

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE AGRONOMÍA
ESCUELA DE AGRONOMÍA
DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA AGRÍCOLA



**ENRAIZAMIENTO DE ESTACAS Y PROTOCOLO DE DESINFECCIÓN
PARA LA INICIACIÓN *in vitro* DE TRINITARIA
(*Bougainvillea glabra* Choisy) cv. sanderiana variegata.**

HELEN YNGBORG PÉREZ PIVAT

MARACAY, OCTUBRE 2003

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE AGRONOMÍA
ESCUELA DE AGRONOMÍA
DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA AGRÍCOLA

**ENRAIZAMIENTO DE ESTACAS Y PROTOCOLO DE DESINFECCIÓN
PARA LA INICIACIÓN *in vitro* DE TRINITARIA
(*Bougainvillea glabra* Choisy) cv. sanderiana variegata.**

HELEN YNGBORG PÉREZ PIVAT

MARACAY, OCTUBRE 2003

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE AGRONOMÍA
ESCUELA DE AGRONOMÍA
DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA AGRÍCOLA

**ENRAIZAMIENTO DE ESTACAS Y PROTOCOLO DE DESINFECCIÓN
PARA LA INICIACIÓN *in vitro* DE TRINITARIA
(*Bougainvillea glabra* Choisy) cv. *sanderiana variegata*.**

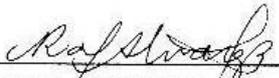
**AUTOR: HELEN YNGBORG PÉREZ PIVAT
TUTOR: RAFAEL ALVAREZ RANGEL**

**TRABAJO PRESENTADO COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OPTAR
AL TÍTULO DE INGENIERO AGRÓNOMO MENCIÓN FITOTECNIA QUE
OTORGA LA UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA**

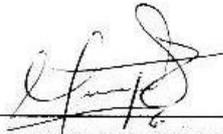
MARACAY, OCTUBRE 2003

APROBACIÓN DEL JURADO

Nosotros los abajo firmantes, miembros del Jurado Examinador del Trabajo de Grado titulado: **ENRAIZAMIENTO DE ESTACAS Y PROTOCOLO DE DESINFECCIÓN PARA LA INICIACIÓN *in vitro* DE TRINITARIA (*Bougainvillea glabra* Choisy) cv. *sanderiana variegata***, cuyo autor es la Bachiller Helen Yngborg Pérez Pivat, cédula de identidad 15.274.519, certificamos que la hemos leído y que en nuestra opinión reúne las condiciones necesarias de adecuada presentación y es enteramente satisfactorio en alcance y calidad como Trabajo de Grado para optar al título de Ingeniero Agrónomo Mención Fitotecnia.


RAFAEL ALVAREZ RANGEL
CI. 2.514.029
TUTOR COORDINADOR


DINABA PERDOMO D.
CI. 7.276.445
JURADO PRINCIPAL


GUSTAVO VARGAS S.
CI. 3.612.106
JURADO PRINCIPAL


CLARET M. DE CLAVIJO
CI. 4.367.136
JURADO SUPLENTE

AGRADECIMIENTOS

A Dios y mi señor Jesucristo por ser siempre mi guía, mi norte, por estar siempre conmigo y darme fe y esperanza para lograr todas mis metas y ser mejor cada día.

A mi Virgen Milagrosa, por estar conmigo siempre, aún en los momentos más difíciles, por darme fuerza y fe para seguir adelante y darme la certeza de que con fe todo se puede lograr.

A mi madre, Margarita, por estar siempre a mi lado, por compartir todo conmigo, por sus consejos, apoyo, cariño y amor incondicional, por siempre confiar en mí y darme seguridad y confianza para lograr mis deseos y metas, como este que hoy se hace realidad y los que aún faltan.

A mi padre, Eduardo, por darme su apoyo y cariño a lo largo de mi vida y carrera, por ayudarme en este proyecto que ya hoy es una realidad.

A mi hermana Isis, mi segunda madre y mi amiga, por su ayuda en los análisis estadísticos de este trabajo y ante todo por entenderme y quererme como soy, por ser mi complemento, por siempre apoyarme y comprenderme, por ser la mejor hermana del mundo.

A la Universidad Central de Venezuela, la casa que vence las sombras, por ser la casa donde se cumplen los sueños como el que hoy se hace realidad.

A FUNDACITE Aragua, por el financiamiento otorgado para este proyecto.

Al Prof. Lusbi Herrera, por guiarme a lo largo de la carrera y por su amistad.

Al Prof. Rafael Alvarez Rangel, por confiar en mí para la realización de este trabajo, por su apoyo y asesoría durante la realización del mismo y por brindarme su amistad.

A la Profesora Dinaba Perdomo, por sus valiosos consejos y asesoría a lo largo de la realización de este trabajo, por su disposición siempre colaboradora y atenta y por brindarme su amistad.

Al Prof. Gustavo Vargas, por su valiosa asesoría a lo largo de la realización de este trabajo, siempre de manera atenta y colaboradora.

A la Profesora Claret Michelangeli de Clavijo, por su valiosa asesoría y por su gran colaboración al facilitar las instalaciones tanto del propagador como del laboratorio del C.I.B.A para la realización de la primera fase de este trabajo.

A la Prof. Gladys Suárez por su colaboración y apoyo como Coordinadora de la Subcomisión de Trabajos de Grado del Dpto. de Botánica Agrícola en todos los trámites referentes a este trabajo.

Al Ing. Agr. MSc. Efraín Salazar por su desinteresada y amable ayuda en facilitar las instalaciones del Laboratorio de Biotecnología del I.N.I.A para la realización de la segunda fase de este trabajo

A la Prof. Nelly Sanabria de Albarracín, por su valiosa ayuda en el diagnóstico y análisis fitopatológico de las muestras de laboratorio.

Al Dr. Gilberto Surga, por su excelente asesoría y sus sabios consejos, por compartir desinteresadamente sus conocimientos en el campo de la Biotecnología, y por brindarme su desinteresada ayuda en facilitar las instalaciones del Laboratorio de Cultivo de Tejidos de la Sección de Frutales del I.N.I.A para la realización de la tercera fase de este trabajo.

Al Prof. Gino Malagutti, por facilitar parte del material vegetal empleado en este trabajo, de manera atenta y colaboradora y por sus amables consejos.

Al Sr. Manuel Belisario, por su valiosa asesoría en relación al montaje del sistema de riego empleado en la segunda y tercera fase de este trabajo.

Al personal que labora en el C.I.B.A, en especial a Maureen, Paola, Marilú y el Sr. Vicente por su valiosa colaboración a nivel de laboratorio.

Al Sr. Luis Castro, por su excelente colaboración, asesoría y ayuda a nivel de laboratorio.

Al Sr. Belloso, Srta. Indira y Srta. Keila por su valiosa colaboración a nivel de laboratorio.

Al personal que labora en la Clínica de Plantas de la Sección de Fitopatología por su amable colaboración.

Al Sr. Verde, por su colaboración desinteresada, siempre atenta y amable, tanto en Docencia como en la realización de este trabajo.

Al Departamento de Botánica Agrícola, en especial al personal de las Cátedras de Fisiología Vegetal y Morfoanatomía Vegetal, por su apoyo y amistad.

A la Srta. Denise y Srta. Elida, Secretarias del Dpto. de Botánica Agrícola, por su atención siempre amable y atenta.

A la Lic. Josefa Medina y al personal que labora en el Departamento de Control de Estudios, en especial la Sra. Zaida, la Sra. Belinda y la Sra. Lourdes, por su amable atención a lo largo de toda mi carrera.

A la Prof. Marisela Ascanio, por su asesoramiento a nivel estadístico.

A la Prof. Romelia Parra, por ser excelente persona, por brindarme su amistad, confianza y cariño. Que Dios la Bendiga.

A la Prof. María Ferrarotto, por su confianza y por su amistad.

A la Prof. María González, por su amistad y cariño, por sus sabios consejos y por sus palabras de aliento y apoyo siempre.

A los Profs. Angel Guadarrama, Nancy Mariño, Luis H. Chong, Damelis Jáuregui, Fanny Camacho, Marlene Lapp y Mercedes Castro, por su amistad y aprecio.

A Diego Diamont por su amistad.

A la Prof. Delia Polanco, por su amistad, cariño, alegría y por ser una gran persona, por enseñarnos que para ser buenos profesionales hay que ser mejores personas. Que Dios la Bendiga.

Al Ing. Agr. MSc. Eduardo Ortega, por su aprecio y por compartir sus conocimientos de manera desinteresada y amable.

Al Ing. Agr. MSc. Amado Rondón, por su aprecio y por compartir sus conocimientos y valiosas experiencias en el campo agrícola de manera siempre amable, atenta y desinteresada.

A los Ing. Agr. Asia Zambrano, Ariadne Vega y Ezequiel Díaz, por su disposición amable y colaboradora durante la realización de este trabajo en las instalaciones del Laboratorio de Biotecnología del I.N.I.A.

A la Ing. Adriana Cortez, de la Unidad de Agrometeorología del CENIAP (INIA) por su amable y valiosa colaboración al suministrar los datos climatológicos correspondientes al primer ensayo de enraizamiento realizado en este trabajo.

A mis compañeros de estudio, en especial a Dayana, Adriana, Keiver, Pedro, Pepe y Alfredo con los que compartí buenos momentos a lo largo de mi carrera.

A todas aquellas personas que de una u otra forma hicieron posible este sueño que hoy se hace realidad.

“Gracias”

HELEN YNGEBORG PÉREZ PIVAT

DEDICATORIA

A la memoria de mi abuelo Joseph A. Pivat S.

Tú, que siempre velas por mí desde la estrella más alta y brillante del firmamento, con todo mi amor te dedico este trabajo, que imprimió de magia tu flor favorita, la trinitaria, porque cada una de ellas, siempre a mi paso, me recuerdan que vives dentro de mi corazón y para siempre.

RESUMEN

La dificultad del enraizamiento de estacas, limita la producción comercial de muchas plantas ornamentales. En este trabajo se plantearon como objetivos la optimización del enraizamiento *in vivo* de la trinitaria (*Bougainvillea glabra* Choisy) cv. sanderiana variegata y la definición de un protocolo de desinfección para su iniciación *in vitro*. Se estableció en febrero 2002, un ensayo de enraizamiento de estacas, tratadas con dosis de AIB de 2000 a 6000 ppm, colocadas en propagador de neblina, con diseño completamente aleatorizado, evaluando a los 45 días las variables: índice de enraizamiento (IE), porcentaje de enraizamiento (PE), media del número de raíces (NR), peso seco de la raíz (PS) y longitud promedio de la raíz (LPR), realizando el análisis estadístico respectivo. Se llevó a cabo un segundo ensayo de enraizamiento, con igual diseño, empleando estacas de 1, 2 y 3 nudos, y dosis de AIB de 2000 a 4000 ppm, para evaluar las variables anteriormente mencionadas. Para el protocolo de desinfección para la iniciación *in vitro*, las plantas madres crecieron en condiciones controladas, definiéndose el protocolo luego de cuatro ensayos para evaluar la mejor dosis de Hipoclorito de Sodio. Los explantes cultivados, fueron colocados en cuarto climático a 25°C, 16 h de fotoperíodo e intensidad lumínica de 100 $\mu\text{E}/\text{m}^2\cdot\text{s}$, descartando el material contaminado semanalmente. El enraizamiento de estacas se logró con todos los tratamientos, obteniéndose el mayor porcentaje de enraizamiento (97.5%) y la mejor calidad de raíces con 2000 ppm AIB; en el segundo ensayo, el enraizamiento sólo ocurrió en 1% de éstas, siendo las de 3 nudos tratadas con 3000 ppm AIB, las de mejor desarrollo de parte aérea. Se definió el protocolo de desinfección para la iniciación *in vitro*, contemplando inmersión de los explantes en solución de jugo de limón y agua fría, lavado superficial, agitación en etanol al 70% por 30 seg, colocación en campana de los explantes en Hipoclorito de Sodio al 1% con agitación por 5 min, corte y siembra de los mismos, obteniéndose ausencia de agentes fúngicos y 10% de contaminación bacteriana; sin embargo, no se observó crecimiento de los explantes luego de cuatro semanas de evaluación.

Palabras clave: *Bougainvillea glabra* Choisy cv. sanderiana variegata/ enraizamiento/ estacas/ microestacas/ protocolo de desinfección/ iniciación *in vitro*.

ABSTRACT

Poor rooting of cuttings limits the commercial production many woody ornamental plants. This research aimed at optimization of adventitious root formation in stem cuttings, and selection of an appropriate disinfection protocol for establishment of variegated bougainvillea (*Bougainvillea glabra* Chosiy cv. *sanderiana variegata*) shoots *in vitro*. Hardwood stem cuttings were taken from median portions branches in Februar 2002, and dipped in IBA solutions varying from 2000 to 6000 ppm; then the cuttings were inserted into the rooting media, and placed under intermittent mist conditions. Rooting was evaluated 45 days later, and the following variables were taken: rooting index (RE), rooting percentage (RP), average number of roots (ARN), root dry weigh (RDW) and average length of the longest root (ARL). A second trial was carried out using hardwood stem cuttings with 1, 2 and 3 nodes, and treatments with IBA solutions ranging from 2000 to 4000 ppm. In relation to the disinfection protocol for the *in vitro* shoot establishment, stock plants were grown under greenhouse conditions, and four different protocols were applied before transferring shoots into sterile conditions, at 25°C, 16 h of photoperiod, and a light intensity of 100 $\mu\text{E}/\text{m}^2\cdot\text{s}$. Contaminated explants were discarded weekly. Rooting of stem cuttings was achieved with all IBA treatments; the highest rooting percentage (97.5%), and the best rooting quality was achieved with 2000 ppm IBA; in the second trial, rooting of cuttings was very poor, only 1% of cuttings with three nodes treated with 3000 ppm IBA showed rooting, and good development of shoots. The disinfection protocol for the *in vitro* shoot establishment, was defined after four trials. It includes the following steps: immersion of shoots in a solution of lemon juice and cold water, washing with household soap, agitation in 70% ethanol (v/v) for 30 seg, and treatment with 1% sodium hypochlorite. Reduction of surface contaminants was successful using this protocol, achieving total absence of fungi, and only 10% of bacterial contamination. However, growing of explants was not observed after four weeks.

