentado debido a los múltiples beneficios que de ella se han descubierto, como por ejemplo sus propiedades anticancerígenas.

En Venezuela el cultivo de la guanábana presenta grandes perspectivas debido a su adaptación a diferentes condiciones edafoclimáticas (Avilán *et al.*, 1992). Por otra parte, su fruta es importante en grandes mercados frutícolas de América del Sur, América Central y del Caribe. La propagación del cultivo de la guanábana puede ser efectuada por vía semilla o material vegetativo. El primer caso es muy común en Cuba, no siendo recomendable porque las plantas obtenidas presentan variaciones de altura, rendimientos, calidad de la fruta, entre otras, además de iniciar la producción tardíamente. La propagación vegetativa sería la más indicada por proporcionar plantas uniformes, tanto en la copa como en el patrón, y con inicios de producción temprana. En Cuba existen varios métodos como el acodado aéreo, estaquillado, injertación y cultivos de tejidos *in vitro*, siendo el más utilizado el de injertación (Pinto y Silva, 1994), aunque este método no es el más fácil, pues los patrones regularmente tardan alrededor de un año para alcanzar el desarrollo óptimo (Guzmán, 1982). En cuanto al acodado aéreo y estaquillado no se ha obtenido éxito (Rasai *et al.*, 1995).

El cultivo *in vitro* como técnica, consiste en subcultivar asépticamente una porción aislada de la planta bajo condiciones de ambiente controlado, para que las células expresen su potencial intrínseco o inducido. Esta técnica tiene posibilidades de ser aplicada en el género *Annona* a fin de obtener grandes cantidades de plantas sanas en menor tiempo (Lemos y Blake, 1996; Rasai, 1995; Rincón, 1999). El desarrollo de un protocolo que permita propagar *in vitro* material de plantas elitescas en su fase adulta, facilitaría el proceso de selección y multiplicación.

Existen investigaciones relacionadas con la micropropagación del cultivo de la guanábana (Bejoy y Hariharan, 1992) para lo cual se han empleado segmentos nodales que reflejaron altos porcentajes de explantes contaminados (Rincón *et al.*, 1999), no

siendo así en el caso de embriones cigóticos en dicho cultivar, de lo cual no hay referencias bibliográficas.

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del hipoclorito de sodio durante el proceso de contaminación microbiana y la viabilidad de explantes de guanábana al establecerlos *in vitro*, así como lograr la multiplicación de los embriones cigóticos utilizando diferentes concentraciones de 6-bencilaminopurina (6-BAP) y ácido naftalenacético (ANA).

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo fue desarrollado en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT) en el periodo de marzo de 2016 a octubre de 2017 con el objetivo de evaluar el efecto de diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio (0; 0,5; 1 y 2 %) durante el establecimiento *in vitro* de embriones cigóticos procedentes de semillas del fruto de plantas de la guanábana (*Annona muricata* L.) y estudiar la influencia de diferentes concentraciones de 6-BAP (0; 0,5; 1; 1,5 y 2,0 mg.L⁻¹) y ANA (0; 0,5; 1; 1,5 mg.L⁻¹) adicionado al medio basal MS (Murashige y Skoog, 1962) en la etapa de multiplicación.

Material vegetal. Se seleccionaron frutos maduros de guanábana de buena calidad.

Tipo de explante. Se extrajeron semillas de frutos maduros los cuales fueron lavados con detergente, realizándose tres enjuagues con agua estéril para posteriormente proceder a su desinfección con las diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio antes mencionadas.

Procedimiento de desinfección superficial. Las semillas de los frutos maduros fueron tratadas con diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio combinadas con dos tiempos de desinfección, 5 y 10 min. Posteriormente, se realizaron tres enjuagues con agua destilada esterilizada.

Medio de cultivo y condiciones de incubación. La siembra se realizó en tubos de ensayo de diámetro (150 mm x 26 mm) con 15 ml de medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS) + 0,5 mg.L⁻¹ de 6-bencilaminopurina + 20 g.L⁻¹ de sacarosa y 4 g.L⁻¹ de agar en la etapa de establecimiento, mientras que para la multiplicación de los explantes se tomó como control el medio MS + 0,5 mg.L⁻¹ de 6-BAP + 1,5 mg.L⁻¹ de ANA + 20 g.L⁻¹ de sacarosa y 4 g.L⁻¹ de agar. El pH del medio se ajustó a 5,7 antes de esterilizarlo en autoclave a 121 °C y 1,1 kg.cm⁻² por 15 min. Todos los frascos de cultivo fueron colocados en cámara de crecimiento a 27±2 °C con una densidad de flujo de fotones fotosintéticos (DFFF) de 62-68 μmolm⁻²s⁻¹ y fotoperiodo de 16 horas de luz y ocho de oscuridad.

