

## MUPLICACIÓN *in vitro* DE *Agave cocui* Trelease A TRAVÉS DE YEMAS AXILARES

### *In vitro* MULTIPLICATION OF *Agave cocui* Trelease THROUGH AXILLARY BUDS

Efraín Salazar\*, Pablo González\* y Carlos Hernández\*\*

\* Investigadores. Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIA-CENIAP). Unidad de Biotecnología Agrícola. Zona Universitaria, vía El Limón, Edificio 09. Maracay 2101, estado Aragua. Venezuela. E-mail: esalazar@inia.gob.ve

\*\* Investigador. INIA LARA. Carretera Barquisimeto, vía Duaca, km 7. Caserío El Cují, entrada a Las Veritas, Barquisimeto, estado Lara. Venezuela.

#### RESUMEN

El cocuy, *Agave cocui* Trelease es importante para las zonas semiáridas del centro-occidente de Venezuela. Involucra sistemas de producción tradicional de licor, jabón, conservas, entre otros. Soportando económicamente muchas familias en el estado Lara. La producción se basa en plantas creciendo naturalmente, con suplencia de materia prima limitada. Para aumentar la disponibilidad de plantas e incrementar la actividad económica de estas comunidades rurales, sistemas de propagación asexual han sido implementados, con una tasa de crecimiento lenta y la producción de plantas no cubre la demanda. Un sistema de propagación *in vitro* usando yemas axilares se ha establecido. Las yemas se colocaron en medio Murashige y Skoog (MS) suplementado con tiamina (1 mg l<sup>-1</sup>), ácido nicotínico (1mg l<sup>-1</sup>), piridoxina-HCl (1 mg l<sup>-1</sup>), mio-inositol (100 mg l<sup>-1</sup>), BA (1 mg l<sup>-1</sup>), ANA (1 mg l<sup>-1</sup>) sacarosa (30 g l<sup>-1</sup>) y Agar (5g l<sup>-1</sup>). Cuarenta explantes fueron cultivados en 10 ml del medio de cultivo, y sembrados en la oscuridad por 7 días. Las yemas se transfirieron a luz fluorescente (16,95 W.m<sup>-2</sup>), 28±2 °C y fotoperíodo de 16 h. Los brotes fueron evidentes 1 mes posterior al cultivo *in vitro*, y 6 brotes en promedio se observaron por yema cultivada. La tasa de brotación aumentó cuando la temperatura subió a 40 °C. Plantas completas se obtuvieron en medio sin hormonas. El trasplante a suelo (1:1:1 de suelo:arena: aserrín de coco) permitió la aclimatación de las plantas en 1 semana. Todas las plantas tuvieron morfología normal, por lo que el cultivo *in vitro* de yemas axilares se puede decir es un método eficiente para propagar *A. cocui* Trelease.

**Palabras Clave:** Cocuy; cultivo *in vitro*; meristemas; yemas axilares; micropropagación.

#### SUMMARY

The cocuy, *Agave cocui* Trelease is an important crop for the semiarid zones of the central-west part of Venezuela. It is involved in a traditional production systems for liquor, soap, preserves, among others. It is the economical support of many families in Lara State, Venezuela. Normally, the production was based in naturally occurring plants, so supply of plants is limited. In order to increase plant supply and improve the economical activity of these rural communities, asexual propagation systems have been implemented with slow growth rate and plant production not enough to satisfy the demand. A mass propagation system using axillary buds have been established. Buds were placed on Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with thiamine (1mg l<sup>-1</sup>), nicotinic acid (1mg l<sup>-1</sup>), pyridoxine HCl (1mg l<sup>-1</sup>), inositol (100mg l<sup>-1</sup>), BA (1mg l<sup>-1</sup>), ANA (1mg l<sup>-1</sup>) sucrose (30 g l<sup>-1</sup>) and Agar (5g l<sup>-1</sup>). Forty explants were cultured in 10ml of culture medium, and were placed in the dark for 7 days. Buds were placed under fluorescent light (16.95 W.m<sup>-2</sup>), at 28±2 °C and a 16 hr photoperiod. Shoots were observed 1 months after culture, an average of 6 shoots were observed for each cultured axillary bud. Sprouting ratio was increased when temperatures was increased to 40 °C. Complete plants were obtained by transferring shoots to medium with no hormones. Transplant to soil (1:1:1 soil:sand:coconut sawdust) allowed plants to be acclimatized in 1 week. All plants have normal morphology. As a conclusion axillary bud *in vitro* culture can be referred as an efficient method to propagate *A. cocui* Trelease.