TABLA DE CONTENIDO

Página de Título.....	i
Aprobación del Jurado.....	ii
Dedicatoria.....	iii
Agradecimientos.....	iv
Resumen.....	ix
Abstract.....	x
Tabla de Contenido.....	xi
Indicede Cuadros.....	xv
Indice de Figuras.....	xvi
Indice de Anexos.....	xviii
I. Introducción.....	1
II. Objetivos.....	3
III. Revisión Bibliográfica.....	4
3.1. Aspectos Botánicos y Morfológicos de la Trinitaria (<i>Bougainvillea glabra</i>).....	4
3.2. Enraizamiento in vivo.....	6
3.3. Propagación in vitro.....	10
IV. Materiales y Métodos.....	15
4.1. Enraizamiento de Estacas.....	15
4.1.1. Ubicación del Ensayo.....	15
4.1.2. Material Vegetal.....	15
4.1.3. Metodología Aplicada.....	17
4.2. Enraizamiento de Miniestacas.....	20
4.2.1. Ubicación del Ensayo.....	20
4.2.2. Material Vegetal.....	20
4.2.3. Metodología Aplicada.....	20

4.3. Protocolo para la Iniciación <i>in vitro</i> de Trinitaria.....	22
4.3.1. Primer Ensayo.....	23
4.3.2. Segundo Ensayo.....	24
4.3.3. Tercer Ensayo.....	25
4.3.4. Cuarto Ensayo.....	27
V. Resultados y Discusión.....	29
5.1. Evaluación del Enraizamiento de Estacas.....	29
5.1.1. Índice de Enraizamiento	30
5.1.2. Porcentaje de Enraizamiento	31
5.1.3. Media del Número de Raíces.....	33
5.1.4. Peso Seco.....	34
5.1.5. Longitud Promedio de la Raíz más Larga.....	38
5.2. Evaluación del Enraizamiento de Miniestacas.....	40
5.3. Evaluación de los Bioensayos para definir un Protocolo de Desinfección para la iniciación <i>in vitro</i> de Trinitaria.....	44
5.3.1. Evaluación del Primer Ensayo.....	44
5.3.2. Evaluación del Segundo Ensayo.....	46
5.3.3. Evaluación del Tercer Ensayo.....	48
5.3.4. Evaluación del Cuarto Ensayo.....	49
5.4. Establecimiento del Protocolo de Desinfección para la iniciación <i>in vitro</i> de Trinitaria (<i>B. glabra</i> Choisy) cv. sanderiana variegata.....	52
5.4.1. Manejo en el Vivero.....	52
5.4.2. Protocolo de Desinfección para la iniciación <i>in vitro</i>	53

VI. Conclusiones.....	54
VII. Recomendaciones.....	56
VIII. Referencias Bibliográficas.....	58
IX. Anexos.....	66

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Comparación de medias de los tratamientos aplicados para cada una de las variables de enraizamiento evaluadas.....	29
Cuadro 2. Resultados del Análisis Fitopatológico de muestras provenientes de cultivos <i>in vitro</i> de Trinitaria (<i>Bougainvillea glabra</i> Choisy) cv. sanderiana variegata.....	45

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Planta de <i>Bougainvillea glabra</i> Choisy cv. sanderiana variegata.....	16
Figura 2. Maceteros con sustrato compuesto por arena de río y aserrín de coco en proporción 1:1, estacas a sembrar y soluciones de AIB en diferentes concentraciones.....	18
Figura 3. Maceteros correspondientes a cada ensayo de enraizamiento.....	22
Figura 4. Pasos generales de los ensayos de desinfección de explantes para su iniciación <i>in vitro</i>	28
Figura 5. Índice de Enraizamiento (IE) de Estacas de Trinitaria (<i>Bougainvillea glabra</i> Choisy) cv. sanderiana variegata tratadas con diferentes dosis de ácido indolbutírico (AIB).....	30
Figura 6. Porcentaje de Enraizamiento (PE) de Estacas de Trinitaria (<i>Bougainvillea glabra</i> Choisy) cv. sanderiana variegata tratadas con diferentes dosis de ácido indolbutírico (AIB).....	32
Figura 7. Número de Raíces Promedio (NRP) en Estacas de Trinitaria (<i>Bougainvillea glabra</i> Choisy) cv. sanderiana variegata tratadas con diferentes dosis de ácido indolbutírico (AIB).....	34
Figura 8. Peso Seco (PS) de Raíces de Estacas de Trinitaria (<i>Bougainvillea glabra</i> Choisy) cv. sanderiana variegata tratadas con diferentes dosis de ácido indolbutírico (AIB).....	35
Figura 9. Comparación de las raíces formadas en las estacas tratadas con cada dosis de AIB y el testigo, secadas en estufa para determinar su peso seco.....	36

Figura 10. Longitud Promedio de Raíces (LPR) de Estacas de Trinitaria (<i>Bougainvillea glabra</i> Choisy) cv. sanderiana variegata tratadas con diferentes dosis de ácido indolbutírico (AIB).....	38
Figura 11. Detalle de raíz delgada, larga y débil formada en estacas tratadas con 5000 ppm AIB.....	39
Figura 12. Detalle de raíces gruesas, firmes y resistentes formadas en estacas tratadas con 2000 ppm AIB.....	39
Figura 13. Miniestacas de 1, 2 y 3 nudos de trinitaria (<i>Bougainvillea glabra</i> Choisy) cv. sanderiana variegata plantadas para su enraizamiento.....	43
Figura 14. Porcentajes de Contaminación Fúngica presente en muestras del 2do Ensayo de Desinfección con diferentes dosis de Hipoclorito de Sodio.....	47
Figura 15. Porcentajes de Contaminación Bacteriana encontrada en muestras del 3er Ensayo de Desinfección con diferentes dosis de Hipoclorito de Sodio.....	49
Figura 16.- Porcentajes de Contaminación Bacteriana encontrado en muestras del 4to Ensayo de Desinfección con diferentes dosis de Hipoclorito de Sodio.....	51

INDICE DE ANEXOS

Anexo A. Plantas de trinitaria (<i>B. glabra</i> Choisy) cv. sanderiana variegata producidas a partir de las diferentes dosis de AIB aplicadas.....	66
Anexo B. Planta de 6 meses producida a partir de estacas tratadas con 2000 ppm AIB.....	67
Anexo C. Cámara de flujo laminar e implementos utilizados para la implantación <i>in vitro</i>	67
Anexo D. Contaminación encontrada en los tubos con ápices cultivados <i>in vitro</i>	68
Anexo E. Datos Mensuales de Precipitación y Temperatura de Maracay durante los meses febrero-abril 2002.....	69

I.- INTRODUCCIÓN

Las trinitarias (*Bougainvillea glabra* Choisy), se caracterizan por ser plantas de usos múltiples; dado que las mismas pueden ser utilizadas como arbusto de copa compacta al ser podadas convenientemente, también como trepadoras para cubrir pérgolas y muros, proporcionando apoyo o como setos vivos mediante podas regulares, además de constituir por sí mismas fuertes barreras vegetativas, lo cual le confiere una gran utilidad como planta ornamental en las zonas tanto del trópico como del mediterráneo y otros lugares de clima similar.

La propagación de plantas ha constituido a lo largo de muchos años, un método efectivo para la obtención rápida y eficiente de plantas con características adecuadas a las exigencias ya sea de productores o viveristas; en este aspecto cobra importancia la especie de interés, pues dependiendo de su naturaleza, se podrá aplicar el método de propagación más conveniente o adecuado a los fines que se requieran lograr.

Respecto a la propagación, es necesario señalar que la misma puede ser llevada a cabo tanto *in vivo* como *in vitro*. Para el caso de la propagación *in vivo* de plantas leñosas, es común el empleo de estacas de tallo o bien la técnica del acodado; en el caso de la propagación *in vitro*, la misma puede ser llevada a cabo a través del cultivo de explantes tomados de las partes jóvenes de las plantas tales como ápices y yemas axilares, entre otros; colocados en un medio contentivo de todos los nutrientes necesarios para su desarrollo en condiciones controladas de luz y temperatura.

Sin embargo, es conocido que a pesar de que la propagación por estacas es la más utilizada tanto por la facilidad de enraizamiento como por la ventaja que ofrece de multiplicar una gran cantidad de material en un espacio reducido, se han reportado en trinitarias blancas y variegadas, bajos porcentajes de enraizamiento, lo cual constituye un problema a resolver, en especial para estas últimas, dada la

creciente importancia que poseen en la actualidad como plantas ornamentales; razón por la cual se ha planteado la realización de un estudio cuyo objetivo fundamental es la optimización del enraizamiento *in vivo* de estacas de esta especie, específicamente del cultivar sanderiana variegata, así como definir un protocolo de desinfección adecuado para la iniciación *in vitro* de la misma, dadas las ventajas que ofrece la micropropagación como técnica de propagación de plantas, a fin de garantizar la disponibilidad de un alto número de plantas de buena calidad para el ornamento de avenidas, redomas, jardines, parques y otros lugares de recreación.

II.- OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

- ❖ Inducir el enraizamiento de estacas y miniestacas de trinitaria (*B. glabra* Choisy) cv. sanderiana variegata así como definir un protocolo de desinfección adecuado para la iniciación *in vitro* de la especie.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- ❖ Promover la formación de raíces adventicias en estacas de trinitaria.
- ❖ Inducir la formación de raíces adventicias *in vivo* en miniestacas de trinitaria.
- ❖ Definir un protocolo de desinfección para la iniciación *in vitro* de trinitaria.

III.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

3.1.- Aspectos Botánicos y Morfológicos de la Trinitaria (*Bougainvillea glabra*):

La trinitaria (*B. glabra* Choisy) es, según Hoyos (1978), una planta oriunda de Brasil y ampliamente cultivada en todos los países tropicales, subtropicales y templados, principalmente por la vistosidad de sus brácteas y su gran resistencia a la sequía. Se diferencia esta especie de la *B. spectabilis* Willd, por presentar el tubo del perianto, hojas y tallo ligeramente pubescentes o glabros, e incluir variedades de color blanco o morado.

Destaca el autor que se trata de plantas trepadoras leñosas, vigorosas, con espinas, que se caracterizan por conservar sus brácteas durante muchos días, lo que les confiere un gran valor ornamental. Otras ventajas de la especie son las relacionadas a su adaptabilidad a condiciones de suelos salinos y climas áridos.

Esta planta, de acuerdo a Hernández (2001), fue descubierta en 1768 por el almirante Louis de Bougainvillea, a quien se le debe su nombre científico. Badillo *et al* (1985), señalan que la trinitaria (*B. glabra*) se clasifica botánicamente de la siguiente manera:

Orden: *Centrospermae*

Familia: *Nyctaginaceae*

Género: *Bougainvillea*

Especie: *Bougainvillea glabra* Choisy

Braswell (1998) indica que la *B. glabra* fue identificada por Choisy en 1850, mientras que GIARDINAGGIO (2000) señala que de ésta especie, es la variedad *sanderiana* la más difundida.

Baines y Key (1978) destacan la existencia de numerosas variedades o híbridos más delicados que las especies conocidas, tal es el caso de las variedades *B. glabra cypheri* y *B. glabra sanderiana*, las cuales son de un color más suave y delicado.

Ávila (1998), reseña como características morfológicas del cultivar *sanderiana variegata* las siguientes:

- Porte medio a bajo
- Hojas variegadas con dos tonalidades de verde (limón y amarillo crema)
- Espinas escasas o ausentes
- Follaje variegado y abundante.

Destaca además, que las hojas variegadas de trinitaria se originan a partir de quimeras de tipo periclinal, las cuales, según Debergh y Zimmerman (1991), citados por Ávila (1998), se consideran relativamente estables cuando las plantas se propagan *in vitro*.

Estas quimeras de tipo periclinal, presentan de acuerdo a Hartmann y Kester (1992), un tejido de un genotipo en una capa relativamente delgada de una o varias células de espesor, cubriendo por completo a un núcleo genéticamente diferente. Además señalan que este tipo de quimera es común y es el más estable en la propagación si se usan estacas de tallo o injertos de rama.

3.2.- Enraizamiento *in vivo*:

Braswell (1998), indica que la forma tradicional de propagación de la trinitaria ha sido la asexual o vegetativa, mediante la utilización de estacas, siendo considerada una de las más efectivas hasta ahora; destacando como ventajas de este método el mantenimiento en el tiempo de las características deseables de determinados genotipos y la garantía de uniformidad de las plantas, así como un acortamiento del ciclo de la planta al adelantar la fase juvenil de la misma.

Asimismo, destaca Suárez (1998), citado por Ávila (1998) que la etapa de enraizamiento y desarrollo de las estacas o acodos es lenta, además de requerir un gran volumen de material vegetal (estacas) para iniciar la propagación.

Hartmann y Kester (1992) indican que en algunos casos una envoltura de tejido lignificado en los tallos puede actuar como una barrera mecánica para la emergencia de las raíces, pero los tratamientos con auxina y el enraizamiento bajo niebla ocasionan una expansión y proliferación considerable de las células de la corteza, el floema y el cambium que resulta en la ruptura de los anillos continuos del esclerénquima; sin embargo aclaran que aún así no se registra formación de iniciales de raíces en cultivares difíciles de enraizar de varias especies de frutales.

La eficiencia del ácido indol-3-butírico (AIB) sobre el enraizamiento de plantas leñosas ha sido probada en especies diferentes a la trinitaria, como la zarzamora (*Rubus spp*), en la cual García y Castillo (1992) encontraron que los tratamientos con esta auxina resultaron mejores y más económicos para promover el enraizamiento.

En *Actinidia deliciosa*, Covatta y Borscak (1991) , reportaron que el enraizamiento de esta especie era difícil, sin embargo Messina y Testolin (1984) citados por estos autores, indican que el ácido naftalacético (ANA) en distintas concentraciones, promueve la aparición de raíces adventicias.

Treeby (1983) también citado por Covatta y Borscak (1991), señala que el AIB parece promover notablemente el enraizamiento de estacas de esta especie. Por otra parte, citan los mismos autores a Carman (1980), quien reseña que la combinación de ANA y AIB es ventajosa para propagar la especie usando estacas leñosas, comprobándose además no sólo mayor porcentaje de enraizamiento, sino también un mayor desarrollo de las raíces formadas.

Zowain (1984) estudió el efecto de tratamientos con AIB y la sal de potasio ácido indolbutírico (K – AIB), por separado, en estacas de madera semidura en cuatro especies de plantas ornamentales, entre las cuales destaca la trinitaria (*B. glabra*), para la cual encontró efectos positivos del AIB y el K-AIB sobre el enraizamiento tanto de trinitaria como de las otras especies evaluadas en su estudio; sin embargo las concentraciones más efectivas sobre el enraizamiento de *Bougainvillea* e *Ixora* fueron las comprendidas en el rango 2500 - 5000 ppm de AIB y K-AIB.

Covatta y Borscak (1991) intentaron la propagación de la zarzamora por estacas leñosas a partir de material conservado en frío húmedo y posterior tratamiento con AIB en concentraciones de 50 a 4000 ppm, obteniendo que con esta última concentración las estacas mostraron mayor número de raíces y mejor vigor de las mismas.

Zowain (1984), logró obtener enraizamiento de trinitaria de 53,3% con 5000 ppm de AIB y 5000 ppm de K-AIB, mediante la inmersión de estacas de tallo de 20 cm de longitud y madera semidura, a 1 cm durante 3 segundos en los reguladores y concentraciones respectivos; colocando las mismas en medio de enraizamiento consistente en mezcla de arena de río y aserrín de coco en proporción 1:1, y manteniendo las estacas bajo cobertizo con propagador de neblina.

Para medir el efecto de los tratamientos sobre el enraizamiento, el autor utilizó la siguiente escala:

Excelente: Estacas con alrededor de 100 raíces y aproximadamente 17 cm de longitud.

Bueno: Estacas que presentaban entre 60 y 100 raíces y medían entre 10-17 cm de longitud.

Regular: Estacas que presentaban entre 20 y 40 raíces y medían entre 5-10 cm de longitud.

Malo: Estacas que presentaban entre 1 y 10 raíces y medían entre 1 – 5 cm de longitud.

Nulo: Sin raíces.

En estacas de cinco especies diferentes de *Ficus*, García (1984) encontró que el mejor enraizamiento en las estacas de *Ficus microcarpa* y *Ficus subcordata* , se obtuvo con 3000 ppm de AIB y medio de enraizamiento consistente en aserrín de coco y arena de río en proporción 1:1.

De hecho, Bolaños (1985) observó en enraizamiento de estacas de *Vitis caribaea*, que los medios de enraizamiento con iguales proporciones de arena y aserrín de coco fueron los de mejor comportamiento sobre el enraizamiento de las estacas, tanto en umbráculo como en propagador de neblina.

Otro aspecto influyente en el porcentaje de enraizamiento, lo constituye la ausencia o presencia de hojas en las estacas utilizadas, Shanmugavelu (1960) citado por Zowain (1984) reporta que en ensayos con cayena, utilizando estacas

de tallo de 15 cm de longitud con hojas y con aplicación de AIB, obtuvo de 75 a 90% de enraizamiento.

Díaz *et al* (1994), obtuvo que para el enraizamiento de *Pachecoa venezuelensis*, es recomendable la utilización de estacas basales tratadas con AIB y sin hojas, ya que éstas muestran una mejor calidad de enraizamiento y menor porcentaje de estacas muertas.

Hessayon (1982) destaca que para la propagación de trinitaria en condiciones templadas es necesaria la aplicación de hormonas vegetales como las ya reseñadas, además de la utilización de esquejes de tallos como explantes.

Por su parte, Ericksen y Mohamed (1974) citados por Torres y Kompen (1992) señalan que las estacas, al ser separadas de la planta original, sufren serias deficiencias metabólicas derivadas de la falta de aportes adecuados de agua y nutrientes para la formación de carbohidratos; además, gran parte de las hojas son eliminadas para evitar una transpiración excesiva, lo cual implica una escasa migración de auxinas endógenas o bien como indican Jarvis y Booth (1981), de un estimulante enraizador endógeno.

Wilson (1994) citado por Vargas *et al* (1999) explica que se ha comprobado que las aplicaciones de auxinas sintéticas estimulan las divisiones celulares del primordio radical, posiblemente porque favorecen la reacción de conjugación que permite la síntesis de ciertas proteínas específicas, pueden incrementar la tasa en la cual los azúcares son descargados dentro del floema para su almacenamiento en el parénquima, promueven el transporte xilemático e incrementan el desarrollo del callo.

Guri (2001) señala que para el tratamiento de esquejes leñosos, funciona mejor la aplicación de hormonas en forma líquida, dado que las de presentación en polvo, suelen degradarse rápidamente en el sustrato, lo cual acorta el tiempo de

actuación de las mismas, puesto que los esquejes leñosos tardan más en enraizar que los herbáceos.

Rivero *et al* (1998), al evaluar el efecto del tiempo de inmersión en AIB sobre el enraizamiento de estacas subapicales de tallo de trinitaria variegada (*B. glabra*), encontraron que, al aplicar este regulador en dosis de 100 ppm, el tiempo de inmersión más adecuado es de 1.5 a 2 horas para obtener mayor número de raíces por estaca.

