

PPD 2107

TESIS
ED2003
M37



Universidad Católica Andrés Bello.

Facultad de Humanidades y Educación.

Escuela de Educación.

Departamento de Ciencias Biológicas.

"PROPAGACIÓN ACELERADA DE

Centrosema venosum **BENTH.**

(Fabaceae)"

Trabajo Especial de Grado para optar al título de Licenciado en

Educación, Mención Ciencias Biológicas.

Autor:

Br. María Gabriela Martín Vetrone.

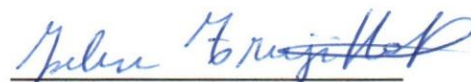
Tutor:

Dra. Iselen Trujillo.

Caracas, Septiembre del 2003.

En mi carácter de Tutor del Trabajo Especial de Grado titulado:
Propagación Acelerada de *Centrosema venosum* Benth (Fabacea),
realizado por **Br. María Gabriela Martín Vetrone** para optar al título de
Licenciado en Educación Mención Ciencias Biológicas, considero que dicho
trabajo reúne los requisitos y méritos suficientes para ser sometido a su defensa
oral y evaluación por parte del jurado examinador designado.

En Caracas, a los 4 días del mes de Septiembre de 2003.



Iselen Trujillo.

C.I.: V-6.524.760

AGRADECIMENTOS.

- ♣ En primer lugar a Dios y a la Virgen María Auxiliadora por guiarme y protegerme a lo largo de mi vida, y por darme la vida que hoy tengo.

- ♣ A mis padres, Tomás Martín B. y Luisa de Martín V., por su gran comprensión, amor y por ayudarme a ser la persona que hoy soy, protegiéndome y guiándome en esta vida. Gracias por todo. Los quiero mucho.

- ♣ A mi hermano Roberto por siempre darle la alegría en los momentos más duros de mi vida.

- ♣ A Anthony Iglesias por comprenderme y ayudarme a superar todos los obstáculos que se me presentaron.

- ♣ A la Dra. Iselen Trujillo por guiarme en este trabajo, por la paciencia que me tuvo y por los consejos que siempre me dio.

- ♣ A Ignacio y Norka por orientarme y ayudarme en la elaboración de este trabajo.

- ♣ A mi amiga Lucy por estar siempre incondicional para lo que necesitara.

- ♣ A Graciella por darme apoyo en este trabajo.

- ♣ A Sergio Tapias por ayudarme en la impresión de este trabajo.

- ♣ A mis profesores de la Universidad Católica Andrés Bello por enseñarme no solo a ser docente sino también a ser una mejor persona cada día.

- ♣ A la Universidad Católica Andrés Bello por ser mi casa de estudios y brindarme gran parte de la educación de mi vida.

DEDICATORIA.

A Dios fuente de amor y sabiduría.

A María Auxiliadora madre de todos.

A mis Padres quienes me apoyan, me orientan y aman.

RESUMEN

Centrosema venosum Benth. es una especie de importancia económica, para el forraje en las sabanas neotropicales de Venezuela. Debido a la dificultad de desarrollo de esta especie en campo se buscó el método más eficaz para su propagación, para ello se utilizó la técnica de micropropagación "in vitro" en la cual se tomó como base el medio de Murashige y Skoog (1962), suplementado con vitaminas, agar y diferentes concentraciones hormonales. En la etapa de iniciación se utilizaron 6 medios con diferentes concentraciones hormonales: IBA y BAP y se observó que el medio más efectivo para esta etapa fue el medio **D** (1,5 mg/l BAP y 0,05 mg/l IBA) ya que produjo un promedio de 10 brotes por explante. En la etapa de multiplicación se utilizaron 4 medios donde se variaron las concentraciones de BAP y se observó que los medios más apropiados fueron el medio **A** (3 mg/l BAP y 8 gr/l de Agar) ya que se obtuvo un promedio de 16 brotes por explante y el medio **D** (3,5 mg/l BAP y 3 gr/l de Phytigel) con un promedio de 13 brotes por explante. En la etapa de enraizamiento se colocaron los brotes en 2 medios: uno IBA y otro sin hormonas y se encontró que el medio que produjo raíces fue el medio IBA. Finalmente es importante destacar que la fase de aclimatación no llegó a realizarse por falta de tiempo, ya que las raíces no presentaron características apropiadas para la transferencia a dicha fase.

INDICE DE FIGURAS.

Fig. 1: Cámara de crecimiento donde se cultivaron los explantes	27
Fig. 2: Germinación "in vitro" de semillas de <i>Centrosema venosum</i> Benth..	28
Fig. 3: Etapa de iniciación de <i>Centrosema venosum</i> Benth.....	30
Fig. 4: Numero de brotes de la etapa de iniciación de <i>Centrosema venosum</i> Benth.a los 120 días de la inoculación de los explantes.....	33
Fig. 5: Diferencias del número de brotes entre tratamientos en la etapa de iniciación de <i>Centrosema venosum</i> Benth. analizado por el programa SPSS versión 11.0 en gráfico del tipo Boxplot.....	34
Fig. 6: Etapa de multiplicación de <i>Centrosema venosum</i> Benth.....	38
Fig. 7: Número de brotes de la etapa de multiplicación de <i>Centrosema venosum</i> Benth. a los 30 días del inicio de esta etapa.....	40
Fig. 8: Diferencias del número de brotes entre tratamientos en la etapa de multiplicación de <i>Centrosema venosum</i> Benth. analizado por el programa SPSS versión 11.0 en gráfico del tipo Boxplot.....	41

LISTA DE ABREVIATURAS

MS	Murashige y Skoog
IBA	Ácido Indolbutírico
BAP	Bencila Aminopurina.
IAA	Ácido Indolacético
2,4 D	Ácido 2,4 Diclorofenoxiacético
GA	Giberelina
ABA	Ácido Absícico
NAA	Ácido Naftalenacético
TDZ	Thidiazurón
INIA	Instituto Nacional de Investigación Agrícola
Cu	Cobre
Mn	Manganeso
I	Yodo
Fe	Hierro
Mo	Molibdeno
HCl	Ácido Clorhídrico
NaOH	Hidróxido de Sodio

INDICE

Agradecimientos.....	i
Dedicatoria.....	iii
Resumen.....	iv
Índice de fotos.....	v
Lista de Abreviaturas.....	vi
I. Introducción.....	1
II. Marco Teórico.....	3
Características de la especie.....	3
Importancia de las leguminosas.....	6
Cultivo "in vitro" de plantas.....	8
Etapas de la micropropagación.....	10
Antecedentes.....	10
Clasificación del cultivo "in vitro".....	14
Ventajas y desventajas.....	15
Antecedentes.....	17
Justificación de la investigación.....	19
III. Objetivo General.....	21
IV. Problema.....	22
V. Tipo de Investigación.....	22

VI. Hipótesis.....	22
VII. Materiales Y Métodos.....	23
1. Recolección y optimización del material a propagar (Especie: <i>Centrosema venosum</i> Benth.).....	23
Germinación "in vivo".....	23
Germinación "in vitro".....	24
2. Propagación "in vitro" de la especie <i>Centrosema venosum</i> Benth.....	25
Iniciación.....	25
Multiplicación.....	26
Enraizamiento.....	26
3. Análisis estadístico.....	27
IX. Discusión y resultados.....	28
Germinación.....	28
Iniciación.....	29
Multiplicación.....	37
Enraizamiento.....	44
X. Conclusiones.....	49
XI. Recomendaciones.....	51
XII. Anexos.....	52
Composición del Medio de Murashige y Skoog (1962).....	52

Concentraciones de reguladores de crecimiento utilizados en la etapa de iniciación del proceso de micropropagación de la especie <i>Centrosema venosum</i> Benth.....	53
Concentraciones de reguladores de crecimiento y agentes gelificantes utilizados en la etapa de multiplicación del proceso de micropropagación de la especie <i>Centrosema venosum</i> Benth.....	54
Análisis estadístico para evaluar la efectividad de seis medios o tratamientos en la etapa de iniciación y cuatro medios o tratamientos en la etapa de multiplicación.....	55
XIII. Bibliografía.....	76

I. INTRODUCCIÓN.

Este trabajo tiene como objetivo principal desarrollar alternativas eficientes para la propagación acelerada de *Centrosema venosum* Benth. (*Fabaceae*), utilizando técnicas de cultivo "in vitro".

Centrosema venosum Benth. es una leguminosa de gran importancia económica y para la biodiversidad en las zonas de sabanas neotropicales del Estado Guárico. Las leguminosas son un componente importante en la vegetación de sabanas en nuestro país, por su significado ecológico y económico. Debido a que su tasa de regeneración en ambientes naturales es sumamente baja, es necesario la implementación de metodologías para una rápida propagación "in vitro" y para su mejoramiento genético (Trujillo, 2001).

En Venezuela, las gramíneas nativas con potencial forrajero tienen un papel secundario; en cambio, las leguminosas nativas se consideran claves para el desarrollo ganadero del país, es decir, las leguminosas juegan un papel importante en cualquier sistema de producción animal, y su importancia se debe a que mejoran la calidad de los pastos, ya sean naturales o introducidos, al fijar nitrógeno del suelo mediante una simbiosis con microorganismos del mismo, e incorporan este elemento a los suelos, mejorando su fertilidad. Además, éstas

especies poseen un alto valor nutritivo lo que contribuye positivamente a la nutrición animal. (Razz y Faría, 1996; Flores y Rodríguez, 1985).

La micropropagación "in vitro" permite la obtención de altas tasas de multiplicación, y de una gran estabilidad genética al compararse con los sistemas de reproducción agámica y clonal, donde se ha facilitado la reducción en costos de manipulación, sin disminuir la eficiencia biológica y productiva, específicamente a nivel de plantas agrícolas y de uso industrial (Pérez Ponce, 1998).

II. MARCO TEÓRICO

Características de la especie.

La familia de las leguminosas (*Leguminosae* o *Fabaceae*) es una agrupación muy extensa de plantas que incluye muchas especies herbáceas, así como un gran número de especies leñosas. Los miembros de esta familia están distribuidos a lo largo de todo el mundo y generalmente pueden ser encontrados en casi cualquier ecosistema. Son habitantes del círculo polar ártico, de regiones templadas y áridas, y pueden constituir la flora principal de algunos hábitat tropicales (Perea, 2001).

Son dicotiledóneas, de ciclo anual, bienal o perenne. Las hojas están compuestas de varios folíolos, dispuestos en forma alterna. Los tallos son muy variados en longitud, ramificación y consistencia, y de crecimiento erecto, semierecto o trepador. El sistema radical generalmente está formado por una raíz principal, desarrollada y profunda, la cual se ramifica en otras secundarias, que le permiten una mayor eficiencia en la extracción del agua y de los nutrientes. Entre las especies del ciclo anual, se encuentra la soya, el frijol y la lenteja. Entre las bienales encontramos el siratrico de agua, la múcuma, clover de la india y el dolichos, mientras que entre las perennes, tenemos al kudzú tropical y la alfalfa (FUSAGRI, 1986).

La familia de las leguminosas comprende cerca de 12.000 especies, 500 géneros, los cuales han sido agrupados en tres subfamilias: *Papilionoideae*, *Mimosoideae* y *Cesalpinioideae*, siendo la más importante la subfamilia *Papilionaceae* (Havard-Duclos, 1968; Razz y Faría, 1996; Judd y col., 1999).

A continuación se presentan las características más resaltantes y la clasificación taxonómica de la especie a estudiar.

Centrosema venosum Benth.:

Subfamilia Papilionoideae: flor irregular, 10 estambres libres o bien 1 libre y 9 soldados o todos unidos. (Havard-Duclos, 1968; Judd y col., 1999)

Tribu Phaseoleae: éstas plantas son hierbas trepadoras o tendidas, raramente se observan erguidas, se presentan como arbustos y casi nunca se observan como árboles. Hojas del tipo pinnadas, generalmente trifoliadas y raramente se han visto de 1, 5 ó 7 folíolos. Los folíolos son enteros o lobulados, ordinariamente estipulados. Las flores se encuentran en posición axial, germinadas y raramente solitarias. Las semillas se encuentran en vainas bivalvas, el cotiledón es grueso, y las primeras hojas son opuestas (Havard-Duclos, 1968; Judd y col., 1999).

