



Centro de Investigación en Alimentación y  
Desarrollo, A.C.

**PROPAGACIÓN *IN VITRO* DE ESPÁRRAGO (*Asparagus  
officinalis* L.) POR ORGANOGÉNESIS DIRECTA A PARTIR DE  
YEMAS DEL RIZOMA**

Por:

Gabriela Millán Soto

TESIS APROBADA POR LA  
COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE ORIGEN VEGETAL

Como requisito para obtener el grado de

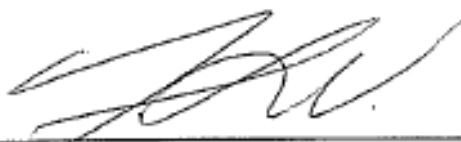
**MAESTRÍA EN CIENCIAS**

**Hermosillo, Sonora**

**Agosto, 2014**

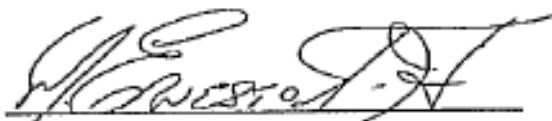
## APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Gabriela Millán Soto, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias.



Dr. Martín C. Esqueda Valle

Director de Tesis



Dr. Martín Ernesto Tiznado Hernández



Dr. Manuel L. Robert Díaz



M.C. Aldo Hiram Gutierrez Saldaña

## DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé el crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director de tesis.



---

Dr. Pablo Wong González

Director General

## DEDICATORIA

A ustedes, mi querida familia:

A mis padres Gabriela y José Reyes quienes han sabido guiarme por el camino de la razón, la verdad, la justicia y los valores. Gracias por todo el amor, el apoyo y la comprensión infinita. Gracias porque nuevamente están conmigo para compartir otro sueño.

A mi único y amado hermano Ernesto Alonso gracias por ser mi ejemplo de fuerza y superación. Gracias porque me enseñas que todo se puede, por darme esos sobrinos tan bellos, por no soltarme de la mano. Las alegrías, sueños e inquietudes siguen presentes.

A mis abuelos Tili y Elvira y al angelito de la familia Susy. Ustedes serán siempre mis segundos padres. Abuelito, tú espíritu vive y seguirá viviendo en nuestra familia.

A mi compañero de aventuras Arturo por ser motivación, apoyo, comprensión, paciencia y amor. Eres mi complemento y mi cómplice, jamás dejemos de soñar. Tú eres mi inspiración.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al CONACYT por brindar el apoyo económico para la realización de este proyecto y servir como intermediario entre los ciudadanos mexicanos y nosotros, estudiantes de posgrado.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. por otorgarme el espacio para llevar a cabo mis estudios de Maestría.

A los señores productores de espárrago por proporcionarnos el material vegetal necesario para llevar a cabo esta investigación, sin su apoyo nada de lo aquí plasmado habría sido realidad.

Al Dr. Martín Esqueda Valle por su confianza y apoyo incondicional a través de los años. Gracias por seguir siendo parte de mi formación como investigador y permitirme hacer lo que más disfruto. Gracias por su amistad!

A los integrantes de mi comité de tesis por su tiempo, paciencia e invaluable conocimiento. Gracias Dr. Martín Ernesto Tizado Hernández por mostrarme al investigador y al profesor en el aula, por su disposición y atenciones; gracias Dr. Manuel L. Robert Díaz por compartir la gran experiencia y sabiduría de la micropropagación de plantas; gracias al M.C. Aldo Hiram Gutierrez Saldaña por ser parte indispensable en este proyecto tanto en campo como en laboratorio, gracias por el apoyo técnico, el análisis estadístico y sus útiles correcciones. Gracias mil a todos, sus acertadas observaciones y recomendaciones hicieron posible esta investigación.

A todo el personal del CIAD por el apoyo y facilidades brindadas durante esta etapa académica: profesores, administrativos y personal de mantenimiento  
GRACIAS!

## **AGRADECIMIENTOS (continuación)**

Al M.C. Alfonso Sánchez y M.C. Damián López por su apoyo técnico y facilitarme material de laboratorio cuando fue necesario.

Al M.C. Javier Ojeda por su apoyo con material y reactivos de laboratorio, así como el transporte eventual de las coronas de espárrago, pero sobretodo gracias por sus consejos y amistad sincera.

