

Establecimiento *in vitro* de lima ácida (*Citrus aurantiifolia* [Christm.] Swingle.) -variedad Tahití- a partir de meristemas axilares

Wilson Ricardo Santiana Vinueza

Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Honduras
Noviembre, 2014

ZAMORANO
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

Establecimiento *in vitro* de lima ácida (*Citrus aurantiifolia* [Christm.] Swingle.) -variedad Tahití- a partir de meristemas axilares

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar al título de Ingeniero Agrónomo en el Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

Wilson Ricardo Santiana Vinueza

Zamorano, Honduras

Noviembre, 2014

Establecimiento *in vitro* de lima ácida (*Citrus aurantiifolia* [Christm.] Swingle.) -variedad Tahití- a partir de meristemas axilares

Presentado por:

Wilson Ricardo Santiana Vinueza

Aprobado:

María Alexandra Bravo, M.Sc.
Asesora Principal

Renán Pineda, Ph.D.
Director
Departamento de Ciencia y Producción
Agropecuaria

Cinthy Martínez, M.B.A.
Asesora

Raúl H. Zelaya, Ph.D.
Decano Académico

Mauricio Huete, Ing. Agr.
Asesor

**Establecimiento *in vitro* de lima ácida (*Citrus aurantifolia* [Christm.] Swingle.)
-variedad Tahití- a partir de meristemas axilares**

Wilson Ricardo Santiana Vinueza

Resumen. La lima ácida (*Citrus aurantifolia* [Christm.] Swingle.) es un árbol de crecimiento perenne perteneciente a la familia Rutaceae, originario del Sudeste de Asia. Su fruto es de importancia económica agrícola a nivel mundial. La propagación de este cultivo es mediante injerto de esquejes o meristemas axilares que se colocan en un patrón que presenta características de resistencia. Este método de propagación asexual tiene la desventaja de transmitir enfermedades de la planta madre a los propágulos. Por tal motivo se ha determinado que la propagación *in vitro* a partir de meristemas puede ser una alternativa para la obtención de material vegetal libre de patógenos. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de citoquininas y giberelinas en la formación de brotes de lima ácida a partir de meristemas axilares. El material vegetal se sembró en el medio basal de Murashige y Skoog modificado y suplementado con 0.25 mg/L de 6 – Bencil Aminopurina (BAP), 0.25 mg/L de Kinetina, 1.5 mg/L Ácido Giberélico, 0.25 mg/L de BAP + 0.25 mg/L Kinetina y el testigo sin hormona. Se observó que los tratamientos 0.25 mg/L de BAP, 0.25 mg/L de Kinetina y el testigo sin hormona presentaron los mejores resultados de porcentaje de explantes con brote. No se observó diferencia significativa en ningún tratamiento respecto al promedio de brotes por explante.

Palabras clave: Biocida, citoquininas, giberelinas, micropropagación.

Abstract. The acid lime (*Citrus aurantifolia* [Christm.] Swingle.) is an evergreen growth belonging to the family Rutaceae, native Southeast Asia. Its fruit is of agricultural economic importance worldwide. This culture propagation is by grafting or axillary meristem cuttings are placed in a pattern that has strength characteristics. This method of asexual propagation has the disadvantage of transmitting diseases from the mother plant propagules. Therefore it has been determined that *in vitro* propagated from meristems can be an alternative for obtaining pathogen-free plant material. The aim of this study was to evaluate the effect of cytokinins and gibberellins in shoot formation of limes from axillary meristems. The plant material was plated on modified Murashige and Skoog medium supplemented with 0.25 mg/L 6 - Benzyl aminopurine (BAP), 0.25 mg/L of kinetin, 1.5 mg/L gibberellic acid, 0.25 mg/L BAP + 0.25 mg / L kinetin and control without hormone. Treatments were observed to 0.25 mg/L of BAP, 0.25 mg/L kinetin and control without hormone showed the best results with bud explants percentage. No significant difference was observed in any treatment compared to the average of shoots per explant.

Keywords: Biocide, cytokinins, gibberellins, micropropagation.

