

# INTERCIENCIA

Revista de Ciencia y Tecnología de América

Interciencia

Asociación Interciencia

interciencia@ivic.ve

ISSN (Versión impresa): 0378-1844

VENEZUELA

2005

Renaldo Salazar / Teresa Edith Vargas / Eva de García / Maira Oropeza  
MICROPROPAGACION Y ORGANOGÉNESIS DE ASTER ERICOIDES CULTIVAR  
"MONTE CASSINO"

*Interciencia*, mayo, año/vol. 30, número 005

Asociación Interciencia

Caracas, Venezuela

pp. 295-299

Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal

Universidad Autónoma del Estado de México

  
LA MEMORIA CIENTÍFICA EN LÍNEA  
<http://redalyc.uaemex.mx>

Renaldo Salazar, Teresa Edith Vargas, Eva De García y Maira Oropeza

### RESUMEN

La micropropagación y la organogénesis de *Aster ericoides* cultivar "Monte Cassino" fueron establecidas a partir del cultivo de yemas, microesquejes y hojas obtenidos de plantas de 2 meses de edad mantenidas en condiciones de vivero. Las yemas y microesquejes fueron cultivados en medios MS suplementados con  $1\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  de cinetina (K) y  $0,5\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  de ácido indolacético (AIA), obteniendo a los 2 meses de cultivo un promedio de 4,68 brotes a partir del cultivo de microesquejes y de 2,64 brotes a partir del cultivo de yemas. El proceso de organogénesis fue inducido utilizando explantes de hojas de plantas cultivadas in vitro en medios MS suplementados con benciladenina (BA) y ácido naftaleno-acético (ANA). El proceso de organogénesis directa fue observado en

medio MS suplementado con  $0,5\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  BA y  $0,5\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  ANA, obteniendo un número promedio de 1 brote por explante, a los 30-45 días de cultivo. La organogénesis indirecta se observó a partir de callos cultivados en medios suplementados con las mayores concentraciones de BA, obteniéndose el mayor índice de formación de brotes (1,16) en el medio suplementado con  $5\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  BA y  $0,5\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  ANA, a los 6 meses de cultivo. El mayor porcentaje de aclimatación (80%) fue observado en plantas obtenidas a partir del proceso de organogénesis en sustratos de tierra negra. La micropropagación a través del cultivo de microesquejes resultó el sistema de propagación in vitro más eficiente para *Aster ericoides* cultivar "Monte Cassino".

### SUMMARY

Micropropagation and organogenesis were established for *Aster ericoides* cv. "Monte Cassino". Buds and micro cuttings were obtained from 2 months old greenhouse grown plants and cultured on an MS medium supplemented with kinetin (K)  $1\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  and indol acetic acid (IAA)  $0,5\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ . Two months later, an average of 4.68 shoots from micro cuttings culture and 2.64 shoots from buds culture were obtained. Organogenic processes were induced using leaf explants obtained from in vitro plants. These explants were cultured on an MS medium supplemented with bencyladenine (BA) and naphthalene acetic acid (NAA). Direct organogenesis was observed

on a medium supplemented with BA  $0.5\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  and NAA  $0.5\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ . After 30-45 days, an average of one shoot per explant was obtained. Indirect organogenesis was observed 15 days after culture initiation in almost all the culture media. After six months, the highest shoot formation index (1.16) was obtained on an MS medium supplemented with BA  $5\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  and NAA  $0.5\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ . Plants regenerated by organogenesis were transferred to pots and a rate of 80% of plant acclimatization was obtained. Micropropagation from micro cuttings was the most efficient in vitro propagation system for *Aster ericoides* cv "Monte Cassino".