En cuanto al tamaño de estaca, Krause (1990) citado por Gómez y Murgueitio (1991) encontró en ensayos realizados enraizando estacas de nacedero (*Trichantera gigantea*) de 1,2 y 3 yemas que los mejores resultados se obtienen con estacas de 3 yemas, las cuales enraizaron en un 84%.

Por otra parte, Tite y Allen (1970) citado por Díaz (1983), explican que propagando estacas de rosa de diferentes tamaños obtuvieron los mejores resultados con estacas de 2 o 3 yemas en comparación con las de 1 yema.

3.3.- Propagación *in vitro*:

En relación a la micropropagación, Rafael (1987) citado por García y Rafael (1989) define la propagación por microesquejes como el método que se basa en el cultivo de una sección (explante) proveniente del vástago de la planta (nudo o entrenudo), con el fin de obtener nuevos vástagos mediante el desarrollo de yemas preexistentes o neoformadas, las cuales podrán, a su vez, proporcionar nuevos esquejes a ser enraizados, obteniéndose así múltiples vitroplantas, idénticas, en principio, a la planta madre.

Tanto Pelacho *et al* (2000) como Arena y Martínez (2001), coinciden en señalar que dicho método incluye varias fases, las cuales son:

- **Preparación de las plantas madres:** Estas plantas son mantenidas por un período que oscila entre unas semanas o varios meses en un invernadero, a fin de cultivar las mismas en condiciones sanitarias óptimas y con control de factores como el riego, la irradiancia recibida y la temperatura.
- **Establecimiento:** Consiste en la desinfección de los explantes y su posterior adaptación al medio artificial de cultivo en condiciones de asepsia.
- **Multiplicación:** En esta fase, se persigue lograr la brotación masiva de las yemas y generar nuevos explantes, hasta obtener el número deseado de nuevos individuos, a través del subcultivo de los brotes en un nuevo medio.
- **Enraizamiento:** Mediante la transferencia de los brotes obtenidos durante la fase de multiplicación a un nuevo medio, se busca la formación de raíces en los mismos.
- **Aclimatación:** Consiste en adaptar las plantas obtenidas al ambiente en que finalmente crecerán, mediante la aclimatación de los explantes a las condiciones de humedad del invernadero, disminuyendo progresivamente la humedad relativa e incrementando progresivamente la intensidad de luz.

Ávila (1998) recomienda que la recolección de material de iniciación para el cultivo de tejidos sea realizado en la época seca del año, para de esta manera controlar de forma natural la incidencia de los hongos, dado que en esa época la población fungosa baja.

Ramírez *et al* (2002) señalan que el cultivo *in vitro* como técnica, consiste en cultivar asépticamente una porción aislada de la planta bajo condiciones de

ambiente controlado, para que las células expresen su potencial intrínseco o inducido.

Montes-López y Rodríguez (2001) señalan que parte de la contaminación encontrada en cultivos *in vitro* se explica por la época de recolección del explante, ya que en el caso del ginkgo (*Ginkgo biloba*), los primordios foliares durante la época de invierno están recubiertos por resistencias tectrices, las cuales impiden su desinfestación en dicha temporada y además permiten la acumulación de contaminantes externos por su forma de roseta.

Por otra parte, Dalsaso y Guevara (1989) indican que las técnicas *in vitro* ofrecen una alternativa rápida de multiplicación de nuevas variedades y que la formación de brotes a partir de yemas apicales o laterales induce la menor variabilidad genética y tiene la ventaja de requerir únicamente el alargamiento del brote y la diferenciación de raíces.

Pierik (1990) explica que en la contaminación bacterial, el problema es más serio cuando se refiere a micropropagación de plantas leñosas, por ser uno de los principales causantes de la merma en la multiplicación a nivel comercial, aparentemente afectando la formación de raíces y en menor proporción la formación de brotes, al causar cambios químicos de los reguladores de crecimiento presentes en los medios.

Es por esto, que cobra importancia el establecimiento de un adecuado protocolo de desinfección de los explantes a utilizar, para lo cual investigadores como Margara (1988), Villalobos (1990) y Robbins (1992) citados por Ávila (1998) recomiendan la inmersión de los explantes en etanol al 70% por 0.5 a 1 min., antes de utilizar el hipoclorito de sodio, lavando de 3 a 5 veces con agua estéril al final.

Por otra parte, García *et al* (1996), señalan que en *Morus alba* cv. Tigreada, la inmersión de los explantes por períodos prolongados (15-30 min) en hipoclorito de sodio a bajas concentraciones, resulta determinante en el proceso de desinfección de yemas apicales.

Princ (1998) indica que las soluciones que contienen cloro son ampliamente empleadas por su seguridad, costo, simplicidad de uso, rapidez de acción y su gran espectro microbiano, a pesar de ser menos satisfactorias para los materiales que contienen material orgánico. Menciona además que el hipoclorito de sodio es el desinfectante a base de cloro más comúnmente empleado, dado que este compuesto es activo frente a bacterias, virus, hongos y esporas bacterianas; por lo tanto, una solución de hipoclorito de sodio, en la concentración adecuada, puede emplearse como un esterilizante químico.

En relación a la oxidación que puede presentarse en el establecimiento de microesquejes e incluso ocasionar la muerte de los mismos, García y Rafael (1990), señalan que en el caso de café 'Catimor' (*Coffea arabica*), los explantes procedentes de plantas crecidas en condiciones naturales presentan serios problemas de oxidación, constituyendo el inconveniente más grave las oxidaciones fenólicas, razón por la cual recomiendan el empleo de explantes procedentes de plantas crecidas *in vivo* bajo condiciones controladas, así como la preparación de los mismos con una mezcla antioxidante consistente en 300 mg/l de ácido ascórbico y 100 mg/l de ácido cítrico.

Utilizando la técnica de cultivo de tejidos, investigadores como Chatuverdi *et al* (1978) estudiaron el efecto de reguladores de crecimiento como la benziladenina (BA) y el ácido indolacético (AIA) sobre el enraizamiento de microestacas de trinitaria (*B. glabra*) cv. 'Magnifica', encontrando que en incubación por 30 días, los microesquejes cultivados en 0.5 mg/l de BA y 1.5 mg/l de AIA produjeron 10 nuevos microesquejes, ocurriendo la formación de raíces con 0.75 mg/l de ácido α -naftalaneacético por 30 días, seguido de 0.5 mg/l de ácido 2-4-5

triclorofenoxiacético, por 20-30 días, y además las raíces formadas fueron normales en un 60% de los cultivos.

Cabe destacar que el medio utilizado fue el de Murashige y Skoog (1962) modificado, difiriendo éste del original en las concentraciones en ppm de los siguientes componentes: NH_4NO_3 (1500), KNO_3 (500), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (200), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (100), Piridoxina – HCl (0.1), d-biotina (0.1), ácido ascórbico (5), α -arginina-HCl (10) y agar (7000).

Es notable resaltar que éste es uno de los trabajos más relevantes de obtención de raíces de la especie a estudiar en condiciones de cultivo de tejidos, siendo utilizada dicha técnica tal y como señala Torres (1988) citado por Ávila (1998) en plantas leñosas para producir material vegetal libre de enfermedades y en especial tanto para la producción masiva y rápida de genotipos idénticos a las plantas madres como para la introducción de nuevas variedades y/o genotipos.

IV.- MATERIALES Y MÉTODOS

4.1.- Enraizamiento de Estacas:

4.1.1.- Ubicación del Ensayo:

El enraizamiento fue realizado durante los meses de febrero a abril de 2002 en el cobertizo del Centro de Investigaciones en Biotecnología Agrícola (CIBA) – Instituto de Genética, ubicado a 450 msnm; en un propagador de neblina con una frecuencia de aspersion de 20 segundos cada 5 min, durante un período de 10 horas diarias.

4.1.2.- Material Vegetal:

Se indujo el enraizamiento de estacas sub-apicales de tallo provenientes de plantas de trinitaria (*B. glabra* Choisy) cv. sanderiana variegata, ubicadas en los jardines de la Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela y zonas aledañas a la misma. Las estacas empleadas fueron de 20 cm de longitud, del grosor de un lápiz (0,7 cm de diámetro aproximadamente) y sin hojas. (Figuras 1 y 3)



Figura 1.- Planta de *Bougainvillea glabra* Choisy cv. sanderiana variegata

A.- Planta

B.- Detalle de bráctea y hojas

C.- Estacas tomadas de la planta para su enraizamiento

4.1.3.- Metodología Aplicada:

Los tratamientos aplicados consistieron en diferentes dosis de ácido indolbutírico (AIB) preparado en etanol al 50%, discriminadas de la siguiente manera:

TRATAMIENTO	DOSIS (ppm)
T ₀ (Testigo)	0
T ₁	2000
T ₂	3000
T ₃	4000
T ₄	5000
T ₅	6000

Estas dosis fueron aplicadas a cada estaca, mediante la inmersión de la base de las mismas durante 1 segundo a 3 cm de profundidad en cada solución según el tratamiento. El número de estacas por pote fue de 10; y se realizaron 4 repeticiones por tratamiento.

Las estacas, una vez tratadas, se colocaron en maceteros de 15 cm de diámetro con un sustrato de enraizamiento compuesto por arena de río y aserrín de coco en proporción 1:1. (**Figura 2**).



Figura 2.- Maceteros con sustrato compuesto por arena de río y aserrín de coco en proporción 1:1, estacas a sembrar y soluciones de AIB en diferentes concentraciones.

Para evaluar el enraizamiento de las estacas en esta fase, se utilizó la escala empleada por Díaz *et al* (1994), la cual es la siguiente:

- Estacas sin enraizamiento o muertas (0) = 0
- Estacas con enraizamiento deficiente (D) = 1
- Estacas con enraizamiento regular (R) = 2
- Estacas con enraizamiento bueno (B) = 3
- Estacas con enraizamiento muy bueno (MB) = 4

Esta clasificación, presenta la ventaja de permitir evaluar la variable cualitativa calidad de enraizamiento y realizar las siguientes determinaciones:

- **Índice de Enraizamiento (IE):** Se procede a calcular un promedio ponderado con la frecuencia que se obtenga de la clasificación anterior, de acuerdo a la fórmula siguiente:

$$IE = (MBx4) + (Bx3) + (Rx2) + (Dx1) + (Ox0) / \text{total de estacas plantadas.}$$
- **Porcentaje de Enraizamiento (PE):** Se obtiene dividiendo el número de estacas con raíces entre el total de estacas plantadas y se divide entre cien.
- **Media del Número de Raíces (NR):** Contando las raíces por estaca y promediándose por macetero.
- **Peso Seco de la Raíz (PSR):** Se separa la parte radical de las estacas para luego secarla en la estufa durante 48 h a 65° C y finalmente pesarla.
- **Longitud Promedio de la Raíz más Larga (LPR):** Se mide la raíz más larga de cada estaca y se promedia por macetero.

El diseño del experimento en esta fase correspondió a un Diseño Completamente Aleatorizado. Para las variables medidas a través de la escala ordinal señalada anteriormente, los datos obtenidos fueron analizados Vía No Paramétrica (Kruskall-Wallis) con sus respectivas Pruebas de Medias; mientras que para las variables cuantitativas analizadas, en el caso de la longitud de las raíces, por no cumplirse los supuestos básicos del análisis de varianza, incluso realizando las transformaciones pertinentes para dicho caso, se procedió entonces a analizar los datos Vía No Paramétrica (Kruskall-Wallis).

Para la variable peso seco, por su parte, al no cumplirse los supuestos del análisis de varianza, se realizó la transformación de los datos a través de raíz cuadrada, cumpliéndose de esta manera dichos supuestos, razón por lo cual se procedió entonces a su análisis Vía Paramétrica mediante ANAVAR y con la aplicación de la Prueba de Medias de Duncan al 5% de significación.

4.2.- Enraizamiento de Miniestacas:

4.2.1.- Ubicación del Ensayo:

El enraizamiento fue realizado durante los meses de julio a septiembre de 2003 en umbráculo ubicado en Urb. El Piñal – El Limón, a 450 msnm, en un propagador de neblina con una frecuencia de aspersion de 20 segundos cada 5 min, durante un período de 10 horas diarias.

4.2.2.- Material Vegetal:

Se indujo el enraizamiento de miniestacas sub-apicales de tallo provenientes de plantas de trinitaria (*B. glabra* Choisy) cv. sanderiana variegata, ubicadas en los jardines de la Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela y zonas aledañas a la misma. (**Figuras 1 y 3**)

4.2.3.- Metodología Aplicada:

En este ensayo, se determinó el efecto de la interacción entre el tamaño de las estacas y las mejores dosis de AIB empleadas en el ensayo anterior sobre el enraizamiento, siendo las estacas empleadas del grosor de un lápiz (0,7 cm de diámetro aproximadamente) y sin hojas, discriminadas según su tamaño de la siguiente manera:

- ❖ Estacas de 1 nudo
- ❖ Estacas de 2 nudos
- ❖ Estacas de 3 nudos

Por su parte, los tratamientos aplicados consistieron en diferentes dosis de ácido indolbutírico (AIB) preparado en etanol al 50%, discriminadas de la siguiente forma:

TRATAMIENTO	DOSIS (ppm)
T ₀ (Testigo)	0
T ₁	2000
T ₂	3000
T ₃	4000

Estas dosis fueron aplicadas a cada miniestaca, mediante la inmersión de la base de las mismas durante 1 segundo a 3 cm de profundidad en cada solución según el tratamiento. El número de estacas por pote fue de 10; y se realizaron 3 repeticiones por tratamiento.

Las estacas, una vez tratadas, se colocaron en maceteros de 15 cm de diámetro, con un sustrato de enraizamiento compuesto por arena de río y aserrín de coco en proporción 1:1.

Para evaluar el enraizamiento de las miniestacas en esta fase, se utilizó la escala empleada por Díaz *et al* (1994), descrita en el ensayo anterior. El diseño del experimento en esta fase correspondió a un Diseño Completamente Aleatorizado.

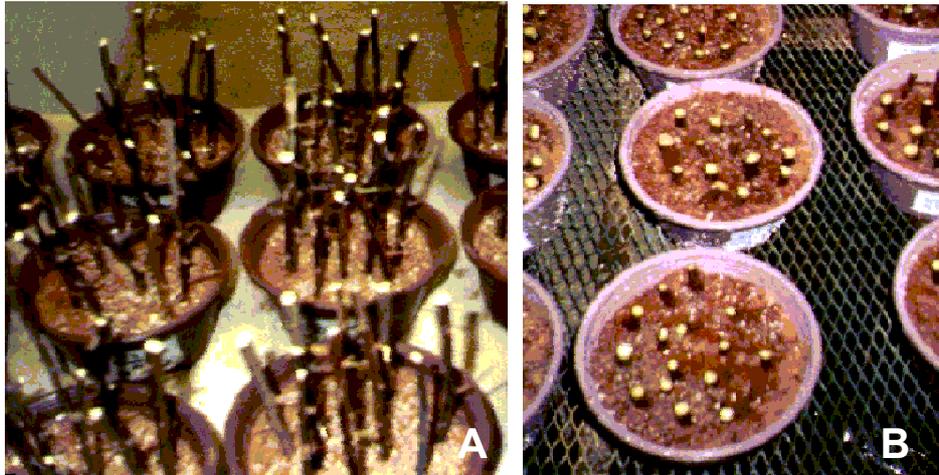


Figura 3.- Maceteros correspondientes a cada ensayo de enraizamiento.

A.- Estacas

B.- Miniestacas

4.3.- Protocolo de desinfección para la iniciación *in vitro* de Trinitaria:

Una vez determinada la dosis de AIB que mejor actuó sobre el enraizamiento de las estacas, se procedió al establecimiento de plantas madres para la obtención de los explantes a utilizar en la iniciación *in vitro*.

Dicho establecimiento se realizó inicialmente en el cobertizo del Centro de Investigaciones en Biotecnología Agrícola (CIBA) – Instituto de Genética, y posteriormente, se establecieron las plantas en umbráculo ubicado en Urb. EL Piñal - El Limón, manteniendo en ambos casos las condiciones anteriormente descritas, alargando sólo el intervalo de riego a partir del segundo montaje realizado a cada 15 min durante 20 días y posteriormente a cada 30 min durante los 25 días restantes, a fin de evitar efectos negativos por el exceso de humedad, dado el hecho de la entrada de la época de lluvia.

Una vez establecidas las plantas madres, se procedió a la obtención de los explantes, los cuales fueron ápices de 5 mm de largo.

Dado que no se contaba con los antecedentes para el establecimiento aséptico de ápices de esta especie en particular, se llevaron a cabo cuatro bioensayos a fin de determinar un protocolo adecuado para su desinfección. (**Figura 4**).