CONTENIDO

Portadilla	i
Página de firmas	ii
Resumen	iii
Contenido	iv
Índice de cuadros, figuras y anexos.....	v
1 INTRODUCCIÓN.....	1
2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	3
3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	8
4 CONCLUSIONES.....	10
5 RECOMENDACIONES	11
6 LITERATURA CITADA	12
7 ANEXOS.....	14

ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Cuadros	Página
1. Medio de cultivo Murashige y Skoog modificado para el establecimiento <i>in vitro</i> de meristemas axilares de lima ácida -variedad Tahití-.....	5
2. Fito hormonas suplementadas al medio basal MS para el establecimiento <i>in vitro</i> de meristemas axilares de lima ácida -variedad Tahití-.....	6
3. Efecto de citocininas y giberelinas en la producción de brotes a partir de meristemas axilares de lima ácida -variedad Tahití- a los 28 días del establecimiento <i>in vitro</i>	9

Figuras	Página
1. Esqueje de segundo crecimiento apical de lima ácida -variedad Tahití-.....	3
2. Procedimiento de preparación del material vegetal (<i>Citrus aurantiifolia</i> [Christm.] Swingle.) -variedad Tahití-.....	4
3. Extracción de los meristemas axilares de lima ácida -variedad Tahití-.....	7
4. Meristemas de lima ácida -variedad Tahití- establecidos en medio MS modificado.	8

Anexos	Página
1. Contaminación presente en medio de cultivo y meristemas axilares de lima ácida -variedad Tahití-.....	14

1. INTRODUCCIÓN

La lima ácida (*Citrus aurantiifolia* [Christm.] Swingle.) es un árbol perenne perteneciente a la familia Rutaceae, originaria del Sudeste de Asia principalmente en Indonesia y Malasia, extendido a nivel mundial en climas tropicales, siendo los principales productores Brasil y México. Según la FAO la producción alcanzó 15'118,462.2 toneladas a nivel mundial solo en el año 2012. El 27% de la producción de consumo es en fruto fresco (FAOSTAT 2013).

La propagación convencional de los cítricos se realiza mediante esquejes o yemas que se injertan en un patrón, al utilizar yemas o esquejes de plantas contaminadas los patógenos pueden diseminarse fácilmente. Motivo por el cual existen programas de certificación de cítricos usando sistemas de cuarentena y de saneamiento. El manejo de plantas libres de enfermedades y el control de vectores reducen la propagación e incidencia de enfermedades tales como HLB (Huanglongbing), CTV (Virus de la tristeza de los cítricos) y psorosis, enfermedades que afectan la fisiología y reducen la producción (Lee *et al.* 1991).

El cultivo de tejidos o micropropagación es el conjunto de técnicas utilizadas para la producción masiva de plantas en condiciones artificiales (Rathore *et al.* 2007). En cítricos el medio desarrollado por Murashige y Skoog en 1962 es el más usado y al que más cultivos se adaptan, su concentración de sales minerales y nutrientes proporcionan un medio óptimo para el desarrollo de meristemas axilares (Gella y Errea 1998).

La propagación de cítricos mediante cultivo de tejidos *in vitro* es una alternativa que nos permite establecer material vegetal extraído de campo y mantener una fuente de germoplasma para la producción continua de microesquejes libres de patógenos. En ocasiones la transmisión de enfermedades por parte de la planta madre puede mantenerse si no se realiza el proceso de desinfección correcto, la siembra bajo condiciones adecuadas y con las medidas sanitarias necesarias en el procedimiento (Gella y Errea 1998).

En la planta se producen fitohormonas que son compuestos orgánicos que estimulan el crecimiento y desarrollo, en la propagación *in vitro* es necesario utilizar cantidades exógenas de fitohormonas para obtener mayor desarrollo y formación de estructuras vegetales, además las fitohormonas retardan la senescencia en la célula y estimulan su crecimiento. La adición de hormonas nos permite acortar el tiempo de crecimiento para la producción masiva de plantas. La respuesta de los tejidos a las fitohormonas dependen de los receptores presentes en las células vegetales y su respuesta está influenciada por la especie vegetal a la cual se le suministre la hormona (Ayerbe 1990).

Estudios han indicado que las fitohormonas juegan un papel importante en la propagación *in vitro*, las más utilizadas en procedimientos de establecimiento son las citocininas tales como Kinetina (6-Furfurilaminopurina), BAP (6-bencilaminopurina), 2iP (2-Isopentenil-adenina).

