

## DESINFECCIÓN Y FORMACIÓN DE CALLOS EN TRES TIPOS DE EXPLANTES DE AGAVE COCUI TRELEASE.

**Ing. Yuslegny Chirino Boniel**

[yuslegnychirino@hotmail.com](mailto:yuslegnychirino@hotmail.com)

Universidad Nacional Experimental Francisco de Miranda  
Venezuela

**Dr. Juan Silva Pupo**

[jsilvap@udg.co.cu](mailto:jsilvap@udg.co.cu)

Universidad de Granma  
Cuba

**Dra. Lianette Yépez González**

[lianette@gmail.com](mailto:lianette@gmail.com)

Universidad Nacional Experimental Francisco de Miranda  
Venezuela

Recibido: 20 de marzo del 2017

Aprobado: 15 de abril del 2017

### RESUMEN

El cocuy, *Agave cocui* Trelease, es una especie de importancia agroecológica y económica en zonas semiáridas, principalmente por la producción de licor. Actualmente, se explotan poblaciones silvestres sin reforestación ocasionando una reducción de las mismas. Se realizó la evaluación de diferentes métodos de desinfección superficial de bulbilos con el empleo de combinaciones de hipoclorito de sodio al 1 y 2% de cloro activo durante 10 y 20 minutos de tratamiento. Como explantes se utilizaron la base del tallo, la base de las hojas y segmento medio de la hoja. Se observaron los microorganismos contaminantes. Se evaluó la formación de callos en los tres explantes mencionados. Los explantes mejor desinfectados fueron la base de la hoja y los segmentos de las mismas, con 92 y 84%, respectivamente. Como contaminantes predominaron los hongos. Los mejores resultados en la formación de callos fueron en la base de la hoja con un 37,17%.

**Palabras clave:** *Agave cocui*, callos, segmento, bulbilo, desinfección.

## DISINFECTION AND CALLUSES ON THREE TYPES OF EXPLANTS AGAVE COCUI TRELEASE.

### ABSTRACT

The cocuy, *Agave cocui* Trelease, is specie of agro-ecological and economic importance in semiarid areas, mainly for the production of liquor. Currently, wild populations are exploited without reforestation causing a reduction them. Evaluation of different methods of surface disinfection of bulbils with the use of combinations of sodium hypochlorite 1 and 2% active chlorine duration 10 and 20 minutes of treatment. As the stem explants were used, the base and the segments of the leaves. Contaminating microorganisms were observed. The calluses formation was evaluated in the three explants mentioned. The best disinfected explants were the base of the leaf and segments thereof, with 92 and 84%, respectively. As contaminants fungi predominated. The best results in callus formation were at the base of the blade, with a 37, 17%.

**Key words:** *Agave cocui*, callus, disinfection, explant, bulbils.

### INTRODUCCIÓN

Las plantas del género agave son importantes desde el punto de vista agroecológico y socioeconómico, por los múltiples usos de que son objeto (García, Méndez & Talavera, 2010). El Cocuy (*Agave cocui* Trelease) es una especie de relevancia económica para las comunidades de las zonas semiáridas del estado Falcón por la producción de licor de penca (Díaz & Sánchez, 2001).

Debido a esta industria artesanal actualmente se explotan poblaciones silvestres sin reforestación, considerando que lo cosechado anualmente es de 80.000 plantas aproximadamente (Díaz, 2004), y que a esto se le suma el carácter legal que ha adquirido dicha actividad, lo que ocasiona una reducción de las mismas. También, por su naturaleza monocárpica y el capado floral por la herbivoría caprina sus poblaciones se ven disminuidas.

El *A. cocui* tiene la particularidad de carecer de rizoma, lo que limita su propagación por esta vía. Por lo tanto, se requiere alrededor de nueve años para llegar a ser productiva, y obtener las dos únicas formas de propagación: semilla y bulbilos. No obstante, la producción de frutos suele ser limitada (Lemus, 2001), lo que incide significativamente

en la densidad de semillas. Caso contrario con los bulbilos que se presentan en gran cantidad en cada rama florífera (ob.cit), siendo este la principal fuente de propagación.

Al respecto, Salazar, González & Hernández (2009), destacan la implementación de sistemas de propagación asexual, a través de la siembra de bulbilos en canteros en algunos municipios del estado Lara, sin embargo, las mismas se han caracterizado por presentar una lenta tasa de crecimiento e insuficiente producción de plantas.