4.3.1.- Primer Ensayo:

Para la realización de este ensayo, el material vegetal, consistente de 10 explantes por cada tratamiento, fue colocado en medio de Murashige y Skoog modificado por Chatuverdi (1978), contentivo de 0.5 mg/l de BA y 1.5 mg/l de AIA, previa aplicación de los tratamientos de desinfección a probar, los cuales fueron:

T₁ = Solución jabonosa de yodo-povidona +etanol 70%

T₂ = Solución de Hipoclorito de Sodio al 0.5%

T₃ = Solución de Hipoclorito de Sodio al 1.0%

T₄ = Solución de Hipoclorito de Sodio al 1.5%

T₅ = Solución de Hipoclorito de Sodio al 5.0%

En el caso del tratamiento de solución jabonosa de iodo-povidona, previo lavado superficial del material vegetal con solución de jabón azul, fue aplicada la misma; luego, se procedió a su enjuague para posteriormente sumergir los explantes en etanol 70% y una vez en campana, enjuagarlos con agua destilada estéril 3 a 4 veces para finalmente realizar el corte e implantación de los mismos; mientras que en el caso de la aplicación de las diferentes dosis de hipoclorito de sodio, precedió:

- Lavado superficial de los explantes con la aplicación de solución jabonosa de jabón azul y sucesivos enjuagues para retirar la misma.
- Inmersión con agitación en etanol 70% por 30 seg, enjuagando luego de tres a cuatro veces con agua destilada.

Se trasladaron los explantes al cuarto estéril, a una cámara de flujo laminar marca Envirco (Enviromental Air Control C.A), y se colocaron en las diferentes soluciones de hipoclorito según el tratamiento a aplicar por espacio de 5 minutos con agitación y posteriores enjuagues sucesivos con agua destilada estéril para finalmente proceder al corte e implantación de los mismos.

La evaluación de este ensayo se realizó a través de observaciones semanales durante un mes, descartándose el material contaminado semanalmente.

4.3.2.- Segundo Ensayo:

Para este ensayo, se procedió en principio, al tratamiento preventivo con funguicida de las plantas madres, tratándolas con aspersiones de Captan + Sulfato de Cobre al 0.25% en proporción 1:1. Luego, se preparó nuevamente el medio de cultivo señalado en el ensayo anterior, estableciéndose en este caso 9 explantes por tratamiento para un total de 36.

Los tratamientos de desinfección aplicados en este ensayo fueron:

T₁ = Solución de Hipoclorito de Sodio al 0.5%

T₂ = Solución de Hipoclorito de Sodio al 1.0%

T₃ = Solución de Hipoclorito de Sodio al 1.5%

T₄ = Solución de Hipoclorito de Sodio al 5.0%

A la aplicación de estos tratamientos precedió:

- Lavado superficial de los explantes con la aplicación de solución jabonosa de jabón azul y sucesivos enjuagues para retirar la misma.

- Inmersión con agitación en etanol 70% por 30 seg.

Se trasladaron los explantes al cuarto estéril, a una cámara de flujo laminar marca NUAIRE (Laminar Flow Products), y se colocaron en las diferentes soluciones de hipoclorito según el tratamiento a aplicar por espacio de 5 minutos con agitación y posteriores enjuagues sucesivos con agua destilada estéril para finalmente proceder al corte e implantación de los mismos.

En este caso, se descartó la aplicación del tratamiento de solución jabonosa de iodo-povidona + etanol 70%, debido al alto grado y la severidad de la contaminación presentada por los explantes correspondientes al mismo en el ensayo anterior.

La evaluación de este ensayo se realizó a través de observaciones semanales durante un mes, descartándose el material contaminado semanalmente.

4.3.3.- Tercer Ensayo:

En este ensayo, se procedió en principio, al tratamiento preventivo con funguicida de las plantas madres, tratándolas con aspersiones de Captan + Sulfato de Cobre al 0.25% en proporción 1:1. Luego, se preparó nuevamente el medio de cultivo señalado en el primer ensayo, agregando al mismo 0.3 g/l de Benlate (Benomil) a fin de controlar la incidencia de agentes fúngicos registrados en los ensayos anteriores.

Esta vez se establecieron 10 explantes por tratamiento para un total de 40. Los tratamientos de desinfección aplicados en este ensayo fueron, al igual que en el ensayo anterior, los siguientes:

T₁ = Solución de Hipoclorito de Sodio al 0.5%

T₂ = Solución de Hipoclorito de Sodio al 1.0%

T₃ = Solución de Hipoclorito de Sodio al 1.5%

T₄ = Solución de Hipoclorito de Sodio al 5.0%

De igual manera, a la aplicación de estos tratamientos precedió:

- Inmersión del material vegetal recién cortado de las plantas madres en papel secante con solución de jugo de limón y agua fría a fin de disminuir la oxidación (oscurecimiento) presente en los explantes del ensayo anterior.
- Lavado superficial de los explantes con la aplicación de solución jabonosa de jabón azul y sucesivos enjuagues para retirar la misma.
- Inmersión con agitación en etanol 70% por 30 seg.

Se trasladaron los explantes al cuarto estéril, a una cámara de flujo laminar marca NUAIRE (Laminar Flow Products), y se colocaron en las diferentes soluciones de hipoclorito según el tratamiento a aplicar por espacio de 5 minutos con agitación y posteriores enjuagues sucesivos con agua destilada estéril para finalmente proceder al corte e implantación de los mismos.

La evaluación de este ensayo se realizó a través de observaciones semanales durante un mes, descartándose el material contaminado semanalmente.

4.3.4.- Cuarto Ensayo:

Para este ensayo, se procedió en principio, al tratamiento preventivo de las estacas, mediante inmersión de las mismas en una solución de Captan + Sulfato de Cobre al 1% en proporción 1:1 previa siembra de las mismas. Posteriormente,

dichas estacas fueron tratadas semanalmente con aspersiones de Captan al 3%. Luego, se preparó nuevamente el medio de cultivo, esta vez con dosis separadas de 0.5 y 1.0 ppm BA. Esta vez se establecieron 10 explantes por tratamiento para un total de 40.

De igual manera, a la aplicación de este tratamiento precedió:

- Inmersión del material vegetal recién cortado de las plantas madres en papel secante con solución de jugo de limón y agua fría a fin de disminuir la oxidación que se presentó en los explantes del ensayo anterior.
- Lavado superficial de los explantes con la aplicación de solución jabonosa de jabón azul y sucesivos enjuagues para retirar la misma.
- Inmersión con agitación en etanol 70% por 30 seg.

Se trasladaron los explantes al cuarto estéril, a una cámara de flujo laminar marca NUAIRE (Laminar Flow Products), y se colocaron en las diferentes soluciones de hipoclorito según el tratamiento a aplicar por espacio de 5 minutos con agitación y posteriores enjuagues sucesivos con agua destilada estéril para finalmente proceder al corte e implantación de los mismos.

La evaluación de este ensayo se realizó a través de observaciones semanales durante un mes, descartándose el material contaminado semanalmente.

Para todos los ensayos, los medios de cultivo una vez sembrados fueron colocados en cuarto climático a 27°C, con fotoperíodo de 16 h e intensidad lumínica de 100 $\mu\text{E} / \text{m}^2 \cdot \text{s}$.

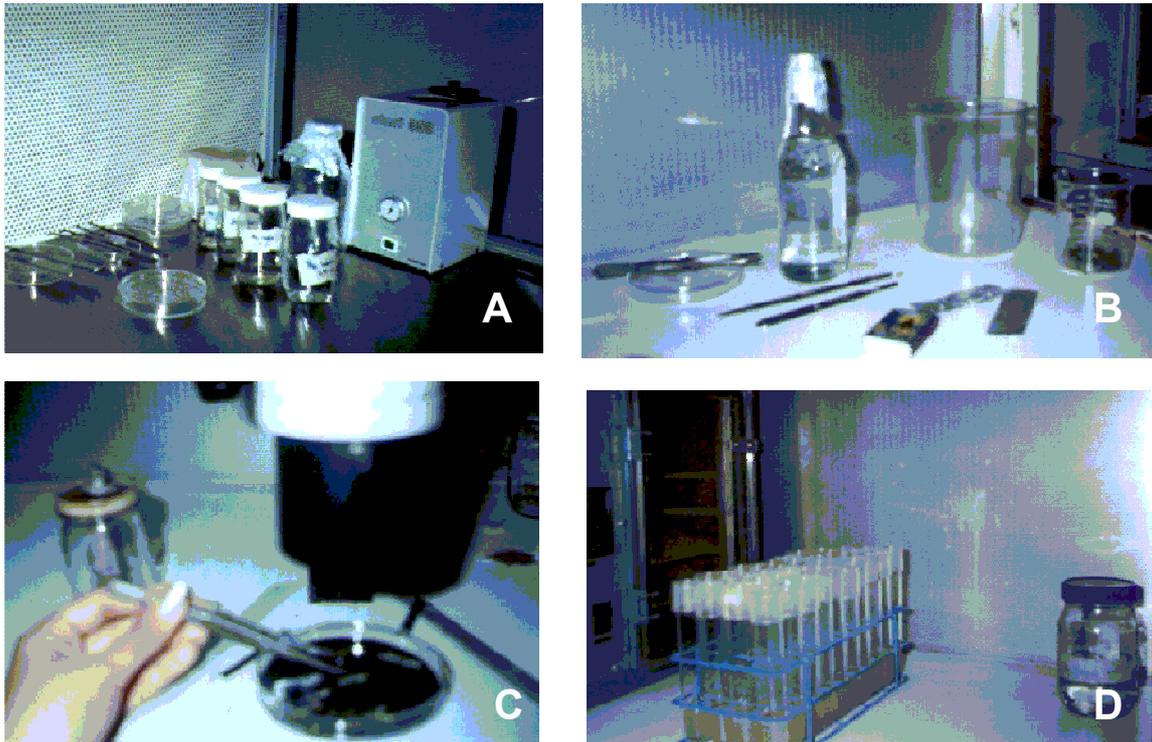


Figura 4.- Pasos generales de los ensayos de desinfección de explantes para su iniciación *in vitro*.

A.- Preparación de soluciones de Hipoclorito de Sodio e instrumentos a utilizar

B.- Explantes ya tratados con etanol al 70% para su desinfección con soluciones de Hipoclorito de Sodio

C.- Corte de los explantes a 5 mm de largo para su implantación

D.- Explantes ya implantados en el medio de cultivo contenido en los tubos de ensayo

V.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1.- Evaluación del Enraizamiento de Estacas:

Una vez efectuadas las evaluaciones respectivas y realizado el análisis estadístico correspondiente, se observó la existencia de diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las variables peso seco, número de raíces, índice de enraizamiento, porcentaje de enraizamiento y longitud de las raíces de las estacas evaluadas en este estudio, al comparar los resultados obtenidos de la aplicación de diferentes dosis de AIB respecto al testigo, tal y como se muestra en el siguiente cuadro:

Cuadro 1.- Comparación de medias de los tratamientos aplicados para cada una de las variables de enraizamiento evaluadas *.

TRAT.	INDICE DE ENRAIZAMIENTO	ESTACAS ENRAIZADAS	MEDIA DEL N° RAÍCES	PESO SECO (g)	LONGITUD PROMEDIO DE LAS RAÍCES (cm)
T ₀	0.20 c	0.35 b	1.325 d	0.00997 b	0.41 d
T ₁	1.075 b	0.975 a	3.500 b c	0.10685 a b	7.2475 a b
T ₂	0.925 b	0.70 a b	3.875 b c d	0.1103 a b	4.325 b c
T ₃	2.30 a	0.925 a	15.675 a	0.30517 a	9.2175 a
T ₄	1.325 b	0.675 a b	10.925 a b	0.22357 a	6.7475 a b c
T ₅	0.70 b c	0.50 b	4.15 c d	0.24242 a	3.3475 c d

* Las letras iguales significan que no existen diferencias significativas entre tratamientos. $\alpha = 0.05$

T₀ = Testigo

T₃ = 4000 ppm

T₁ = 2000 ppm

T₄ = 5000 ppm

T₂ = 3000 ppm

T₅ = 6000 ppm

5.1.1.- Índice de Enraizamiento:

En relación a la variable **índice de enraizamiento (IE)**, se observa en la **Figura 5**, que el mayor índice corresponde al tratamiento 3 (4000 ppm), influenciada a su vez la expresión de esta variable, por los altos valores de la media del número de raíces y la longitud promedio de las raíces formadas en dicho tratamiento; el cual difiere del resto, siendo por su parte homogéneos entre sí, los tratamientos 1, 2, 4 y 5.

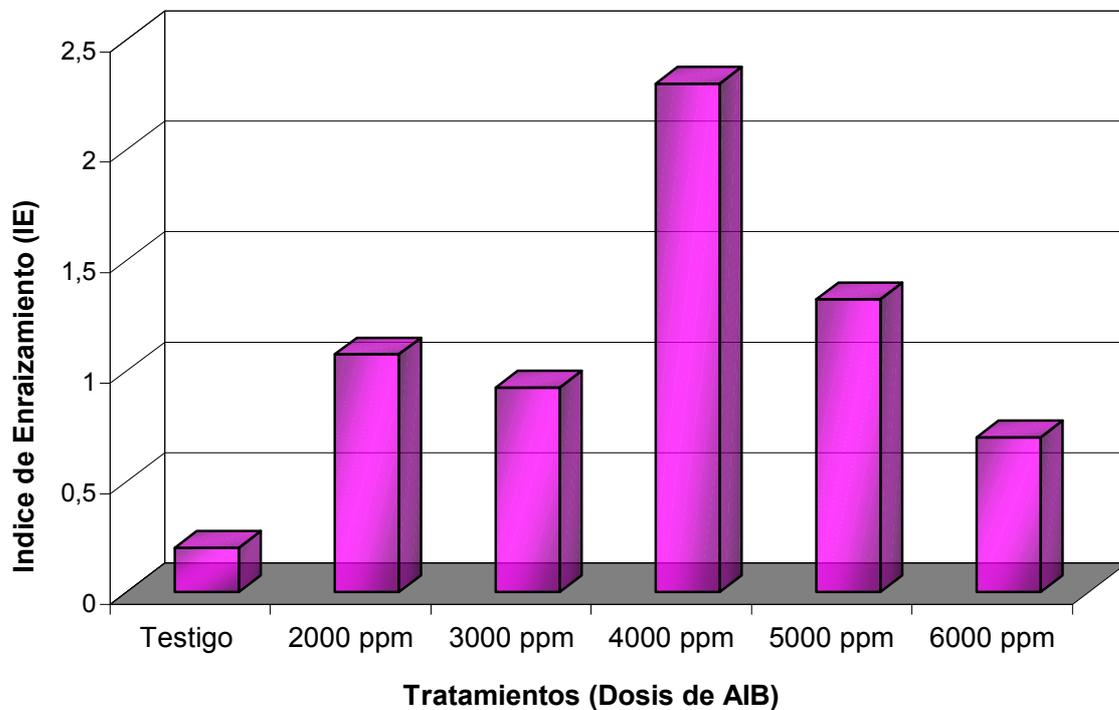


Figura 5.- Índice de Enraizamiento (IE) de Estacas de Trinitaria (*Bougainvillea glabra* Choisy) cv. sanderiana variegata tratadas con diferentes dosis de ácido indolbutírico (AIB)

5.1.2.- Porcentaje de Enraizamiento:

Al evaluar el **porcentaje de estacas enraizadas**, en la **Figura 6** se aprecia que no existen diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los tratamientos 1,2,3 y 4 y entre los los tratamientos 0,2,4 y 5.

Cabe destacar que con la primera serie mencionada de tratamientos, se obtuvieron los mayores porcentajes de estacas enraizadas por tratamiento, destacando en este caso el tratamiento 1 (2000 ppm), en el cual, de 40 estacas plantadas, enraizaron 39, lo cual arroja un **porcentaje de enraizamiento (PE)** de 97.5%, seguido por el tratamiento 3 (4000 ppm) con 92.5%, luego el tratamiento 2 (3000 ppm) con 70% y el tratamiento 4 (5000 ppm) con 67.5%.

Este resultado es particularmente destacable, dado que en ensayos previos con *B. glabra* Choisy, tal y como el realizado por Zowain (1984) el mayor porcentaje de enraizamiento alcanzado fue de 53.3% con la dosis de 5000 ppm de AIB , mientras que en el presente trabajo, se encontró un porcentaje de enraizamiento superior al 60% con la misma dosis y porcentajes superiores al 90% con dosis más bajas, destacando particularmente la dosis de 2000 ppm, con la cual el porcentaje de enraizamiento obtenido fue cercano al 98%.