Al M.C. Eduardo Hernández por su apoyo en la toma de fotografías.

A la familia Gutierrez Saldaña por recibirme amablemente en su casa durante el trabajo de campo y muy especialmente al Sr. Rosario Gutierrez por transmitirme su amplio conocimiento y experiencia sobre el cultivo de espárrago.

A Haideé Villa por su gran amistad y por el apoyo técnico cuando fue parte del equipo de laboratorio.

A mis padres por creer en mí siempre y soñar a mi lado, mil gracias por apoyar cada decisión de mi vida y estar conmigo cada día. .

A mi hermano Ernesto y su hermosa familia Ana, Dorian y Reyitos por estar en cada paso.

A mi familia postiza Los Ibarra porque sé que siempre cuento con su cariño y apoyo en cada logro.

A mis amigas y hermanas Alma, Patsy, Nabile e Isabel por seguir acompañándome a través de los años.

A mis bioguines que a pesar del tiempo y la distancia siguen ahí.

## **AGRADECIMIENTOS (continuación)**

A mis compañeros y amigos vegetalillos de generación Chavi, Leo, Alejandra, Thalía, Cinthya, David, Heriberto, Rosy, Mayra, Dalila y Nitzia por la convivencia dentro y fuera del aula.

A todos aquellos que no pude mencionar pero forman parte de mi vida...GRACIAS!

A Dios por darme vida y razón, por depositar en mí la fe, la esperanza y la confianza de superarme y ser mejor cada día.

Por último, gracias a ti Martha Coronado porque sin ti este proyecto no tendría vida, tu forma crítica y analítica de ver el mundo permitió el desarrollo de esta investigación. De corazón, gracias por tus sabios consejos y la amistad brindada.

## CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS.....	x
RESUMEN.....	xiii
INTRODUCCIÓN .....	1
ANTECEDENTES .....	3
El Espárrago y sus Generalidades.....	3
Características y posición taxonómica.....	3
Morfología.....	4
Propiedades y usos .....	6
El Cultivo de Espárrago en Sonora.....	6
Producción.....	8
Problemática del cultivo .....	11
La Propagación <i>In Vitro</i> para la Producción de Espárrago .....	12
Etapas de la propagación <i>in vitro</i> .....	13
Factores incidentes en la micropropagación .....	13
Situación Actual de la Propagación <i>In Vitro</i> en Sonora .....	18
HIPÓTESIS .....	20
OBJETIVOS .....	21
Objetivo General.....	21
Objetivos Específicos .....	21
MATERIALES Y MÉTODOS .....	22
Selección y Colecta del Material Biológico .....	22
Obtención del Explante .....	23
Medios de Cultivo.....	24
Siembra <i>In vitro</i> .....	24
FASE 1: Establecimiento .....	25



Desinfección de explantes .....	25
FASE 2. Multiplicación.....	27
Experimento 1. Efecto del tamaño del rizoma en la producción de brotes.....	27
Experimento 2. Efecto de la sacarosa en la producción de brotes. ....	27
Experimento 3. Efecto de BAP (6-bencilaminoapurina) en la producción de brotes y enraizamiento. ....	28
Experimento 4. Efecto de la temperatura en la producción de brotes y enraizamiento. ....	28
FASE 3: Aclimatación.....	29
Análisis de Datos.....	30
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	31
FASE 1: Establecimiento .....	31
Desinfección de explantes.....	31
FASE 2. Multiplicación.....	35
Efecto del tamaño del rizoma en la producción de brotes.....	35
Efecto de la sacarosa en la producción de brotes.....	36
Efecto de 6-bencilaminoapurina (BAP) en la producción de brotes y enraizamiento. ....	43
Efecto de la temperatura en la producción de brotes y enraizamiento. ....	47
CONCLUSIÓN.....	57
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58

## LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Morfología de <i>Asparagus officinalis</i> L.....	5
2	Localización de la plantación comercial de espárrago en Caborca, Sonora, México.....	22
3	A) Aspecto del rizoma compuesto por brotes y raíces. B) Aspecto del conjunto de yemas del rizoma, limpios y preparados para la primera desinfección.....	23
4	Contaminación, coloración verde en el tejido y necrosis/oxidación en explantes de rizoma de espárrago desinfectados con el tratamiento B de Headline y Cupertron respectivamente durante 30 d de cultivo <i>in vitro</i> .....	32
5	Efecto del tamaño del rizoma en la producción de brotes de espárrago a los 21 d de cultivo <i>in vitro</i> .....	35
6	Efecto de la sacarosa en la producción de brotes de espárrago a los 21 d de cultivo <i>in vitro</i> .....	36
7	Producción de brotes de espárrago a los 21 d de cultivo <i>in vitro</i> en los diferentes tratamientos con sacarosa.....	37
8	Efecto del tratamiento C de sacarosa en la producción de brotes de espárrago <i>in vitro</i> .....	38
9	Efecto de 6-bencilaminoapurina (BAP) en la producción de brotes de espárrago a los 21 d de cultivo <i>in vitro</i> .....	43
10	Efecto de 6-bencilaminoapurina (BAP) en la altura de los turiones de rizomas de espárrago a los 21 d de cultivo <i>in vitro</i> .....	45
11	Efecto negativo de 6-bencilaminoapurina (BAP) en rizomas de espárrago a los 21 d de cultivo <i>in vitro</i> .....	45

## LISTA DE FIGURAS (Continuación)

Figura		Página
12	Efecto de la temperatura (35 °C), sacarosa y 6-bencilaminoapurina (BAP) en la producción de brotes de espárrago a los 10 y 21 d de cultivo <i>in vitro</i> .....	49
13	Morfología de rizomas con sin raíz (A) y con raíz (B) utilizados para la fase de aclimatación.....	51
14	Sobrevivencia de rizomas con raíz y sin raíz a los 21 d de aclimatación en invernadero.....	52
15	Efecto de la presencia/ausencia de raíz y el sustrato en la altura de rizomas aclimatados en invernadero (p<0.05) (n=6).....	54

## LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Principales países productores de espárrago.....	10
2	Área cosechada de los principales países productores de espárrago.....	10
3	Desinfectantes comerciales utilizados para el proceso de desinfección de yemas vegetativas de rizomas de espárrago.....	26
4	Formulación de los sustratos para la fase de aclimatación de rizomas.....	29
5	Efecto de la sacarosa en el peso fresco de rizomas de espárrago a los 21 d de cultivo <i>in vitro</i> .....	39
6	Efecto de 6-bencilaminoapurina (BAP) en el peso fresco de rizomas de espárrago a los 21 d de cultivo <i>in vitro</i> .....	44
7	Efecto de la temperatura (35°C) en la producción de brotes de espárrago a los 10 y 21 d de cultivo <i>in vitro</i> ...	49
8	Características organogénicas de rizomas para aclimatación.....	50
9	Sobrevivencia de rizomas de espárrago a los 21 d de aclimatación en invernadero para cada sustrato.....	52
10	Características físicas y químicas del suelo del sustrato para aclimatación de rizomas <i>in vitro</i> en condiciones de invernadero.....	56

## RESUMEN

El espárrago (*Asparagus officinalis* L.) es una hortaliza cultivada para la producción de turiones de gran interés en mercados internacionales. Sin embargo, los métodos convencionales de cultivo no son suficientes para satisfacer esta demanda, por lo que la propagación *in vitro* se presenta como una alternativa viable para incrementar su producción. Actualmente, no existe un protocolo eficiente de propagación *in vitro* de espárrago y la principal problemática es el material vegetal que se utiliza como explante. Por lo cual, el objetivo de este estudio es establecer un protocolo eficiente de propagación *in vitro* de espárrago por organogénesis directa a través de yemas del rizoma. Se evaluaron y caracterizaron los rizomas *in vitro* en la fase de establecimiento (FE), multiplicación (FM) y aclimatación (FA). En la FE se observó un 36% de explantes sin contaminación y 72% con coloración verde en el tejido a una concentración B de fungicida y fungicida-bactericida, respectivamente. En la FM se presentó una producción media de 27 brotes/rizoma a los 21 días de establecimiento *in vitro* en un medio adicionado con el tratamiento C de sacarosa ( $p < 0.05$ ) y libre de fitohormonas. La mayor producción de brotes se observó con el tratamiento B de BAP (30.7 brotes/explante), pero provocó disminución en el crecimiento de turiones y vitrificación ( $p < 0.05$ ). La temperatura de 35 °C aumentó la producción de brotes y disminuyó el tiempo de activación de las yemas vegetativas ( $p < 0.05$ ). Se logró un 95% sobrevivencia de rizomas aclimatados en invernadero. El presente protocolo se considera eficiente para la producción de rizomas *in vitro*, ya que se redujeron los tiempos y costos de producción.