Además se usa giberelinas las cuales tienen acción directa en la célula estimulando su desarrollo y formación de tejidos nuevos. (Raven *et al.* 1992).

Las giberelinas tienen efecto en las células vegetales y estimulación en la elongación de entrenudos y crecimiento de los meristemas al ser suministrado en medios de cultivo *in vitro*. Además puede interrumpir la latencia en las semillas, y es usada generalmente para medios donde se siembre embriones aislados. Esta fitohormona generalmente tiene acción en el crecimiento pero inhibe la formación de raíces adventicias y la formación de vástagos adventicios (Pierik 1975).

Dados los niveles e incidencia de enfermedades en Centro América y la proliferación de HLB como enfermedad altamente infectiva y de carácter letal en toda la región es importante el desarrollo de un protocolo para la producción de plantas libres de patógenos.

Los objetivos de este estudio fueron:

- Establecer *in vitro* meristemas axilares de lima ácida (*Citrus aurantiifolia* [Christm.] Swingle.) -variedad Tahití-.
- Evaluar el efecto del BAP, Kinetina y ácido giberélico en el establecimiento *in vitro* de meristemas axilares de lima ácida -variedad Tahití-.

2. MATERIALES Y METODOS

Localización del estudio. El experimento se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de Zamorano, Carrera de Ingeniería Agronómica del Departamento de Ciencia y Producción Agropecuaria Escuela Agrícola Panamericana, ubicada en el Valle del Yeguaré, Honduras.

Material vegetal. Se utilizaron meristemas axilares tomados de esquejes de lima ácida (*Citrus aurantifolia* [Christm.] Swingle.) -variedad Tahití- extraídos de la plantación de cítricos de Zamorano ubicado en la vega del Yeguaré (13°59'35"N 86°59'26"E – 738 msnm). Los esquejes fueron tomados de árboles que presentaban buen desarrollo foliar (Figura 1).



Figura 1. Esqueje de segundo crecimiento apical de lima ácida -variedad Tahití-.

Desinfección del material vegetal. Una vez extraído el material vegetal del campo se retiró hojas y espinas para facilitar el manejo. Se removió residuos de suelo con agua potable y detergente. Luego se cortó los esquejes en segmentos de 1.5 a 2 cm (Figura 2).

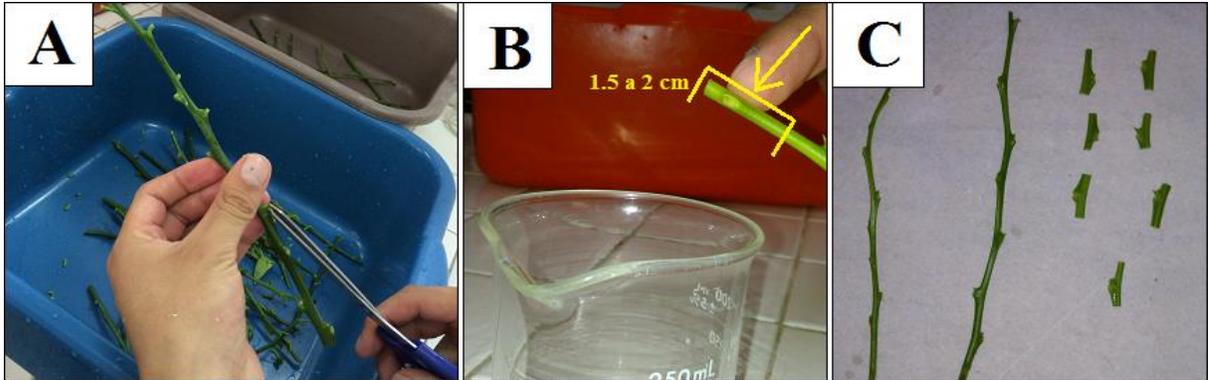


Figura 2. Procedimiento de preparación del material vegetal (*Citrus aurantifolia* [Christm.] Swingle.) -variedad Tahití-. A) Extracción de hojas y espinas de los esquejes. B) Segmentos de 1.5 a 2 cm. C) Segmentos utilizados para la extracción del meristema axilar.