El cultivo *in vitro* como aplicación biotecnológica, ha contribuido a incrementar la producción agrícola a través de métodos eficiente para la micropropagación masiva de plantas. Esta actividad cuenta con un basamento jurídico estableciendo en la Constitución de la República Bolivariana de Venezuela en sus artículos 110 y 305, así como también en la ley orgánica de ciencia, tecnología e innovación y el artículo 14 de la ley orgánica de seguridad de la nación, en las mismas se reconoce de interés público la ciencia, tecnología, el conocimiento, la innovación y sus aplicaciones, como instrumentos fundamentales y recursos estratégicos para la seguridad y soberanía nacional.

En cultivos *in vitro* de agaváceas se han utilizado diversas partes de plantas como: segmentos de tallo, bulbilos, rizomas, semillas y segmentos de plantas *in vitro* (Martínez & Pacheco, 2005). En este sentido, los bulbilos en el A. cocui representan un material vegetal abundante para ser utilizados como fuente de explantes primarios (Villalobos & Thorpe, s.f.), no obstante han sido muy pocos los trabajos reportados en propagación *in vitro* del cocuy, usando este tipo de material.

Se propone la propagación masiva *in vitro* mediante embriogénesis somática usando los bulbilos aéreos, con el propósito de establecer viveros para resembrar poblaciones silvestres y establecer plantaciones. Por tal motivo, el objetivo de este trabajo es determinar el método de desinfección con hipoclorito de sodio más adecuado para cada uno de los explantes y evaluar la formación de callos en los mismos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Reproducción y Genética Vegetal del Centro de Investigaciones Ecológicas de Zonas Áridas (CIEZA), de la Universidad Nacional Experimental Francisco de Miranda, Coro, estado Falcón - Venezuela.

Se utilizaron 150 bulbilos de *A. cocui* proveniente del sector Butare, municipio Colina, estado Falcón, de los cuales se tomó una muestra de 31 brotes aéreos que tenían un peso promedio de 11,39 g y una longitud de 8,82 cm.

En el experimento se empleó como medio de cultivo las sales Murashige & Skoog (MS), las cuales se detallan en la tabla 1, además fue complementado con 0,3 mg/L de Bencil amino purina (BAP) y 2 mg/L de 2,4-D. El pH se ajustó a 5,7 y las variaciones se regularon con ácido clorhídrico (HCl) y hidróxido de potasio (KOH). El medio de cultivo fue suplementado con agar 7g/L y se esterilizó en autoclave marca FANEM a 15 PSI (103,421 Pa) a 121°C durante 20 minutos.

Se utilizaron placas de petri de 9 cm de diámetro, a razón de 20,0 ml de medio de cultivo. La incubación se llevó a cabo bajo condiciones de oscuridad. La temperatura de las cámaras de cultivo fue de  $27 \pm 2$  grados Celsius.

Constituyentes	Concentración final en el medio de cultivo
	(mg/L)
	MS
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650
KNO <sub>3</sub>	1900
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170.0
KI	0.83
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O	0.25
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.025
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	440.0
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	370.0
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	22.3
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8.6
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.025
Na <sub>2</sub> -EDTA	37.2

FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27.80
Tiamina-HCl	0.1
SACAROSA	30g/l
Mio-Inositol	100
Ácido Nicotínico	0.5
Piridoxina	0.5
Glicina	2.0

**Tabla 1:** Medio de Murashige & Skoog (1962)

Todo el material fue manejado de forma aséptica, previo a su ingreso al laboratorio, fue lavado superficialmente con detergente para la eliminación de contaminantes triviales y polvo, posteriormente fueron cortadas y eliminadas las partes de hojas marchitas y deterioradas.

Se aplicó un diseño completamente aleatorizado con cuatro tratamientos que incluyen las combinaciones de concentraciones de hipoclorito de sodio al 1 y 2% de cloro activo y dos tiempos de aplicación, 10 y 20 minutos utilizados para cada uno de los tres tipos de explantes. Se emplearon 50 réplicas por tratamiento.

Las partes de los bulbilos que fueron diseccionadas son las siguientes:

- A.- Base de las hojas (BH)
- B.- Segmento medio de la hoja interna (SH)
- C.- Segmento de la base del tallo (BT).