Establecimiento *in vitro* de embriones cigóticos de guanábana con diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio

Se seleccionaron frutos maduros de guanábana de buena calidad a los que se extrajo la semilla, las mismas fueron tratadas con diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio (0; 0,5; 1,0; y 2,0 %) combinadas con dos tiempos de desinfección, 5 y 10 min (Tabla 1).

Tabla 1. Influencia del porcentaje de desinfección del hipoclorito de sodio en embriones cigóticos de semilla de guanábana en diferentes tiempos durante el establecimiento *in vitro*.

Concentraciones empleadas de hipoclorito de sodio (%)	Tiempos de desinfección
0,0	5
0,5	
1,0	
2,0	
0,0	10
0,5	
1,0	
2,0	

A los 10 y 20 días de realizado el establecimiento *in vitro* se midieron los porcentajes de explantes con hongos, bacterias, viables y oscurecidos. Los hongos se detectaron por medio de la presencia de micelio y las bacterias a través de los exudados presentes en el explante o en la base de este, en contacto con el medio de cultivo. Se denominó explante viable aquel de color verde, descartándose los verdes amarillentos y pardos.

Influencia de diferentes concentraciones de 6-BAP y ANA en la etapa de multiplicación de embriones cigóticos de guanábana

Se utilizó como control el medio de cultivo (Murashige y Skoog (MS) + 1,0 mg.L⁻¹ de 6-BAP + 0,5 mg.L⁻¹ de ANA + 20 g.L⁻¹ de sacarosa y 4 g.L⁻¹ de agar) propuesto por Mejía (1994). Los diferentes medios de cultivo se conformaron a partir de la combinación de los reguladores del crecimiento (Tabla 2).

Tabla 2. Combinación de los reguladores del crecimiento (6-BAP y ANA) sobre la multiplicación del cultivar de guanábana.

Tratamientos	6-BAP (mg.L ⁻¹)	ANA (mg.L ⁻¹)
1	0,0	0,0
2		0,5
3		1,0
4		1,5
5	0,5	0,0
6		0,5
7 (control)		1,0
8		1,5
9	1,0	0,0
10		0,5
11		1,0
12		1,5
13	1,5	0,0
14		0,5
15		1,0
16		1,5
17	2,0	0,0
18		0,5
19		1,0
20		1,5

En esta fase se realizaron los subcultivos cada 35 días.

Procesamiento estadístico

Con los criterios de la estadística descriptiva se realizaron las tablas que expresan los resultados procesados con estadística inferencial paramétrica (análisis de varianza de clasificación simple). La comparación múltiple de medias se realizó según Tukey cuando se encontró homogeneidad de varianza, (Lerch, 1977). Se utilizó el paquete estadístico MSTAT-C de la Universidad de Michigan (Bricker, 1993 citado en Guzmán y Castaño, 2002).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Establecimiento *in vitro* de embriones cigóticos de guanábana con diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio

Con los resultados obtenidos se pudo demostrar que con el hipoclorito de sodio a una concentración del 1 % y un tiempo de desinfección de 10 minutos, se logró obtener que el 92 % de los embriones sobrevivieran y se desarrollaran plantas completas. Mientras que al utilizar la concentración de 0,5 % combinado con los tiempos de desinfección evaluados, no controló la presencia de contaminantes (hongos y bacterias) y cuando se utilizó una concentración del 2 %, produjo la muerte de los embriones, (Tabla 3).

Tabla 3. Efecto de la concentración y tiempo de desinfección del hipoclorito de sodio en el porcentaje de sobrevivencia de los embriones cigóticos.