Por otra parte, Czekalski (1989), aplicando dosis de 2000 y 4000 ppm de AIB a estacas del mismo cultivar de trinitaria, encontró que dichas estacas enraizaron en un rango comprendido entre 66 a 88%, resultados éstos también superados por los obtenidos en el presente trabajo.

En la especie *Prunus persica*, Dutra *et al* (1999) encontraron que el mayor porcentaje de estacas enraizadas se obtuvo con la concentración de 2000 ppm AIB.

Vlasica (1977) citado por Al-Saqri y Alderson (1996), encontró, al probar seis sustancias reguladoras para el enraizamiento de estacas de olivo, que la mejor de ellas fue el AIB en dosis de 2000 y 2500 ppm.

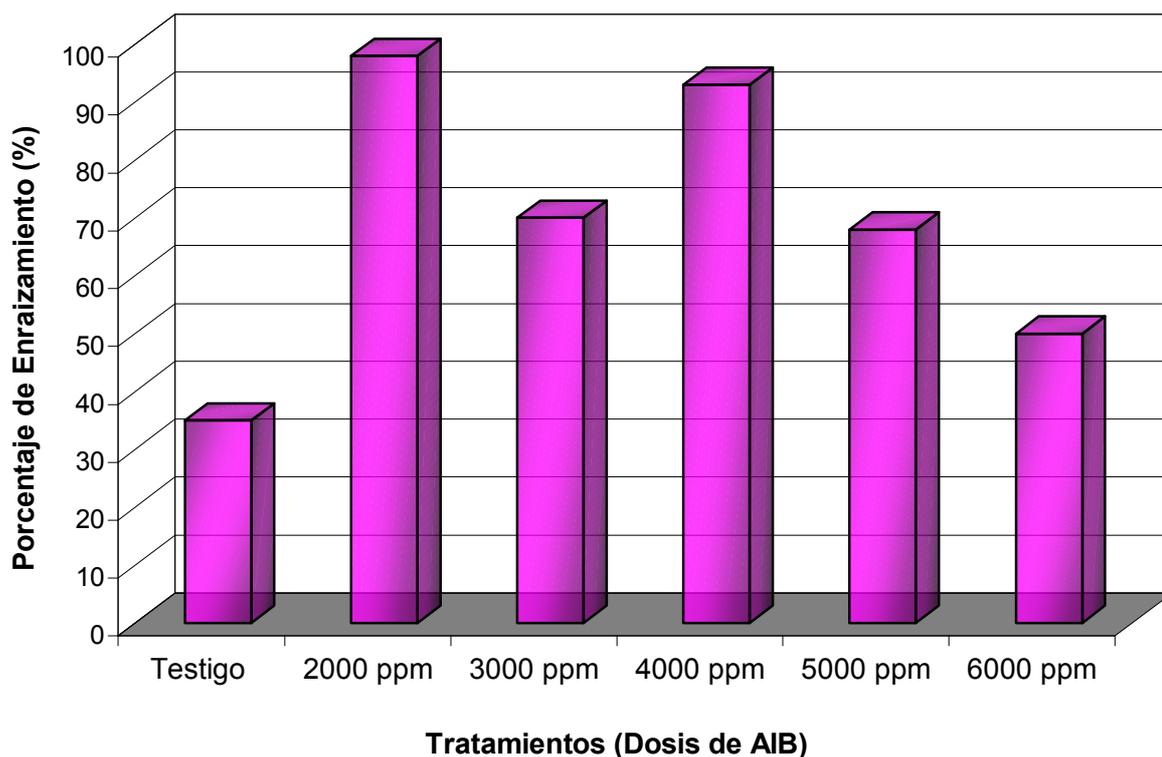


Figura 6.- Porcentaje de Enraizamiento (PE) de Estacas de Trinitaria (*Bougainvillea glabra* Choisy) cv. sanderiana variegata tratadas con diferentes dosis de ácido indolbutírico (AIB)

5.1.3.- Media del Número de Raíces:

En cuanto al **número de raíces (NR)**, en la **Figura 7** se observa que los tratamientos 3 (4000 ppm) y 4 (5000 ppm) indujeron los mayores números de raíces promedios por pote; mientras que el análisis estadístico revela que las diferencias no son significativas ($p > 0.05$).

Este resultado coincide tanto con el resultado obtenido por Covatta y Borscak (1991), quienes en *Actinidia deliciosa* encontraron que el mayor número total de raíces por tratamiento fue obtenido con la dosis de 4000 ppm de AIB, como con el encontrado por Espinoza (1983), quien en otra planta leñosa como el semeruco (*Malpighia glabra*), encontró que las mejores respuestas en el enraizamiento se observaron el tratamiento de 5000 ppm de AIB, tanto para el número de estacas enraizadas como para el número promedio de raíces por estacas.

Es necesario señalar que si bien estos tratamientos presentan el mayor número de raíces, se observó al momento de la evaluación que las mismas eran muy largas, delgadas y débiles; además de presentar diferencias de hasta el doble entre el número de raíces presentes por cada pote evaluado dentro de un mismo tratamiento, a diferencia del tratamiento 1 (2000 ppm), en el cual la diferencia entre el número de raíces presentes por cada pote es menor; no presentando diferencias significativas ($p > 0.05$) desde el punto de vista estadístico respecto a los tratamientos 4 (5000 ppm) y 2 (3000 ppm).

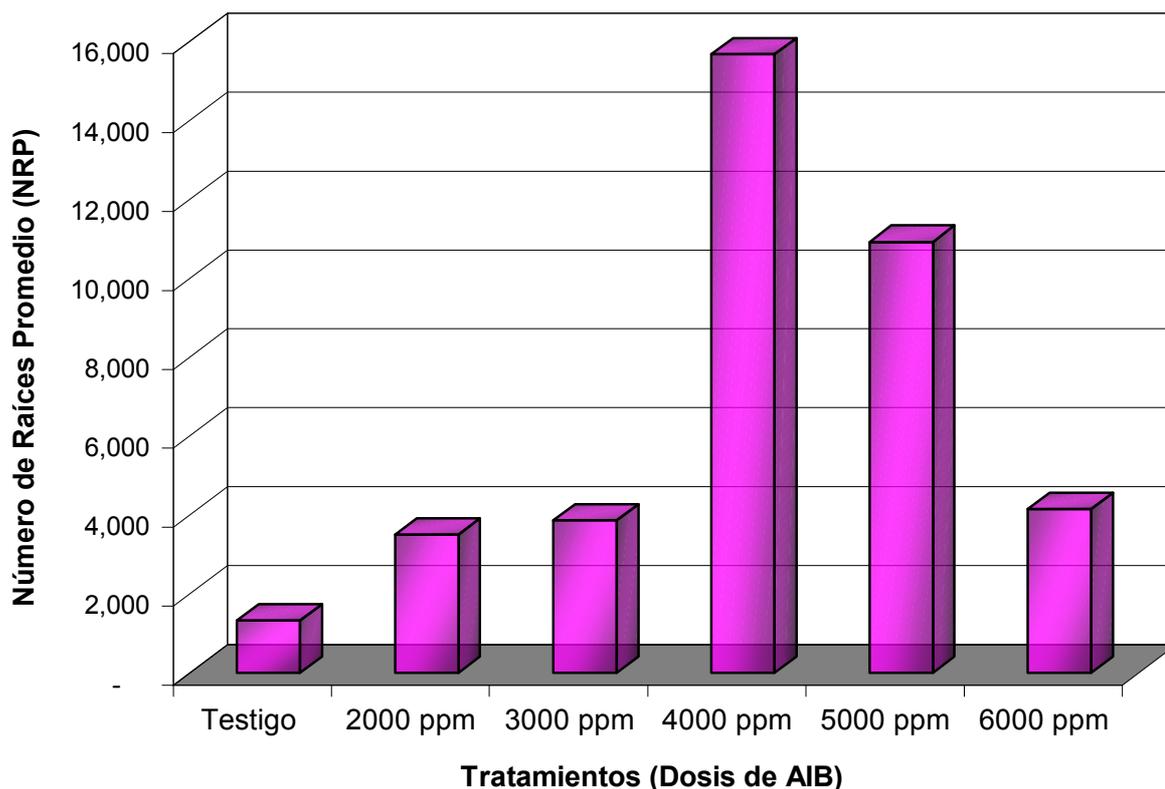


Figura 7.- Número de raíces Promedio (NRP) en Estacas de Trinitaria (*Bougainvillea glabra* Choisy) cv. sanderiana variegata tratadas con diferentes dosis de ácido indolbutírico (AIB)

5.1.4.- Peso Seco:

En relación al **peso seco (PS)**, se observa, desde el punto de vista estadístico, que los tratamientos 1,2,3,4 y 5 son homogéneos entre sí, difiriendo sólo del testigo, el cual obtuvo el menor valor promedio (cerca a cero) en la medición de esta variable. (**Figura 9**).

Es notable destacar como los mayores pesos secos se registran a medida que son mayores las concentraciones de AIB, hasta la concentración de 4000 ppm, tal y como se observa en la **Figura 8**, dado que en las estacas tratadas con dichas dosis, las raíces son más abundantes, determinando por tanto, mayores pesos.

Por otra parte, se observa a partir de la dosis de 4000 ppm de AIB, que los tratamientos aplicados no presentan una influencia marcada en la expresión de esta variable.

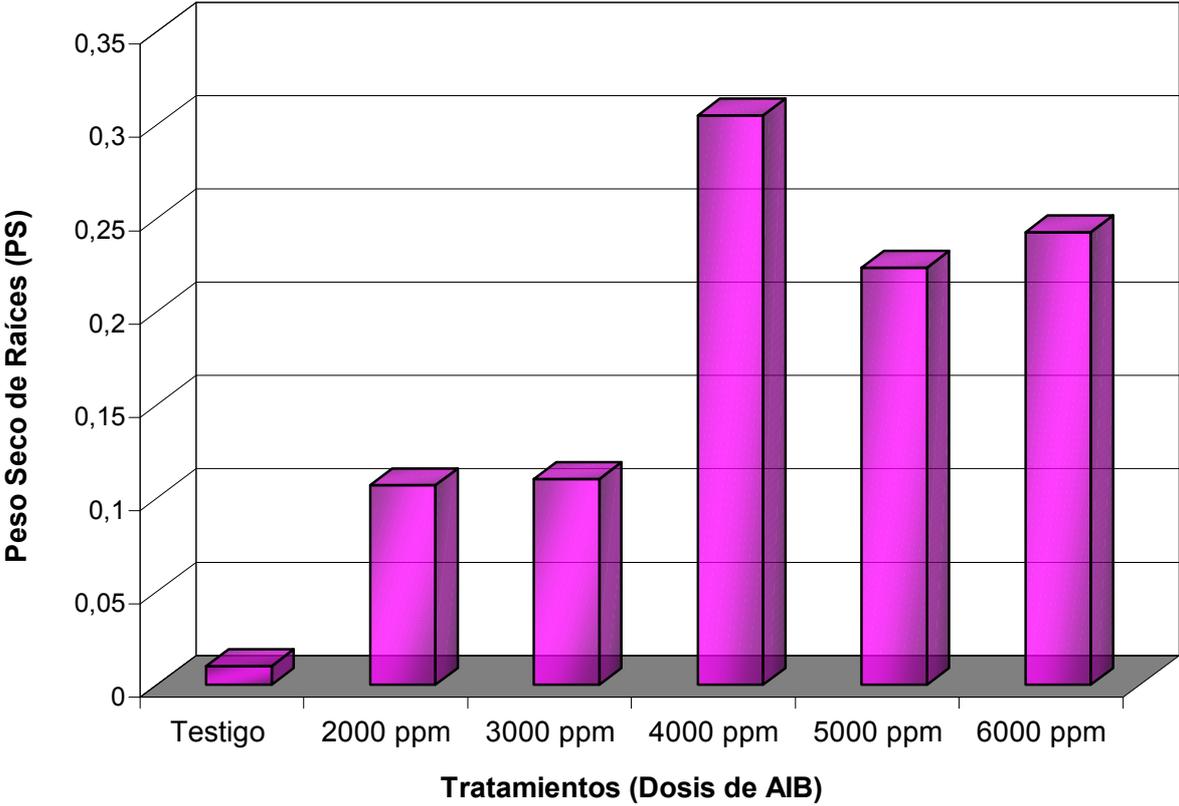


Figura 8.- Peso Seco (PS) de Raíces de Estacas de Trinitaria (*Bougainvillea glabra* Choisy) cv. sanderiana variegata tratadas con diferentes dosis de ácido indolbutírico (AIB)

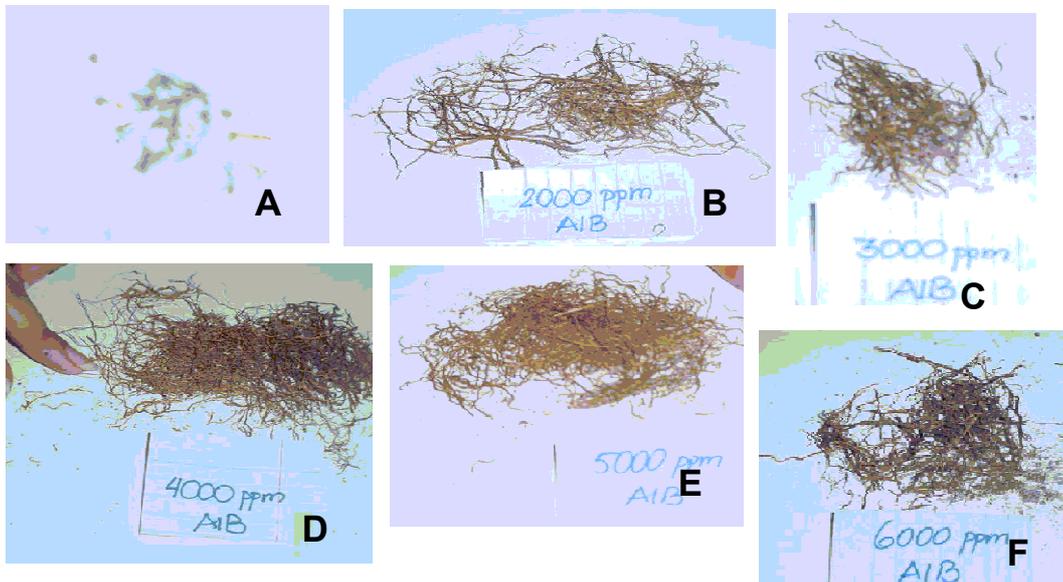


Figura 9.- Comparación de las raíces formadas en las estacas tratadas con cada dosis de AIB y el testigo, secadas en estufa para determinar su peso seco.

A.- Testigo

B.- 2000 ppm AIB

C.- 3000 ppm AIB

D.- 4000 ppm AIB

E.- 5000 ppm AIB

F.- 6000 ppm AIB

Es necesario destacar, que al realizar el Análisis de Correlación a través de la Prueba de Spearman, entre las variables media del número de raíces y peso seco, dicha correlación resultó positiva, es decir, que a medida que el número de raíces formadas por tratamiento es mayor, así también lo es el peso seco.

En el caso del tratamiento 5 (6000 ppm de AIB), se observa que el peso seco de las raíces formadas en este tratamiento, no presenta, desde el punto de vista estadístico, diferencias significativas con los tratamientos 1,2,3 y 4; sin embargo, se aprecia que el mismo es muy similar al de los tratamientos 3 (4000 ppm AIB) y 4 (5000 ppm), a pesar de presentar menor número de raíces y menor longitud promedio de las raíces que éstos, ya que las raíces formadas con 6000 ppm de AIB, fueron muy cortas pero gruesas, aportando por lo tanto, mayor peso seco.

5.1.5.- Longitud Promedio de la Raíz más Larga:

En cuanto a la **longitud promedio de la raíz (LPR)**, no existen diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los tratamientos 3 (4000 ppm), 1 (2000 ppm) y 4 (5000 ppm); siendo éstos los que arrojaron los mayores valores para esta variable, tal y como se observa en la **Figura 10** .

Sin embargo, es necesario destacar que con las dosis de 4000 y 5000 ppm de AIB, se observó que las raíces formadas, a pesar de presentar mayor longitud, también eran más débiles, finas y quebradizas (**Figura 11**) comparadas con las formadas en las estacas tratadas con 2000 ppm de AIB, las cuales se presentaban más firmes, gruesas y resistentes (**Figura 12**). Estos resultados a su vez, difieren de los de Zowain (1984) quien encontró los mejores resultados para esta variable en trinitaria, sólo con la dosis de 5000 ppm de AIB.