El procedimiento de desinfección consistió en:

- Inmersión de los bulbilos con jabón comercial marca Las Llaves y solución jabonosa en agitación de 5 min, respectivamente.
- Lavado con agua corriente hasta eliminar totalmente los restos de cada jabón, para luego lavarlos con agua destilada.
- Inmersión con agitación en los diferentes métodos de desinfección por el tiempo respectivo, luego de los cuales se lavaron 3 veces con agua destilada estéril en la cámara de flujo laminar modelo CF 03, procediendo a la disección de los explante.

La incubación se efectuó en condiciones de oscuridad durante una semana y las evaluaciones se realizaron a partir de las 72 horas.

Las variables a evaluadas fueron:

- Explantes desinfectados (%).
- Explantes con quemaduras u otros daños (%).
- Microorganismos contaminantes.
- Formación de callos (%).
- Coloración de los callos y consistencia (duros o friables).

Las variables de la formación de callos se evaluaron a las tres semanas de cultivo teniendo en cuenta el tipo de explante utilizado.

Las variables expresadas en porcentaje fueron evaluadas estadísticamente según el análisis de comparación de proporciones utilizando el software CompaProWin 2.0.1, desarrollado por Castillo & Miranda (2014).

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

En la tabla 2 se muestran los resultados del porcentaje de desinfección de los diferentes tipos de explantes de manera separada en cada uno de ellos. En el explante base de las hojas se obtuvo un 92% de explantes desinfectados en los tratamientos con hipoclorito de sodio al 2% durante 10 y 20 minutos, con diferencias significativas con relación a los tratamientos con hipoclorito de sodio al 1% durante 10 y 20 minutos, donde se logró un 78% de explantes desinfectados, lo que indica que la inclusión del hipoclorito de sodio al 2% favorece la obtención de material in vitro aséptico.

**Tabla 2.** Resultados de la desinfección de bulbilos aéreos de *Agave cocui* en cada uno de los explantes.

Tipo de explante	Métodos de desinfección	Explantes sanos (%)	Significación 5%
BH	Hipoclorito de Sodio 1%, 10min	78 ±0,06 <b>b</b>	*
	Hipoclorito de Sodio 1%, 20min	78 ±0,06 <b>b</b>	
	Hipoclorito de Sodio 2%, 10min	92 ±0,04 <b>a</b>	
	Hipoclorito de Sodio 2%, 20min	92 ±0,04 <b>a</b>	
SH	Hipoclorito de Sodio 1%, 10min	54 ±0,09 <b>b</b>	*
	Hipoclorito de Sodio 1%, 20min	70 ±0,07 <b>ab</b>	
	Hipoclorito de Sodio 2%, 10min	84 ±0,05 <b>a</b>	
	Hipoclorito de Sodio 2%, 20min	74 ±0,07 <b>ab</b>	
BT	Hipoclorito de Sodio 1%, 10min	12 ±0,13 <b>ab</b>	*
	Hipoclorito de Sodio 1%, 20min	6 ±0,13 <b>b</b>	
	Hipoclorito de Sodio 2%, 10min	26 ±0,12 <b>a</b>	
	Hipoclorito de Sodio 2%, 20min	6 ± 0,13 <b>b</b>	

Letras iguales en las columnas, no hay diferencia significativa para el 5% de probabilidad de error.

Leyenda: BH: Base de las hojas SH: Segmento medio de la hoja interna  
BT: base del tallo.

En el explante de segmento medio de la hoja interna, no se encontraron diferencias significativas entre los tiempos de exposición con el hipoclorito de sodio al 2%, sin embargo, se obtuvo un mayor valor en porcentaje de desinfección (74%) en el tiempo de exposición de 10 minutos. Los valores más bajos se obtuvieron con el tratamiento de hipoclorito de sodio al 1% durante 10 minutos, donde sólo se logró un 54% de explantes desinfectados. En el explante base del tallo los tratamientos con hipoclorito de sodio no fueron efectivos para la eliminación de los microorganismos contaminantes existentes

como parte de la microflora epifítica que tienen los tejidos vegetales, ya que solo se obtuvo un 26% en el tratamiento con hipoclorito de sodio durante 10 minutos. Estos resultados en este tipo de explante sugieren la necesidad de emplear otros métodos de desinfección para la base del tallo.

La base de las hojas fue la parte del bulbilo que mejor respondió a la desinfección, posiblemente por estar menos expuestas a la intemperie, seguido por el segmento medio de la hoja interna y en último lugar la base tallo.