**Key Words:** Cocuy; *in vitro* culture; meristems; axillary buds; micropropagation.

## INTRODUCCIÓN

El cocuy, *Agave cocui* Trelease, es un cultivo autóctono de Venezuela, y es importante para las zonas semiáridas del centro-occidente de Venezuela. Este cultivo, involucra un sistema de producción tradicional de varios productos, tales como licor, jabón, conservas, y muchos otros usos. Es el soporte económico de muchas familias de los estados Lara y Falcón en Venezuela, estando presente su uso desde épocas precolombinas (González-Batista, 2000).

La producción tradicionalmente se basa en plantas creciendo naturalmente, por lo que la suplencia de materia prima es limitada. A fin de aumentar la disponibilidad de plantas de cocuy e incrementar la actividad económica de estas comunidades rurales de bajos recursos, pertenecientes a los municipios Urdaneta, Iribarren y Torres del estado Lara, algunos sistemas de propagación asexual, tal como la siembra de bulbilos en canteros, han sido implementados; sin embargo, la tasa de crecimiento es lenta y la producción de plantas no es suficiente para satisfacer la demanda, ocasionando la utilización indiscriminada de las poblaciones naturales, con el consecuente riesgo de pérdida de la diversidad biológica.

La multiplicación *in vitro* a través de yemas o meristemas, es una estrategia que permite la multiplicación masiva de plantas, las cuales además de ser genéticamente uniformes e idénticas a la planta madre, tienen la ventaja de ser plantas libres de patógenos.

En el caso particular de *Agave*, Tapati (1992) observó la micropropagación de *Agave sisalana*. Vargas y García (1996) señalaron que para *A. sisalana* los segmentos de hojas y las yemas axilares eran los tejidos más adecuados para la inducción de respuestas morfogénicas *in vitro*.

Estos autores establecieron que para obtener brotes a partir de las yemas axilares deberían sembrarse los explantes en medio conteniendo las sales MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementadas con BA (2 mg l<sup>-1</sup>) y ANA (0,1 mg l<sup>-1</sup>).

Más recientemente, Hazra *et al.* (2002) establecieron las condiciones para la regeneración *in vitro* de esta especie, a través de organogénesis indirecta partiendo de tejido foliar. Rodríguez-Garay *et al.* (1996) obtuvieron embiogénesis somática en *Agave victoria-reginae*. Por su parte, Enríquez del Valle *et al.* (2005)

encontraron que el uso de ácido indol acético y las sales del medio de Schenk e Hildebrandt (1972) estimularon el crecimiento de los brotes de *Agave angustifolia* y la producción de mayor número de raíces.

En el caso de *A. cocui* Trelease, Mogollón *et al.* (2003) estudiaron el efecto de dos reguladores de crecimiento en el enraizamiento *in vitro* de cocuy. Yepez *et al.* (2001) establecieron una metodología para la propagación de cocuy a partir de organogénesis indirecta utilizando segmentos de hojas. Todas estas metodologías implican la formación de un callo, lo cual es fuente de variabilidad genética (Skirvin *et al.*, 1994).

Este trabajo se basó en la obtención de un protocolo para la regeneración de *Agave cocui* Trelease, basado en el cultivo *in vitro* de meristemas provenientes de yemas axilares, como estrategia para la obtención masiva de plantas, que apoyen el desarrollo socio-productivo de las comunidades.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se realizó en la Unidad de Biotecnología Vegetal del Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIA-CENIAP) en Maracay. Se usaron yemas adventicias provenientes de bulbilos del escape de plantas de cocuy (*A. cocui* Trelease) procedentes de la zona de Guamuy en el municipio Urdaneta del estado Lara, Venezuela. Las yemas axilares se removieron y se desinfectaron inicialmente en etanol 70% durante 1 min, y posteriormente en una solución de hipoclorito de sodio 2,5% i.a., durante 5 min.