Los segmentos nodales se sumergieron en una solución de etanol al 70% por 20 segundos. A continuación se sumergieron en una solución de Hipoclorito de Sodio (NaClO) al 20% v/v (Magia Blanca[®] al 4.72% i.a.) con dos gotas de Tween 80 por cada 100 ml de solución, por 15 minutos. En cámara de flujo laminar horizontal marca EACIN (“Environmental Air Control, Inc.”) se extrajo la solución de NaClO, se realizaron tres lavados con agua destilada estéril y se colocó los segmentos en platos Petri estériles.

Preparación de medio de cultivo. Se usó el medio de Murashige y Skoog MS modificado (Cuadro1).

Al medio se le agregó el Biocida PPM[®] (“Plant Preservative Mixture”) (3mL/L) este biocida es una sustancia química sintética que contiene microorganismos activos destinados a destruir, neutralizar, impedir la acción o ejercer un control de cualquier organismo considerado nocivo, tiene amplio espectro capaz de controlar hongos, bacterias y virus (Plant Cell Technology 2014).

Cuadro 1. Medio de cultivo Murashige y Skoog modificado para el establecimiento *in vitro* de meristemas axilares de lima ácida -variedad Tahití-.

Componente	Fórmula	Nombre común	mg/L
Macro elementos	CaCl ₂ .2H ₂ O	Cloruro de calcio bihidratado	440.000
	KH ₂ PO ₄	Fosfato monobásico de potasio	170.000
	KNO ₃	Nitrato de potasio	1,900.000
	MgSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de magnesio heptahidratado	370.000
	NH ₄ NO ₃	Nitrato de amonio	1,650.000
Micro elementos	H ₃ BO ₃	Ácido bórico	6.200
	CoCl ₂ .6H ₂ O	Cloruro de cobalto hexahidratado	0.025
	CuSO ₄ .5H ₂ O	Sulfato de cobre pentahidratado	0.025
	KI	Yoduro de potasio	0.830
	MnSO ₄ .4H ₂ O	Sulfato de manganeso tetrahidratado	22.300
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	Molibdato de sodio bihidratado	0.250
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de zinc heptahidratado	8.600
Hierro	FeNa EDTA	Sal férrica sódica de ácido etilendiaminotetraacético	50.000
Componentes Orgánicos		Myo-inositol	100.000
		Tiamina-HCL	0.400
		Sacarosa	30,000.000

Fuente: Roca y Mroginski (1991)

Se suplemento el medio de cultivo MS con distintas concentraciones según estudios realizados obteniendo un desarrollo favorable y aceptación al medio de cultivo suplementado con citocininas y giberelinas.

Cuadro 2. Fitohormonas suplementadas al medio basal MS para establecimiento *in vitro* de meristemas axilares de lima ácida -variedad Tahití-.

Tratamiento (mg/L)	Fuente
0.25 BAP ^Ψ	(Al-Khayri y Al-Bahrany 2001)
1.50 GA ₃ ^ϕ	(Pérez 2013)
0.25 KIN ^θ	(Savita <i>et al.</i> 2011)
0.25 BAP + 0.25 KIN	(Savita <i>et al.</i> 2011)
Testigo sin fitohormonas	(Roca y Mroginski 1991)

^Ψ BAP = 6 – Bencil Aminopurina

^ϕ GA₃ = Ácido Giberélico

^θ KIN = Kinetina (6-Furfurilaminopurina)

Se utilizó el medidor de pH “Meter S20 Seven Easy” y se ajustó el nivel de pH a 5.8 con HCL y/o KOH. El medio se solidificó con 1.8 gr/L de Phytigel[®]. Se dispensó en envases de vidrio de 100 ml colocando en cada uno 10 ml de medio de cultivo, se taparon con papel aluminio y se esterilizó en el autoclave (“Market Forge Sterilmatic STM – E”) a 15 PSI durante 20 minutos a una temperatura de 121°C.

Extracción y siembra de meristemas axilares. Se desinfectó todas las superficies con alcohol al 70% para evitar contaminación, las herramientas (pinzas, bisturís) se esterilizaron a 250°C en el esterilizador de calor seco. Se realizaron cortes longitudinales en el material vegetal para extraer el meristema axilar (Figura 3). Los meristemas fueron sembrados uno en cada frasco colocando la parte basal en contacto con el medio, los frascos se taparon y sellaron con cinta plástica. Los cultivos se incubaron a 22 °C, con humedad relativa de 70% a 80%, a 2000 Lux con un fotoperiodo de 16 horas procedente de lámparas fluorescentes del tipo “Silvanya Daylight Incandescent 75 W”.