Los tratamientos del hipoclorito al 1 % y 2 %, donde se obtuvieron los mejores resultados en desinfección para la base de las hojas y segmento medio de la hoja son satisfactorios para su empleo como método de desinfección en otras investigaciones donde se empleen los referidos explantes.

En todo proceso de establecimiento y condiciones de crecimiento del cultivo *in vitro* es necesario cuatro aspectos básicos: asepsia y esterilización, elección de explantes, elección del medio de cultivo y buenas condiciones de crecimiento. En lo que respecta a este acápite, la asepsia y esterilización es una condición esencial en el éxito del cultivo *in vitro*, garantía de un buen crecimiento (Ross, Krause & Pagliano, 2008).

Toribio (2005), señaló que la obtención de un material estéril es difícil, pese a las precauciones tomadas, el 95% de los explantes se contaminan sino se tiene una adecuada esterilización del tejido; fundamentalmente cuando el material procede de condiciones de campo (Sondahl *et al.*, 1994, citado por Álvarez & Silva, 2009), como es el caso de los bulbilos utilizados para este ensayo.

Las condiciones físicas en que normalmente se incuban los cultivos conforman un ambiente propicio para la proliferación de microorganismos, los cuales compiten con el explante por el medio de cultivo o lo modifican (Mroginski & Roca, 1991). En este sentido, Yépez (2001) indica que en estudios de cultivo *in vitro* el uso vitroplantas garantizan explantes sanos, ya que este tipo material vegetal establecido en medio de multiplicación aséptica no requiere de desinfección superficial.

Otros autores han estudiado estrategias de desinfección en bulbilos de *A. cocui*, provenientes de ambientes no controlados, como es el caso de Salazar *et al.* (2009),



reportando eficiencia en el método de desinfección, con etanol al 70% durante 1 min, e hipoclorito de sodio 2,5%, durante 5 min.

No obstante, a través de este ensayo se pudo determinar el método de desinfección superficial más eficiente para el material vegetal proveniente directamente del campo, así como también el explante que mejor respondió a la misma.

Como contaminantes microbianos se observaron los hongos filamentosos del género *Penicillium* y levaduras. La contaminación por hongos es uno de los factores que más afecta el éxito del trabajo in vitro por lo que su control resulta indispensable para reducir las pérdidas en este sentido (Álvarez & Silva, 2009).

Por referencia se conoce que el tejido de cocuy es rico en flora levaduriforme, responsable del proceso de fermentación (Yegres, F., Fernández, Padin, Rovero & Yegres, R., 2003). Estos resultados coinciden con lo señalado por Uribe y Cifuentes (2004), que afirman que el principal problema en la etapa de establecimiento es la contaminación fúngica.

Yegres *et al.* (2003), aislaron y caracterizaron los microorganismos fermentadores del licor de cocuy, usando tres medios para la producción de biomasa de microorganismos, un medio sintético y dos medios complejos con melaza y/o vinaza (destilado del mosto), confirmaron el papel principal de la *Saccharomyces cerevisiae* (levaduras, moda =  $6 \times 10^6$  um, temperatura óptima de crecimiento de 30 °C, formación de ascosporas, asimilación y fermentación de glucosa, maltosa, sacarosa y rafinosa) en el proceso fermentativo espontáneo. Igualmente el efecto favorable del fosfato de amonio y del azúcar en la productividad de proceso fermentativo.

En este experimento, aunque no se logró la identificación de las levaduras, es probable que una de ellas, de acuerdo a los resultados de Yegres *et al.* (2003), sea del género *Saccharomyces sp.*, ya que la misma forma parte de la flora levaduriforme del tejido de cocuy principalmente a nivel del tallo, parte del mayor valor económico para la producción del licor de cocuy, por lo que no es descartable que el medio de cultivo rico en azúcar y nitrógeno provoque el rápido crecimiento de las levaduras, impidiendo la absorción de estos nutrientes por los explantes vegetales cultivados, situación que

provoca su muerte, tal como lo señalan Pedroza & Montes (2008) para el caso de la levadura *Rodhotorola* en explantes de *Hypericum goyanesii*.

La aparición de quemaduras en los explantes se hizo visible en la segunda semana de cultivo *in vitro*. En la tabla 3 se presentan los resultados del porcentaje de explantes con quemaduras. No hubo diferencias significativas entre el tratamiento de hipoclorito al 1% durante 20 minutos y los tratamientos de hipoclorito al 2%, en el explante base de las hojas.