El exceso de desinfectante se removió, bajo condiciones de flujo laminar de aire esterilizado, con tres lavados sucesivos con agua destilada esterilizada. A las yemas axilares se le eliminaron los primordios foliares externos, hasta obtener un explante de aproximadamente 0,5mm, consistiendo del domo meristemático y de 1 a 3 primordios foliares. Los explantes se sembraron en tubos de ensayo de 25x150mm conteniendo 10 ml de medio MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con tiamina (1 mg l<sup>-1</sup>), ácido nicotínico (1 mg l<sup>-1</sup>), piridoxina-HCl (1 mg l<sup>-1</sup>), mio-inositol (100 mg l<sup>-1</sup>), BA (0, 0,1 y 1 mg l<sup>-1</sup>), ANA (0, 0,1 y 1 mg l<sup>-1</sup>) sacarosa (30 g l<sup>-1</sup>) y agar (5g l<sup>-1</sup>).

Se sembraron bajo un diseño completamente aleatorizado en un factorial 3x3. Cada tratamiento constó de 10 explantes. Los tubos se colocaron en la oscuridad

por 7 d. Las yemas se colocaron posteriormente bajo luz fluorescente ( $16,95 \text{ W.m}^{-2}$ ) a  $28 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  y un fotoperíodo de 16 h. Se midió el porcentaje de supervivencia, la tasa de crecimiento, número de brotes, número de plantas completas. Los tratamientos se realizaron por triplicado.

Las plantas obtenidas se transplantaron a una mezcla 1:1:1 de suelo: arena: aserrín de coco, en una cámara húmeda 100% HR. Las plantas regeneradas fueron regadas interdiario alternando una solución conteniendo  $\frac{1}{4}$  de las sales MS y agua esterilizada. Cada 2 d se fueron abriendo agujeros en la cámara húmeda para la adaptación gradual de las plantas a las condiciones ambientales.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El cultivo de yemas axilares permitió la supervivencia de 100% de los explantes sembrados, lo cual indicó que la estrategia de desinfección empleada fue eficiente en prevenir la aparición de microorganismos contaminantes. Sin embargo, sólo 40% de los explantes se mantuvieron verdes 4 semanas posteriores a la siembra, correspondientes, principalmente, a los tratamientos con altas dosis de BA. Esta respuesta posiblemente se deba a las altas concentraciones de las citoquininas (BA) las cuales se han señalado que incrementan el contenido de clorofila a través de la diferenciación de cloroplastos, y en consecuencia la capacidad fotosintética (Davies, 1995). Debe tomarse en cuenta que el efecto beneficioso de las citocininas en el mantenimiento de la coloración verde de los tejidos parece estar relacionada con el efecto del genotipo, ya que, Bairu *et al.* (2009) observaron un efecto acelerador del ennegrecimiento de ápices caulinares de *Harpagophytum procumbens* al estar presente en el medio de cultivo cualquier citocinina. Los mismos autores encontraron que la presencia de cualquier auxina potenciaba el proceso de oscurecimiento de los explantes.

Los explantes que no mantuvieron el color verde, se necrosaron en las primeras dos semanas de cultivo *in vitro*. El lavado sucesivo de los tejidos que comenzaron a presentar oscurecimientos, con soluciones antioxidantes (Acido cítrico  $500 \text{ mg l}^{-1}$ , Acido Ascórbico  $1 \text{ g l}^{-1}$ , DTT  $10 \text{ mM}$  o DIECA  $2 \text{ g l}^{-1}$ ), no inhibió el proceso de oscurecimiento en aquellos tejidos que lo exhibieron.

La respuesta *in vitro* favorable de las yemas apicales como fuente de explante en *Agave* ya fue estudiado por

Vargas y García en 1996. Estos autores también señalaron el efecto beneficioso del medio MS suplementado con BA y ANA para la formación de brotes.