El género *Centrosema* está compuesto por plantas herbáceas con hojas de tres folíolos, raramente de 5 ó 7 folíolos; las flores son blancas, violetas, rosa o azul pálido, se encuentran solitarias o en racimos sobre un pedúnculo axilar solitario o germinado. Las semillas se encuentran en vainas sésiles, lineal, plano-comprimida. Se encuentran 30 especies en América Austral, Central, Java y Norteamérica (Havard-Duclos, 1968).

Centrosema venosum Benth., es una especie que presenta tallos finos, hojas trifoliadas, folíolos verde intenso en el haz, más claro en el envés, oblongos a lanceolados, acuminados, de 5 cm de largo y 2.5 cm de ancho, con vellosidades en ambas caras, peciolados; brácteolas cóncavas, más largas que el cáliz, estriadas y con vellosidades; flores violáceas; corola con estandarte pequeño, quilla incurvada, más corta que las alas, alas semiaplanadas y semicurvadas a los extremos; cáliz corto, con lacinio de 5 mm de longitud, que se incurva sobre la quilla; estambres diadelfos; vainas lineales, de 12 cm de largo, aplanadas y dehiscentes, hasta con 20 semillas y semillas de 3.5 mm de largo, de color marrón claro y manchas negras (Havard-Duclos, 1968; Judd y col., 1999).

Importancia de las leguminosas.

Las leguminosas forrajeras en su gran mayoría son originarias del trópico, existiendo un elevado número de cultivares, tanto autóctonos como introducidos. Constituyen una importante fuente forrajera por su elevada composición proteínica y tienen la característica de albergar microorganismos en sus raíces (bacterias), las cuales toman el nitrógeno del aire lo fijan al suelo, y las plantas lo toman en forma de solución nítrica. Las leguminosas son capaces de establecer una estrecha relación de simbiosis con bacterias del género *Rhizobium*, que se alojan en las raíces, mediante lo cual aprovechan el nitrógeno del aire, necesario para la formación de proteínas, lo que le confiere un alto valor nutritivo. Su cultivo, en forma aislada o asociadas con gramíneas forrajeras, aporta una fuente alimenticia de gran valor para el consumo del ganado, sin embargo, son muy escasas las fincas donde se les cultiva con fines de alimentación bovina (Havard-Duclos, 1968; FUSAGRI, 1986; Guzmán, 1996).

Centrosema venosum Benth., es una de las leguminosas más interesantes para el forraje verde, heno, o para la producción de la "harina de alfalfa", utilizada en los estados unidos. Se encuentran recubriendo los suelos, y tarda en cubrir una extensión de 0,9 mts²., en todas direcciones,

aproximadamente unos 5 ò 6 meses, originando un tapiz de 0,45 metros de espesor, con un rendimiento de 50 t/ha directamente consumible; pero es necesario esperar que pierda su humedad, ya que cuando está húmedo acarrea meteorismo (Havard-Duclos, 1968; Razz y Faría, 1996)

Debido a que la disponibilidad de las diferentes especies de leguminosas dentro de las sabanas neotropicales del Estado Guárico no es uniforme durante todo el año, y que el número de individuos de una misma especie presentes en este agroecosistema no son suficientes para la implementación de ciertos estudios de diversa índole, se hace necesario utilizar un sistema de propagación rápido y eficiente, que permita el suministro continuo de material vegetal en este tipo de investigación (Trujillo, 2001).

Las zonas de Venezuela que se encuentran dentro de la clasificación de sabanas neotropicales ocupan posiciones geográficas muy estratégicas para facilitar la implementación de los sistemas asociados al desarrollo de una agricultura autosustentable. Muchas de las especies que conforman su inventario florístico, tienen un enorme potencial económico, principalmente para la explotación maderera. Por otro lado, la relativa baja fertilidad natural de los suelos asociados a este tipo de ecosistema, hace necesario el énfasis en el desarrollo de especies vegetales adaptadas a esas condiciones edafoclimáticas (Trujillo, 2001).

La ganadería en el trópico y particularmente en Venezuela, depende de la alimentación a base de pastos. Aproximadamente el 60% de estos pastos son gramíneas naturales, las cuales crecen en el suelo con escasa fertilidad y son de bajo potencial productivo, valor nutritivo, principalmente en proteínas y fósforo, y digestibilidad de la materia seca. De allí, la importancia de introducir las leguminosas en la alimentación de ganado. (FUSAGRI, 1986)

Cultivo “in vitro” de plantas

El cultivo “*in vitro*” de plantas abarca un conjunto de técnicas que permiten el cultivo de órganos, tejidos, células y protoplastos en condiciones asépticas empleando medios de cultivos artificiales, con la finalidad de inducir la formación y desarrollo de los órganos hasta completar un individuo. Esta técnica se basa fundamentalmente en lo que se conoce como totipotencia, lo cual quiere decir, que toda célula somática joven o en proceso de diferenciación, es capaz de producir una planta completa si el explante se encuentra en condiciones adecuadas (Vargas Hernández, 1982; Pérez Ponce, 1998).

El cultivo celular, como en la actualidad se le conoce, fue iniciado por Haberlandt en 1902. Haberlandt fue el primer científico que cultivó células aisladas completamente diferenciadas en solución Knoop suplementada con sacarosa. Hasta nuestros días se han realizado diversas técnicas de cultivo de plantas, donde destacan Murashige y Skoog (1962) quienes desarrollaron un medio nutritivo con el que lograron un crecimiento rápido en tejidos de tabaco. En la actualidad, las sales inorgánicas de ese medio de cultivo se usan con bastante éxito en casi todas las especies. (En Vargas Hernández, 1982; En Serrano y Piñol, 1991).

Los medios de cultivos para la propagación de plantas, en su mayoría son utilizados en estado sólido, pero también existen medios líquidos. Para hacer los medios sólidos o semisólidos, es necesario usar agentes gelificantes como son el caso de agar, gelrite o phytigel. Estos medios resultan muy beneficiosos para los explantes, ya que permiten la ganancia de peso y facilitan la detección temprana de cualquier contaminación. El agar es un material de soporte usado ampliamente en el cultivo de tejidos, ya que provee al medio de un excelente gel húmedo para el desarrollo de las plántulas; sin embargo, fisiológicamente no es inerte, puesto que es una fuente de cantidades variables de sustancias inhibitoras o estimulantes del crecimiento. En el cultivo de tejidos de plantas, frecuentemente se usa agar Disco Bacto en una concentración de 0,6 a 1,0 % m/v. En muchas ocasiones los cultivos "in vitro" se ven afectados

adversamente cuando se aumentan las concentraciones de agar, ya que el medio se vuelve excesivamente compacto, y no permite la difusión de nutrientes en el tejido. El phytigel es un agente gelificante altamente purificado, compuesto de ácido glucorónico, ramnosa y glucosa, que permite la detección de contaminación microbial (Pierik, 1990; Hurtado y Merino, 1991; Pérez Ponce, 1998; Smith, 2000 y Chawla, 2002).

También pueden usarse medios líquidos con apoyo, en lugar de los medios sólidos. Estos incluyen: medios líquidos sin agar, donde se usa plástico de espuma limpio, glasswool o rockwool como apoyo; puentes de papel de filtro que se introducen en el medio; esponja viscosa debajo del papel de filtro como reserva del medio líquido en sustitución del agar (Chawla, 2002).

Etapas de la micropropagación.

Etapa de iniciación: esta etapa es la que va a permitir la inducción de los explantes de la especie a estudiar, permitiendo la formación de callos y brotes en el explante. Esta fase tiene como finalidad inducir la micropropagación de la especie a estudiar (Pérez Ponce, 1998).

En esta etapa se utilizan explantes obtenidos a partir de plántulas generadas por un proceso de germinación “in vitro” e “in vivo”, o partir de plantas ubicadas en campo.

Las ventajas que ofrece la germinación de semillas “in vitro” se podrían resumir en los siguientes puntos:

- a. El proceso de esterilización de semillas es mucho más fácil que la esterilización de tejido, adicionalmente dicho tratamiento con agentes desinfectantes puede realizarse en condiciones más drásticas en las semillas que en el material vegetal (este último se suele dañar, por lo que hay que eliminar posteriormente las partes afectadas o quemadas por la acción de los desinfectantes).
- b. Existe una reducción de la tasa de contaminación durante el establecimiento de cultivos celulares cuando se parte de un material que se desarrolló en condiciones asépticas, en relación a un tejido desinfectado (ya que la infección interna del material vegetal no se elimina mediante la esterilización química).
- c. El porcentaje de germinación de determinadas semillas aumenta debido a la desinfección, ya que se realiza en un ambiente acondicionado, y sin competencia con la germinación de otras semillas o contaminantes como hongos y bacterias.

- d. La germinación de determinadas semillas puede ser favorable en un cultivo in vitro. Tal es el caso de las semillas de orquídeas que, debido a su pequeño tamaño, contienen muy pocas reservas alimenticias que hacen improbable su supervivencia in vivo (Huamanyauri, s. f.).

Etapa de multiplicación: esta es la etapa más importante del proceso de micropropagación, es cuando se realiza la verdadera propagación de la especie a estudiar, ya que en ella no sólo comienza la mayor producción de propágulos a partir de los explantes sembrados "in vitro" sino se define su calidad genética por ser esta fase en la que se pueden producir las variantes somaclonales (Pérez Ponce, 1998).

La proliferación de los explantes en el cultivo "in vitro" puede lograrse al utilizar sustancias reguladoras de crecimiento como son las citocininas, auxinas, giberelinas y otros reguladores de crecimiento (Villalobos y Rosell, 1990; Pérez Ponce, 1998).

Etapa de enraizamiento: el proceso de enraizamiento es fundamental para la supervivencia de las plantas generadas "in vitro". Esto le permitirá a la planta una mejor adaptación al ser transferida al suelo (Barba y col., 2001).

Esta fase se caracteriza por ser la más voluminosa de todo el proceso, pues en ella cada brote, esqueje o yema que se ha formado durante la fase de multiplicación, debe ser cultivado y manipulado "in vitro", para que además de crecer y desarrollar un tallo con las primeras hojas, forme y desarrolle varias raíces que permitan iniciar la absorción de nutrientes, y al trasplantarse sobre un sustrato enriquecido pueda convertirse en una vitroplanta aclimatada lista para llevarse al campo (Villalobos y Rosell, 1990; Pérez Ponce, 1998).

Para lograr la mayor eficiencia biológica, económica y productiva, deben manejarse varios factores, entre los que podemos destacar: medios de cultivo, condiciones lumínicas, frascos de cultivo con dimensiones adecuadas para la especie y el riesgo de contaminación.

Etapa de aclimatación: la fase de aclimatación es trascendental para la propagación comercial, pues del resultado de esta, dependerá en gran medida la calidad final de las plantas y eficiencia total del proceso (Pérez Ponce, 1998) .

Durante el cultivo "in vitro", las plantas crecen en un ambiente con alta humedad relativa, baja intensidad luminosa, temperatura constante, escaso intercambio gaseoso y medios ricos en compuestos orgánicos, especialmente sacarosa. Estas condiciones provocan cambios en la morfología y la fisiología

de las plantas, que las hacen diferir de las que crecen en invernaderos o en el campo (Pérez Ponce, 1998) .

Las características más notables en las plantas cultivadas "in vitro" son que presentan tallos más delgados, menor cantidad de ceras cuticulares y epicuticulares, reducción de los tejidos mecánicos de soporte, mayor contenido de agua en las células, escasa capacidad fotosintética, estomas con baja funcionalidad y crecimiento heterótrofo o mixóforo, entre otras. Todos estos cambios provocan que una parte de las plantas micropropagadas no sobrevivan al trasplante a las condiciones ambientales, por esta razón es importante aplicar una aclimatación a dichas plantas para luego transferirlas a suelo, ya que las vitroplantas necesitan en primer lugar mejorar sus condiciones morfológicas para poder adaptarse más fácilmente a las condiciones naturales (Denng y Donnelly, 1993; Pérez Ponce, 1998) .