**Palabras clave:** espárrago, propagación *in vitro*, organogénesis directa, yemas vegetativas, rizoma.

## ABSTRACT

*Asparagus* (*Asparagus officinalis* L.) is a vegetable cultivated for the production of shoots (spears) of great interest in international markets. However, conventional culture methods are not sufficient to meet this demand, so that the propagation *in vitro* is presented as a viable alternative to increase production. Currently, there isn't an efficient protocol for the propagation *in vitro* of asparagus and the main reason is the plant material used as explant. Therefore, the aim of this study is to establish an efficient method for the propagation *in vitro* of asparagus by direct organogenesis through rhizome buds. *In vitro* rhizomes were evaluated and characterized in the establishment (FE), multiplication (FM) and acclimatization (FA) stages. We found for FE that 36% sterilized explants and 72% green coloration tissue using the disinfectant treatment B. In the FM observed an average yield of 27 shoots/rhizome at 21 days *in vitro* establishment in a medium supplemented with sucrose treatment C ( $p < 0.05$ ) without phytohormones. The B treatment BAP inducing the formation of the highest number of shoots (mean shoot number per explant = 30.7), but caused reduced growth of shoots and vitrification. The temperature of 35 ° C increased shoot production and decreased the time of activation of the vegetative buds ( $p < 0.05$ ). In the FA the percentage survival of rhizomes was 95 under greenhouse conditions. This protocol suggesting an efficient method for the production of *in vitro* rhizomes, as time and production costs were reduced.

**Keywords:** asparagus, propagation *in vitro*, direct organogenesis, vegetative buds, rhizome.

## INTRODUCCIÓN

El espárrago (*Asparagus officinalis* L.) es una planta herbácea que se caracteriza por ser una especie perenne, monocotiledónea y dioica que crece en climas templados y subtropicales (Grubben y Denton, 2004). La importancia de esta especie radica en que es la única de su género cultivada como hortaliza para la producción de turiones, que son considerados un alimento gourmet debido a su sabor exquisito y sus propiedades nutricionales (Pamplona, 2006; Delcid, 2011). Los turiones se desarrollan a partir de yemas vegetativas que conforman el rizoma, un tallo modificado que actúa como unión entre el sistema radical y la parte aérea de la planta (López y Cointry, 2008). Por lo anterior, el cultivo de esta hortaliza es de gran interés en mercados internacionales tales como Estados Unidos, Canadá, Japón y Europa (Navarro y López, 2002).

La plantación de espárrago se realiza mediante propagación por semillas y trasplante del rizoma. No obstante estos métodos convencionales no son suficientes para satisfacer la demanda del mercado debido a que la siembra directa por semilla genera cultivos heterogéneos y resulta un proceso arduo que requiere de 3 años desde el comienzo del programa hasta la obtención de la semilla comercial y por otra parte, la división vegetativa del rizoma favorece la transmisión de enfermedades por hongos y bacterias, siendo a la vez una práctica lenta cuando se requiere un gran número de plantas (Asprelli *et al.*, 2002; Valenzuela y López, 2011). Además, es un cultivo que demanda gran cantidad de agua para obtener buenas producciones, el cual es un elemento escaso en la región y por otro lado costoso debido al alto consumo de energía en su extracción de pozos profundos (Fimbres y Mollinedo, 2005). Por tal motivo, la propagación *in vitro* se presenta como una alternativa para incrementar la producción de espárrago, generar individuos de mejor calidad y

rendimiento, tener disponibilidad de material vegetal en todas las épocas del año y garantizar plantas libres de enfermedades.