Al analizar el efecto del medio de cultivo sobre el crecimiento de los explantes de cocuy se obtuvo que los datos de distribuyeron normalmente (Coeficiente de Shapiro-wilk 0,92). El análisis de la varianza reveló diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, con un  $R^2 = 0,93$  y el coeficiente de variación de 30%. Un mes posterior a la siembra *in vitro*, los meristemas sembrados en el tratamiento con  $1 \text{ mg l}^{-1}$  de ambos reguladores de crecimiento mostraron el mayor crecimiento (ver Cuadro), siendo notorios a simple vista, con un desarrollo inicial de coloración verdosa (Figura 1).

**CUADRO.** Crecimiento de explantes de yemas axilares de cocuy (*A. cocui* Trelease) a los 21 días de ser cultivados *in vitro* en medios con diferentes combinaciones de ANA y BA.

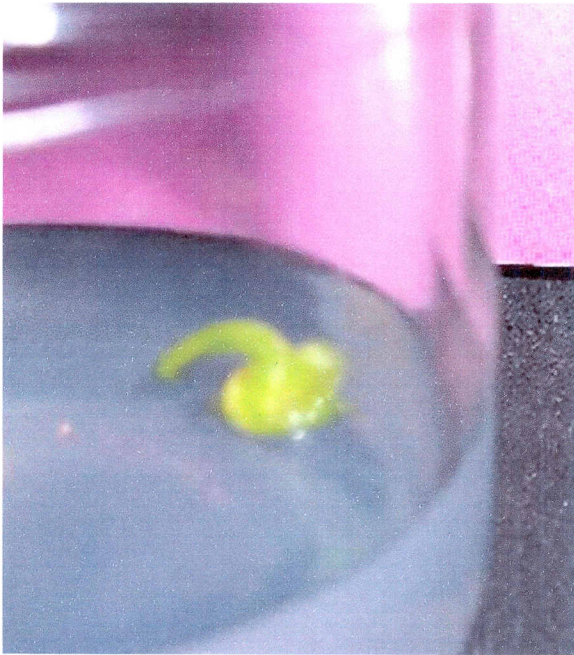
Tratamiento		Incremento en tamaño de los explantes (mm)
ANA ( $\text{mg l}^{-1}$ )	BA ( $\text{mg l}^{-1}$ )	
0	0	$0,00 \pm 0,00^{\text{d*}}$
0	0,1	$0,42 \pm 0,38^{\text{bcd}}$
0	1,0	$0,75 \pm 0,25^{\text{bc}}$
0,1	0	$0,00 \pm 0,00^{\text{d}}$
0,1	0,1	$0,83 \pm 0,29^{\text{bc}}$
0,1	1,0	$1,25 \pm 0,25^{\text{ab}}$
1,0	0	$0,33 \pm 0,58^{\text{cd}}$
1,0	0,1	$1,33 \pm 0,29^{\text{ab}}$
1,0	1,0	$2,83 \pm 0,29^{\text{a}}$

(\*) Letras iguales indican que no hay diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos según la prueba de media de Tukey ( $\alpha=0,05$ ).

El resto de los tratamientos mostraron un crecimiento mucho menor para el mismo período de tiempo, por lo que se decidió continuar con los medios MS suplementados con  $1 \text{ mg l}^{-1}$  de BA y  $1 \text{ mg l}^{-1}$  ANA. En el caso de *A. cocui* Trelease los resultados difieren de los obtenidos por Vargas y García para la formación de brotes en *A. sisalana*, requiriéndose en el caso de cocuy la mitad de



la concentración de BA y 10 veces más auxina. Esto podría deberse a diferencias en el contenido interno de reguladores de crecimiento entre ambas especies, lo cual, además del factor genético, puede ser explicado por la procedencia de los explantes. Se sabe que la condición fisiológica de los explantes es fundamental para la respuesta que exhibirán *in vitro*, y el contenido endógeno de hormonas está directamente influenciado tanto por el estado fisiológico del tejido, como por las condiciones de crecimiento de las plantas.