Concentraciones empleadas de hipoclorito de sodio (%)	Tiempos de desinfección	% de embriones cigóticos que sobrevivieron
0,0	5	0,0
0,5		0,5
1,0		54,0
2,0		0,0
0,0		0,0
0,5	10	0,9
1,0		92,0
2,0		0,0

Según Posada (2005), se logró la desinfección en el cultivo de la papaya (*Carica papaya* L.) al utilizar una concentración de hipoclorito de sodio al 1 % durante 10 minutos alcanzando un porcentaje de embriones cigóticos viables de un 68,0 % en el medio de cultivo en estado líquido durante la etapa de establecimiento *in vitro*.

Por otra parte, Jadán *et al.* (2016) obtuvieron los mejores resultados al utilizar una concentración de hipoclorito de sodio al 1,5 % durante 10 minutos logrando un 68,5 % de embriones viables en la etapa de establecimiento *in vitro* de los brotes de *Vasconcellea x helbornii* (Badillo) a los 21 días de cultivo.

Sin embargo, Bohórquez *et al.* (2016) obtuvieron el mayor porcentaje de embriones superficialmente asépticos (66,0 %) al utilizar una concentración del 1 % de hipoclorito de sodio durante un tiempo de 5 min en el cultivar de *Espeletia paipana* S.

También García *et al.* (2012) lograron el 73,0 % de la brotación de la yema axilar de los segmentos nodales en el cultivo de la guanábana cuando utilizó una concentración de hipoclorito de sodio al 1,0 %.

En especies leñosas durante la etapa de establecimiento *in vitro* se produce afectación por la incidencia de contaminaciones por hongos, bacterias o ambos, así como por la oxidación fenólica de los explantes (Hernández y González, 2010).

La baja viabilidad en las dosis de 0 y 0,5 % se asociaron a la invasión total del explante por microorganismos contaminantes, principalmente hongos, que ocasionaron con el tiempo la muerte del mismo (Ramírez y Salazar, 1998), y en la dosis de 2,0 %, a un efecto tóxico del hipoclorito de sodio (Ramírez y Salazar, 1997). Adicionalmente, el porcentaje de explantes viables (92 %), fue superior al obtenido por Rincón *et al.* (1999) de 28 %, cuando desinfectaron los embriones cigóticos de guanábana con 1,0 % de hipoclorito de sodio.

En el tratamiento de semillas de tomate al utilizar una concentración de hipoclorito de sodio al 1 % durante un tiempo de desinfección de un minuto, se obtuvo buenos resultados, logrando cero porcentaje de contaminación y una germinación del ciento por ciento (Walasek, 2012).

En *Annona muricata*, estos resultados constituyen el primer reporte donde se obtienen altos porcentajes de desarrollo de brotes axilares (92,0 %) a partir de embriones cigóticos establecidos, con baja incidencia de contaminación microbiana (Figura 1).



Figura 1. Explantes obtenidos a partir de embriones cigóticos en el cultivar de guanábana en la etapa de establecimiento *in vitro*.

Influencia de diferentes concentraciones de 6-BAP y ANA en la etapa de multiplicación de embriones cigóticos de guanábana

A partir de los resultados obtenidos con la combinación de los reguladores del crecimiento (6-BAP y ANA) se pudo demostrar que con el tratamiento quince ($1,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de 6-BAP y $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de ANA) se obtuvieron los mejores resultados con diferencias significativas con respecto a los demás tratamientos (Tabla 4).

Tabla 4. Resultados obtenidos de la combinación de los reguladores del crecimiento (6-BAP y ANA) en la multiplicación *in vitro* del cultivar de guanábana.

Tratamientos	Altura de la planta (cm)	Hojas activas (u)
1	2,37 c	2,95 b
2	2,89 b	2,05 d
3	3,00 b	1,95 d
4	2,30 c	2,55 c
5	2,76 c	2,50 c
6	2,60 c	1,05 e
7 (control)	2,62 c	2,30 c
8	2,21 d	2,70 b
9	2,31 d	2,85 b
10	2,22 d	3,01 b
11	2,02 e	2,42 c
12	1,99 e	2,95 b
13	2,56 c	2,46 c
14	2,12 e	2,79 b
15	3,30 a	4,40 a
16	2,58 c	2,45 c
17	2, 47 c	2,88 b
18	2,28 d	1,64 d
19	2,59 c	2,75 b
20	2,60 c	2,98 b
ES ±	0,10 *	0,07 *
CV (%)	11,83	13,01

Letras desiguales dentro de cada columna difieren para $p < 0,05$ según prueba de Tukey.