La propagación *in vitro* mediante organogénesis directa es una de las técnicas más utilizadas para la producción de espárrago que consiste en generar clones o copias de genotipos específicos (Caro *et al.*, 2010). Sin embargo, las metodologías que se utilizan actualmente se consideran lentas e ineficientes debido a que pueden presentar bajos porcentajes de regeneración de plantas y formación de raíces, largos períodos de cultivo y dificultad técnica. Estas desventajas se atribuyen al material vegetal que se utiliza como explante que generalmente son semillas, secciones nodales y meristemas apicales del turión (Desjardins, 1992; Asprelli *et al.*, 2002; Duangpaeng *et al.*, 2003; Pontarol y Camadro, 2005; Bojnauth *et al.*, 2010; Fazelzadeh *et al.*, 2013).

Una alternativa viable es utilizar como explante yemas vegetativas del rizoma para la inducción y producción de rizomas *in vitro*, ya que ofrece una mejor regeneración de plantas y capacidad para la formación de raíz debido a la presencia de un mayor número de meristemas en la superficie del explante y tejido de parénquima en la base. Por lo tanto, el propósito de este estudio fue establecer un protocolo eficiente de propagación *in vitro* de espárrago por organogénesis directa a través de yemas del rizoma que permita incrementar la producción de plantas elite de espárrago. Los objetivos específicos fueron establecer un método eficiente de desinfección, optimizar el medio de cultivo para un eficiente establecimiento, multiplicación y enraizamiento de rizomas *in vitro* y determinar las condiciones óptimas de aclimatación en invernadero.



## ANTECEDENTES

### El Espárrago y sus Generalidades

#### **Características y posición taxonómica**

El espárrago es una planta de origen europeo, que se conoce desde épocas antiguas y es cultivada desde hace 2000 años, formando parte de la alimentación del ser humano debido a su delicado sabor y sus propiedades nutricionales. Llegó a América en el siglo XVII, traída por los españoles. Es una planta vivaz, que puede permanecer en el suelo por varios años, y cuya parte aprovechable son las yemas de los tallos denominados turiones (Fernández y Bañon, 1992).

Etimológicamente espárrago proviene del latín *Asparagus*, del griego "Asparagos" y del persa *Asparag* que significa "brote". El espárrago pertenece a la familia Liliaceae y se denomina botánicamente *Asparagus officinalis* L. (Fernández y Bañon, 1992). Es una planta herbácea perenne que se caracteriza por ser una especie monocotiledónea (Grubben y Denton, 2004). Es originario de la región oriental del Mediterráneo y Asia Menor y crece de manera natural en climas templados y subtropicales, siendo la única especie de su género cultivada como hortaliza (Ornstrup, 1997).

El espárrago es de naturaleza dioica, hay plantas con flores masculinas y plantas con flores femeninas (Fernández y Bañon, 1992). Las plantas masculinas son más productivas en turiones que las plantas femeninas, esto es lógico que ocurra, ya que las plantas femeninas en la formación de flores, frutos y semillas utilizan buena parte de las reservas, que en el caso de las plantas masculinas acumulan dichas reservas en las raíces para la próxima producción de turiones. Las plantas masculinas son también más precoces y longevas que las hembras (del Pozo-L, 1999; López y Cointry, 2008).

## **Morfología**

La planta del espárrago está compuesta por una parte subterránea y una parte aérea. La parte subterránea está formada por un rizoma y el sistema radical, que en conjunto forman lo que se denomina “corona”, “garra” o “araña”. La parte aérea se denomina helecho o follaje y la constituyen tallos erectos y hojas modificadas. Esta estructura es donde se desarrollan las flores y los frutos (del Pozo-L, 1999). Benages-Sanahuja (1990) señala que la parte aérea, cumple la función de convertir sustancias químicas en materia orgánica para poder elaborar las reservas necesarias que durante el siguiente año posibilitarán la producción de turiones.

El rizoma es un tallo modificado que actúa como unión entre el sistema radical y la parte aérea de la planta. Este posee dos tipos de raíces: unas carnosas y gruesas que pueden alcanzar hasta más de un metro de profundidad y cuya función es almacenar los carbohidratos y, otras fibrosas, que son delgadas y cortas, cuya función es la absorción del agua y nutrientes. En el rizoma se forman, además, grupos de yemas vegetativas, ubicadas en el ápice de crecimiento, de donde se desarrollan los turiones o espárragos (del Pozo-L, 1999; López y Cointry, 2008; Watson y Dallwitz, 1992). Estos turiones constituyen el producto aprovechable para el consumo humano y se caracterizan por presentar brácteas que se encuentran en el ápice formando la cabeza que posteriormente se abre para dar paso al sistema foliar. Estos tallos tiernos son los futuros tallos ramificados de la planta (Fernández y Bañón, 1992; Grubben y Denton, 2004).