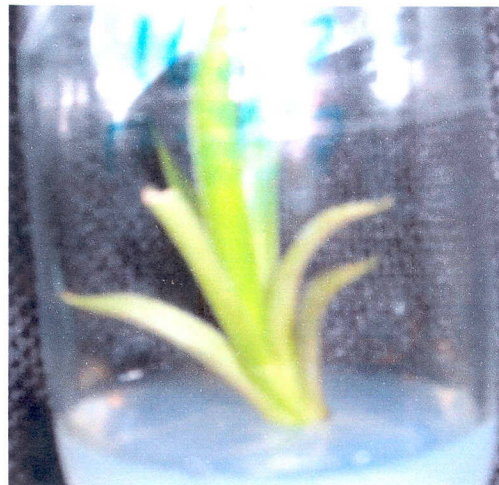
**FIGURA 1.** Brote verdoso de cocuy regenerado *in vitro* tres semanas posteriores a la siembra en condiciones *in vitro*.

Posteriormente, de cada yema sembrada se observó la aparición de brotes múltiples, 2-6 brotes por explante (Figura 2), en el mismo medio de cultivo, 8 semanas posteriores a la siembra. Este proceso se vio acelerado cuando la temperatura se elevó hasta 40 °C. Efectos similares de estimulación de la brotación al aumentar la temperatura han sido señalados en *Allium chinense* (Xu *et al.*, 2008). Gong *et al.* (2005) observaron un efecto estimulador de la brotación en *Arabidopsis* regulado por Glutathione-S-transferasas (GSTS, E.C. 2.5.1.18), las cuales han estado relacionadas con la tolerancia a diferentes estreses, entre los que se encuentra el estrés por temperaturas altas.



**FIGURA 2.** Brotes múltiples de cocuy a partir de una yema axilar cultivada *in vitro*.

Cada uno de los brotes formados, se separó individualmente en el mismo medio de cultivo, dando origen a brotes con 3 a 6 hojas con morfología aparentemente normal (Figura 3). En ninguno de los brotes se observó la formación de raíces al mantenerlos en el mismo medio de cultivo, esto posiblemente relacionado con altas concentraciones de citocininas, las cuales es posible que favorezcan la formación de los brotes, pero inhiban la inducción de las raíces. Pérez *et al.* (2006) demostraron que la rizogénesis en brotes de *Stylosanthes* spp., se obtuvo al eliminar las citocininas del medio de cultivo.

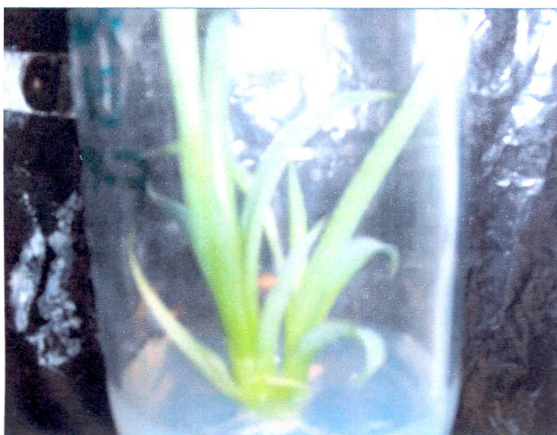


**FIGURA 3.** Brote de cocuy desarrollado *in vitro* provisto de 3 a 4 hojas de morfología normal.



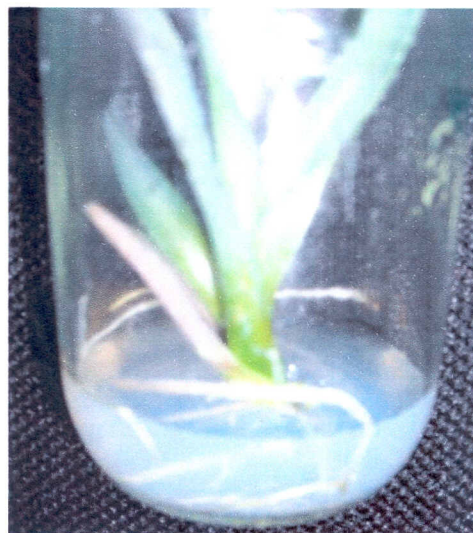
Resultados similares fueron encontrados por Torres y Mogollón (2000) en el enraizamiento de brotes de *Cattleya* regenerados *in vitro*. Laplaze *et al.* (2007) observaron que las citocininas tuvieron una acción inhibitoria sobre las células formadoras de raíces laterales en el periciclo, inhibiendo la formación del gradiente de auxinas necesario para la inducción del primordio radical, estableciendo las primeras bases para el entendimiento del efecto inhibitorio de estas hormonas sobre la rizogénesis.