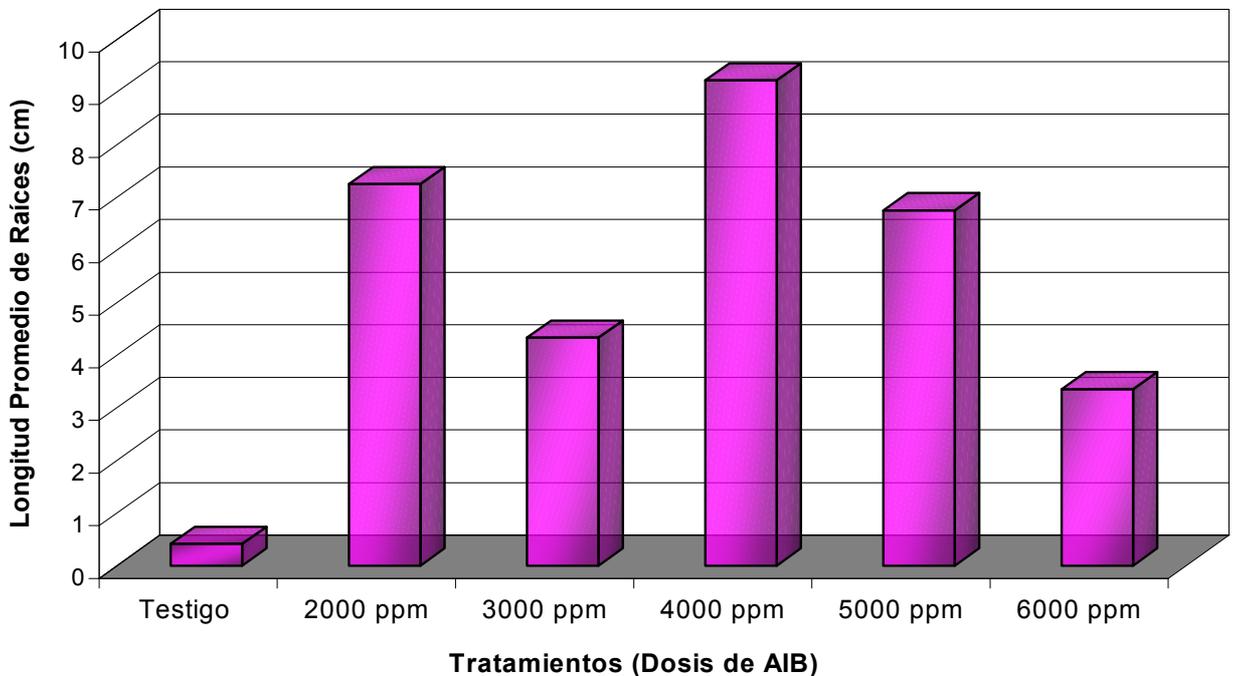


Figura 10.- Longitud Promedio de Raíces (LPR) de Estacas de Trinitaria (*Bougainvillea glabra* Choisy) cv. sanderiana variegata tratadas con diferentes dosis de ácido indolbutírico (AIB)



Figura 11.- Detalle de raíz delgada, larga y débil formada en estacas tratadas con 5000 ppm AIB.



Figura 12.- Detalle de raíces gruesas, firmes y resistentes formadas en estacas tratadas con 2000 ppm AIB.

De las observaciones realizadas, se puede inferir que la dosis que presenta la influencia más positiva sobre la calidad del enraizamiento y las raíces formadas en las estacas tratadas, es la de 2000 ppm de AIB, dado que con la aplicación de la misma se obtienen buenos resultados en cuanto al porcentaje de estacas enraizadas y la calidad de las raíces formadas, siendo éstas más gruesas, firmes y resistentes que las formadas en estacas tratadas con 4000 y 5000 ppm de AIB, así como un notable desarrollo de la parte aérea; además, dicha dosis resulta más económica para el viverista por requerir menos cantidad de producto en su preparación, beneficiando la calidad final de las plantas producidas.

5.2.- Evaluación del Enraizamiento de Miniestacas:

En relación al enraizamiento de miniestacas, se procedió a realizar un muestreo a los 30 días de plantadas, sin embargo, al observarse la ausencia de raíces, se procedió a evaluar el ensayo a los 45 días del mismo.

Una vez transcurrido el período de enraizamiento, se procedió a evaluar las estacas sembradas, observándose aún la ausencia de enraizamiento por parte de las mismas. Finalmente, las estacas fueron evaluadas en su totalidad a los 15 días siguientes, observándose sólo el enraizamiento de dos estacas de 3 nudos correspondientes al tratamiento de 3000 ppm de AIB, las cuales desde un principio mostraron mejor aspecto y mayor desarrollo de brotes y hojas de la parte aérea.

A pesar del escaso enraizamiento por parte de las estacas, se pudo observar que las estacas de 2 y 3 nudos presentaron mejor aspecto y desarrollo de la parte aérea, en especial éstas últimas, comparadas con las estacas de 1 nudo, en las cuales el desarrollo de la parte aérea fue nulo. (**Figura 13**)

Estos resultados coinciden en parte con lo obtenido en miniestacas de *Trichantera* por Krause (1990) citado por Gómez y Murgueitio (1991), y por Díaz (1984) en *Rosa sp*, dado que el enraizamiento de ambas especies al comparar distintos tamaños de estacas, fue mayor con estacas de 3 nudos que con estacas de 1 ó 2 nudos.

Por otra parte, estos resultados difieren de los obtenidos en el ensayo de enraizamiento de estacas realizado anteriormente probando diferentes dosis de AIB en estacas de 5 nudos, en el cual se obtuvo enraizamiento tanto en el testigo como en los diferentes tratamientos.

Estas diferencias pueden encontrar sus causas en la incidencia tanto de la época de recolección y siembra del material vegetal como en el clima y frecuencia de riego, dado que dicho ensayo a diferencia del anterior se estableció durante el período de lluvia, razón por la cual se regularon los riegos dentro del propagador, sin embargo, la incidencia de una alta humedad relativa existente en el ambiente por las sucesivas precipitaciones, afectó negativamente el enraizamiento y la ausencia de radiación solar suficiente, el desarrollo de brotes y hojas de dichas estacas, ya que estas condiciones ambientales no son las adecuadas y requeridas para la especie.

Esto coincide con lo expuesto por Hartmann y Kester (1992) quienes indican que, en algunos casos, la estación del año puede tener enorme influencia en los resultados obtenidos y puede ser la clave para obtener un enraizamiento exitoso; respecto a ello señalan los autores que, es posible obtener un excelente enraizamiento bajo niebla, de estacas de olivo foliosas a finales de primavera y en el verano, mientras que el enraizamiento se reduce casi a cero si se toman estacas similares a mediados de invierno.

Por otra parte, reportan que en el caso de estacas de *Ficus infectoria*, éstas enraizan mejor durante la primavera y el verano, cuando la actividad cambial está en su punto más alto, disminuyendo a cero durante el otoño y el invierno, cuando cesa la actividad del cámbium.

Ochse *et al* (1965) señalan en relación a la incidencia de la estación climática sobre el desarrollo vegetativo, que en el caso de las plantas del género *Annona*, las mismas prosperan bien en regiones relativamente secas, destacando que la anona colorada (*Annona reticulata* L.) y la anona blanca (*Annona squamosa*) no resisten los períodos prolongados de tiempo fresco, sin embargo, toleran bien la sequía.

Destacan además que, en plantas como el olivo, al propagarse por medio de estacas, el enraizamiento se obtiene bajo humedecimiento de lluvia ligera; requiriendo este tipo de propagación un buen criterio respecto a la cantidad de agua aplicada, empleando la aspersion más fina posible, solamente para conservar húmedas las estacas, dado que, demasiada humedad, puede inducir el desarrollo de callos a expensas de la producción de raíces.

De acuerdo a Torres (1968), la trinitaria se desarrolla comúnmente en zonas cálidas y secas como Cumaná en el Edo. Sucre y sus alrededores, asimismo, destaca Schnee (1973) que la *B. glabra* es menos frecuente en el país que la *B. spectabilis*.

Por otra parte, es necesario destacar que esta planta encuentra las condiciones ideales para su desarrollo en la formación definida por Ewel *et al* (1976) como bosque muy seco tropical, del cual muchas áreas son consideradas “áridas” debido a la presencia de muchas plantas espinosas en su flora, tal como la trinitaria.

Respecto a la influencia del número de nudos y tamaño de las estacas en el enraizamiento, Michelangelli (1978) citado por Díaz (1983), indica que, en Venezuela, trabajando con 3 tamaños de estaca de *Rosa indica* (los cuales comprendían estacas de 10.5 a 18 cm, 18.5 a 22 cm y 14 a 26.5 cm) y con tres números de yemas por estaca (4,5 y 6 yemas) encontró mayor peso seco a mayor tamaño de estaca y a mayor número de yemas; lo cual indica, de manera general, que estacas más grandes y con mayor cantidad de nudos, presentan mayores posibilidades de enraizamiento, desarrollo de brotes y hojas, así como mayor sobrevivencia.



Figura 13.- Miniestacas de 1, 2 y 3 nudos de trinitaria (*Bougainvillea glabra* Choisy) cv. sanderiana variegata plantadas para su enraizamiento.

5.3.- Evaluación de los Bioensayos para definir un Protocolo de Desinfección para la Iniciación *in vitro* de Trinitaria:

5.3.1.- Evaluación del Primer Ensayo:

En las sucesivas evaluaciones realizadas, se observó que la contaminación se encontraba presente en todos los tratamientos evaluados, siendo ésta total en los mismos a la cuarta semana de evaluación.

En el caso del tratamiento de solución de hipoclorito de sodio al 0.5% (T₂) , se observó contaminación creciente a partir de la primera semana de evaluación , sin embargo, se observó emisión de hojas en 3 explantes al mes de haber iniciado el ensayo.

De igual manera, en el tratamiento con solución de hipoclorito al 1.5% (T₄) sólo 5 explantes presentaban principio de emisión de brotes (hojas) y el medio sin presencia aparente de contaminación a las 3 semanas de montado el ensayo; sin embargo, a la cuarta semana se presentó contaminación severa en los 10 explantes presentes al momento de la evaluación para este tratamiento.

En el caso del tratamiento con solución de hipoclorito de sodio al 1% (T₃) la contaminación fue más acentuada al final de la evaluación, contando aún para este momento con un mayor número de explantes en relación a los tratamientos restantes. Es necesario destacar que a una semana de haberse montado el ensayo, fue este tratamiento el que presentó menor contaminación en comparación al resto de los tratamientos.

Para el tratamiento con solución de hipoclorito de sodio al 5% (T₅), en este se observó alta contaminación desde el inicio del ensayo, igualmente para el tratamiento con solución de yodo-povidona + etanol 70% (T₁), en el cual la contaminación fue total y severa en todos los explantes montados.

Con el fin de determinar que tipos de agentes contaminantes se encontraban presentes tanto en los medios de cultivo como en el material vegetal original, fueron enviadas a la Clínica de Plantas de la Sección de Fitopatología de la Facultad de Agronomía – U.C.V, las muestras correspondientes a cada tratamiento.

Una vez realizados los análisis fitopatológicos correspondientes, utilizando el método de preparados microscópicos, se obtuvieron los siguientes resultados:

Cuadro 2.- Resultados del Análisis Fitopatológico de muestras provenientes de cultivos *in vitro* de Trinitaria (*Bougainvillea glabra* Choisy) cv. sanderiana variegata.

TRATAMIENTOS	RESULTADOS
T₁ (Sol. Detergente + Etanol 70%)	Bacterias Gram (+), no fitopatógenas Hongo con micelio pigmentado, septado y conidios unicelulares (N.I*).
T₂ (Sol. Hip. Sodio 0.5%)	<i>Aspergillus sp.</i>
T₃ (Sol. Hip. Sodio 1.0%)	Bacterias Gram (-), posiblemente fitopatógenas.
T₄ (Sol. Hip. Sodio 1.5%)	Ácaros, <i>Aspergillus sp.</i>
T₅ (Sol. Hip. Sodio 5.0%)	Bacterias Gram (-), posiblemente fitopatógenas. Hongos de micelio hialino, septado y conidios unicelulares (N.I*).

* N.I: No Identificados.

5.3.2.- Evaluación del Segundo Ensayo:

En este ensayo, se observó la presencia de agentes fitopatógenos, cuya presencia fue confirmada por los análisis de laboratorio realizados en la Clínica de Plantas de la Sección de Fitopatología de la Facultad de Agronomía – U.C.V, mediante la aplicación del método de impresión con celotape a muestras correspondientes a cada uno de los tratamientos aplicados. Los agentes presentes fueron 3 hongos no identificados posiblemente saprofitos y *Fusarium sp*; sin embargo, la aparición de éstos fue más lenta y progresiva que la de los agentes presentes en los ensayos anteriores, con ausencia aparente de agentes bacterianos.

Por otra parte, en este caso se apreció la oxidación fenólica y oscurecimiento de los explantes sembrados luego de una semana, lo cual según Scott (1975) citado por Graterol (1992), es el resultado de la polimerización oxidativa de las quinonas a partir de 0-dihidroxifenoles o monofenoles.

En cuanto a la efectividad de los tratamientos de desinfección superficial aplicados, tal y como se muestra en la **Figura 14**, se pudo observar a la cuarta semana de evaluación, que la mayor contaminación se presentó en el tratamiento de solución de hipoclorito al 0.5% (T₁) con 89% de explantes contaminados; a este tratamiento siguen, de mayor a menor presencia de contaminación, el de solución de hipoclorito al 5% (T₄) con 78%, al 1.5 % (T₃) con 67% y por último el de solución de hipoclorito al 1% (T₂) con 56%, el cual presentó el menor porcentaje de contaminación. Sin embargo, en este ensayo, la causa de la muerte de la totalidad de los explantes y el principal problema que se presentó, fue la oxidación de los mismos.

Cabe destacar que a pesar del alto porcentaje de contaminación presente en el tratamiento de solución de hipoclorito al 0.5% (T₁), esta contaminación ocurrió

gradualmente, siendo de hecho, en uno de los explantes correspondientes a este tratamiento donde se observó inicio de brotación, oxidándose luego el mismo.

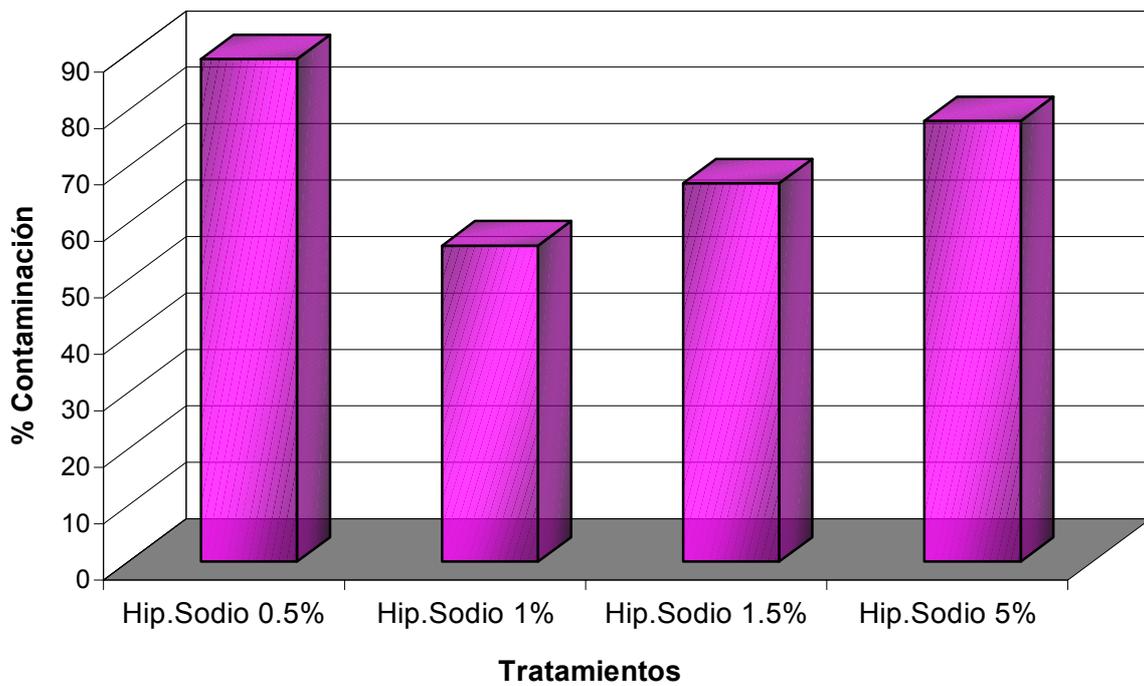


Figura 14.- Porcentajes de Contaminación Fúngica presente en muestras del 2do Ensayo de Desinfección con diferentes dosis de Hipoclorito de Sodio

5.3.3.- Evaluación del Tercer Ensayo:

En este ensayo, se observó un buen control de los agentes fúngicos, los cuales se encontraron ausentes. Igualmente, se apreció el control de la oxidación en los explantes sembrados, los cuales presentaban ausencia de daños necróticos y coloración marrón tostado, síntoma característico de éste proceso.