Las flores son de color blanco-verdoso con forma de campana, de 5-8 mm las femeninas y 3-5 mm las masculinas. El proceso de polinización es de tipo entomófilo (del Pozo-L, 1999). El fruto es una baya de 8 mm de diámetro color rojo y cada uno de los cuales contiene de 1 a 2 semillas redondeadas color negras de 3-4 mm (Delgado, 2007) con un poder germinativo superior al 85%. Por cada 100 g hay alrededor de 5,000 semillas y estas dan origen a la corona (Figura 1) (CIREN, 1987).

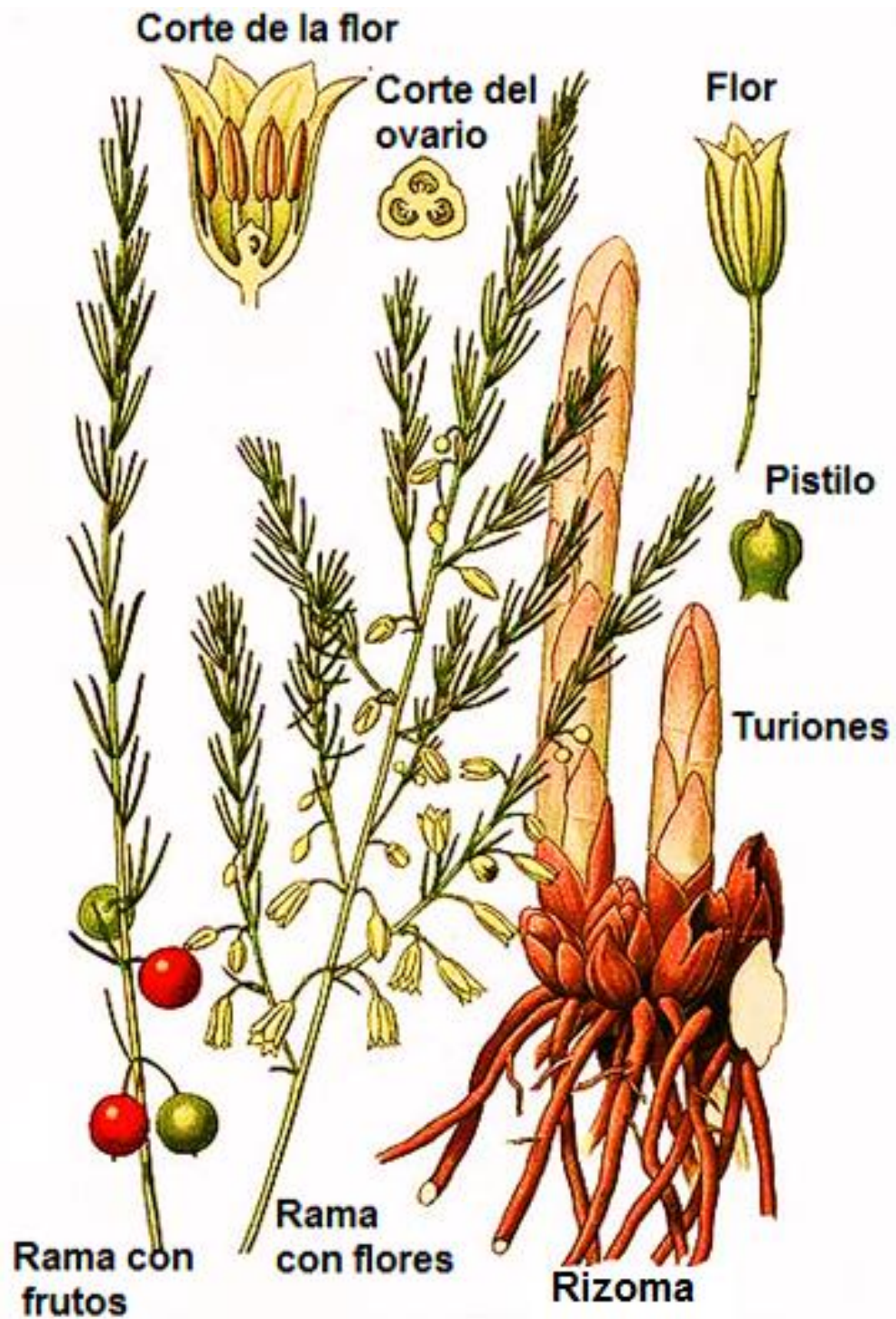


Figura 1. Morfología de *Asparagus officinalis* L. (Masclef, 1891).