En algunos casos el trasplante a medio fresco permitió el desarrollo de brotes nuevos (Figura 4), con un predominio de 2 brotes por explante, y ambos brotes presentaron la morfología típica de una plántula de cocuy. La estimulación de la brotación debe estar relacionada a la presencia de citocininas en dosis lo suficientemente elevadas para cambiar la relación Auxina/citocinina a favor de las últimas, estimulando la organogénesis. En sus trabajos, Guo *et al.* (2005) trabajaron la inducción de brotes en cotiledones y segmentos nodales de *Brassica* como resultado de la aplicación exógena de citocininas. De igual modo, Li *et al.* (2009) mostraron el efecto beneficioso de la Cinetina sobre la inducción de brotes en *Sorghastrum nutans* L. Nash. Subotic' *et al.* (2009) estudiaron similarmente un incremento en la inducción de brotes de *Centaurium erythraea* con el uso de citocininas, adicionalmente estos autores señalaron que las citonininas del tipo urea (Thidiazurón, N-(2-chloro-4-pyridyl)-N0-fenillurea (CPPU)) indujeron mayor formación de brotes que las citocininas tipo Adenina (Benzil Adenina (BA), Cinetina (CIN) y 2-isopentenil adenina (2iP)).



**FIGURA 4.** Brote adventicio de cocuy formado posterior al trasplante de brote inicial a medio fresco.

Los brotes al ser transplantados a medio sin reguladores de crecimiento, emitieron raíces, las cuales se elongaron hasta 10 cm de longitud en el mismo medio de cultivo (Figura 5). Los resultados parecen indicar que al eliminar los reguladores de crecimiento el balance auxina/citocinina, pareciese aumentar a favor de las auxinas, lo cual tendería a la inducción de raíces, tal y como lo señalaron Skoog y Miller (1957). Estos resultados concuerdan con lo establecido por George y Sherrington (1984) quienes señalaron que las citocininas endógenas podían inhibir el enraizamiento. Similarmente, Seeni *et al.* (1992) observaron la inhibición del enraizamiento en la orquídea *Renanthera imschootiana* por efecto de las citocininas, del mismo modo que Bairu *et al.* (2009) presentaron la inducción de raíces de *Harpagophytum procumbens* al eliminar las citocininas del medio de cultivo, demostrando el efecto inhibitorio de estos reguladores sobre el enraizamiento.

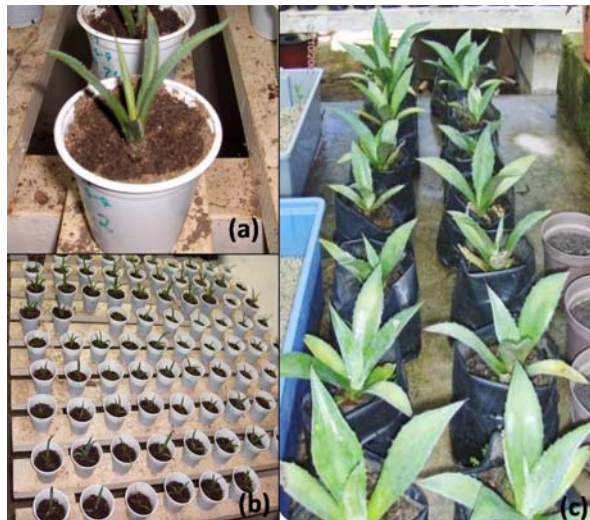


**FIGURA 5.** Brote de cocuy enraizado en medio sin reguladores de desarrollo.

En un intento por explicar el efecto inhibitorio de las citocininas, Nishimura *et al.* (2004) señalaron que el efecto inhibitorio de las citocininas en los procesos morfogénéticos estaría relacionado con la acción de los genes Histidina Kinasa (HK), quienes actuarían sobre las células meristemáticas o de inducción de formación de órganos, impidiendo el proceso de diferenciación celular. Similarmente, Guo y Hu (2008) observaron que al incrementar la concentración de citocininas en *Arabidopsis*, el proceso de formación de raíces se inhibía. Sin embargo, Aloni *et al.* (2006) establecieron

que una vez formado el primordio radical, posiblemente bajo el control de auxinas y etileno, las citocininas sintetizadas en el ápice radical controlaban la dominancia de la raíz principal inhibiendo el crecimiento de las raíces laterales.