Sin embargo, se encontró desde la primera semana de evaluación, la presencia de bacterias Gram (+), no patógenas, endógenas; detectadas en principio por los exudados presentes en los explantes o bien en la base de los mismos, cuya presencia fue confirmada por los análisis de laboratorio realizados en la Sección de Fitopatología de la Facultad de Agronomía – U.C.V., encontrándose la misma alrededor del material vegetal sembrado y expandiéndose de allí a las paredes de los tubos de ensayo más afectados, los cuales correspondieron a los tratamientos de solución de hipoclorito al 1.5% (T₃).

Se observó además, tal y como se aprecia en la **Figura 15** que la presencia de dichas bacterias, mermaron la mayoría de los explantes, quedando sólo 2 para la dosis de 0.5% de Hipoclorito de Sodio, 1 para la de 1%, ninguno para la de 1.5% y 3 para la de 5% al final de la evaluación; presentando éstos últimos un indicio de crecimiento y mayor tamaño.

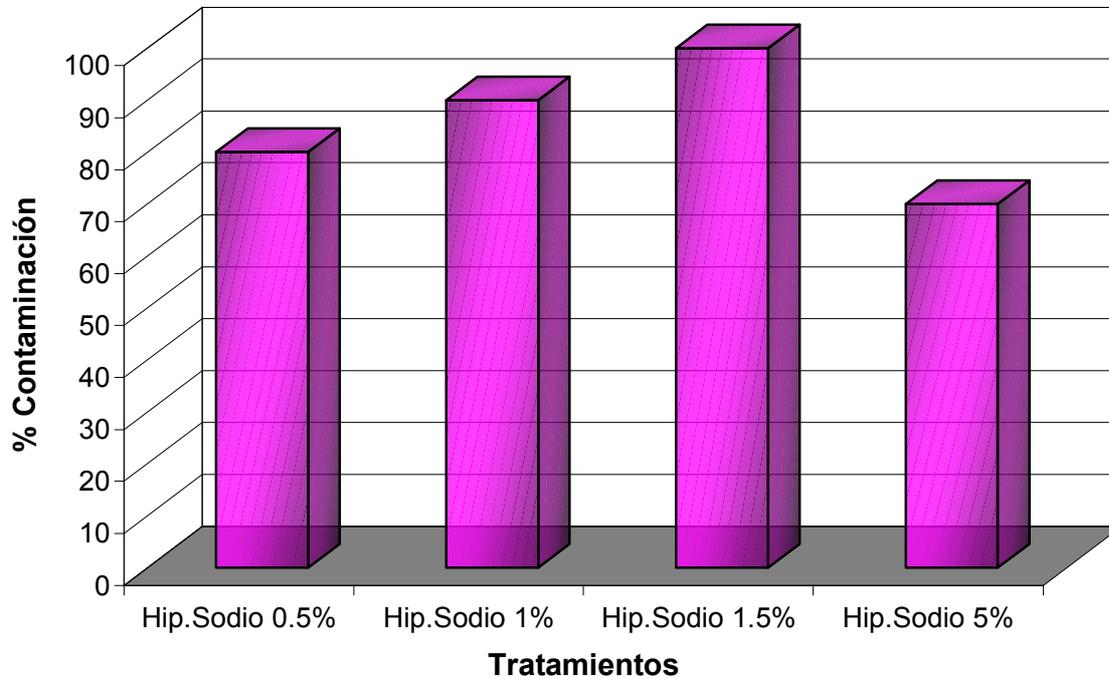


Figura 15.- Porcentajes de Contaminación Bacteriana encontrada en muestras del 3er Ensayo de Desinfección con diferentes dosis de Hipoclorito de Sodio

5.3.4.- Evaluación del Cuarto Ensayo:

Una vez efectuado dicho ensayo, se encontró contaminación bacteriana desde la primera semana de evaluación, tanto en las muestras de 0.5 ppm BA como en las de 1.0 ppm BA. Sin embargo, es importante señalar que en los mismos se encontraron ausentes agentes fúngicos. En este caso, tal y como se ilustra en la **Figura 16** se encontró que con el tratamiento de 0.5% de Hipoclorito, resultaron contaminadas el 50% de las muestras, seguido de mayor a menor por el de solución de Hipoclorito al 5% con 40% de contaminación, luego la de 1.5% con 30%, y finalmente, con el menor porcentaje de contaminación, el de 1% con 10% de contaminación.

Es necesario destacar que, a pesar de disminuir los porcentajes de contaminación bacteriana respecto al ensayo anterior, y no presentar contaminación fúngica, los explantes que no presentaban síntomas de contaminación, presentaron ausencia de respuesta fisiológica, permaneciendo en un estado de latencia sin manifestación alguna, lo cual ha sido observado por Torres (1988) citado por Ávila (1998) quien explica que las plantas leñosas se comportan de forma diferente a las herbáceas al aplicar la técnica de propagación *in vitro*, siendo generalmente de lenta propagación y con complejo ciclo de latencia y desarrollo.

Por otra parte, Ávila (1998) al estudiar las respuestas morfogénicas de la trinitaria, encontró para el cv. sanderiana variegata sólo la formación de callos, presentándose dicha formación únicamente en las combinaciones de AIA y TDZ, no así en las combinaciones de AIA y BA también probadas. Además, destaca el autor el hecho de que al comparar el cv. sanderiana variegata con la *B. glabra*, se halló un 50.5% de explantes sin respuesta morfogénica para la primera y un 11.5% para la segunda.

En cuanto a la solución de Hipoclorito de Sodio a emplear en la desinfección superficial de los explantes, una vez realizado el análisis de varianza y no encontrar diferencias significativas entre las soluciones evaluadas, se recomienda emplear la solución de Hipoclorito de Sodio al 1% , dado que de las mismas, fue la que mostró un mejor control de la contaminación en los ensayos realizados.

Cabe mencionar que, en estos ensayos, no fue pertinente la aplicación de antibióticos, ya que si bien los mismos, tal y como señalan Villalobos y Torpe (1991) pueden ser de utilidad para la desinfección de los explantes, en general, su empleo solamente se justifica en casos de excepción y en cultivos de corta duración, ya que la alta especificidad de los antibióticos implican que no previenen la proliferación de todos los microorganismos, además de que no previenen la proliferación de todos los microorganismos, además de que tales productos modifican la composición de los medios de cultivo y pueden ser metabolizados por los explantes.

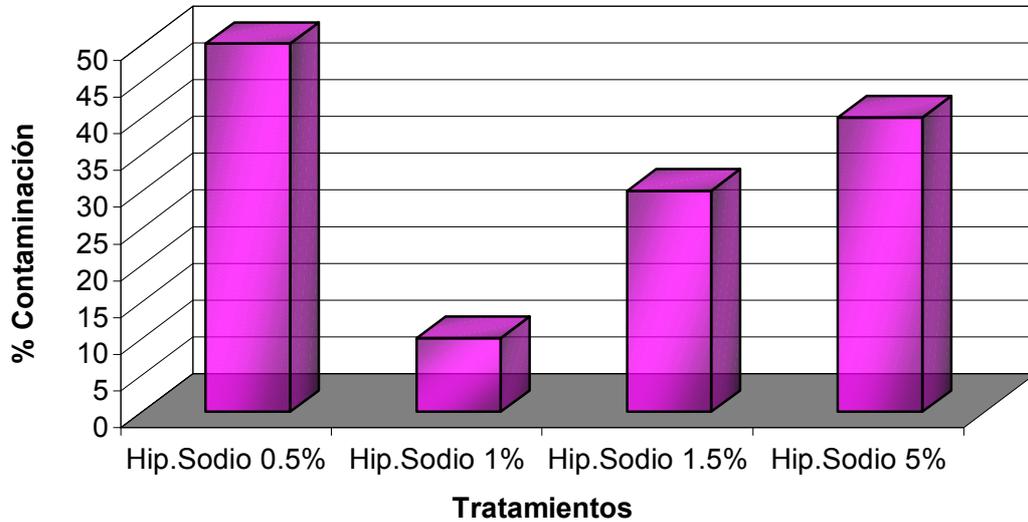


Figura 16.- Porcentajes de Contaminación Bacteriana encontrado en muestras del 4to Ensayo de Desinfección con diferentes dosis de Hipoclorito de Sodio

Por otra parte, Graterol (1992) obtuvo en microestacas de durazno *in vitro*, que con la aplicación de antibióticos como rifampicin y tetraciclina, no se logró ningún control sobre los contaminantes endógenos, y además, dichos antibióticos, pese a lograr un buen control sobre bacterias aisladas, causaron un efecto letal sobre el material vegetal por el alto nivel efectivo de los compuestos.

Sin embargo, al identificarse la presencia de bacterias como *Pseudomonas sp.*, se sugiere la incorporación al medio de cultivo del antibiótico Gentamicina en dosis de 40 mg/l, la cual, tal y como señalan García y Rafael (1990), logró controlar la bacteria en microesquejes de café procedentes de campo, arrojando sólo un 16.17% de contaminación.

Destaca además el hecho de que en el último ensayo, para la dosis de Hipoclorito de Sodio seleccionada para el protocolo de desinfección sólo se observó un 10% de contaminación bacteriana, porcentaje que puede disminuir si se suministra un manejo adecuado al material vegetal previa siembra, tal y como se ha indicado anteriormente.

5.4.- Establecimiento del Protocolo de Desinfección para la Iniciación *in vitro* de Trinitaria (*B. glabra* Choisy) cv. sanderiana variegata

En función de los resultados obtenidos, se aprecia que la desinfección del material vegetal para su iniciación *in vitro* comienza desde el manejo de las plantas madres, por lo tanto, se sugiere:

5.4.1.- Manejo en el Vivero:

Un adecuado manejo en el vivero es primordial para la iniciación *in vitro* del material vegetal, por lo tanto, dicho manejo deberá contemplar:

- 1.- Toma de estacas de plantas sanas, en las mejores condiciones fitosanitarias.
- 2.- Tratamiento preventivo de las estacas mediante inmersión de las mismas en solución de Captan + Sulfato de Cobre al 1% en proporción 1:1, previo a la plantación de las mismas.
- 3.- Plantación de las estacas para su enraizamiento, en sustrato desinfectado con vapor, compuesto por arena de río y aserrín de coco en proporción 1:1 y mantenidas en cobertizo o umbráculo.
- 4.- Aspersión semanal de las estacas con solución de Captan al 3%, tal y como recomienda Oliger y col. (1995), quienes emplearon con éxito dicho fungicida en el tratamiento preventivo de estacas de mora (*Rubus sp*) a través de aspersiones con el producto.
- 5.- Control del riego en función de la estación climática, debiendo alargarse sus intervalos en época de lluvia para evitar la aparición de agentes contaminantes. A este respecto, señala Graterol (1992) que en el establecimiento *in vitro* de

microestacas de durazno (*Prunus persica* L. Batsch) fue el control del riego el factor que más incidió sobre la disminución o ausencia de bacterias en las mismas.

5.4.2.- Protocolo de Desinfección para la iniciación *in vitro*:

Para controlar la acción de agentes contaminantes y el problema de oxidación, se sugiere como protocolo de desinfección para la iniciación *in vitro* de la especie estudiada el siguiente:

- 1.- Inmersión del material vegetal (explantes) recién cortado de las plantas madres en papel secante con solución de jugo de limón y agua fría a fin de disminuir la oxidación de los explantes.
- 2.- Lavado superficial de los explantes con la aplicación de solución jabonosa de jabón azul y sucesivos enjuagues para retirar la misma.
- 3.- Inmersión con agitación en etanol 70% por 30 seg.
- 4.- Una vez que se trasladan los explantes a la cámara de flujo laminar, previa limpieza de la misma con etanol o alcohol iodado, colocar los mismos en la solución de Hipoclorito de Sodio al 1% por espacio de 5 min. con agitación. Posteriormente enjuagar con agua destilada estéril tres o cuatro veces para proceder al corte e implantación de los mismos.

VI.- CONCLUSIONES

- ❖ Se logró la formación de raíces adventicias en estacas de trinitaria de 20 cm con las diferentes dosis de AIB aplicadas, siendo la mejor dosis empleada la de 2000 ppm con la cual se obtuvo un porcentaje de enraizamiento de 97.5%, así como raíces más firmes, gruesas y resistentes.

- ❖ La formación de raíces adventicias *in vivo* en miniestacas de trinitaria no ocurrió de manera satisfactoria, aportando sólo pocas estacas de 3 nudos tratadas con 3000 ppm de AIB algún resultado, siendo las estacas de esta combinación, las que presentaban mejor desarrollo de la parte aérea y mejor aspecto desde iniciado el ensayo, en el cual el enraizamiento ocurrió en muy baja proporción.

- ❖ Se definió el manejo en el vivero adecuado para el material vegetal a ser utilizado en la iniciación *in vitro* , dada la importancia del estado sanitario del mismo para dicha fase de propagación; este manejo debe contemplar la toma de estacas de plantas sanas, el tratamiento de dichas estacas con solución de Captan +Sulfato de Cobre al 1% en proporción 1:1, siembra en sustrato compuesto por arena y aserrín de coco en proporción 1:1 esterilizado, así como su mantenimiento en propagador de neblina, aspersiones semanales con Captan al 3% y un riguroso control del riego en función de la estación climática.

- ❖ Se definió un protocolo de desinfección para la iniciación *in vitro* de la especie, a fin de controlar los agentes contaminantes y el problema de oxidación, presente en los explantes implantados; dicho protocolo contempla la inmersión de los explantes recién cortados de las plantas madres en solución de jugo de limón y agua fría, lavado superficial con solución jabonosa de jabón azul, 3 a 4 enjuagues con A.D.E, inmersión con agitación en etanol al 70% por 30 seg, y en campana, colocar los mismos en solución Hipoclorito de Sodio al 1% por 5 min con agitación, para proceder al corte e implantación.

VII.- RECOMENDACIONES

- ❖ Para el enraizamiento de estacas de trinitaria, se recomienda realizar las siembras en época seca, dado que en la misma disminuye la incidencia de enfermedades tanto fungosas como bacterianas, y se cuenta con las condiciones ideales de temperatura y luz para el desarrollo de las plantas, siendo más manejables las condiciones de riego y humedad en el propagador, obteniéndose material más sano para su transplante definitivo y para la toma de explantes para la iniciación *in vitro*.

- ❖ Realizar ensayos con mayor número de tamaños de estaca y más amplio rango de concentraciones de AIB, a fin de determinar con precisión la interacción tamaño de estaca – dosis de regulador en el enraizamiento de la especie y favorecer el incremento de la tasa de multiplicación de la especie; asimismo, se recomienda realizar dichos ensayos en la época seca, por las razones antes expuestas.

- ❖ Realizar ensayos conducentes a evaluar la influencia tanto del grosor de las estacas como de su ubicación en la planta madre sobre el enraizamiento de las mismas.

- ❖ Efectuar ensayos de propagación que contemplen el transplante de las estacas una vez enraizadas, a fin de evaluar su sobrevivencia al mismo, así como el desarrollo de las plantas en su hábitat definitivo.

- ❖ Llevar a cabo mayor número de ensayos en laboratorio, a fin de optimizar la iniciación *in vitro* de la especie, así como determinar las causas fisiológicas que impiden el desarrollo adecuado de brotes y raíces por parte de los explantes de la misma, para ello, se recomienda el empleo de yemas laterales para su implantación y evaluación en ensayos similares a los realizados en este trabajo, dada la importancia de la posición relativa de las yemas tomadas de la planta madre para su propagación *in vitro*.

- ❖ Inducir la ruptura de la latencia de las yemas *in vivo* a fin de promover la actividad de las mismas para su implantación *in vitro* y lograr la iniciación.

- ❖ Realizar un estudio conducente al análisis de la influencia de la intensidad, fotoperíodo y calidad de la luz sobre el comportamiento morfogenético *in vitro* de la especie, dado su relevante papel en la diferenciación y procesos de desarrollo en las mencionadas condiciones.

VIII.-REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL- SAQRI; ALDERSON, P. 1996. Effects of IBA, cutting type and rooting media on rooting of *Rosa centifolia*. Journal of Horticultural Science 71(5): 729-737.

- ARENA, M; MARTÍNEZ, G. 2001 . [8 agosto 2002]. El cultivo *in vitro* en la propagación de las plantas. Programa Recursos Vegetales y Desarrollo Frutihortícola (PROVEG). Centro Austral de Investigaciones Científicas (CADIC). Argentina. [en línea] [http:// www.tierradelfuego.org.ar](http://www.tierradelfuego.org.ar) .