### Introducción

La familia Asteraceae es de gran interés económico a nivel mundial, ya que distintas especies son utilizadas para el consumo humano mediante la extracción de aceite comestible (género *Helianthus* sp.), para uso medicinal con la extracción y purificación de fenoles en los géne-

ros *Anthemis* sp. (Echeverri-garay *et al.*, 2000) y *Tagetes* sp. (Misra y Datta, 2001) y para ornamentación exótica entre los cuales encontramos representantes de los géneros *Chrysanthemum* sp., *Gerbera* sp. y *Aster* sp. (Bunker, 1994). A partir del género *Aster* sp. se han obtenido numerosos híbridos y distintos cultivares que han sido desa-

rollados para la producción de flores de corte y plantas de jardín, lo cual ha hecho que el crecimiento y floración de esta planta ornamental sean de gran interés económico (Wallerstein *et al.*, 1992). En tal sentido, los estudios de floración a nivel fisiológico en este género han sido conducidos con el fin de obtener plantas con caracte-

rísticas deseables para luego ser introducidas en el mercado ornamental. (Kristiansen *et al.*, 1997; Wallerstein *et al.*, 2002). No obstante, la producción de estas plantas ha sido heterogénea y existe necesidad de retardantes de crecimiento que permitan reducir la altura de las mismas y la obtención de plantas en macetas. Este hecho ha origi-

---

### PALABRAS CLAVE / *Aster ericoides* / Cultivo de Microesquejes / Cultivo de Yemas / Flores de Corte / Organogénesis /

---

Recibido: 22/10/2004. Modificado: 14/04/2005. Aceptado: 15/04/2005.

Renaldo Salazar. Licenciado en Biología, Universidad Central de Venezuela (UCV). Estudiante de Postgrado en Botánica, UCV, Venezuela. E-mail: rensalaz@hotmail.com.  
Teresa Edith Vargas. Doctora en Ciencias en Botánica, UCV,

Venezuela. Asistente de Investigación, Centro de Botánica Tropical, UCV, Venezuela.  
Eva de García. Doctora en Ciencias, UCV, Venezuela. Profesor-Investigador y Jefe del Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Centro de Botánica Tro-

pical, Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias, UCV.  
Maira Oropeza. Doctora en Ciencias, UCV. Profesor-Investigador, UCV. Dirección: Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Centro de Botánica Tropical,

Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias, UCV. Apartado 47114, Caracas 1041, Venezuela. email: moropeza@strix.ciens.ucv.ve

A micropropagación e a organogênese de *Aster ericoides* Cultivar "Monte Cassino" foram estabelecidas a partir do cultivo de gemas, microestaquias e folhas obtidas de plantas de 2 meses de idade mantidas em condições de viveiro. As gemas e microestaquias foram cultivadas em meios MS suplementados com 1mg·l<sup>-1</sup> de cinetina (K) e 0,5mg·l<sup>-1</sup> de ácido indolacético (AIA), obtendo aos 2 meses de cultivo uma média de 4,68 brotes a partir do cultivo de microestaquias e de 2,64 brotes a partir do cultivo de gemas. O processo de organogênese foi induzido utilizando explantes de folhas de plantas cultivadas in vitro em meios MS suplementados com benziladenina (BA) e ácido naftaleno acético (ANA). O processo de organogênese direta foi

observado em meio MS suplementado com 0,5mg·l<sup>-1</sup> BA e 0,5mg·l<sup>-1</sup> ANA, obtendo um número médio de 1 brote por explante, aos 30-45 dias de cultivo. A organogênese indireta se observou a partir de calos cultivados em meios suplementados com as maiores concentrações de BA, obtendo-se o maior índice de formação de brotes (1,16) no meio suplementado com 5mg·l<sup>-1</sup> BA e 0,5mg·l<sup>-1</sup> ANA, aos 6 meses de cultivo. A maior porcentagem de aclimatação (80%) foi observado em plantas obtidas a partir do processo de organogênese em substratos de terra negra. A micropropagación através do cultivo de microestaquias resultou o sistema de propagação in vitro mais eficiente para *Aster ericoides* cultivar "Monte Cassino".

nado una creciente demanda por nuevos cultivares que puedan tener un crecimiento compacto y un amplio rango de colores de flores (Kristiansen *et al.*, 1997). Los sistemas de regeneración *in vitro* como la micropropagación, la organogénesis (directa e indirecta) y la embriogénesis somática, son técnicas alternativas de propagación que permiten la obtención de un gran número de plantas bien desarrolladas bajo condiciones establecidas y en un corto lapso de tiempo (Serrano y Piñol, 1991). Estos procesos, en particular la micropropagación y la organogénesis han sido inducidos en muchas especies ornamentales de la familia Asteraceae, entre ellas *Helianthus* sp. (Greco *et al.*, 1984; Lupi *et al.*, 1987; Witzens *et al.*, 1988; Espinasse *et al.*, 1989; Pugliesi *et al.*, 1993; Laparra *et al.*, 1997), *Chrysanthemum* sp. (Kaul *et al.*, 1990; Lee *et al.*, 1997) y *Gerbera* sp. (Reynoird *et al.*, 1993). En este trabajo se establecen la micropropagación a través del cultivo de yemas y microesquejes y la organogénesis directa e indirecta para la especie *Aster ericoides* cultivar "Monte Cassino".