Clasificación del cultivo "in vitro"

Es importante destacar, que el cultivo "in vitro" de plantas ha sido clasificado según diversos criterios. Una de las clasificaciones más empleada, ha sido basada en el tipo de explante utilizado:

- a. Cultivo de plantas intactas: se coloca la semilla a germinar "in vitro", y se obtiene la plántula, a partir de la cual se selecciona el explante.
- b. Cultivo de embriones: se extrae el embrión de la semilla y se cultiva en forma aislada.
- c. Cultivo "in vitro" de un órgano aislado: se cultivan distintos órganos de las plantas, por ejemplo: meristemos, ápices, raíces, anteras u otros órganos.
- d. Cultivo de callo: consiste en cultivar una porción de tejido que se ha desdiferenciado, a la cual se le denomina callo.
- e. Cultivo de células aisladas: se cultivan células individuales, las cuales se obtienen de un tejido, de un callo o de cultivos en suspensión, con la ayuda de enzimas o mecánicamente.
- f. Cultivos de protoplastos: se cultiva el protoplasto de células obtenidos por digestión enzimática.

Ventajas y desventajas del cultivo "in vitro".

Entre las ventajas que presenta el cultivo "in vitro" de plantas, se puede señalar que la micropropagación es más rápida que la multiplicación "in vivo". En ocasiones, es posible propagar algunas especies "in vitro" que no pueden ser multiplicadas "in vivo".

En relación a sus ventajas económicas se puede decir que para la multiplicación "in vitro" no son necesarias grandes extensiones de terreno para cultivar (invernaderos), combustible para el transporte, etc, lo cual en un período posterior al establecimiento de la infraestructura necesaria para la aplicación de esta técnica, pueden constituir un ahorro; pero en cuanto a las técnicas y a la mano de obra, el ahorro no es tan significativo y hasta podría constituir un problema económico (Vargas Hernández, 1982; Pierik, 1990; Barba y col., 2001).

Además de las ventajas nombradas anteriormente, la micropropagación presenta algunas desventajas que es necesario señalar, como lo es que en ocasiones la estabilidad genética de la propagación "in vitro" puede ser débil, por el efecto de agentes externos. Por otro lado, para las plantas leñosas, la producción de raíces es un proceso complejo, y para algunas especies herbáceas, las raíces formadas pueden resultar no funcionales. Adicionalmente, no todas las especies responden igual al cultivo "in vitro", ya que cada especie requiere métodos particulares de cultivo (Pierik, 1990; Barba y col., 2001).

Antecedentes.

Angeloni y col en 1992, regeneraron plantas a partir de explantes de hojas de *Centrosema brasiliianum* cultivados "in vitro". En una primera, se obtuvo formación de callos y brotes utilizando medio de Murashige y Skoog (1962). La regeneración de retoños múltiples fue lograda transfiriendo los callos hacia medios frescos, que contenían NAA y BAP. Los brotes formaron raíces al ser transferidos a medios de Murashige y Skoog (1962) con NAA, y posteriormente las plántulas fueron transferidas exitosamente al suelo.

Arenas y col. 1998, trabajaron en la regeneración de plántulas de *Turbínícarpus pseudopectinatus* (0.5-1 cm altura) obtenidas in vitro se utilizaron ápices y bases que fueron sembradas asépticamente en medio de inducción MS (1962), por 45 días, con BA en las siguientes concentraciones 0, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 mg/l y ANA 0, 0.01, 0.1 y 0.5 mg/l; donde fueron sembrados 20 explantes por tratamiento e incubados a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de. 16 h. Los primeros cambios en los explantes(callos, crecimiento del tejido) se observaron en un período de 15 a 25 días. Al término de 3 meses, la mejor respuesta de organogénesis directa se encontró asociada a la inducción con BA en una concentración de 2 mg/l en ausencia de ANA, y el mejor tratamiento de enraizamiento se logró con ANA a una concentración de 0.01 mg/l. El logro

de la regeneración "in vitro" de especies escasas en la naturaleza resulta cada vez más, una urgente necesidad ante la pérdida de poblaciones silvestres.

Dewan y col.(1992) al trabajar con *Acacia nilotica* subsp. *indica* Brennan.; obtuvieron múltiples brotes, de los explantes de esta especie, los cuales se formaron en el medio B₅ establecido por Gamborg y col. (1968), el cual estaba suplementado con citocininas como el BAP, Dimetilalanina-amino-purina, kinetina o zeatina. De las cuatro citocininas, el BAP fue el que aportó el máximo de diferenciación en la multiplicidad del brote; donde el promedio más alto en relación al número de brotes fue de 6.3 brotes por explante. En cuanto a la etapa de enraizamiento, se formaron retoños individuales cuando se transfirió a un medio con ácido indolacético; donde se aumentó la producción de raíces. Luego de obtener un tamaño adecuado, las plántulas se transfirieron al suelo.

En los trabajos realizados por Mroginski y col., en 2002 con *Arachis correntina*, que es una leguminosa perenne que vive en suelos arenosos profundos del Noroeste de la provincia de Corrientes, en Argentina, y es considerada una especie de interés forrajero. Esta investigación desarrolló un procedimiento que permitió la regeneración "in vitro" de plantas, donde se cultivaron secciones de folíolos y pecíolos de la primera hoja desplegada, utilizando como medio base el de Murashige y Skoog (1962) suplementado con

0,01; 0,1; 1; 3 y 6 mg/l de thidiazurón. Los resultados indican que varios de los medios de cultivo probados permitieron la obtención de callos y yemas, destacándose el medio con 1 mg/l de TDZ, como el óptimo cuando los explantes provenían de porciones de folíolos, y los medios con 1 y 6 mg/l de TDZ, cuando se cultivaron pecíolos. En la actualidad se conducen experimentos que permitan lograr el enraizamiento de las plantulas obtenidas.

Justificación de la investigación.

En la actualidad, se realizan diversos trabajos en multiplicación "in vitro" en distintas especies de leguminosas. Esta técnica se ha utilizado ampliamente en la propagación de plantas para alimentación de ganado, uso comercial y medicinal, entre otros, permitiendo así una multiplicación a gran escala, lo que ha facilitado la comercialización de las mismas.

Debido a que la propagación de algunas leguminosas en el campo resulta un proceso complejo, diversos investigadores han realizado trabajos en los cuales aplicaron la técnica de cultivo de plantas "in vitro", como una alternativa apropiada para su propagación. Dentro del marco de la investigación propuesta, se seleccionó la especie: *Centrosema venosum* Benth., para ser propagada "in vitro" por ser una especie que presenta una alternativa de gran

valor económico y para la biodiversidad en sistemas de sabanas como las del Estado Guárico, ya que puede ser utilizada eficientemente por el entorno socioeconómico de este ecosistema, para diversos fines, como son: alimentación animal y la mejora de la calidad del suelo (Trujillo, 2001).

III. OBJETIVO GENERAL

Determinar la metodología más eficiente para la propagación "in vitro" de *Centrosema venosum* Benth.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.- Optimizar la técnica de germinación a fin de mejorar la recolección del material a estudiar.
- 2.- Establecer un sistema de micropropagación eficiente para la multiplicación clonal de esta especie.
- 3.- Establecer las concentraciones de los reguladores de crecimiento y las condiciones adecuadas para las etapas de micropropagación de esta especie.

IV. PROBLEMA

El cultivo de plantas "in vitro" requiere utilizar diferentes combinaciones de concentraciones de reguladores de crecimiento y condiciones específicas para cada caso particular, por lo que el problema de esta investigación sería ¿Cuál será la concentración óptima de reguladores de crecimiento y las condiciones necesarias para la propagación "in vitro" de *Centrosema venosum* Benth.?

V. TIPO DE INVESTIGACIÓN

El tipo de investigación utilizado para realizar este trabajo es experimental.

VI. HIPÓTESIS

Si se utilizan diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento y diferentes condiciones de cultivo en la propagación "in vitro" de *Centrosema venosum* Benth., se podrán determinar las condiciones más apropiadas para su multiplicación a gran escala.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS.

1. RECOLECCIÓN Y OPTIMIZACIÓN DEL MATERIAL A PROPAGAR (Especie: *Centrosema venosum* Benth.).

Las semillas utilizadas para esta experiencia fueron donadas por el Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas-INIA, de Valle de la Pascua. Las semillas fueron germinadas "in vivo" e "in vitro". Para ello se realizaron los siguientes procedimientos.

1.1 Germinación "in vivo":

- a. **Germinación:** las semillas de *Centrosema venosum* Benth. se colocaron en un envase con tierra abonada y se dejaron por un período de quince (15) días hasta que las plántulas alcanzaron una altura de 15 cm aproximadamente, para luego realizar el proceso de desinfección de los explantes a utilizar.
- b. **Desinfección de los explantes:** los explantes se sometieron inicialmente a un lavado con una solución jabonosa (50% v/v) agitando en una plancha magnética durante cinco (5) minutos, y posteriormente se hicieron tres (3) lavados con agua destilada. Luego

los explantes fueron desinfectados con una solución de povidine (50% v/v) agitando igualmente en una plancha magnética por un período de cinco (5) minutos, seguido de tres (3) lavados consecutivos con agua destilada. Posteriormente, los explantes se colocaron en una solución de cloro comercial (70% v/v), donde fueron agitados en una plancha magnética por diez (10) minutos. Posteriormente, se llevaron a una cámara de flujo laminar donde se procedió a realizar el corte de los explantes para su posterior siembra en condiciones "in vitro".

1.2 Germinación "in vitro":

- a. Desinfección:** las semillas fueron sometidas inicialmente a un lavado con una solución jabonosa (50% v/v), agitando en una plancha magnética durante cinco (5) minutos. Se realizaron tres (3) lavados sucesivos con agua destilada. Luego fueron desinfectados con una solución de povidine (50% v/v) agitando igualmente en una plancha magnética por un período de cinco (5) minutos, con tres (3) lavados consecutivos con agua destilada. Luego fueron colocados en una solución de cloro comercial (70% v/v) y se agitaron igualmente en una plancha magnética por diez (10) minutos. Posteriormente, se llevaron a una cámara de flujo laminar donde se procedió a realizar la siembra de las semillas.

b. Germinación: las semillas fueron colocadas en la cámara de flujo laminar y lavadas con agua destilada estéril, luego se colocaron las semillas en Activol por 24 horas, y posteriormente se colocaron en los medios de germinación en un medio al 50% de concentración de sales de Murashige y Skoog (1962) y sacarosa (30 gr/ml). Luego de un período de quince (15) días se procedió a realizar el proceso de iniciación.

2. PROPAGACIÓN "IN VITRO" DE LA ESPECIE *Centrosema venosum* Benth.

2.1 **Iniciación:** en esta etapa se seleccionaron explantes provenientes del material germinado "in vivo" e "in vitro". Se utilizaron los entrenudos y los brotes de la planta como explantes. Los explantes fueron colocados en medios de cultivos preparados con sales Murashige y Skoog (1962) al 100% de su concentración (**Anexo 1**), suplementados con vitaminas como la tiamina (0,1 mg/l), el mioinositol (100 mg/l) y el ácido nicotínico (0,5 mg/l), sacarosa (30 gr/l) y agar (8 gr/l). Adicionalmente, el medio fue suplementado con Acido Indolbutírico (IBA) y Bencilaminopurina (BAP) en diferentes concentraciones (**Anexo 2**). EL pH del medio se ajustó a 5.8 con una solución básica (NaOH 1N) o una solución ácida

(HCl 1N) posteriormente los medios fueron servidos en tubos pirex de 15 cm de largo y 2 cm de diámetro, en alícuotas de 25 ml. Posteriormente, los tubos fueron esterilizados en autoclave a una presión de 15 atm y a una temperatura de 121 °C durante 20min. Luego se tomaron los explantes seleccionados y se procedió a la siembra en condiciones asépticas en la cámara de flujo laminar. Se utilizaron 6 tratamientos y un grupo control, con 9 replicas cada uno.