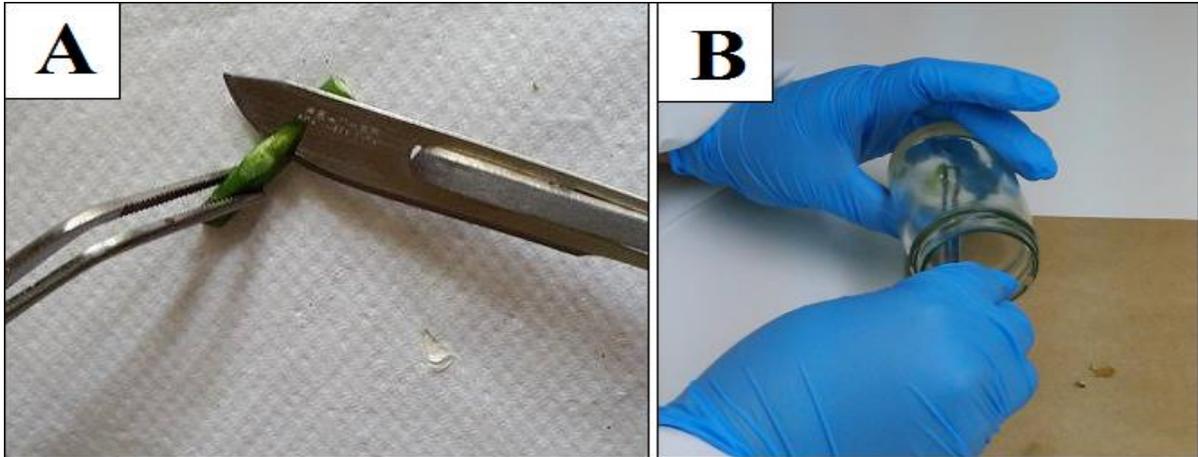


Figura 3. Extracción de meristemas axilares de lima ácida -variedad Tahití-. A) Corte longitudinal realizado para extraer el meristema axilar. B) Siembra en medio de establecimiento.

Diseño Experimental y análisis estadístico. Se utilizó un Diseño Completamente al Azar, que consistió de cinco tratamientos, tres repeticiones y cada repetición con 20 unidades experimentales. Se realizó el análisis de varianza (ANDEVA), y una separación de medias con el método DUNCAN con un nivel de significancia ($P \leq 0.05$). Los datos fueron analizados con el programa “Statistical Analysis System” (SAS versión 9.3[®]).

Datos evaluados. Las variables evaluadas fueron contaminación cada siete días, y a los 28 días se evaluó el número de explantes con brotes y número de brotes por explante.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Establecimiento de meristemas axilares. Al final de la etapa de establecimiento (28 días) se obtuvo el 70.6% de meristemas asépticos (Figura 4). Se observó a los siete días que los meristemas iniciaron su crecimiento y a partir del día catorce se observaron brotes ya formados. Se observó que los tratamientos suplementados con 0.25 mg/L de BAP, 0.25 mg/L de KIN y testigo sin fitohormonas presentan los mejores resultados en el porcentaje de explantes con brotes adventicios.