Se obtuvieron 415 plantas en el primer ciclo de cultivo, 8 semanas posteriores a la siembra *in vitro*, de las cuales 300 se transplantaron a una mezcla 1:1:1 de arena:tierra:aserrín de coco y se adaptaron gradualmente a las condiciones de humedad y luminosidad. El porcentaje de plantas adaptadas en esta fase fue de 60%, y las pérdidas de los explantes principalmente se debió a daños en el sistema radical, el cual se desprendía con facilidad. Dos semanas posteriores al trasplante al suelo, las plantas se colocaron a crecer en condiciones de umbráculo, donde presentaron la morfología típica de las plantas de cocuy (Figura 6 a, b y c.). El porcentaje de supervivencia al trasladar las plantas ya endurecidas a condiciones de umbráculo fue del 100%, donde las plantas exhibieron una morfología normal.



**FIGURA 6.** (a) Plantas de *A. cocui* Trelease regeneradas *in vitro* ya transplantadas a suelo, (b) materiales creciendo en condiciones de cámara de aclimatación o endurecimiento y (c) materiales creciendo en condiciones de umbráculo.

### CONCLUSIONES

- La propagación de *A. cocui* Trelease a partir de yemas axilares es una estrategia efectiva para la propagación masiva de esta especie.

- Permite la regeneración de plantas completas de apariencia normal, en un lapso de 8 semanas.
- Las yemas apicales deben cultivarse *in vitro* en un medio MS suplementado con BA y ANA a 1 mg l<sup>-1</sup> respectivamente.
- Para la inducción de las raíces los brotes regenerados deberán transferirse a un medio desprovisto de reguladores de crecimiento, donde se producirán raíces de apariencia normal.
- La eficiencia del proceso de trasplante a suelo dependerá en gran medida de la calidad del sistema radical.

### BIBLIOGRAFÍA

- Aloni, R., E. Aloni, M. Langhans and C. Ullrich. 2006. Role of Cytokinin and Auxin in Shaping Root Architecture: Regulating Vascular Differentiation, Lateral Root Initiation, Root Apical Dominance and Root Gravitropism. *Annals of Botany*, 97(5):883-893.
- Bairu, M.W., N. Jain, W. A Stirk, K. Doleal and J. Van Staden. 2009. Solving the problem of shoot-tip necrosis in *Harpagophytum procumbens* by changing the cytokinin types, calcium and boron concentrations in the medium. *South African Journal of Botany*, 75(1):122-127.
- Davies, P. J. 1995. *The Plant Hormones: Their nature, occurrence and factors in plant physiology, biochemistry and molecular biology*- 2nd Edition, Khwer Academic Publishers- 545 p.
- Enríquez Del Valle, J. R., G. Carrillo y J. L. Rodríguez de la O. 2005. Sales Inorgánicas y ácido indolbutírico en el enraizado *in vitro* de brotes de *Agave angustifolia*. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 28(02):175-178.
- George, E. F. y P. D. Sherrington. 1984. *Plant propagation by tissue culture*. Exegetics Ltd. Eversley, England. 1 333 p.
- Gong, H., Y. Jiao, W.-W. Hu and E.-Ch. Pua, 2005. Expression of glutathione-S-transferase and its role in plant growth and development *in vivo* and shoot morphogenesis *in vitro*. *Plant Molecular Biology* 57(1):53-66.