2.2 **Multiplicación:** al observar respuestas morfológicas adecuadas se procedió con la siguiente etapa, los explantes fueron cambiados a un medio de multiplicación, para el cual se utilizaron cuatro tratamientos y un grupo control, utilizando como base sales de Murashige y Skoog (1962) al 100% de su concentración suplementado como fue indicado en la etapa anterior. En esta etapa se utilizaron diferentes agentes gelificantes, se eliminó el IBA y se implementó diferentes concentraciones de BAP (**Anexo 3**). Se utilizaron 9 replicas para cada tratamiento.

2.3 **Enraizamiento:** posteriormente, se procedió al enraizamiento de las plántulas obtenidas "in vitro". Para esta etapa se utilizó un medio base con sales Murashige y Skoog (1962) al 100% y suplementado con IBA

(0.5 mg/l) y un grupo control sin ningún regulador de crecimiento, con 9 réplicas cada uno.

La fase de iniciación, multiplicación y enraizamiento de esta especie se llevó a cabo en el laboratorio de Biotecnología Agrícola del IDECYT (Instituto de Estudios Científicos y Tecnológicos) con condiciones de temperatura de 26 °C e intensidad lumínica de $50 \mu\text{E}/\text{m}^2 \cdot \text{seg}^{-1}$ respectivamente (**Fig. 1**).

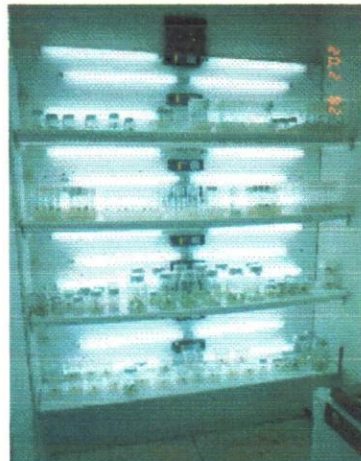


Figura 1: Cámara de crecimiento donde se cultivaron los explantes.

3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los análisis estadísticos realizados a los resultados obtenidos en esta investigación fueron análisis de varianza ANOVA y estadística descriptiva utilizando el programa SPSS versión 11.0, para obtener gráficos del tipo Boxplot.

VIII. DISCUSIÓN Y RESULTADOS

1. GERMINACIÓN:

La germinación de semillas de *Centrosema venosum* en tierra abonada trajo como consecuencia un alto porcentaje de contaminación de los explantes en el proceso de iniciación a la micropropagación de esta especie. Adicionalmente, al aplicarle el tratamiento de desinfección a los explantes se observó que sufrían daño a nivel del tallo. Por lo contrario, al germinar las semillas en un medio con 50% de las sales de Murashige y Skoog (1962), la desinfección previa de estas, permitió minimizar la contaminación por hongos y bacterias y los explantes a utilizar, se desarrollaron con mayor rapidez y mayor vigor (**Fig. 2**).

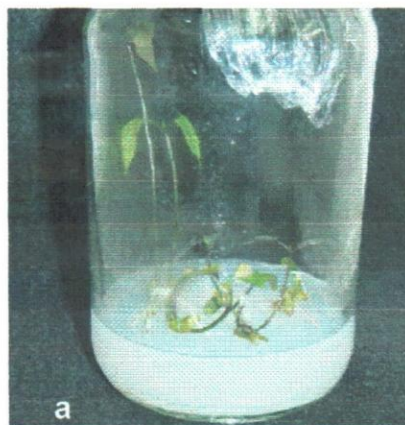


Figura 2: Germinación "in vitro" de semillas de *Centrosema venosum* Benth.

El objetivo fundamental de la germinación de semillas "in vitro" fue la obtención de material vegetal en condiciones óptimas para su posterior utilización en el cultivo "in vitro" de esta especie.

2. INICIACIÓN:

Para esta etapa de la experimentación se utilizaron explantes provenientes de semillas germinadas "in vivo" y semillas germinadas "in vitro". Los explantes provenientes de las semillas germinadas "in vivo" presentaron un porcentaje de contaminación del 80% por esta razón se optó por utilizar los explantes seleccionados de las plántulas obtenidas de la germinación "in vitro". Los explantes obtenidos a través del proceso de germinación "in vitro" se colocaron en el medio de Murashige y Skoog (1962) al 100% de su concentración, suplementado con vitaminas: tiamina (0,1 mg/l), mioinositol (100 mg/l), ácido nicotínico (0,5 mg/l), agar (8 gr/l) y sacarosa (30 gr/l), con diferentes combinaciones de concentraciones de Bencilaminopurina (BAP) y Ácido Indolbutírico (IBA) (**Anexo 2**).

En la Tabla 1, se pueden observar los resultados obtenidos a los 30 días de haber iniciado el cultivo, donde los explantes comienzan con la producción de callos. En esta etapa, los explantes comienzan a presentar formación de callos, los cuales posteriormente permitieron la formación de los brotes.

Posteriormente, en un período de 120 días, los explantes colocados en los tratamientos C (2,5 mg/l de BAP y 0,1 mg/l de IBA) y D (1,5 mg/l de BAP y 0,05 mg/l de IBA) presentan producción de hojas mientras que el resto de los tratamientos sólo producen callos, esto se debe a que las combinaciones de las concentraciones de los reguladores de crecimiento que se implementó fueron las más favorables para que la especie desarrollara los callos y los brotes necesarios para iniciar el proceso de micropropagación. Es importante resaltar que los mejores resultados se obtuvieron al utilizar, como explante, los brotes que se encuentran en las yemas de iniciación (**Tablas 1, 2 y Fig. 3 y 4**).

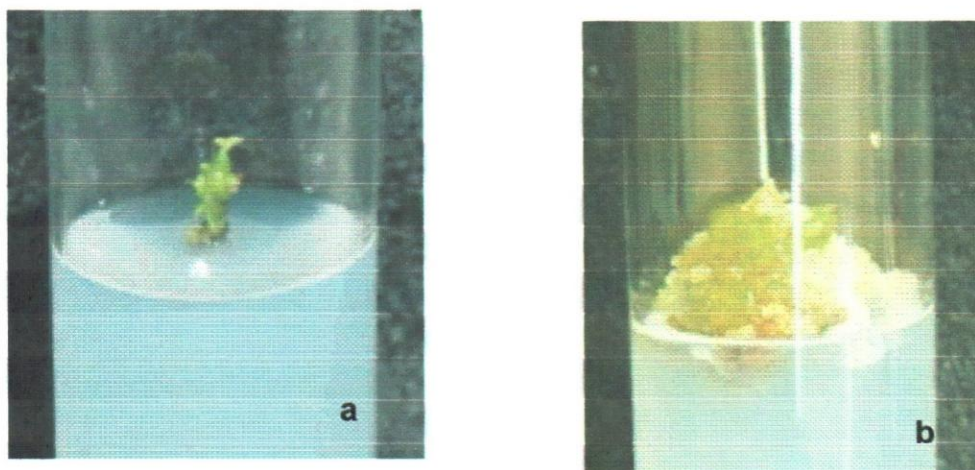


Figura 3: Etapa de iniciación de *Centrosema venosum* Benth. **a.** Detalle de pequeño callo con brotes en el explante, **b.** Detalle del explante con callos y brotes.

Tabla 1: Etapa de iniciación de *Centrosema venosum* Benth (30 días de cultivo).

Tratamiento	Presencia de callos	Observaciones
A (1,5 mg/l BAP y 0,1 mg/l IBA)	+	Los explantes comienzan a producir callos y brotes.
B (2,0 mg/l BAP y 0,1 mg/l IBA)	++	Los explantes presentan callos y brotes en grandes cantidades.
C (2,5 mg/l BAP y 0,1 mg/l IBA)	+	Los explantes comienzan a producir callos y brotes.
D (1,5 mg/l BAP y 0,05 mg/l IBA)	++	Los explantes presentan callos y brotes en grandes cantidades.
E (2,0 mg/l BAP y 0,05 mg/l IBA)	-	Los explantes presentan pocos callos y aún no presentan brotes.
F (2,5 mg/l BAP y 0,05 mg/l IBA)	+	Los explantes comienzan a producir callos y brotes.
CONTROL	-	No existe formación de brotes.

Leyenda:

+++ Callo abundante.

++ Callo intermedio.

+ Poco callo.

- Ausencia.

Tabla 2: Etapa de iniciación de *Centrosema venosum* Benth (120 días de cultivo).

Tratamiento	Presencia de callos	Nº de Brotes	Explantos muertos	Observaciones
A (1,5 mg/l BAP y 0,1 mg/l IBA)	++	4	1	Un 30% de los explantes presentan callos verdes y marrón, un 20% de los explantes presentan tallo y numerosas hojas.
B (2,0 mg/l BAP y 0,1 mg/l IBA)	++	4	0	Solo el 10% de los explantes presentan callos verdes.
C (2,5 mg/l BAP y 0,1 mg/l IBA)	+	2	0	Un 20% de los explantes presentan tallo y numerosas hojas.
D (1,5 mg/l BAP y 0,05 mg/l IBA)	++	10	0	Un 70% de los explantes presentan callos verdes, un 80% presentan brotes.
E (2,0 mg/l BAP y 0,05 mg/l IBA)	++	3	0	Un 30% de los explantes presentan brotes, un 40% de los explantes presentan callos.
F (2,5 mg/l BAP y 0,05 mg/l IBA)	+	3	0	Un 30% de los explantes presentan brotes, un 10% de los explantes presentan callos.
CONTROL	-	0	0	No existe presencia de callos y de brotes.

Leyenda:

+++ Callo abundante.

++ Callo intermedio.

+ Poco callo.

- Ausencia.

Figura 4: Número de brotes de la etapa de iniciación de *Centrosema venosum* Benth a los 120 días de la inoculación de los explantes.