## Materiales y Métodos

### Material Vegetal

Plantas de *Aster ericoides* cultivar "Monte Cassino", colectadas en la localidad de El Jarillo, Estado Aragua, Venezuela, fueron traslada-

TABLA I  
NÚMERO PROMEDIO DE BROTES POR CALLO (N=15) E ÍNDICE DE FORMACIÓN DE BROTES (IFB) DURANTE EL PROCESO DE ORGANOGÉNESIS INDIRECTA EN EXPLANTES DE HOJA DE *Aster ericoides* CULTIVAR "MONTE CASSINO" A LOS 6 MESES DE CULTIVO

Medio	BA (mg·l <sup>-1</sup> )	ANA (mg·l <sup>-1</sup> )	Número promedio de brotes por callo (n=15)	Porcentaje de callos con brotes (n=15)	IFB
1	1	1	3,33*	53	0,192
2	0,5	0,5	3,73*	33	0,083
3	2	1	14,66*	100	0,977
4	5	0	0	0	0
5	5	0,5	17,4*	100	1,16
6	0,5	5	0	0	0

(\*) Promedios significativamente diferentes a P<0,001

das al Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad Central de Venezuela y mantenidas bajo condiciones de vivero, suministrándoles semanalmente fertilizantes (Mairiol®), fungicidas (Vitavax®) e insecticidas (aceite blanco).

### Explantes

Se utilizaron tres tipos de explantes: yemas, microesquejes y hojas. Las yemas y microesquejes fueron obtenidos a partir de plantas de dos meses de edad mantenidas en condiciones de vivero y los segmentos de hoja de aproximadamente 1cm<sup>2</sup> se obtuvieron de plantas *in vitro* regeneradas a partir del cultivo de microesquejes.

### Medios de Cultivo

Los medios de cultivo fueron preparados con las sales

de Murashige y Skoog (1962); tiamina 0,4mg·l<sup>-1</sup>; mio-inositol 100mg·l<sup>-1</sup>, sacarina 30g·l<sup>-1</sup>, pH 5,8. El medio fue solidificado con agar 6g·l<sup>-1</sup>. Para inducir la formación de brotes a partir de yemas y microesquejes el medio de cultivo fue suplementado con 1mg·l<sup>-1</sup> de cinetina (K); 0,5mg·l<sup>-1</sup> de ácido indol-acético (AIA) y 100 o 150mg·l<sup>-1</sup> del antibiótico comercial Cefotaxima. En el caso del proceso de organogénesis se utilizaron diferentes concentraciones y combinaciones de benziladenina (BA) y ácido naftalenoacético (ANA) (Tabla I).

### Cultivo de yemas y microesquejes

Las yemas y microesquejes fueron lavados con jabón comercial (15min); bactericida (Betadine 10%; 15min); fungicida (sulfato de cobre;

25min); solución de cloro comercial al 70% (5min) y Cefotaxima 50mg·l<sup>-1</sup> (15min). Entre cada paso se realizaron lavados con agua destilada estéril. Los explantes desinfectados fueron trasladados a cámara de flujo laminar donde se sembraron en los medios de cultivo correspondientes. Los cultivos fueron mantenidos bajo condiciones de luz continua (50µmoles·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>) y temperatura de 25 ±1°C. La cuantificación de los brotes a partir del cultivo de yemas y microesquejes se realizó a los 2 meses determinando el número promedio de brotes por explante.