**Tabla 3.** Porcentaje de explantes de bulbilos de *A. cocui* con quemaduras en cada tipo de explante.

Explante	Tratamientos	Explantes con daños (%)	Significación 5%
BH	Hipoclorito de sodio 1%, 10 min	2 ± 0,14 b	*
	Hipoclorito de sodio 1%, 20 min	18 ± 0,12 a	
	Hipoclorito de sodio 2%, 10 min	12 ± 0,13 a	
	Hipoclorito de sodio 2%, 20 min	10 ± 0,13 ab	
SH	Hipoclorito de sodio 1%, 10 min	12 ± 0,13 ab	*
	Hipoclorito de sodio 1%, 20 min	4 ± 0,13 b	
	Hipoclorito de sodio 2%, 10 min	16 ± 0,12 a	
	Hipoclorito de sodio 2%, 20 min	8 ± 0,13 ab	
BT	Hipoclorito de sodio 1%, 10 min	0 ± 0 b	*
	Hipoclorito de sodio 1%, 20 min	10 ± 0,13 a	
	Hipoclorito de sodio 2%, 10 min	10 ± 0,13 a	
	Hipoclorito de sodio 2%, 20 min	12 ± 0,13 a	

Letras iguales no hay diferencia significativa para el 5% de probabilidad de error.

Legenda: BH: Base de las hojas SH: Segmento medio de la hoja interna BT: base del tallo.

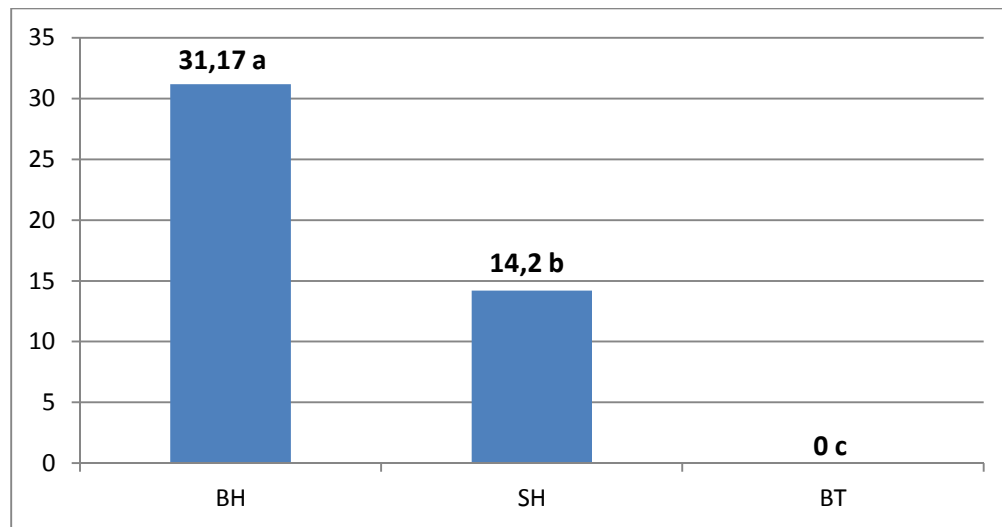
No obstante, el tratamiento de hipoclorito al 1% durante 20 minutos arrojó un valor superior de 18%. En el explante segmento medio de hoja las quemaduras estuvieron entre un 16 y un 4%, sin diferencias significativas entre los tratamientos con hipoclorito de sodio al 2% durante 10 y 20 minutos y el de hipoclorito de sodio al 1% durante 10 minutos. Entre todos los explantes en el que menos quemaduras se observó fue en la base de los tallos, quizás relacionado con ser un tejido más coráceo y duro.

Es de destacar, que las partes de los bulbilos que presentaron mayor deterioro fueron la base y el segmento medio de hoja; al respecto Pedroza & Montes (2005), indican que la toxicidad generada por un agente desinfectante sobre un tejido depende de su clase y procedencia porque estos efectos pueden diferir de un organismo a otro, o como en este caso de un órgano a otro.

Entre los esterilizantes utilizados en cultivos de tejido vegetal están: hipoclorito de calcio, hipoclorito de sodio, alcohol etílico, cloruro de mercurio, antibióticos y cloramina T. (Toribio, 2005), los cuales se emplean para la eliminación de los contaminantes microbianos de la superficie de los explantes a través de la inmersión de estos en dichas soluciones (Álvarez & Silva, 2009).