- ÁVILA, O. 1998. Avances en la morfogénesis *in vitro* de trinitaria (*Bougainvillea glabra* Choisy) cvs. Glabra y Sanderiana variegata. Tesis de Grado. Facultad de Agronomía. U.C.V. Maracay, Venezuela. 77 p.

- BADILLO,V; SCHNEE,L; BENÍTEZ,C. 1985. Clave de las Familias de Plantas Superiores de Venezuela. 7ma Edición. Espasande Editores. Caracas, Venezuela. 270 p.

- BAINES,J; KEY,K. 1978. El ABC de las Plantas de Interior. H. Blume Ediciones. Madrid, España. 191 p.

- BOLAÑOS, J. 1985. Enraizamiento de estacas de uvas americanas (*Vitis caribaea*) y determinación del área foliar. Tesis de Grado. Facultad de Agronomía. U.C.V. Maracay, Venezuela. 40 p.

- BRASWELL, G . 1998. [30 marzo 2001]. *Bougainvillea* Tutorial. [en línea].
[http:// www. freeyellow. com/ members3 /Bougainvillea /main.htm](http://www.freeyellow.com/members3/Bougainvillea/main.htm).pruning.

- CHATUVERDI,H; SHARMA,A; PRASSAD,R. 1978. Shoot Apex Culture of *Bougainvillea glabra* cv. 'Magnifica'. HortScience 13 (1) : 36.

- COVATTA.F; BORSCAK, J. 1991. Enraizamiento de estacas leñosas de *Actinidia deliciosa* (Chevalier) C.F. Liang-A.R. Ferguson, 1984-Cv.Hayward. Revista de la Facultad de Agronomía. Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires, Argentina. 12(3): 245 – 248.

- CZEKALSKI, M. 1989. The influence of auxins on the rooting of cuttings of *Bougainvillea glabra* Choisy . Acta Horticulturae 251: 345-352.

- DALASO, L; GUEVARA, E. 1989. Multiplicación clonal *in vitro* del aguacate (*Persea americana*) cv. 'Fuerte'. Agronomía Costarricense 13(1): 61-71.

- DÍAZ DE MANZANO, M. 1983. Efecto de dos reguladores vegetales sobre el enraizamiento de estacas de *Rosa indica* L. Trabajo de Ascenso. Facultad de Agronomía. U.C.V. Maracay, Venezuela. 92 p.

- DÍAZ,Y; VIERA,J; VARGAS, G. 1994. Posibilidad de propagación asexual por estacas en *Pachecoa venezuelensis* Burkart. Agronomía Tropical 45(4): 551-559.

- DUTRA, L; SCHWENGBER, J; TONIETTO, A; KERSTEN, E. 1999. Enraizamiento de estacas de ramos de Pessegueiro (*Prunus persica* L. Batsch). AGROCIENCIA 5(2): 93-95.

- ESPINOZA, O. 1983. Estimulación del enraizamiento en estacas de semeruco (*Malpighia glabra* L.) mediante el uso de algunas sustancias fitorreguladoras. Tesis de Grado. Facultad de Agronomía. U.C.V. Maracay, Venezuela. 72 p.

- EWEL, J; MADRIZ, A; TOSI, J. 1976. Zonas de vida de Venezuela. Memoria explicativa sobre el mapa ecológico. Editorial Sucre. Caracas, Venezuela. 270 p.

- GARCÍA, E. 1984. Comportamiento de cinco especies del género *Ficus* durante el enraizamiento bajo niebla intermitente. Tesis de Grado. Facultad de Agronomía. U.C.V. Maracay, Venezuela. 90 p.

- GARCÍA, A; CASTILLO, A. 1992. Enraizamiento *ex vitro* de cuatro cultivares de zarzamora (*Rubus spp*). Revista Chapingo 16 (78) : 107 - 109.

- GARCÍA, E; RAFAEL, M. 1989. Propagación clonal de plantas de café (*Coffea arabica* L. 'Catimor') a partir de microesquejes cultivados *in vitro*. Agronomía Tropical 39(4-6): 249-268.

- GARCÍA, E; RAFAEL, M. 1990. Control de la oxidación y contaminación en microesquejes de café (*Coffea arabica* 'Catimor') cultivados *in vitro*. *Agronomía Tropical* 40 (4-6): 281-290.

- GARCÍA, M; PRIETO, M; LUGO, Y; MILLIAM, I; CEPERO, L. 1996. [8 agosto 2002]. Estudios preliminares sobre micropropagación de *Morus alba*, una nueva contribución para el ecosistema ganadero. Estación Experimental de Pastos y Forrajes "Indio Huatey". Matanzas, Cuba. [en línea] <http://www.lead.virtualcentre.org>.

- GIARDINAGGIO. 2000. [8 agosto 2002]. La Bougainvillea (Nyctaginaceae). [en línea] <http://www.giardinaggio.it / index.htm>

- GÓMEZ, M; MURGUEITIO, E. 1991. [6 junio 2003]. Efecto de la altura de corte sobre la producción de biomasa de nacedero (*Trichantera gigantea*). *Livestock Research for Rural Development*. Vol.3. N°3. Centro para la Investigación en Sistemas Sostenibles de Producción Agropecuaria (CIPAV). Cali, Colombia. [en línea] <http://www.cipav.org.co>

- GRATEROL, J. 1992. Control de oxidaciones fenólicas, establecimiento y multiplicación de microestacas de durazno (*Prunus persica* L. Batsch) *in vitro*. Tesis de Maestría. Postgrado en Agronomía. Facultad de Agronomía. U.C.V. Maracay, Venezuela. 111 p.

- GURI, J. 2001. [8 agosto 2002]. Hormonas de Enraizamiento. [en línea]. <http://www.docum.com/hormonas/raíz.htm> >.

- HARTMANN, H; KESTER, D. 1992. Propagación de Plantas: Principios y Prácticas. Compañía Editorial Continental. México. 716 p.

- HERNÁNDEZ, M. 2001. Flores de Papel. Jardinería. En Todo en Domingo. Diario El Nacional. Caracas, Venezuela. p.41.

- HESSAYON, D. 1982. El Experto en Plantas de Interior. Blume-Elfos. Barcelona, España. 128 p.

- HOYOS, J. 1978. Flora Tropical Ornamental. Sociedad de Ciencias Naturales La Salle. Caracas, Venezuela. 429 p.

- JARVIS, B; BOOTH, A. 1981. Influence of indolbutyric acid, boron, myo - inositol, vitamin D₂ and seedling age on adventitious root development in cuttings of *Phaseolus aureus*. *Physiol. Plant* 53:213-218.

- MONTES-LÓPEZ, J.J; RODRÍGUEZ, J.L. 2001. Establecimiento y brotación *in vitro* de yemas axilares y ápices de ginkgo (*Ginkgo biloba* L.). *Revista Chapingo. Serie Horticultura*. 7(1): 49-59.

- OCHSE, J.J; SOULE, M; DIJKMAN, M; WEHLBURG, E. 1965. Cultivo y mejoramiento de plantas tropicales y subtropicales. Vol.I. Editorial Limusa. México, D.F. 828 p.

- OLIGER, P; PARRAGUEZ, L; GEBAUER, M; ARCE, P. 1995. Micropropagación y estudios regenerativos *in vitro* de mora cultivada. Ciencia e Investigación Agraria 22(3): 123-130.

- PELACHO, A; CLOSAS, L; CUEVA, R; SANFELIU, J; BADÍA, J; ALINS, G. 2000. [8 agosto2002]. El Cultivo *in vitro*. Unidad de Fisiología Vegetal. Departamento de Hortofruticultura, Botánica y Jardinería. Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agrícola de Lleida. España. [en línea]. <http://www.etsea.udl.es/invitro.htm> >.

- PIERIK, M.R.L. 1990. Cultivo in vitro de las Plantas Superiores. 3era Edición. Ediciones Mundi - Prensa. Madrid, España. 326 p.

- PRINC, F. 1998. [8 agosto 2002]. Novedades de desinfección de alto nivel: agentes halogenados no corrosivos. Fundación para el Desarrollo de la Esterilización en Argentina (FUDESA). FUDESA Informa N° 8. [en línea]. http://www.drwebsa.com.ar/fudesa/info_08.htm .

- RAMÍREZ - VILLALOBOS, M; URDANETA, A; LEÓN DE SIERRALTA, S. 2002. Establecimiento *in vitro* de explantes adultos del guanábano (*Annona muricata* L.) tratados con hipoclorito de sodio. Revista de la Facultad de Agronomía de la Universidad del Zulia (LUZ). 19:48-55.

- RIVERO, G; URDANETA, J; URDANETA, J; BADELL, M. 1998. Determinación del tiempo de inmersión en ácido indolbutírico para la propagación por estacas de *Bougainvillea glabra* var. variegada. En: Resúmenes. XLIV Reunión Anual de la Sociedad Interamericana de Horticultura Tropical. Barquisimeto, Edo. Lara. Venezuela. p.100.

- SCHNEE, L. 1973. Plantas Comunes de Venezuela. Imprenta Universitaria. U.C.V. Maracay, Venezuela. 822 p.

- TORRES, A. 1968. Algunas plantas leñosas de Cumaná. Editorial Universitaria de Oriente. Cumaná, Venezuela. 134 p.

- TORRES, R; KOMPEN, M. 1992. Efecto sinérgico del boro en el enraizamiento de acodos en *Pinus caribaea* var. hondurensis. Acta Científica Venezolana 43: 45-51.

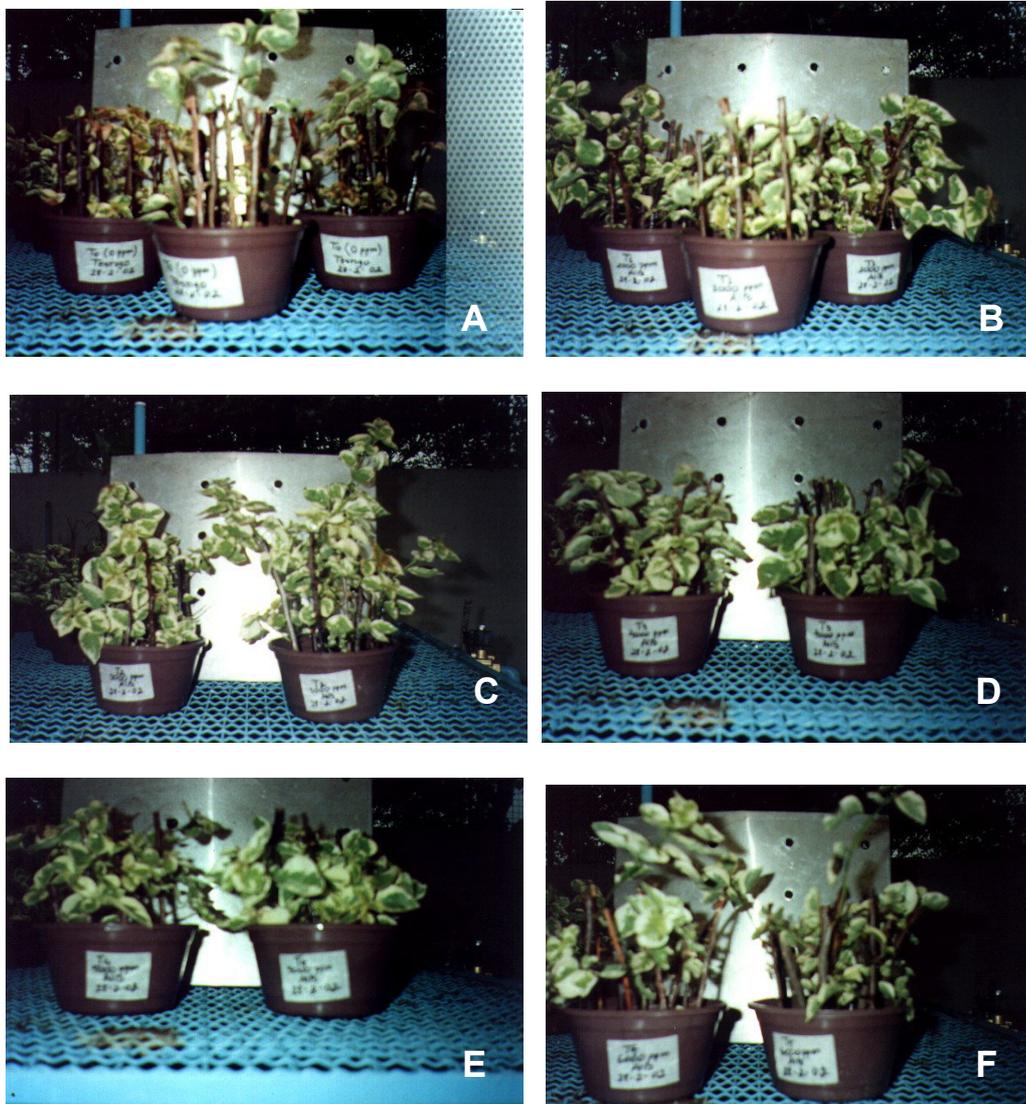
- VARGAS, G; ARELLANO, G; SOTO, R. 1999. Enraizamiento de estacas de icaco (*Chrysobalanus icaco* L.) sometidas a aplicaciones de auxinas. Bioagro. 11 (3): 103 –108.

- VILLALOBOS,V; THORPE,T. 1991. Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. En: MROGINSKI, L; ROCA, W. Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Colombia. pp 127 - 141.

- ZOWAIN,O. 1984. Enraizamiento de estacas de plantas ornamentales con ácido indolbutírico y ácido indolbutírico sal de potasio. Tesis de Grado. Facultad de Agronomía. U.C.V. Maracay, Venezuela. 80 p.

IX.- ANEXOS

ANEXO A.- Plantas de trinitaria (*B. glabra Choisy*) cv. sanderiana variegata producidas a partir de las diferentes dosis de AIB aplicadas.

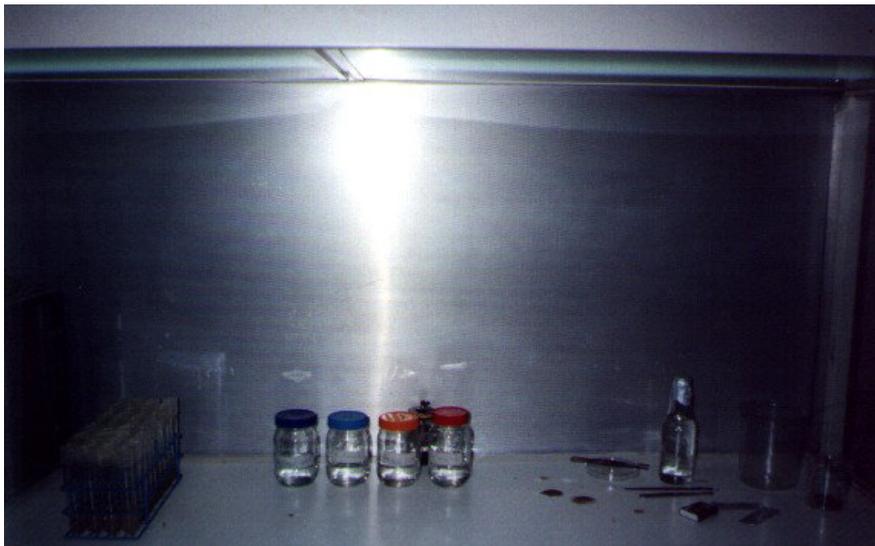


- A.- Testigo**
- B.- 2000 ppm AIB**
- C.- 3000 ppm AIB**
- D.- 4000 ppm AIB**
- E.- 5000 ppm AIB**
- F.- 6000 ppm AIB**

ANEXO B.- Planta de 6 meses producida a partir de estacas tratadas con 2000 ppm AIB



ANEXO C.- Cámara de flujo laminar e implementos utilizados para la implantación *in vitro*.



ANEXO D.- Contaminación encontrada en los tubos con ápices cultivados *in vitro*.



ANEXO E.- Datos Mensuales de Precipitación y Temperatura de Maracay durante los meses febrero-abril 2002

Estación: CENIAP

Latitud: 10°17' N

Longitud: 67°37' W

Altitud: 455 msnm.

Año: 2002

Meses	Precipitación (mm)	Temperatura Promedio (°C)
Enero	1,4	32,7
Febrero	0	34,4
Marzo	1,5	35
Abril*	66,5	34,7
Mayo	165,1	32,8
Junio	127,1	31,3
Julio	67,3	32,1
Agosto	128,2	32,1
Septiembre	139,3	32,1
Octubre	72,6	32,8
Noviembre	37,1	32,9
Diciembre	0,6	32,8

Febrero, Marzo y Abril Meses en los cuales fue realizado el ensayo de enraizamiento de estacas

Fuente: Unidad de Agrometeorología. CENIAP - I.N.I.A. Maracay.