### Organogénesis

Para cada medio de inducción (Tabla I) se sembraron 5 réplicas cada una con 5 explantes de hojas (25 explantes en total) en envases de vidrio (5cm de alto x 4cm de diámetro) los cuales fueron trasladados a una cámara de crecimiento bajo condiciones de luz continua (50µmoles·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>) y temperatura (25 ±1°C). Se realizaron observaciones cada 15 días considerando el tamaño y color del explante; formación de callo (tipo, color y abundancia) y formación de brotes. La cuantificación de los brotes se realizó a partir de 15 muestras de callos de aproximadamente 1cm<sup>2</sup>, para cada uno de los medios de cultivo, a los 6 meses de cultivo, determinando el número promedio de bro-

tes por callo/explante y el Índice de Formación de Brotes (IFB) según Martel y García (1992). Para el proceso de organogénesis directa, la cuantificación de los brotes se realizó a los 6 meses de cultivo, determinando el número promedio de brotes por explante y el IFB según Martel y García (1992), en todos los explantes cultivados.

#### Enraizamiento

No fue necesaria la utilización de un medio de cultivo diferente a los medios de iniciación para inducir la formación de raíces, ya que al momento de realizar la cuantificación de brotes para el proceso de micropropagación (2 meses) y organogénesis (6 meses) se observó que estos brotes formaron raíces en el mismo medio de inducción.

#### Análisis Histológico

Con el fin de evaluar la naturaleza del proceso organogénico se realizaron cortes a mano alzada de callo y/o explantes en cada uno de los medios de inducción a los 2 meses de cultivo, realizando observaciones anatómicas bajo microscopio óptico (NIKON 14 MLABP 2) y fotografiados con cámara NIKON FDX-35 Modelo H-III adaptada al microscopio óptico.

#### Aclimatación

Un total de 228 plantas regeneradas a partir del cultivo de yemas, microesquejes y del proceso de organogénesis fueron trasvasadas, eliminando el exceso de agar, a envases plásticos (8cm de alto x 6cm de diámetro) los cuales contenían dos tipos de sustrato: tierra negra y una mezcla de tierra negra y arena lavada (1:2). Las plántulas fueron colocadas en propagadores bajo condiciones de baja luminosidad ( $10\mu\text{moles}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) y alta humedad relativa (80-

93% a lo largo del día). A los 30 días, estas plantas fueron trasladadas a condiciones de vivero para su aclimatación. Dos meses después, se determinó el número de plantas que sobrevivieron en cada sustrato.

#### Análisis Estadístico

Los datos obtenidos durante el establecimiento de los cultivos de microesquejes, yemas y hojas fueron sometidos

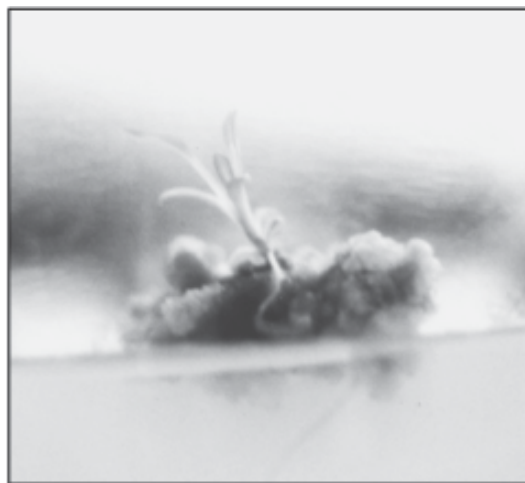


Figura 1.- Brote de *Aster ericoides* cv "Monte Cassino" regenerado directamente a partir de explante de hoja.

obtenidos a partir de microesquejes se observó a las dos semanas de cultivo en el mismo medio utilizado para inducir la formación de brotes. A los dos meses de cultivo, un promedio de 3 raíces principales y abundantes raíces secundarias fueron observadas.