El hipoclorito de sodio (NaClO) es uno de los agentes desinfectantes más empleado debido a su poder germicida y los pocos efectos de toxicidad en los tejidos, sin embargo ocasionalmente puede causar necrosis y muerte de los mismos (López, F., Murcia, López, P. & Valencia, 2010; Albany, Vilchez, Sierralta, Molina & Chacin, 2006).

En la tercera semana de cultivo se observó la formación de callos. En la figura 1 se presentan los resultados, donde fueron superiores en el explante base de las hojas con un 31,7% de respuesta, mostrando diferencias significativas con el explante segmento medio de la hoja donde se obtuvo un 14,2%.



*Letras diferentes. Diferencia significativa para el 5% de probabilidad.*

**Figura 1.** *Porcentaje de formación de callos en los tres tipos de explantes cultivados in vitro.* Leyenda: BH: Base de las hojas SH: Segmento medio de la hoja interna BT: base del tallo.

En los explantes se formaron callos friables, sueltos, de color blanco (Figura 2), cuya aparición está asociada al corte realizado en las partes base de las hojas y segmento medio de hoja.



**Figura 2.** Aspecto del callo obtenido de consistencia friable.

El explante base de tallo no mostró ninguna respuesta callogénica, debido a la alta contaminación por levadura.

Los resultados en la formación de callos coincide con lo obtenido por Azarte & Mejias (2011) en la especie *A. angustifolia* Haw, donde detectaron la formación de callos de color blanco cremoso, de consistencia suave y friable cultivados bajo condiciones de oscuridad.

## CONCLUSIONES

El método de desinfección más adecuado para la base de las hojas y segmento medio de hoja, con más del 84 %, en ambos explantes fue hipoclorito de sodio al 2 %.

Los microorganismos contaminantes que causaron mayor incidencia fueron los hongos. En la base de las hojas y segmento medio de la hoja fue donde ocurrió la callogénesis, pero un mayor porcentaje de callos se presentó en el explante base de las hojas.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICA

- Albany, J., Vilchez, S., De Sierralta, L., Molina, M. & Chacín, P., (2006). Una metodología para la propagación *in vitro* de Aloe vera L. *Revista de la Facultad de Agronomía (LUZ)*, 23, 213-222, Disponible en: [http://revfacagronluz.org.ve/PDF/abril\\_junio2006/albany.pdf](http://revfacagronluz.org.ve/PDF/abril_junio2006/albany.pdf).
- Álvarez, Y. (2009). *Obtención de callos y regeneración de brotes en el cultivo del maíz (Zea mays L.)*. (Tesis inédita de maestría en Ciencias agrícolas). Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad de Granma, Granma, Cuba.
- Arzate, A. & Mejías, R. (2011). Capacidad Embriogénica de Callos Inducidos en Ejes Embrionarios Cigóticos de *Agave angustifolia* Haw. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 34, 101 – 106. Disponible en [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid= S0187-73802011000200008&script= sci\\_abstract](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid= S0187-73802011000200008&script= sci_abstract).
- Castillo, Y. & Miranda, I. (2014). COMPAPROP: Sistema para comparación de proporciones múltiples. *Revista Protección Vegetal*, 29 (3), 231-234.
- Constitución de la República Bolivariana de Venezuela (CRBV) de 1999. 5453. (2000).
- Díaz, M. & Sánchez, R. (2001). Del programa de *Agave cocui* o de cómo es posible hacer ciencia al servicio del hombre. *Revista multidisciplinaria Croizatia*, 2 (3), 167- 171.
- Díaz, M. (2004). *Evaluación de la productividad y el rendimiento y ecofisiología del Agave cocui Trelease y su respuesta a los cambios en las condiciones de crecimiento*. Disponible en: <http://www.fundacite-falcon.gob.ve/index.php/programas/pculminados/684>.
- García, E., Méndez, J. & Talavera, D. (2010). El género *Agave* spp. en México: principales usos de importancia socioeconómica y agroecológica. *RESPYN Revista Salud Pública y Nutrición*, 5, 109-129. Disponible en: <http://www.respyn.uanl.mx/especiales/2010/ee-05-2010/.../09.pdf>.
- Lemus, L. (2001). *Ecología reproductiva del Agave cocui Trelease (Agavaceae) en una zona árida del estado Falcón: Fenología reproductiva, biología floral, mecanismo de polinización y sistema genético de reproducción*. (Informe de avance de resultados. "Programa de Agave, Fase I). Coro.
- Ley orgánica de ciencia, tecnología e innovación de 2010. 842. Disponible en: [http://www.uc.edu.ve/uc\\_empresas/LOTIC.pdf](http://www.uc.edu.ve/uc_empresas/LOTIC.pdf).
- Ley orgánica de seguridad de la nación de 2002. 37.594. Disponible en: [www.ceedcads.org.ar/Srd-LibBL/VEN/Ley\\_Seguridad\\_Nacion.pdf](http://www.ceedcads.org.ar/Srd-LibBL/VEN/Ley_Seguridad_Nacion.pdf).
- López, F., Murcia, C., López, P. & Valencia, C. (2010). Estandarización del protocolo de desinfección de disco de hoja en la inducción de callogénesis de *cordia alliodora* (ruiz & pav.) okén (lamiales: boraginaceae) en condiciones *in vitro*. *Revista de investigaciones de la Universidad Quindío*, 20, 120 - 125. Disponible en: [http://blade1.uniquindio.edu.co/Uniquindio/revista\\_investigaciones/adjuantos/pdf/ fe01\\_RIUQ2015.pdf](http://blade1.uniquindio.edu.co/Uniquindio/revista_investigaciones/adjuantos/pdf/ fe01_RIUQ2015.pdf).