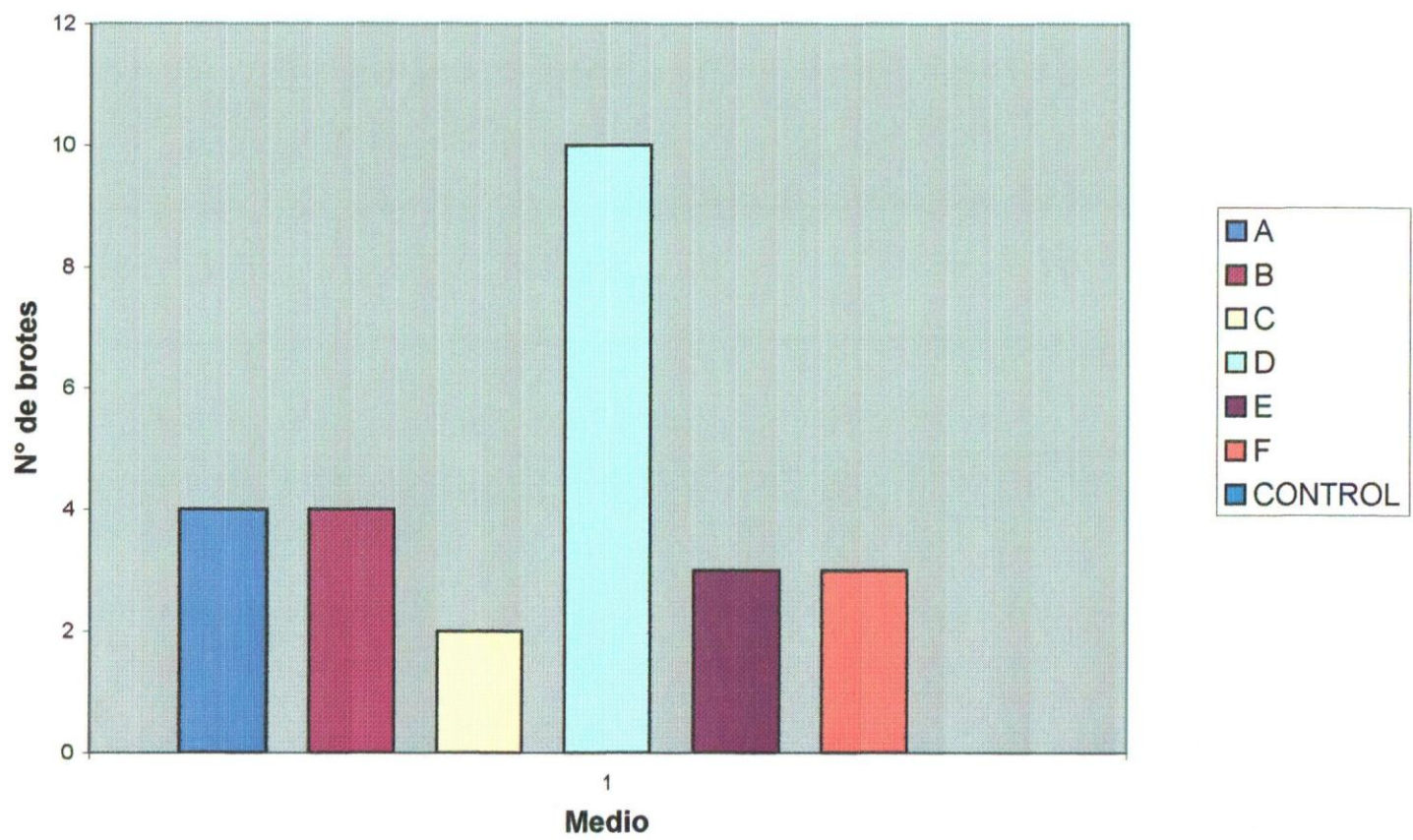
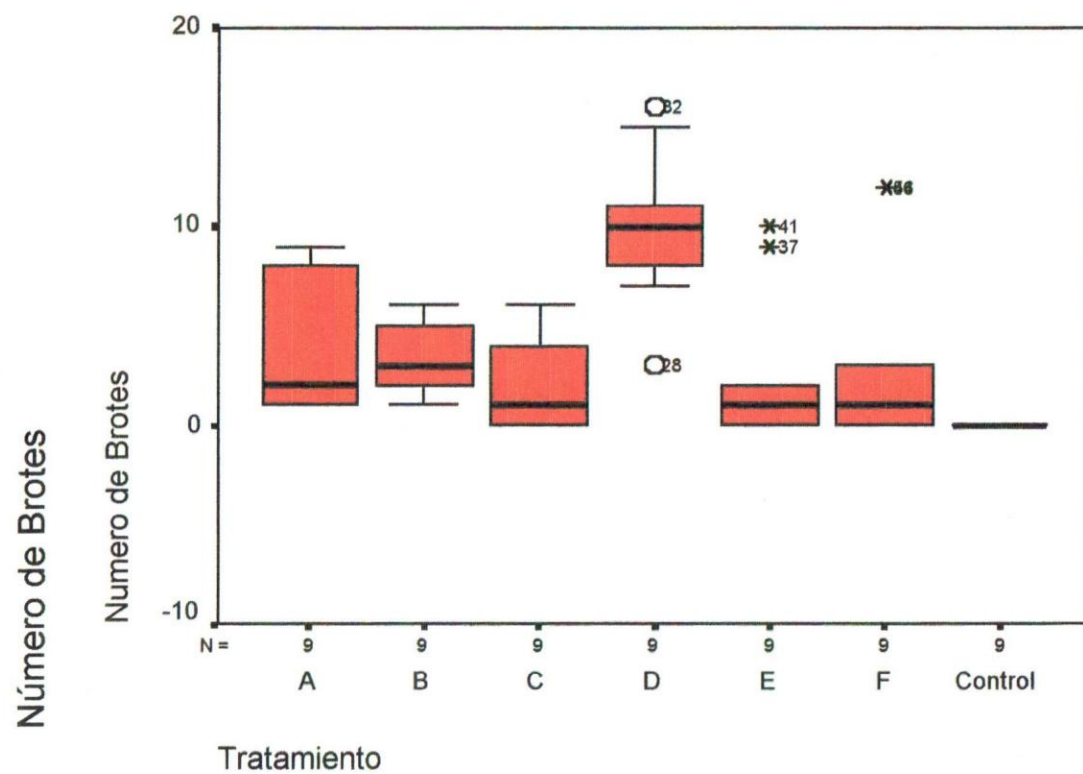


Figura 5: Diferencias del número de brotes entre tratamientos en la etapa de iniciación de *Centosema venosum* Benth. analizado por el programa SPSS versión 11.0 en gráfico del tipo Boxplot.



La efectividad de cada uno de los tratamientos se pudo determinar utilizando un análisis de varianza (**Anexo 4, Figura 5**), el cual permitía comparar el número promedio de brotes para cada tratamiento, a fin de dilucidar cuál de los seis medios es el más apropiado para lograr un período de iniciación exitoso en el cultivo "in vitro" de esta especie.

En la figura 5 podemos observar que el tratamiento D presenta una diferencia con respecto al resto de los tratamientos. Al observar los valores promedios obtenidos para cada tratamiento, se puede decir que el tratamiento D resulta ser más efectivo en relación a los otros tratamientos. Sin embargo, para establecer si estos resultados son estadísticamente significativos, se procedió a aplicar un análisis de varianza. El resultado de estos análisis indica que, con un nivel de riesgo del 5%, el promedio obtenido con el medio D es significativamente diferente a los promedios obtenidos por los medios A, B, C, E y F (**Anexo 4**).

Al comparar los resultados de este trabajo con el realizado por Tonatiuh Arenas y col. (1998) en tallos de la especie *Turbinicarpus pseudopectinatus*, se puede observar que la concentración más apropiada de BAP en la etapa de iniciación es de 2 mg/l. En otro trabajo realizado por Angeloni y col (1992) al trabajar con *Centrosema brasiliianum*, se determinó

que el medio óptimo para la propagación de esta especie fue el medio MS, con concentraciones de reguladores de crecimiento de 0,1 mg/l de NAA y 1 mg/l de BAP. Xie y Hong (2001) trabajando con *Acacia mangium* utilizaron combinaciones de reguladores de crecimiento, TDZ (1-2 mg/l) y de IAA (0,25-2mg/l), resultando que la concentración más efectiva fue de 2 mg/l de TDZ y 0,25 mg/l de IAA.

Los resultados obtenidos en esta investigación indican que la concentración de BAP adecuada para la etapa de iniciación en *Centrosema venosum* Benth es de 1,5 mg/l. Los diferentes resultados obtenidos en las investigaciones mencionadas anteriormente, demuestran que el estudio de la propagación "in vitro" de cada especie, debe ser realizado analizando minuciosamente todos los factores que pueden intervenir en la misma, ya que cada especie tiene demandas diferentes en su proceso de micropropagación.

En la etapa de iniciación, se puede observar que las hormonas juegan un papel importante en la inducción de callos y brotes. Una de las hormonas encargadas de este proceso de inducción son las citocininas, las cuales son derivados de la adenina, y entre sus principales efectos sobre las plantas destacan: la activación de la división celular, la formación de yemas en hojas separadas de la planta, y la inducción de iniciación del crecimiento en los tallos

y ramas, rompimiento del letargo de yemas y semillas en muchas especies (Curtis y Raven, 1985), lo cual pudo observarse en algunas de los tratamientos empleados en esta investigación.

Otro tipo de hormona que juega un papel importante en esta etapa son las auxinas (IBA), ya que las mismas al ser usadas paralelamente a las citocininas pueden estimular o suprimir la embriogenesis "in vitro" (Curtis y Raven, 1985; Augé, 1995).

3. MULTIPLICACIÓN:

Para esta fase, se utilizaron 4 tratamientos donde se eliminó la concentración de auxinas (IBA) y se modificaron las concentraciones de citocininas (BAP) y de los agentes gelificantes (**Anexo 3**).

En la Tabla 3, se muestran los resultados obtenidos a los 30 días de su inoculación en los medios de multiplicación, donde se puede observar elongamiento del tallo, un aumento en la producción de los brotes y éstos presentan producción de hojas. Los callos de algunos explantes presentan diferente coloración: verde y marrón, donde solo los callos verdes son los que van a permitir la formación de nuevos brotes. Los resultados indican que los

mejores tratamientos para esta etapa son el A (3,0 mg/l BAP y 8 gr de agar) y el D (3,5 mg/l BAP y 3 gr de phytigel) con un promedio de 16 y 13 brotes respectivamente (Tabla 3, Fig. 6a, 6b y 7).

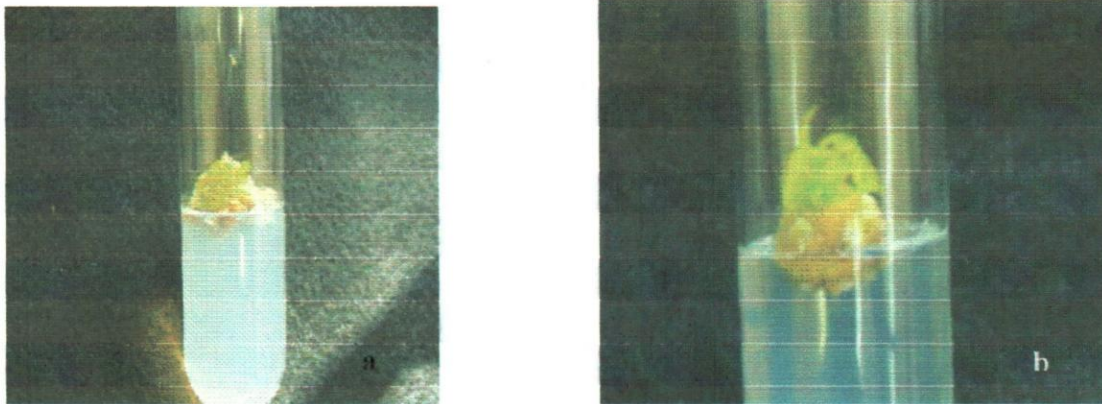


Figura 6: Etapa de multiplicación de *Centrosema venosum* Benth. **a** Detalle de brotes y callos en el explante, **b** Detalle de un brote con hojas y callos en el explante.

Tabla 3: Etapa de multiplicación de *Centrosema venosum* Benth.

Tratamiento	Presencia de callos	Nº de Brotes	Explantos muertos	Observaciones
A (3,0 mg/l BAP y 8 g/l agar)	+++	16	0	El 33% de los explantes presentan sólo callos con numerosos brotes y hojas.
B (3,0 mg/l BAP y 3 g/l phytigel)	+++	4	0	El 78% de los explantes presentan sólo callos con pocos brotes.
C (3,5 mg/l BAP y 8 g/l agar)	+++	3	1	El 44% de los explantes presentan sólo callos con pocos brotes.
D (3,5 mg/l BAP y 3 g/l phytigel)	+++	13	0	El 44% de los explantes presentan sólo callos con numerosos brotes.
CONTROL	-	0	0	No existe presencia de brotes y callos.

Leyenda:

+++ Callo abundante.

++ Callo intermedio.

+ Poco callo.

- Ausencia.

Figura 7: Número de brotes de la etapa de multiplicación de *Centrosema venosum* Benth a los 30 días del inicio de esta etapa.