#### Organogénesis directa

El proceso de organogénesis directa únicamente se obser-

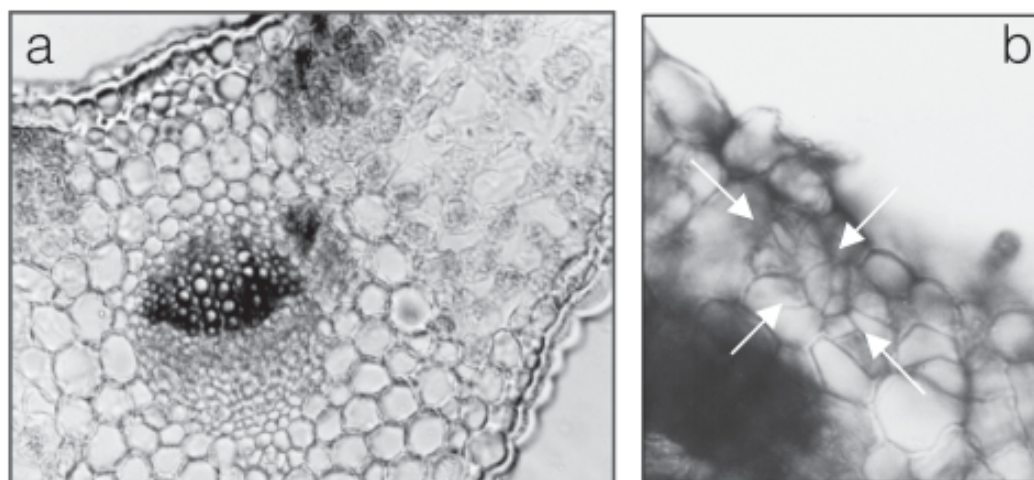


Figura 2. a: Corte transversal de una hoja de una planta obtenida a partir del cultivo de microesquejes y mantenida en condiciones *in vitro* (20X). b: Corte transversal de una hoja cultivada en medio suplementado con  $0,5\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  de BA y  $0,5\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  de ANA. Las flechas indican un grupo de células parenquimáticas en división que forman meristemoides directamente a los 30 días de cultivo.

a la prueba de Kruskal-Wallis para determinar diferencias significativas relacionadas a la formación de brotes entre tratamientos, usando el programa Statistic 6.0.325.0.

### Resultados

#### Cultivo de microesquejes y yemas

Al cultivar microesquejes y yemas en medios de cultivo sin antibióticos se observó una gran variedad de microorganismos patógenos como bacterias y hongos, los cuales dificultaron el esta-

blecimiento de cultivos asépticos *in vitro*. Este problema fue minimizado con la adición de  $150\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  de cefatoxima al medio de cultivo. El 90-95% de los microesquejes sembrados respondieron con la formación de brotes y raíces a los 8-9 días. A los dos meses de cultivo, el número promedio de brotes fue  $4,76 \pm 2,49$  ( $n=21$ ). Con respecto a las yemas, se observó la formación de brotes a los 14-15 días. El número promedio de brotes fue de  $2,57 \pm 1,53$  ( $n=26$ ) a los 2 meses de cultivo. La formación de las primeras raíces en los brotes

vó en el medio de inducción 2 (Tabla I) a los 30-45 días de cultivo. El 4% de los explantes de hoja cultivados en este medio respondieron a la formación directa de brotes, con la formación de un brote por explante (Figura 1). A los 6 meses de subcultivo, se observó la formación directa de brotes en el 12% de los explantes de hoja, con un número promedio de brotes por explante de 31, un IFB= 0,16 y un número promedio de raíces por brote de 5.

La formación de brotes directamente a partir de los explantes, fue corroborada



mediante el análisis histológico de los cortes transversales de las hojas a los 30-45 días de cultivo. La Figura 2a muestra el corte transversal de una hoja de una planta obtenida a partir del cultivo de microesquejes y mantenida en condiciones *in vitro*. Al cultivar estas hojas en el medio de inducción 2 (Tabla I), luego de 30 días se puede observar la formación de meristemoides directamente a partir de las células parenquimáticas cercanas a la epidermis abaxial (Figura 2b).

#### Organogénesis Indirecta

La formación de callo se observó en todos los explantes sembrados en los medios de inducción 1, 2, 3, 5 y 6, principalmente hacia las zonas de corte, aproximadamente a los 15 días de cultivo. En el medio 4, suplementado sólo con BA no se observó la formación de callo ni de brotes. La respuesta de los explantes a la formación de callo fue de un 100% a los 30 días de cultivo. Estos callos presentaron apariencia friable con zonas translúcidas en algunos casos y otros con coloraciones desde blanquecino hasta marrón claro.

La formación de brotes a partir de callo se observó en los medios de inducción 1, 2, 3 y 5 a los 3 meses de cultivo (Tabla I). La mayor formación de brotes y los mayores valores de IFB se observaron en los medios 3 y 5 a los 6 meses de cultivo (Figura 3).