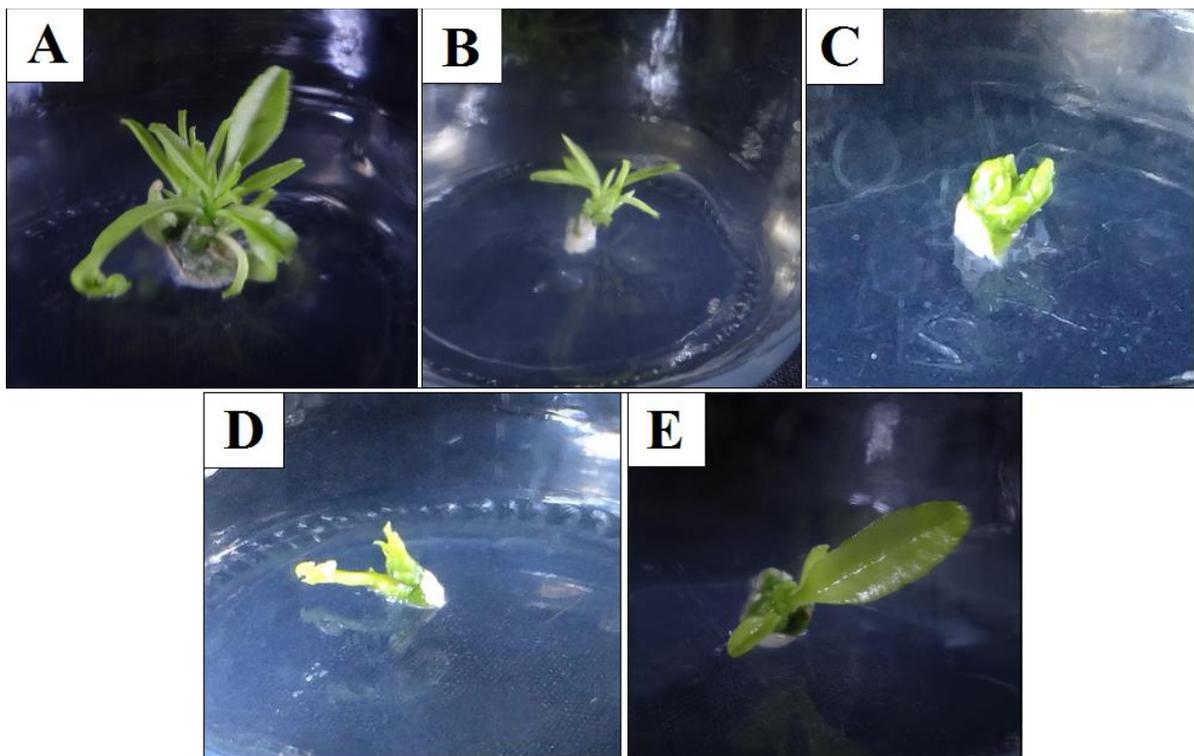


Figura 4. Meristemas de lima ácida -variedad Tahití- establecidos en medio MS modificado. A) Microesquejes en medio suplementado con 0.25 mg/l de BAP. B) Microesqueje en medio suplementado con 0.25 mg/L de Kinetina. C) Microesquejes en medio suplementado con 1.50 mg/L de Ácido Giberélico. D) Microesquejes en medio suplementado con 0.25 mg/L de BAP + 0.25 mg/L de KIN. E) Testigo.

El tratamiento suplementado con 0.25 mg/L de BAP obtuvo el 80% de los meristemas establecidos en el medio de cultivo, esto concuerda con estudios realizados por Al-Khayri y Al-Bahrany (2001) quienes realizaron experimentos en lima ácida (*Citrus aurantiifolia* [Christm.] Swingle.) a diferentes concentraciones de BAP obteniendo como resultado óptimo la concentración de hormona de 0.25 a 0.50 mg/L, esta respuesta positiva se debe a que el BAP estimula la división celular y la formación de brotes adventicios, pero inhibe la formación de raíces (Cuadro 3).

Cuadro 3. Efecto de citocininas y giberelinas en la producción de brotes a partir de meristemas axilares de lima ácida -variedad Tahití- a los 28 días del establecimiento *in vitro*.

Tratamientos (mg/L)	Unidades Experimentales (n)	Explantos con brote (%)	Promedio de brotes por explante
0.25 BAP ^ψ	28	80 ^a ^ο	2.4*
0.25 KIN ^θ	15	67 ^{ab}	2.2
1.50 GA ₃ ^φ	18	32 ^{bc}	2.0
0.25 BAP + 0.25 KIN	12	21 ^c	2.0
Testigo	15	68 ^{ab}	2.0

^ο Los tratamientos con distinta letra son significativamente diferentes, según la prueba Duncan ($P \leq 0.05$).

^ψ BAP = 6 – Bencil Aminopurina

^φ GA₃ = Ácido Giberélico

^θ KIN = Kinetina (6-Furfurilaminopurina)

*No hubo diferencia significativa entre tratamientos.