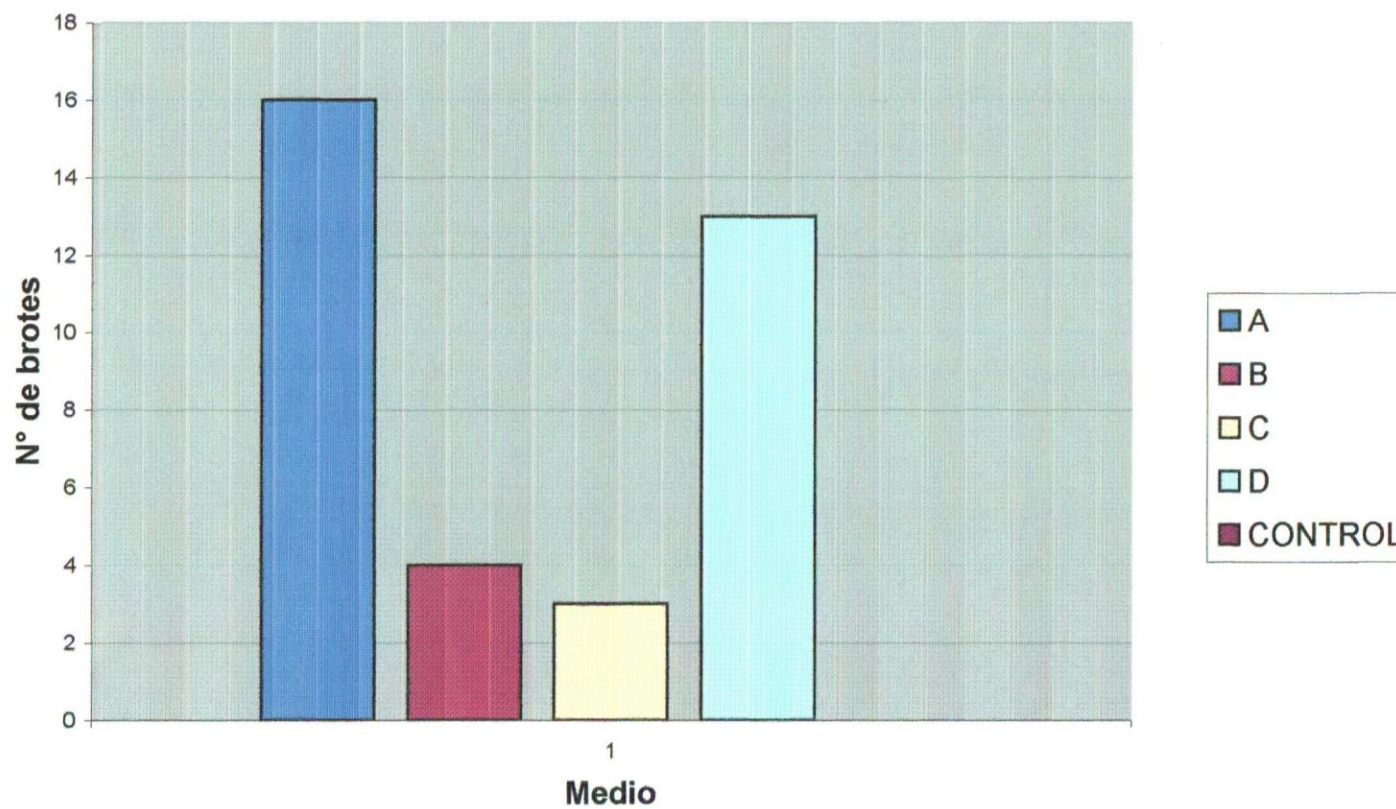
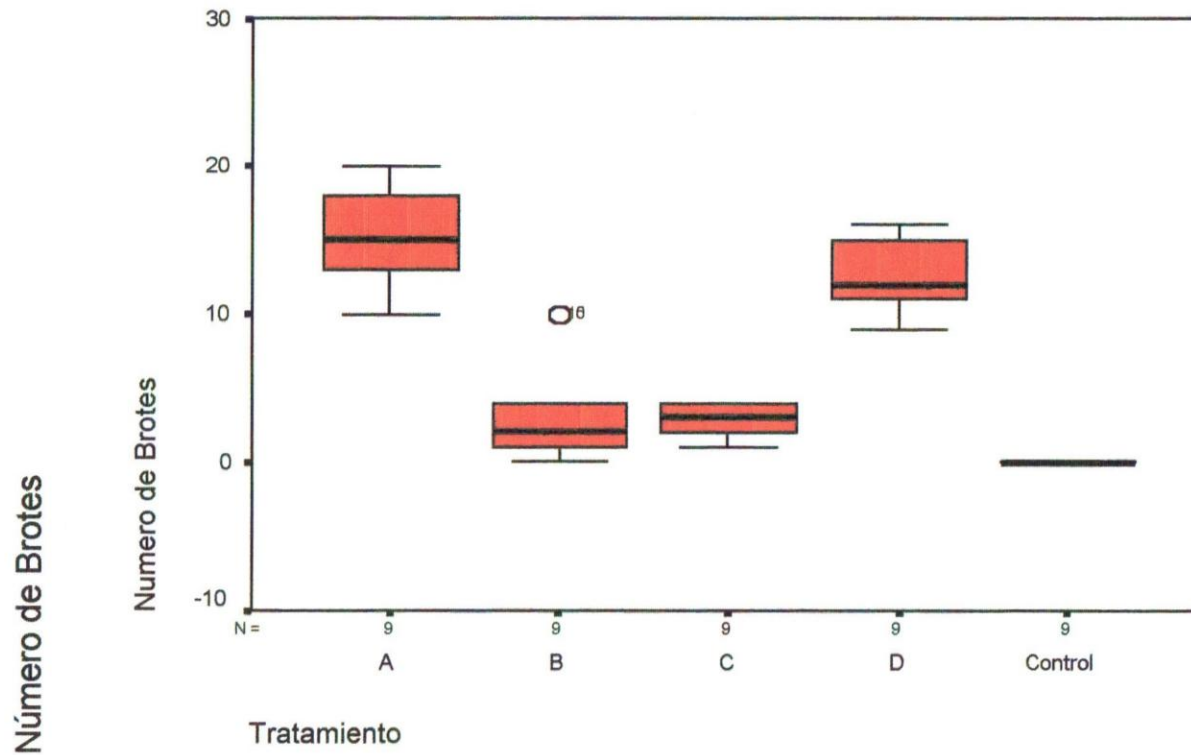


Figura 8: Diferencias del número de brotes entre tratamientos en la etapa de multiplicación de *Centosema venosum* Benth. analizado por el programa SPSS versión 11.0 en gráfico del tipo Boxplot.



En la etapa de multiplicación de esta investigación se utilizaron dos agentes gelificantes: el agar y el phytigel con el objeto de determinar cual de los dos agentes favorecía en mayor porcentaje el desarrollo de los brotes y evitando un proceso de vitrificación de éstos, y por lo tanto, generando plántulas con mayor vigor. Esto se debe a que el agar no permite la absorción de gran cantidad de agua, evitando que el callo se transforme en un callo frágil y permitiendo que la plántula desarrolle mejores brotes, sin embargo, el phytigel permite la ganancia de peso debido a la absorción de agua por parte de la plántula, pero por otro lado en algunos casos los explantes desarrollados en phytigel presentan mayores casos de vitrificación, ya que este medio permite una mayor absorción de agua por el explante (Pérez Ponce, 1998).

Los resultados indican que no existen diferencias significativas en relación al agente gelificante utilizado, ya que los medios que arrojaron mejores resultados, como fueron el A y el D, donde se utilizó agar y phytigel respectivamente, presentaron un número de brotes similar. Sin embargo, las características morfológicas de los brotes en el medio A eran más uniformes y de mayor vigor, lo que podría indicar que el agente gelificante más indicado para la multiplicación de esta especie es el agar.

En esta etapa se observa que los tratamientos A (3 mg/l de BAP y 8 gr/l de agar) y D (3,5 mg/l de BAP y 3 gr/l de phytigel) presentan altos valores

promedios, en cuanto al número de brotes. Debido a esto, fue necesario aplicar un análisis de varianza para verificar si existen diferencias significativas entre los resultados obtenidos para estos tratamientos, y a su vez entre estos dos y el resto de los tratamientos (**Anexo 4 y figura 8**). Luego de analizar los resultados del análisis de varianza, se observa que con un nivel de riesgo del 5%, los promedios de los tratamientos A y D son significativamente superiores a los obtenidos por los medios B (3 mg/l de BAP y 3 gr/l de phytigel) y C (3,5 mg/l de BAP y 8 gr/l de agar). Entre los medios A y D no existen diferencias significativas, es decir, aunque en valores absolutos sus promedios son diferentes (16 contra 13), estadísticamente esa diferencia no es significativa, esto con un nivel de riesgo del 5%. Los dos puntos anteriores nos llevan a concluir que se obtuvieron resultados similares en los medios A y D, lo cuales a su vez fueron superiores a los obtenidos en B y C. En la figura 8 podemos observar gráficamente como es la diferencia entre los tratamientos.

En el trabajo realizado por Reddy y col. (1995) en *Acacia holocersia* se obtuvo que el tratamiento más efectivo, fue el medio MS suplementado con 5 mg/l de BAP. En los trabajos realizados por Forlin y col. (2001), al regenerar *Desmanthus virgatu*, a través de anteras, se observó que la concentración de BAP que produjo mayor cantidad de brotes fue de 3 mg/l. Vengadesan y col. (2000) al trabajar con explantes de *Acacia sinuata* obtuvieron en sus

resultados que 2,97 mg/l de BAP y 0,77 mg/l de IAA eran las mejores concentraciones de los reguladores de crecimiento para la micropropagación de esta especie, y si se le adicionaba una concentración de 0.39 mg/l de GA favorecía la elongación de los brotes. En trabajos realizados en *Stylosanthes biflora* por Torres y col (1986), se observó que la mejor combinación de reguladores de crecimiento para la etapa de multiplicación de esta leguminosa fue de 5 mg/l de NAA y 1mg/l BAP.

En los trabajos mencionados anteriormente se puede observar que las citocininas juegan un papel muy importante en esta etapa ya que la presencia de concentraciones elevadas de reguladores de crecimiento como las citocininas (BAP) favorece el desarrollo de brotes (Serrano y Piñol, 1991).

4. ENRAIZAMIENTO:

En esta etapa se utilizó un medio basado en sales de Murashige y Skoog (1962) al 100% suplementado con 0,5 mg/l de IBA y un grupo control.

En la Tabla 4, se puede observar que a los 15 días de inoculado los explantes en el medio de enraizamiento se presenta la iniciación del proceso de aparición de raíces, mientras que los explantes que se encuentran en el medio

control sin reguladores de crecimiento, no presentan formación de raíces. Estos resultados pueden explicarse basándose en que las auxinas son reguladores de crecimiento que actúan en la inducción del enraizamiento en plantas, y el medio que no tiene dichos reguladores de crecimiento no favorece el proceso mencionado anteriormente (Serrano y Piñol, 1991).

Tabla 4: Etapa de enraizamiento en plántulas de *Centrosema venosum* Benth.

Tratamiento	Explantos con raíces	Observaciones
IBA (0,5 mg/l)	++	Comienzan a salir las raíces.
Control	-	Se ha producido elongamiento del tallo.

Leyenda:

- +++ Raíces abundante.
- ++ Raíces intermedio.
- + Pocas raíces.
- Ausencia.

Adicionalmente se pudo observar que las plántulas que fueron inoculadas en el tratamiento control (sin reguladores de crecimiento) presentaron una elongación del tallo más marcada que las plántulas inoculadas en el tratamiento con IBA, lo cual puede tener explicación en que en las plántulas al no estar sometidas a estimulaciones con concentraciones exógenas de citocininas, se ve favorecido el proceso de elongación de los tallos por concentraciones endógenas de auxinas.

Las auxinas intervienen en numerosos fenómenos fisiológicos y su acción depende de la concentración y la interacción con otros reguladores de crecimiento. En estudios realizados con las auxinas se pueden identificar que existen numerosos efectos fisiológicos que producen en las plantas, uno de ellos es que actúan en la formación de las raíces; en concentraciones muy pequeñas, pueden estimular el crecimiento de las raíces, el cual se pudo observar en los resultados de este trabajo. No obstante, las auxinas en concentraciones elevadas, inhiben claramente el crecimiento de las raíces adventicias, pero promueven la formación de nuevas raíces secundarias (Curtis y Raven, 1985; Augé y col., 1995).

En trabajos realizados por Vengadesan (2000) con explantes de hipocótilos de *Acacia sinuata*, se determinó que la concentración más

efectiva para enraizar dicha especie fue de 1.66 mg/l de IBA. Reddy y col (1995) trabajando en *Acacia holocersia* determinaron que la concentración óptima para el enraizamiento de dicha leguminosa fue de 0,05 mg/l de IBA. En investigaciones similares, Angeloni y col. (1992) al trabajar con *Centrosema brasiliianum* observaron que la concentración más efectiva para el enraizamiento de esta especie fue de 0,01 mg/l de NAA.