- Martínez, M. & Pacheco, J. (2006). Protocolo para la micropropagación de *Furcraea macrophylla* Baker. *Revista de agronomía Colombiana*, 24 (2), 207- 213. Disponible en: <http://revistas.unal.edu.co/index.php/agrocol/article/view/20022/21156>.
- Mroginski, L. & Roca, W. (1991). *Establecimiento de cultivo de tejido vegetal in vitro*. Recuperado en: <http://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/Cultivo%20de%20Tejidos%20en%20la%20Agricultura/capitulo2.pdf>.
- Murashige, T. & F. Skoog. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15, 473 - 497.
- Pedroza, J. & Montes, M. (2008). Micropropagación de *Hypericum goyanesii*, una especie en vía de extinción. *Revista Científica*, 10, 109-118. Recuperado en: <http://revistas.udistrital.edu.co/ojs/index.php/revcie/article/view/300/431#.VPZwqoqCc90.google>.
- Ross, S., Krause, M & Pagliano, G. (2008). *Curso de Micropropagación y Proyectos de Producción*. Recuperado en: <http://www.fagro.edu.uy/~fisveg/docencia/Cursos%20posgrado%20y%20optativos/curso%20de%20micropropagacion/mateoricos/Clase%201%20%20Cultivo%20in%20vitro%20de%20vegetales%20%202008.pdf>.
- Salazar, E., González, P. & Hernández, C. (2009). Multiplicación *in vitro* de *Agave cocui* Trelease a través de yemas axilares. *Revista Agronomía tropical* 59 (2), 129-135. Recuperado en: [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext.&pid=50002-192X2009000200002](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext.&pid=50002-192X2009000200002).
- Toribio, H. (2005). *Comportamiento de explantes de agave pulquero (Agave atrovirens) en la interacción de dos reguladores de crecimiento*. (Tesis de grado, Instituto Politécnico Nacional). Disponible en: [itzamna.bnct.ipn.mx:8080/.../COMPORTAMIENTOEXPLANTES.Pdf](http://itzamna.bnct.ipn.mx:8080/.../COMPORTAMIENTOEXPLANTES.Pdf).
- Uribe, M. & Cifuentes, L. (2004). Aplicación de técnicas de cultivo *in vitro* en la propagación de *Legrandia concinna*. *Revista Bosque (Valdivia)*, 25 (1), 129-135. Recuperado de [http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0717-92002004000100012&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0717-92002004000100012&script=sci_arttext).
- Villalobos, V. & Thorpe, T. (S.F.). Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. En Marassi, M. (s.f.), *Cultivo de tejidos en la agricultura, fundamentos y aplicaciones* (127-141). México. Disponible en: <http://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/cultivodetejidosenlaagricultura/capitulo6.pdf>.
- Yegres, F., Fernández, Z.; Padin, C.; Rovero L. & Yegres, R. (2003). *Saccharomyces cerevisiae* en la fabricación del licor cocuy. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 23 (1).
- Yepez, L. (2001). Propagación *in vitro* de *Agave cocui* Trelease. *Revista multidisciplinaria Croizatia*, 2 (3), 161- 248.