Al realizar cortes de los callos friables, a los 2 meses de cultivo, se observó que las células eran alargadas y estaban distribuidas laxamente, con un contenido citoplasmático denso y en continua división. A los 3 meses de sub-cultivo, se observaron organizaciones celulares bien definidas, con células de diferentes tamaños y paredes engrosadas (Figura 4a), meristemoides (Figura 4b) y tejidos meristemáticos.

Las plantas regeneradas a partir del proceso de organogénesis formaron raíces en los mismos medios de inducción con un promedio de una raíz por brote.

#### Aclimatación

Los mayores porcentajes de aclimatación, se observaron al utilizar como sustrato la tierra negra. Las plantas regeneradas *in vitro* a partir de hojas presentaron los mayores porcentajes de ac-

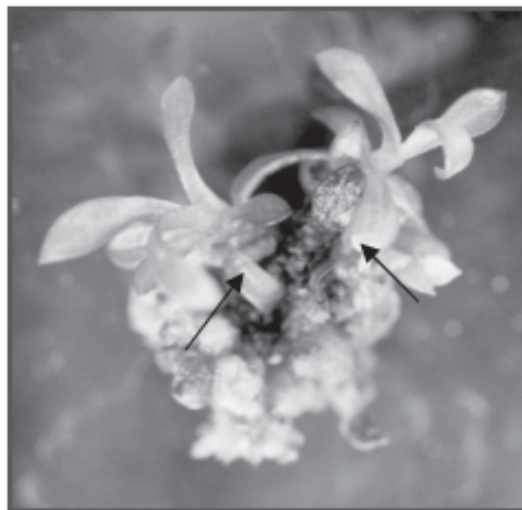


Figura 3. Formación de brotes a partir de callo en el medio de inducción 5 a los 6 meses de cultivo.

multiplicación o de enraizamiento diferente al medio de inducción. Este resultado es de gran valor comercial, ya que permite el establecimiento de un sistema de propagación *in vitro* a gran escala para esta especie. Como todo el proceso se lleva a cabo en un mismo medio de cultivo, esto conlleva a una disminución de los costos de producción (Pennell, 1984).

Con respecto al proceso de organo-

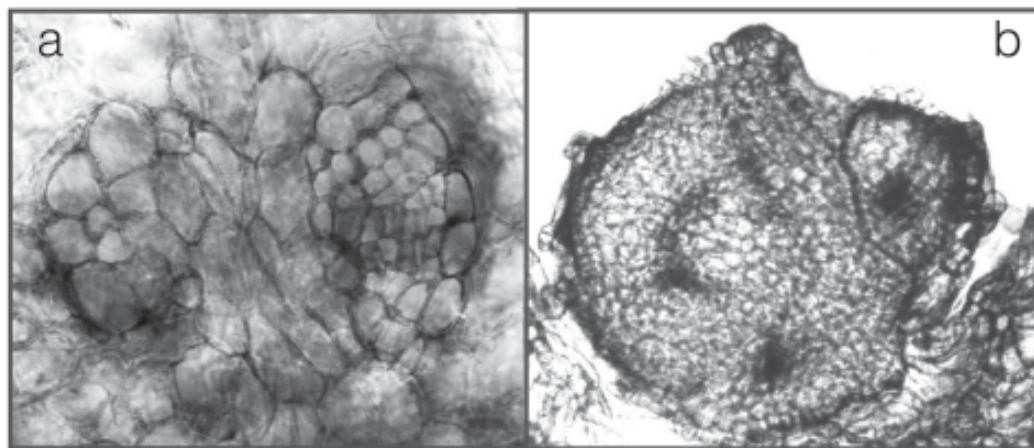


Figura 4. a: Corte transversal de un callo a los 3 meses de cultivo mostrando tejidos meristemáticos (40X). b: Detalle de un meristemóide originado en un callo a los 3 meses de cultivo (10X).

matación (80%), seguidas por las plantas originadas a partir de microesquejes (45%). No se observó una adecuada adaptación a las condiciones de vivero de las plantas regeneradas *in vitro* a partir de yemas.