El tratamiento suplementado con 0.25 mg/L de KIN presentó un 67% de explantes con brote. Esta fitohormona es capaz de inducir a la división celular, además de activar las yemas adventicias, retardando la senescencia y estimulando la movilización de nutrientes hacia los puntos de crecimiento. Diferentes concentraciones de Kinetina estimulan el crecimiento pero excesos pueden tener efectos negativos en el material vegetal (Ayerbe 1990). Estudios realizados por Calavan *et al.* (1972) determinaron respuestas positivas en cultivos perennes al ser estimulados con kinetina, esta hormona produce formación de nuevos brotes a partir de meristemas. Resultados similares se observaron en el testigo al presentar 68% de brotes adventicios, esto se debe a la adaptación positiva al medio de cultivo basal Murashige y Skoog estos resultados concuerdan con lo observado por Bhat *et al.* (1992).

Los tratamientos suplementados con 1.50 mg/L de GA₃ y 0.25 mg/L de BAP + 0.25 mg/L de KIN presentan respectivamente 32% y 21% de explantes con brotes, siendo esto los porcentajes más bajos. Se observó que la combinación de BAP con KIN da una respuesta antagónica, pero el resultado es que las dos juntas reducen la formación de brotes. Estos resultados contrastan con los observados por Savita *et al.* (2011).

4. CONCLUSIONES

- Se logró establecer meristemas axilares de lima ácida (*Citrus aurantiifolia* [Christm.] Swingle.) -variedad Tahití-.
- Se observó el mayor número de explantes en los medios suplementados con 0.25 mg/L de BAP, 0.25 mg/L de KIN y el tratamiento sin hormonas en el establecimiento *in vitro* de meristemas axilares de lima ácida -variedad Tahití-.

5. RECOMENDACIONES

- Mantener material vegetal en un lugar donde se pueda controlar las condiciones sanitarias para disminuir contaminación en la etapa de establecimiento.
- Realizar pruebas con los brotes obtenidos de los meristemas axilares para continuar con la etapa de multiplicación.

6. LITERATURA CITADA

Al- Khayri, J.M. y A.M. Al-Bahrany. 2001. In vitro micropropagation of *Citrus aurantifolia* (lime). Consultado 15 de Septiembre de 2014. Disponible en <http://www.iisc.ernet.in/currsci/nov102001/1242.pdf>

Ayerbe, L. 1990. Cultivo *in vitro* de las Plantas Superiores. Madrid, España, Ediciones Mundi Prensa. 326 p.

Bhat, S.R., P. Chitrakleha, y K.P.S. Chandel. 1992. Regeneration of plants from long-term root culture of lime, *Citrus aurantiifolia* (Christm.) Swing. Consultado 11 de Octubre de 2014. Disponible en <http://link.springer.com/article/10.1007/BF00036141#page-2>

Calavan, E.C., C.N. Roistacher y E.M. Nauer. 1972. Thermotherapy of citrus for inactivation of certain viruses. Consultado 05 de Octubre de 2014. Disponible en http://www.ivia.es/iocv/archivos/proceedingsVII/7th186_193.pdf

FAOSTAT 2013. Consultado 07 de Octubre de 2014. Disponible en <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>

Gella, R. y P. Errea. 1998. Termoterapia *in vitro* para frutales. Consultado 25 de Septiembre de 2014. Disponible en <http://citarea.cita-aragon.es/citarea/handle/10532/889>

Lee, R.F., K.S. Derrick, M.J.G. Beretta, C.M. Chagas y V. Rosetti. 1991. Diseases of Fruits and Vegetables Diagnosis and Management. Volume I. Consultado 1 de Octubre de 2014. Disponible en http://books.google.hn/books?id=RypnQT5KPtC&pg=PA304&dq=Lee,+R.+F.,+Derrick,+K.S.,+Beretta,+M.J.G.,+Chagas,+C.M.+and+Rosetti,+V.+1991.&hl=es&sa=X&ei=eGM1VPqVJc_roAT2rIL4Bw&ved=0CBwQ6AEwAA#v=onepage&q=Lee%20R.%20F.%20C%20Derrick%20K.S.%20Beretta%20M.J.G.%20Chagas%20C.M.%20and%20Rosetti%20V.%201991.&f=false