La etapa de aclimatación de las plántulas obtenidas "in vitro" no pudo culminarse debido a que las plantas presentaban tallos débiles, y raíces poco desarrolladas, y debido a que en la etapa de aclimatación las plantas son sometidas a condiciones no controladas entre las que podemos nombrar: se cultivan en ambientes pocos ventilados, tallos más delgados, menor cantidad de ceras cuticulares y epicuticulares, reducción del tejido mecánico de soporte, incremento del contenido de agua en las células, escasa capacidad fotosintética, estomas con baja funcionalidad y crecimiento heteróforo y mixóforo. Todos estos cambios provocan que una gran cantidad de plántulas no sobrevivan a la micropropagación ya que las condiciones ambientales como las temperaturas altas, la alta intensidad lumínica, los bajos valores de humedad, entre otros, afectan el desarrollo de las plantas en condiciones ambientales no controladas, por esta razón, en esta etapa se realiza un proceso de adaptación progresiva para permitir que la planta puede ser trasferida al suelo en

condiciones apropiadas (mayor vigor y desarrollo) asegurando su supervivencia en condiciones de campo.

X. CONCLUSIONES

1. Los resultados obtenidos en la etapa de germinación permiten concluir que la vía más efectiva para obtener explantes con mayor vigor de *Centrosema venosum* Benth. para el proceso de micropropagación es la germinación "in vitro", ya que las plantas germinadas "in vitro" no sufren daño y constituyen un material vegetal óptimo para el establecimiento de este proceso. Adicionalmente, este procedimiento evita el riesgo de contaminación por bacterias y hongos.
2. En la etapa de iniciación se puede concluir que el tratamiento D es el más efectivo para esta especie con una concentración de BAP 1,5 mg/l y de IBA 0.05 mg/l, donde se obtuvo un valor promedio de 10 brotes por explante, con un tiempo de generación para este número de brotes de 120 días.
3. En la etapa de multiplicación se puede concluir que los tratamientos más efectivos son el tratamiento A con 3 mg/l BAP y 8 gr/l de agar y el tratamiento D con 3,5 mg/l BAP y 3 gr/l phytigel los cuales presentaron un promedio de 16 y 13 brotes por explante respectivamente, donde el tiempo de generación de este número de brotes fue de 30 días. En

cuanto a los agentes gelificantes no hubo diferencias entre las plántulas propagadas con agar y con phytigel.

4. En la etapa de enraizamiento el medio más exitoso fue el suplementado con auxinas (0,5 mg/l IBA), generándose la formación de las raíces a los 15 días de haber iniciado esta etapa.

5. El proceso de micropropagación para esta especie reviste gran importancia, ya que su reproducción en ambientes naturales es muy baja. Esta tecnología permite regenerar un mayor número de plántulas para así poder obtener una rápida propagación de la especie, permitiendo así aprovechar una mayor cantidad de esta especie para el forraje y alimentación del ganado.

XI. RECOMENDACIONES

1. Es recomendable optimizar el tiempo establecido para la etapa de iniciación en la micropropagación de esta especie, ya que así el proceso de propagación "in vitro" permitirá incrementar la producción de esta leguminosa en un tiempo más corto.
2. Se recomienda utilizar otras alternativas para optimizar el enraizamiento de las plantas obtenidas "in vitro". Entre las alternativas a implementar, se puede recomendar: el uso de diversos medios de enraizamiento con combinación de diferentes reguladores de crecimiento (ácido indolacético (IAA) o el ácido naftalenacético (NAA), y diversas condiciones de cultivo (agente gelificante, concentraciones de sales, temperatura, intensidad lumínica).
3. Es importante realizar el proceso de aclimatación de las plantas de *Centrosema venosum* Benth obtenidas "in vitro", con el objeto de concluir la caracterización del proceso de micropropagación de esta especie.

ANEXO 1

COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE MURASHIGE Y SKOOG (1962).

Símbolos de las soluciones Stock	Constituyente
A	$(\text{NH}_4)\text{NO}_3$
B	KNO_3
C	H_3BO_3 KH_2PO_4 KI $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ $\text{CoCl} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
D	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
E	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
F	Na_2EDTA $\text{FeSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

ANEXO 2

CONCENTRACIONES DE REGULADORES DE CRECIMIENTO UTILIZADOS
EN LA ETAPA DE INICIACIÓN DEL PROCESO DE MICROPROPAGACIÓN
DE LA ESPECIE *Centrosema venosum* Benth.

Tratamientos	Concentraciones de BAP (mg/l)	Concentraciones de IBA (mg/l)
A	1,5	0,1
B	2,0	0,1
C	2,5	0,1
D	1,5	0,05
E	2,0	0,05
F	2,5	0,05
Control	—	—

ANEXO 3

CONCENTRACIONES DE REGULADORES DE CRECIMIENTO Y AGENTES GELIFICANTES UTILIZADOS EN LA ETAPA DE MULTIPLICACIÓN DEL PROCESO DE MICROPROPAGACIÓN DE LA ESPECIE *Centrosema venosum* Benth.

Tratamientos	Concentraciones de BAP (mg/l)	Agentes Gelificantes (gr/l)	
		Agar	Phytigel
A	3,0	8	—
B	3,0	—	3
C	3,5	8	—
D	3,5	—	3
Control	—	8	—
Control	—	—	3

ANEXO 4

ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA EVALUAR LA EFECTIVIDAD DE SEIS MEDIOS O TRATAMIENTOS EN LA ETAPA DE INICIACIÓN Y CUATRO MEDIOS O TRATAMIENTOS EN LA ETAPA DE MULTIPLICACIÓN

1.- Etapa de Iniciación.

1.1.- Análisis de los residuos

Previo al análisis de varianza es necesario verificar que se cumpla el supuesto de normalidad de los residuos; los residuos son los valores que se obtienen al restar el valor obtenido en cada réplica dentro de cada tratamiento del promedio por tratamiento.

Resultados de los cálculos estadísticos de los residuos de los tratamientos, incluyéndose un grupo control de la etapa de iniciación de *Centrosema venosum* Benth.

Tratamiento	Replica 1	Replica 2	Replica 3	Replica 4	Replica 5	Replica 6	Replica 7	Replica 8	Replica 9
A	4,00	-4,00	-4,00	8,00	-4,00	6,00	2,00	-4,00	-4,00
B	-3,33	0,67	3,67	2,67	-4,33	-4,33	-4,33	5,67	3,67
C	-2,22	-2,22	3,78	4,78	3,78	-2,22	-1,22	-2,22	-2,22
D	0,22	1,22	-1,78	2,22	-4,78	3,22	2,22	0,22	-2,78
E	3,22	-2,78	-2,78	6,22	5,22	-0,78	-2,78	-2,78	-2,78
F	8,67	-3,33	-3,33	-3,33	-3,33	-1,33	0,67	0,67	4,67
G	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Nota: G es el tratamiento control

Los residuos estandarizados se obtienen de la siguiente manera:

$$d_{ij} = \frac{y_{ij} - \bar{Y}_i}{DesvY_i}$$

Donde:

d_{ij} : es el residuo estandarizado correspondiente al i-ésimo medio con la replicación número j

$DesvY_i$: es la desviación típica o estándar del i-ésimo tratamiento

Resultados de los valores de los residuos estandarizados de los tratamientos de la etapa de iniciación de *Centrosema venosum* Benth.

Tratamiento	Replica 1	Replica 2	Replica 3	Replica 4	Replica 5	Replica 6	Replica 7	Replica 8	Replica 9
A	0,80	-0,80	-0,80	1,60	-0,80	1,20	0,40	-0,80	-0,80
B	-0,81	0,16	0,90	0,65	-1,06	-1,06	-1,06	1,38	0,90
C	-0,71	-0,71	1,21	1,53	1,21	-0,71	-0,39	-0,71	-0,71
D	0,08	0,46	-0,67	0,84	-1,81	1,22	0,84	0,08	-1,05
E	0,85	-0,73	-0,73	1,64	1,37	-0,20	-0,73	-0,73	-0,73
F	2,04	-0,79	-0,79	-0,79	-0,79	-0,31	0,16	0,16	1,10
G	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Al analizar el comportamiento de los residuos estandarizados se observa que la totalidad se encuentran entre los valores -3 y 3, por lo que no se observa ningún residuo inusitado, lo cual señala que no existen motivos para dudar que los residuos siguen una distribución normal.

1.2.- Análisis de varianza.

1.2.1.- Todos los medios entre sí.

El análisis de varianza como se señaló anteriormente, se utiliza para verificar que las diferentes medias o valores promedios obtenidos en los medios utilizados son significativamente diferentes entre sí, por lo cual, el medio que obtiene un mayor número de brotes promedios en realidad si es el óptimo para lograr una mayor propagación de la especie.

Por medio del uso del software SPSS, se aplica el ANOVA, obteniéndose los siguientes resultados:

Resultados del análisis de varianza de los tratamientos de la etapa de iniciación de *Centrosema venosum* Benth, a través del uso del software SPSS.

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	338,37	5	67,674	4,47	0,002
Within Groups	726,667	48	15,139		
Total	1065,037	53			

Al observar el valor de la significación obtenida para el conjunto de datos (0,002) se puede decir que, con un riesgo del 5%, existen diferencias significativas entre el número de brotes promedios obtenidos para cada uno de los medios.

A continuación, el análisis de varianza nos muestra el test en el que se comparan los tratamientos dos a dos, para analizar entre ellos cuando se presentan las diferencias significativas.

Test comparativo entre tratamientos de la etapa de iniciación de *Centrosema venosum* Benth.

(I) TRATAMIENTO	(J) TRATAMIENTO	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
-5,777	5,1104	-0,3333	1,8342	1		
	C	1,7778	1,8342	0,925	-3,6659	7,2215
	D	(*) -5,7778	1,8342	0,032	-11,2215	-0,3341
	E	1,2222	1,8342	0,985	-4,2215	6,6659
	F	0,6667	1,8342	0,999	-4,777	6,1104
B	A	0,3333	1,8342	1	-5,1104	5,777
	C	2,1111	1,8342	0,857	-3,3326	7,5548
	D	(*) -5,4444	1,8342	0,05	-10,8881	-7,57E-04
	E	1,5556	1,8342	0,957	-3,8881	6,9992
	F	1	1,8342	0,994	-4,4437	6,4437
C	A	-1,7778	1,8342	0,925	-7,2215	3,6659
	B	-2,1111	1,8342	0,857	-7,5548	3,3326
	D	(*) -7,5556	1,8342	0,002	-12,9992	-2,1119
	E	-0,5556	1,8342	1	-5,9992	4,8881
	F	-1,1111	1,8342	0,99	-6,5548	4,3326
D	A	(*) 5,7778	1,8342	0,032	0,3341	11,2215
	B	(*) 5,4444	1,8342	0,05	7,58E-04	10,8881
	C	(*) 7,5556	1,8342	0,002	2,1119	12,9992
	E	(*) 7	1,8342	0,005	1,5563	12,4437
	F	(*) 6,4444	1,8342	0,012	1,0008	11,8881
E	A	-1,2222	1,8342	0,985	-6,6659	4,2215
	B	-1,5556	1,8342	0,957	-6,9992	3,8881
	C	0,5556	1,8342	1	-4,8881	5,9992
	D	(*) -7	1,8342	0,005	-12,4437	-1,5563
	F	-0,5556	1,8342	1	-5,9992	4,8881
F	A	-0,6667	1,8342	0,999	-6,1104	4,777
	B	-1	1,8342	0,994	-6,4437	4,4437
	C	1,1111	1,8342	0,99	-4,3326	6,5548
	D	(*) -6,4444	1,8342	0,012	-11,8881	-1,0008
	E	0,5556	1,8342	1	-4,8881	5,9992

(*) The mean difference is significant at the 0.05 level.

Al analizar el test de diferencia significativa para cada uno de los medios con los otros cinco, se observa que de manera consistente el promedio del tratamiento D, es significativamente superior al promedio obtenido con los otros medios.