#### Discusión

La propagación de plantas *in vitro* de este cultivar resultó ser más eficiente a partir del cultivo de microesquejes. La formación de brotes, así como su regeneración es mayor y más rápida a partir del cultivo de microesquejes en comparación al cultivo de yemas a los 2 meses de cultivo. Este resultado sugiere que las concen-

traciones endógenas de auxinas y citocininas en estos explantes son diferentes. La formación de brotes en los microesquejes se ve favorecida porque estos proporcionan otras sustancias que permiten el desarrollo de las yemas en un menor tiempo en comparación con las yemas axilares aisladas (Cherubini, 1987). Cabe notar que durante estos dos meses de cultivo se logra obtener plantas a partir del cultivo de microesquejes, adecuadas para su aclimatación a condiciones de vivero. Estas plantas fueron subcultivadas siempre en el mismo medio de cultivo, sin necesidad de traspasar las vitroplantas a un medio de

génesis, los resultados indican que este proceso puede ser inducido en segmentos de hoja tanto directamente sobre el explante, así como por vía indirecta a partir de callo.

El proceso de organogénesis directa se observó utilizando concentraciones bajas de BA y ANA. Este resultado es diferente al obtenido por Lee *et al.* (1997) quienes observaron la formación de brotes a partir de callo en *Chrysanthemum* sp. utilizando estas mismas condiciones de cultivo. Sin embargo, la formación directa de brotes ha sido observada utilizando estas combinaciones de hormonas en otros géneros de la familia Astera-

ceae como *Petasites hybridus* (Wildi *et al.*, 1998) y *Roman chamomile* (Echeverrigaray *et al.*, 2000).

Con respecto al proceso de organogénesis indirecta la mayor formación de callo se observó en los medios suplementados con concentraciones altas de auxinas, mientras que en los medios suplementados solamente con citocininas no se observó la proliferación de callo. La relación auxina/citocinina en el medio de cultivo es fundamental para la inducción de callo y de brotes en numerosas especies vegetales (Hartmann y Kester, 1994).

La formación de brotes a partir de callo fue observada en medios suplementados con diferentes combinaciones de ANA y BA; sin embargo, una mayor formación de brotes fue observada en los medios con las mayores concentraciones de BA (medios 3 y 5). BA es la citocinina más útil y eficaz para la micropropagación de plantas, y su efecto en la formación de brotes en géneros de la familia Asteraceae ha sido demostrado (Roest y Bokelmann, 1975; Echeverrigaray *et al.*, 2000; Misra y Datta, 2001). Los presentes resultados son similares a los obtenidos por Reynoird *et al.* (1993) en *Gerbera hybrida* y Lee *et al.* (1997) en *Chrysanthemum coronarium* L., quienes utilizan las mismas concentraciones de BA y ANA. Las altas concentraciones de BA en los medios inducen cambios en células del parénquima distribuidas hacia los alrededores de los haces vasculares los cuales son las señales que dirigen el destino de las células hacia la formación de agregados celulares o meristemoides a partir de los cuales se produce la formación de brotes.

Durante la aclimatación, última etapa en el establecimiento de plantas obtenidas *in vitro* se observó que el mejor sustrato corresponde

al de tierra negra, evidenciándose por el alto porcentaje de plantas aclimatadas en este sustrato. Ahora bien, en este sustrato se observó un mayor porcentaje de aclimatación de plantas obtenidas por los procesos de organogénesis. Esto indica que no solo el sustrato beneficia la aclimatación de las plantas sino que la procedencia de las mismas favorece la aclimatación a condiciones de vivero.

Finalmente, la escogencia del método de regeneración adecuado para propagar esta especie va a depender del objetivo planteado. Si lo que se pretende es regenerar un gran número de plantas en un lapso de tiempo corto, genéticamente idénticas a la planta donadora del explante, entonces la micropropagación a partir de microesquejes es el proceso adecuado. Sin embargo, si se quiere obtener un gran número de plantas aunque en un lapso de tiempo mayor, pero que nos permitan aumentar la variabilidad genética de este cultivo para fines de mejoramiento, entonces la organogénesis directa o indirecta deben ser los métodos seleccionados.

#### AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Nelson Ramírez y a Deyanira González, Alix Amaya, Fanny Malavé y Carolina Bernal por sus valiosos comentarios, y el financiamiento del Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad Central de Venezuela CDCH-UCV a través del Proyecto Individual N° PI-0333-4393-2001 otorgado a Maira Oropeza.