Pérez, A.I. 2013. Efecto de precursores y reguladores de crecimiento en la formación de brotes adventicios a partir de explantes de limon persa (*Citrus latifolia*). Tesis Mag. Sci., Montecillo, Texcoco, Edo. de México, Institución de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas. 166 p. Consultado 15 de Agosto de 2014. Disponible en http://colposdigital.colpos.mx:8080/jspui/bitstream/10521/2025/1/Perez_Luna_AI_MC_Fruti cultura_2013.pdf

Pierik, R.L. 1999. *In vitro* culture of higher plants. Consultado 24 de Octubre de 2014. Disponible en http://books.google.hn/books?id=3DTyQSqa_nAC&dq=pierik+y+steegmans+1975&hl=es&source=gbs_navlinks_s

Plant Cell Techonology. 2014. Bioside PPM[®] (Plant Preservative Mixture) Consultado 25 de Octubre de 2014. Disponible en <http://www.plantcelltechnology.com/plant-preservative-mixture-ppm/>

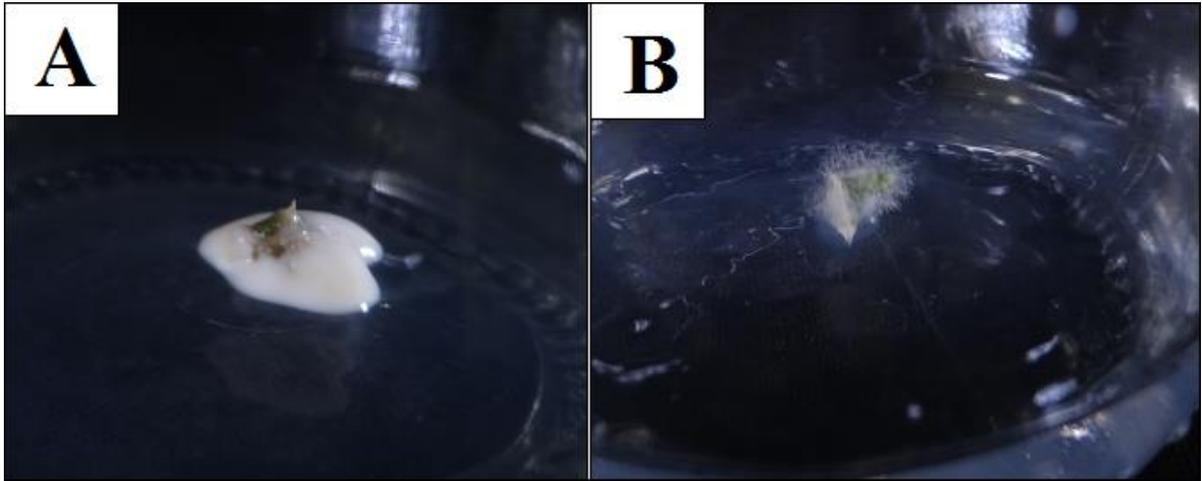
Rathore, J., M.S. Rathore, M. Singh, M. Singh, R.P. Singh y N.S. Shekhawat. 2007. Micropropagation of mature tree of *Citrus limon*. Consultado 23 de Septiembre de 2014. Disponible en <http://nopr.niscair.res.in/bitstream/123456789/5026/1/IJBT%206%282%29%20239-244.pdf>

Raven, P., R.F. Evert y S.E. Eichhorn, 1991. Biología de las plantas, cuarta ed. Barcelona, España. Consultado 14 de Octubre de 2014. Disponible en http://books.google.hn/books?id=xvNd3udrh1YC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=fals

Roca W. y L. Mroginski. 1991. Cultivo de tejidos en la Agricultura Fundamentos y Aplicaciones. Cali, Colombia. CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 969 p.

Savita, A., B. Singh, V. Singh y A.N. Kaur. 2011. An efficient plant regeneration protocol from callus cultures of *Citrus jambhiri* Lush. Consultado 16 de Octubre de 2014. Disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3550540/>

7. ANEXOS



Anexo 1. Contaminación presente en medio de cultivo y meristemas axilares de lima ácida - variedad Tahití. A) Contaminación por bacteria. B) Contaminación por hongo.