- González-Batista, C. 2000. Nota histórica sobre el *Agave cocui* Trelease. Mimeografiado. Centro de Investigaciones Históricas. U.N.E.F.M. 65 p.
- Guo, D.-P., Z.-J. Zhu, X.-X. Hu and S. J. Zheng., 2005. Effect of cytokinins on shoot regeneration from cotyledon and leaf segment of stem mustard (*Brassica juncea* var. Tsatsai). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 83(1):123-127.
- Guo, J. y Hu, X. 2008. Noninvasive Expressions of *ipt* in Whole Plants or Roots through pOp/LhG4 Indicate a Role of Plant Aerial Parts and Light in Cytokinin Synthesis and Root Inhibition. *Journal of Plant Growth Regulation* 27(3):251-262.
- Hazra, S. K., S. Das y A. K. Das. 2002. Sisal plant regeneration via organogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 70(3):235-240.
- Laplaze L, E. Benkova, I. Casimiro, L. Maes, S. Vanneste, R. Swarup, D. Weijers, V. Calvo, B. Parizot, M. B. Herrera-Rodríguez, R. Offringa, N. Graham, P. Doumas, J. Friml, D. Bogusz, T. Beeckman and M. Bennett. 2007. Cytokinins act directly on lateral root founder cells to inhibit root initiation. *Plant Cell*. 19(12):889-900.
- Li, Y., J. Gao y S. -Z. Fei, S.-Z. 2009. High frequency *in vitro* embryogenic callus induction and plant regeneration from indiangrass mature caryopsis. *Scientia Horticulturae* 119:306-309.
- Mogollón, N., M. González y M. Liendo. 2003. Efecto de dos tipos de reguladores en el enraizamiento del cocuy (*Agave cocui* Trelease) cultivado *in vitro*. **In:** LIII Convención Anual de AsoVAC. Maracaibo, Edo. Zulia. *Acta Científica Venezolana*. 45 p.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and byoassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*. 15:437-497.
- Nishimura, Ch., Y. Ohashi, S. Sato, T. Kato, S. Tabata y Ch. Ueguchi. 2004. Histidine Kinase Homologs That Act as Cytokinin Receptors Possess Overlapping Functions in the Regulation of Shoot and Root Growth in Arabidopsis. *The Plant Cell* 16:1 365-1 377.
- Pérez, A., I. Trujillo, M. del C. Vidal y N. De Lima. 2006. Propagación *in vitro* de *Stylosanthes capitata* Vogel: una especie de gran potencial forrajero. *Acta Bot. Venez.*, 29(2):335-346.
- Rodríguez-Garay, A. Gutiérrez-Mora and B. Acosta-Dueñas. 1996. Somatic embriogénesis of *Agave victoria-reginae* Moore. *Plant Cell, tissue and organ culture*. 46:85-87.
- Schenk, R. U. and A. C. Hildebrandt. 1972, Methods and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell culture. *Can. Jour. Bot.* 50:199-204.
- Seeni, S. y P. G. Latha. 1992. Foliar regeneration of the endangered Red Vanda, *Renanthera imschootiana* Rolfe (Orchidaceae). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* vol 29, num 3, p. 167-1 772.
- Skirvin, R. M., K. D. McPheeters and M. Norton. 1994. Sources and frequency of somaclonal variation. *HortScience* 29 (11):1 231-1 246.
- Skoog, F. and C. O. Miller. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. *Symp Soc Exp Biol*. 54(11):118-130.
- Subotic´, A., S. Jevremovic´ and D. Grubis´ic. 2009. Influence of cytokinins on *in vitro* morphogenesis in root cultures of *Centaurium erythraea*-Valuable medicinal plant. *Sci. Hortic.* 34p
- Tapati, D. 1992. Micropropagation of *Agave sisalana*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 31(3):253-255
- Torres, J. y N. Mogollón. 2000. Micropropagación de *Cattleya mossiae* parker ex hook mediante brotación axilar inducida por tidiazurón. *Bioagro*, 12(1):10-14.
- Vargas, T. y E. García. 1996. Propagación clonal masiva de *Agave sisalana* (SISAL). *Acta Biol. Venez* 16(3):39-44.
- Xu, Z., Y. -Ch. Um, Ch- H. Kim, G. Lu, D. P. Guo, H. L. Liu, A. A. Bah and A. Mao. 2008. Effect of plant growth regulators, temperature and sucrose on shoot proliferation from the stem disc of Chinese jiaotou (*Allium chinense*) and *in vitro* bulblet formation. *Acta Physiologiae Plantarum* 30(4):521-528.
- Yépez, L., E. García y E. Vargas. 2001. Notas preliminares sobre la propagación clonal *in vitro* de *Agave cocui* Trelease. **In:** <http://investigacion.unefm.edu.ve/croizatia>.