#### REFERENCIAS

Bunker KV (1994) Overcoming poor germination in Australian daisies (Asteraceae) by combinations of gibberelin, scarification, light and dark. *Sci. Hort.* 59: 243-252.

Cherubini Lecuna V (1987) Regeneración "in vitro" de

*Ipomoea batatas* a partir de secciones de hoja u otros órganos vegetativos. Tesis. Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela. 97 pp.

Echeverrigaray S, Fracaro F, Andrade LB, Biasio S, Atti-Serafini L (2000) In vitro shoot regeneration from leaf explants of *Roman chamomile*. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 60: 1-4.

Espinasse A, Lay C, Volin J (1989) Effects of growth regulator concentrations and explant size on shoot organogenesis from callus derived from zygotic embryos of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 17: 171-181.

Greco B, Tanzarella OA, Carozo G, Blanco A (1984) Callus induction and shoot regeneration in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Sci. Lett.* 36: 73-77.

Hartmann HT, Kester DE (1994) *Propagación de Plantas. Principios y Prácticas*. Continental. México. pp. 549-592.

Kaul V, Miller RM, Hutchinson JF, Richards D (1990) Shoot regeneration from stem and leaf explants of *Dendratema grandiflora* Tzvelev (syn. *Chrysanthemum morifolium* Ramat). *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 21: 21-30.

Kristiansen K, Wang Hansen C, Brandt K (1997) Flower induction in seedlings of *Aster novi-belgii* and selection before and after vegetative propagation. *Euphytica* 93: 361-367.

Laparra H, Stoeva P, Ivanov P, Hahne G (1997) Plant regeneration from different explants in *Helianthus smithii* Heiser. *Plant Cell Rep.* 16: 692-695.

Lee T, Huang MEE, Pua E (1997) High frequency shoot regeneration from leaf disc explants of garland chrysanthemum (*Chrysanthemum coronarium* L.) *in vitro*. *Plant Sci.* 126: 219-226.

Lupi MC, Bennicci A, Locci F, Gennai D (1987) Plantlet formation from callus and shoot-tip culture of *Helianthus annuus* (L.). *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 11: 47-55.

Martel A, García E (1992) Formación *in vitro* de brotes adventicios en discos de tubérculos de papa

(*Solanum tuberosum* L. cultivar Sebago). *ITON* 53: 57-64, VII.

Misra P, Datta SK (2001) Direct differentiation of shoot buds in leaf segments of white marigold (*Tagetes erecta* L.). *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 37: 466-470.

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-97.

Pennell D (1984) The impact of micropropagation on commercial production. *Sci. Hort.* 35: 28-33.

Pugliesi C, Cecconi F, Baroncelli S (1993) Organogenesis and embryogenesis in *Helianthus tuberosus* and in the interspecific hybrid *Helianthus annuus* x *Helianthus tuberosus*. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 33: 187-193.

Reynoird JP, Chriqui D, Noin M, Brown S, Marie D (1993) Plant regeneration from *in vitro* leaf culture of several *Gerbera* species. *Plant Cell Tiss. Organ Cult* 33: 203-210.

Roest S, Bokelmann GS (1975) Vegetative propagation of *Chrysanthemum cinerariaefolium* *in vitro*. *Sci. Hort.* 1: 120-122.

Serrano García M, Piñol Serra MT (1991) *Bioteconología Vegetal*. Síntesis. Madrid, España. pp.285.

Wallerstein I, Kadman-Zahavi A, Yahel H, Nissim A, Stav R, Michal S (1992) Control of growth and flowering in two *Aster* cultivars as influenced by cutting type, temperature and day length. *Sci. Hort.* 50: 209-218.

Wallerstein I, Libman D, Machnic B, Whitelam G (2002) Modifications in *Aster* responses to long-day conditions caused by overexpression of phytochrome A or B. *Plant Sci.* 50: 209-218.

Wildi E, Schaffner W, Berger Butter K (1998) In vitro propagation of *Petasites hybridus* (Asteraceae) from leaf and petiole explants and from inflorescence buds. *Plant Cell Rep.* 18: 336-340.

Witrzens B, Scowcroft WR, Downes RW, Larkin PJ (1988) Tissue culture and plant regeneration from sunflower (*Helianthus annuus*) and interspecific hybrids (*H. tuberosus* x *H. annuus*). *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 13: 61-76.