Sobre la multiplicación de explantes provenientes de embriones cigóticos con reguladores del crecimiento (6-BAP y ANA) en este cultivar no existe información.

Según Abubacker y Deepalakshmi (2017), se logró la formación de brotes axilares en el cultivar de guanábana a partir del medio de cultivo formado por las sales MS + 1,0 mg.L⁻¹ de 6-bencilaminopurina + 0,5 mg.L⁻¹ de Kinetina + 1,5 mg.L⁻¹ de Ácido indolbutírico.

También Medina *et al.* (2015) lograron la multiplicación del plátano bocadillo del choco, *Musa acuminata* a partir de meristemos apicales con 3,0 mg.L⁻¹ de 6-BAP y 1,0 mg.L⁻¹ de ANA.

En el cultivar de pino (*Pinus cubensis* G.) con una concentración de 22,5 mg.L⁻¹ de 6-BAP y 5,4 mg.L⁻¹ de ANA se incrementó el número y la longitud de los brotes axilares en la fase de multiplicación (Raima *et al.*, 2011).

El propósito del cultivo de embriones es obtener plantas de tamaño uniforme y libre de patógenos, ya que acelera el proceso de germinación y el crecimiento de las plántulas. De ahí la importancia de utilizar esta técnica como una alternativa para la propagación de especies que tienen semillas que presentan dormancia o de especies en peligro (Soares *et al.*, 2011; Zurita *et al.*, 2014).



Figura 2. Plantas *in vitro* de guanábana a los 35 días de cultivo al emplear 1,5 mg.L⁻¹ de 6-BAP y 1,0 mg.L⁻¹ de ANA.

CONCLUSIONES

1. Al utilizar una concentración de hipoclorito de sodio al 1,0 % con un tiempo de desinfección de 10 minutos se logró obtener el 92,0 % de brotación de los embriones cigóticos durante el establecimiento *in vitro* en el cultivo.
2. A partir de la combinación de 1,5 mg.L⁻¹ de 6-BAP y 1,0 mg.L⁻¹ de ANA se obtuvieron plantas *in vitro* de buena calidad.

BIBLIOGRAFÍA

- AVILÁN, L.; F. LEAL y D. BAUTISTA. 1992. Manual de Fruticultura. Principios y manejo de la producción. Segunda Edición. Tomo I. Ed. América C.A. Caracas, Venezuela. 776 p.
- ABUBACKER, M. and T. DEEPALAKSHMI. 2017. *In vitro* direct regeneration of *Annona muricata* L. from nodal explant. *Biosciences Biotechnology Research*, 14(1):123-128.
- BEJOY, M. and M. HARIHARAN. 1992. *In vitro* plantlet differentiation in *Annona muricata*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 31:245-247.
- BOHÓRQUEZ-QUINTERO, M.A.; E.J. ARAQUE-BARRERA y J.C. PACHECO-MALDONADO. 2016. Propagación *in vitro* de *Espeletia paipana* S. Díaz y Pedraza, frailejón endémico en peligro de extinción. *Actualidades Biológicas*, 38(104):99-108.
- GARCÍA, L.; J. ALVAREZ; Y. ALVARADO; M. GONZÁLEZ; M. LA O; D. MIRABAL y C. ROMERO. 2012. Establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de plantas jóvenes de *Annona muricata* L. *Bioteecnología Vegetal*, 12 (4): 229-234.
- GUZMÁN, F. 1982. La guanábana. Revisión bibliográfica. En: Fruticultura Tropical. Federación Nacional de Cafeteros de Colombia. Programa de Desarrollo y Diversificación de zonas cafeteras. Colombia. p. 232-253.
- GUZMÁN, O. A. y J. CASTAÑO. 2002. Reconocimiento de nemátodos fitopatógenos en plátanos 'Dominico hartón' (*Musa* AAB, Simmonds), 'Africa', 'FHIA-20' y 'FHIA-21' en Colombia. *InfoMusa*, 11(2):34-35.