1.2.2.- Tratamientos A, B y C.

Por medio del uso del software SPSS, se aplica el ANOVA para comparar las medias obtenidas por los tratamientos A, B y C, obteniéndose los siguientes resultados:

Resultados del análisis de varianza de los tratamientos A, B y C de la etapa de iniciación de *Centrosema venosum* Benth

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	23,185	2	11,593	0,676	0,518
Within Groups	411,556	24	17,148		
Total	434,741	26			

En este caso el nivel de significación señala que, con un riesgo del 5% no existen diferencias significativas entre en número promedio de brotes obtenidos con estos tres medios (ya que el valor de la significación es mayor a 0,05).

1.2.3.- Tratamientos D, E y F.

Por medio del uso del software SPSS, se aplica el ANOVA para comparar las medias obtenidas por los tratamientos D, E y F, obteniéndose los siguientes resultados:

Resultados del análisis de varianza de los tratamientos D, E, y F de la etapa de iniciación de *Centrosema venosum* Benth

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	272,519	2	136,259	10,378	0,001
Within Groups	315,111	24	13,13		
Total	587,63	26			

En este caso, el nivel de significación (por ser menor que 0,05) nos indica que, con un riesgo de 5% si existen diferencias significativas entre el número de brotes promedios obtenidos con estos tres medios.

Para conocer el medio que genera la diferencia significativa, se aplica un ANOVA dos a dos, obteniéndose:

Test comparativo entre tratamientos de la etapa de iniciación de *Centrosema venosum* Benth .

(I) TRATAMIENTO	(J) TRATAMIENTO	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
D	E	(*) 7	1,7081	0,001	2,7343	11,2657
	F	(*) 6,4444	1,7081	0,003	2,1788	10,7101
E	D	(*) -7	1,7081	0,001	-11,2657	-2,7343
	F	-0,5556	1,7081	0,943	-4,8212	3,7101
F	D	(*) -6,4444	1,7081	0,003	-10,7101	-2,1788
	E	0,5556	1,7081	0,943	-3,7101	4,8212

(*) The mean difference is significant at the .05 level.

grupo control E que muestra residuos nulos:

Resultados de los cálculos estadísticos de los residuos de los tratamientos de la etapa de multiplicación de *Centrosema venosum* Benth.

Tratamiento	Replica 1	Replica 2	Replica 3	Replica 4	Replica 5	Replica 6	Replica 7	Replica 8	Replica 9
A	2,44	-0,56	2,44	-2,56	0,44	-1,56	0,44	-0,56	-0,56
B	-4,00	5,00	1,00	-4,00	0,00	-4,00	-4,00	6,00	4,00
C	-0,22	-2,22	-2,22	-2,22	1,78	7,78	-0,22	-0,22	-2,22
D	-1,56	-0,56	5,44	-0,56	2,44	0,44	-0,56	-1,56	-3,56
E	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Nota: El tratamiento E lo constituye el grupo control

Resultados de los valores de los residuos estandarizados de los tratamientos de la etapa de multiplicación de *Centrosema venosum* Benth.

Tratamiento	Replica 1	Replica 2	Replica 3	Replica 4	Replica 5	Replica 6	Replica 7	Replica 8	Replica 9
A	1,47	-0,33	1,47	-1,53	0,27	-0,93	0,27	-0,33	-0,33
B	-0,95	1,19	0,24	-0,95	0,00	-0,95	-0,95	1,42	0,95
C	-0,07	-0,69	-0,69	-0,69	0,55	2,41	-0,07	-0,07	-0,69
D	-0,60	-0,21	2,09	-0,21	0,94	0,17	-0,21	-0,60	-1,37
E	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Al analizar el comportamiento de los residuos estandarizados se observa que la totalidad se encuentran entre los valores -3 y 3, por lo que no se observa ningún residuo inusitado, lo cual señala que no existen motivos para dudar que los residuos siguen una distribución normal.

2.2.- Análisis de varianza con un solo factor.

Al aplicar el ANOVA, se obtuvieron los siguientes resultados:

Al observar el valor de la significación obtenida para el conjunto de datos (0) se puede decir que, con un riesgo del 5%, existen diferencias significativas entre el número de brotes promedios obtenidos para cada uno de los medios.

A continuación, el análisis de varianza nos muestra el test en el que se comparan los tratamientos dos a dos, para analizar entre ellos cuando se presentan las diferencias significativas.

Test comparativo entre tratamientos de la etapa de multiplicación de *Centrosema venosum* Benth.

(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
A	B	(*) 11,5556	1,4482	0	7,6319	15,4792
	C	(*) 13,3333	1,4482	0	9,4097	17,257
	D	3	1,4482	0,184	-0,9237	6,9237
B	A	(*) -11,5556	1,4482	0	-15,4792	-7,6319
	C	1,7778	1,4482	0,614	-2,1459	5,7015
	D	(*) -8,5556	1,4482	0	-12,4792	-4,6319
C	A	(*) -13,3333	1,4482	0	-17,257	-9,4097
	B	-1,7778	1,4482	0,614	-5,7015	2,1459
	D	(*) -10,3333	1,4482	0	-14,257	-6,4097
D	A	-3	1,4482	0,184	-6,9237	0,9237
	B	(*) 8,5556	1,4482	0	4,6319	12,4792
	C	(*) 10,3333	1,4482	0	6,4097	14,257

(*)The mean difference is significant at the 0.05 level.

BIBLIOGRAFIA.

- ANGELONI, P. N., REY, H. Y. y MROGINSK, L. A., (1992). Regeneration of plants from callus tissue of the pasture legume *Centrosema brasilianum*. Plant Cell Reports. 11: 519-521p.
- ARENAS, T., MONROY , M. A., MATA , M., JIMÉNEZ , A. y CHÁVEZ Á., V. M. (1998) Regeneración in vitro de *Turbinicarpus pseudopectinatus* (Backeberg)Glass & Foster. Memorias del XV Congreso Mexicano de Botánica. México. Disponible en: <http://www.unne.edu.ar/cyt/2001/5-Agrarias/A-026.pdf>.
- AUGÉ R., (1995) The Physiological Phenomena Related to the Realisation of Culture In Vitro. En: In vitro Culture and its application in Horticulture. Science Publishers, Inc. USA, 7-31p.
- BARBA A., A, LUNA R., B. S. y ROMERO A., J., (2001) Micropropagación de plantas. Editorial Trillas. 29-36p.
- CHAWLA, H. S. (2002). Introduction to Plant Biotechnology. Science Publishers. U.S.A. 14-23 p.

- CURTIS, H. y RAVEN, P. H., (1995). Integración del crecimiento: Fitohormonas. En: Biología Vegetal. Editorial Omega. Barcelona, España. 162-179p.
- DeFOSSARD, R. A. (1977) The horizons of tissue culture propagation Seminar NSW ASS. Nursery-men. Universidad de Sydney. Australia. 1-147p.
- DENNG, R. y DONNELLY, D. J., (1993) In vitro hardening of red raspberry through CO₂ enrichment and relative humidity reduction on sugar-free medium. Can. J. Plant Sci. 73:1105-1113p.
- DEWAN, A., NONDA, K. y GUPTA, S. C., (1992). In vitro micropropagation of *Acacia nilotica* subsp *indica* Brennan via cotyledonary nodes. Plant Cell Reports. 12:18-21p.
- FLORES, A.J. y S. RODRIGUEZ. (1985). Recursos fitogenéticos de especies forrajeras en Venezuela. Memorias del II Congreso Venezolano de Genética, Valencia, Venezuela. 6 p.

FORLIN, S. M., SEIJO, G., REY, H. Y. y MROGINSKI, L. A. (2001).

Regeneración de plantas por cultivo *in vitro* de anteras de *Desmanthus virgatus* (Leguminosae). UNIVERSIDAD NACIONAL DEL NORDESTE Comunicaciones Científicas y Tecnológicas 2000. Corrientes, Argentina.

FUSAGRI, (1986). **Pastos.** FUSAGRI. Serie: PETRÓLEO Y AGRICULTURA. Venezuela. 10p.

GAMBORG, O. L., MILLER, R. A. y OJIMA, K., (1968). **Nutrient requirements of suspension culture of soybean root cells.** Experimental Cellular Research, 50, 151-158p

GUZMÁN P., JOSÉ E., (1996). **Pastos y forrajes. Producción y aprovechamiento.** Espasande Editores. Caracas, Venezuela. 351p.

HAVARD-DUCLOS, B., (1968). **Las Plantas Forrajeras Tropicales.** Editorial BLUME. Barcelona, España. 153 y 185p.

HUAMANYAURI T., S.,(s. f.). **Citoquininas efectos en propagacion vegetal.**

Disponible en:

www.lamolina.edu.pe/FACULTAD/Agronomia/horticultura/propagacion/fit
ohormonas

HURTADO M., D. V. Y MERINO M., M. E., (1991). **Cultivo de tejidos vegetales.** Editorial Trillas. Mexico. 15-30 133-148p.

JUDD, W. S., CAMBELL, C. S., KELLOGG, E. A. y STEVENS, P. F., (1999) **Plant Systematics.** Sinaver Associates, Inc. USA. 283-284p.

MURASHIGE, T. y SKOOG, F., (1962). **A revised medium for rapid growth and bioassay whith tobacco tissue cultures,** *Physiol. Plant*, 15: 473-497p.

MROGINSKI, E., REY, H. Y. y MROGINSKI, L. A., (2002). **Obtención de múltiples yemas a partir del cultivo in vitro de hojas mediante el empleo de thidiazurón en *Arachis correntina* (Leguminosae).** XIII Reunión de Comunicaciones Científicas y Técnicas 2002. Facultad de Ciencias Agrarias. UNNE. Disponible en:

<http://www.agr.unne.edu.ar/Extension/Resumen/ Biotecnologia/biotec-007.doc>.

- PEREA D., M., (2001). **Biotecnología agrícola. Un enfoque hacia el mejoramiento de plantas.** ACEVIV. Bogotá, Colombia. 307p.
- PEREZ PONCE. J. N. Y col., (1998). **Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología.** INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA DE LAS PLANTAS. Villa Clara, Cuba. 13p.
- PIERIK, R. L. M., (1990). **Cultivo in vitro de las plantas superiores.** Editorial Mundi-Prensa. España. 29-30, 35-36, 184-209p.
- RAZZ, R Y FARÍA, N., (1996). **Características botánicas de especies de *Centrosema (L.) Benth.*** Venezuela. Disponible en: http://www.redpav-fpolar.info.ve/fagroluz/v13_5/v135z003.html
- REDDY, K. K., BHASKAR, P. y SUBASH, K. (1995) **In vitro propagation of *Acacia holoceryia* forest tree.** In Vitro. 31:3, pt. 2, 83A
- SERRANO G., M. Y PIÑOL S., M. T., (1991). **Biotechnología Vegetal.** Editorial Síntesis. España. 15-21, 55-64p.

- SMITH, R. H., (2000). Plant Tissue Culture. Techniques and Experiments.
Academic Press. California. USA. 44-54p.
- STEWART, F. C. Y CAPLIN, S. M., (1952). Investigation on growth and metabolism of plant cells. IV. Evidence on the role of the coconut milk factor development. Ann. Bot. 16: 491-504p.
- TORRES, K. C., TORRES, J. S., THRO, A. M y KITCHEN, L (1986)
Micropropagation and screening of *Stylosanthes biflora* cultures to various levels of glyphosate. Plant Tissue Cell Culture. 6 Meet., 74.
- TRUJILLO, I., (2001). Desarrollo de técnicas de micropropagación "in vitro" para especies de interés económico y de impacto en el mantenimiento de la biodiversidad de sabanas neotropicales del Estado Guárico. Proyecto de Investigación. FONACIT. Venezuela.
- VARGAS HERNANDEZ, J. J. (1982). Aplicaciones del cultivo de tejidos en la propagación vegetativa de especies forestales. Rev. Ciencia Forestal. Nº 39 Vol. 7. 44-61p.