- HERNÁNDEZ, Y. y M. GONZÁLEZ. 2010. Efectos de la contaminación microbiana y la oxidación fenólica en el establecimiento *in vitro* de árboles frutales. *Cultivos Tropicales*, 31(4): 58-69.
- JADÁN, M.; K. BASANTEZ; R. GÓMEZ y I. BERMÚDEZ. 2016. Establecimiento *in vitro* de brotes de *Vasconcellea x helbornii* (Badillo) Badillo. *Biotecnología Vegetal*, 16(2):67-72.
- LEMOS, E and J. BLAKE. 1996. Micropropagation of juvenile and mature *Annona muricata* L. *Journal of Horticultural Science*, 71:395-403.
- LERCH, G. 1977. La experimentación en las ciencias biológicas y agrícolas. Ed. Científica y Técnica. La Habana, 288p.
- MARTÍNEZ, J. 2011. Botanofilia, el oráculo de la botánica: *Botánica Ambiental* curso 2015/16. Grupo B. <https://www.ucm.es/>
- MEDINA, A.; L. MEDINA y L. KARIME. 2015. Propagación *in vitro* de *Musa acuminata* (Simmunds), plátano bocadillo del Chocó, Colombia, a partir del cultivo meristemos apicales. *Rev. Biodivers. Neotrop.*, 5(1):47-53. ISSN 2027-8918 e ISSN 2256-5426.
- MEJÍA, R. 1994. Agrobiotecnología Fundamentos y aplicaciones. Propagación comercial 312 especies de plantas por cultivo *in vitro*. Perú.
- MURASHIGE, T. and F. SKOOG. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15:473-497.
- PINTO, A. y E. SILVA. 1994. Graviola para exportação: Aspectos técnicos da produção. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. Secretaria de Desenvolvimento Rural-SRD. Programa de Apoio à Produção e Exporta. EMBRAPA-SPI. Brasília, DF.41 p.
- PINTO, A.; M. CORDEIRO; S. ANDRADE; F. FERREIRA; H. FILGUEIRAS; R. ALVES and D. KIMPARAS. 2005. *Annona* species, International Center for Underutilised Crops, University of Southampton, Southampton. 268 p.
- POSADA, L. 2005. Aplicaciones de la biotecnología a la propagación de la papaya. *Biotecnología Vegetal*, 5(2): 67-79.
- RAIMA, C.; J. IGARZA y A. OCHOA. 2011. Propagación *in vitro* de plantas de *Pinus cubensis* Griseb. *Biotecnología Vegetal*, 11(1) 3-13.
- RAMÍREZ, M. y E. SALAZAR. 1997. Establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de guayabo (*Psidium guajava* L.). *Rev. Fac. Agrom. LUZ*, 14:497-506.
- RAMÍREZ, M. y E. SALAZAR. 1998. Método de desinfección y efecto de citocininas en el cultivo *in vitro* de segmentos hojas de *Psidium guajava* L. *Rev. Fac. Agrom. LUZ.*, 15:162-173.
- RASAI, S.; A. GEORGE and A. KANTHARAJAH. 1995. Tissue culture of *Annona* spp. (cherimoya, atemoya, sugar apple and soursop): A review. *Scientia Horticulturae*, 62:1-8.
- RINCÓN, A.; R. ORTEGA; J. URDANETA; S. LEÓN DE SIERRALTA; B. BRACHO y M. RAMÍREZ. 1999. Establecimiento aséptico de brotes laterales de *Annona* spp. *Rev. Fac. Agron. LUZ*, 16(1):76-81.
- RODRÍGUEZ, A.; E. FARRÉZ; J. PLACERES; O. PEÑA; L. FORNARIS; L. MULLEN; J. RAMOS y D. HERNÁNDEZ-ESPINOSA. 2010. Una mirada al manejo del cultivo de la guanábana (*Annona muricata* L.). *CitriFrut*, 27(1):64-68.
- SOARES, J.; F. RODRIGUEZ; M. PASQUAL; C. NUNES y A. ARAUJO. 2011. Germinação de embriões de crescimento inicial *in vitro* de Macaúba. *Ciência Rural*, Santa Maria, Online. ISSN 0103-8478.

- WALASEK, D. 2012. Evaluación de métodos para desinfectar semillas de tomate contra cancro bacteriano (*Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis*). *Revista Agrociencia Uruguay*, 16(1):76-83.
- ZURITA, W.; J. GÓMEZ; E. ATRIÁN; A. HERNÁNDEZ; M. GRANADOS; E. GARCÍA; J. SALGADO y R. SÁNCHEZ. 2014. Establecimiento de un método eficiente de germinación *in vitro* y micropropagación del cirimo (*tilia mexicana schlecht.*) (*tiliaceae*). *Polibotánica*, (38):129-144.