### **Propiedades y usos**

El espárrago es un producto natural de textura carnosa y firme, un aroma intenso con un sabor ligeramente dulce que requiere exposición a la luz solar para obtener un color verdoso. Esta hortaliza es considerada como un alimento gourmet por su sabor exquisito y propiedades nutricionales (Delcid, 2011). Desde el punto de vista nutritivo es uno de los alimentos más bajos en calorías con sólo 23 kcal/100 g. Esto se debe a su casi total carencia de grasas y su escaso aporte en hidratos de carbono. No obstante, es una de las hortalizas más ricas en proteínas con 2.28 g/100 g, cantidad que se aproxima a la espinaca (2.86%) (Pamplona, 2006).

Además de sus cualidades alimenticias, se le atribuyen tradicionalmente propiedades medicinales, ya que el espárrago tiene un efecto diurético y laxante suave por su alto contenido en fibra. Asimismo se ha utilizado como tónico para tratar neuritis, reumatismo, antihemorrágico y anticancerígeno (Delcid, 2011).

### **El Cultivo de Espárrago en Sonora**

La plantación se lleva a cabo mediante dos métodos, siembra directa por semilla y en menor cantidad a través de trasplante de rizoma; en caso de utilizar la siembra directa puede realizarse en los meses de septiembre a marzo y el trasplante se lleva a cabo de enero a marzo (Valenzuela y López, 2011). La duración económica del cultivo puede ser de hasta 15 a 20 años con un buen manejo (del Pozo-L, 1999; Castagnino *et al*, 2012) y llega al máximo de producción a los 4 ó 5 años, dependiendo del tamaño de los rizomas al momento de la plantación (Asprelli *et al.*, 2002).

El desarrollo y crecimiento del espárrago conlleva tres ciclos:

Primer ciclo de crecimiento: Cada planta se forma a partir de semillas que emergen en primavera. Durante la germinación se rompe la testa de la semilla y emerge la radícula. La emergencia corresponde a la aparición del brote aéreo. Posteriormente en estado de plántula se diferencian y comienzan a desarrollar el rizoma, y los sistemas radiculares adventicios y fibrosos. A partir de las yemas vegetativas, que se han diferenciado en el rizoma, se desarrollan nuevos brotes aéreos los que crecen y se expanden dando origen al follaje (del Pozo-L, 1999).

En el verano el follaje se compone de varios helechos los que continúan creciendo hasta el final de esta estación, igual que el rizoma. También durante el verano se diferencian nuevas yemas vegetativas en el rizoma, las que permanecerán como tal hasta la próxima temporada de crecimiento. La etapa reproductiva se inicia con la aparición de las primeras floras y luego se forman los frutos que maduraran a fines del verano. Durante el otoño ocurre la senescencia del follaje y se inicia el receso invernal del espárrago (del Pozo-L, 1999).

Segundo ciclo de crecimiento: Las yemas vegetativas siguen brotando, emergen y crecen los turiones (tallos), formándose nuevamente el follaje. Durante este ciclo no hay cosecha de turiones y lo que se pretende es que se desarrolle el follaje, aumente la biomasa del rizoma y del sistema radicular de reserva de manera que se acumulen suficientes carbohidratos y se diferencien un gran número de yemas vegetativas en el rizoma. El follaje puede alcanzar hasta 2 m de altura. El período reproductivo es similar al primer ciclo, pero se producen un número mayor de flores y de frutos por planta. En otoño se produce la senescencia del follaje y las plantas entran nuevamente en receso (del Pozo-L, 1999).

Tercer ciclo de crecimiento: Se inicia con la brotación de turiones en primavera y se efectúa la cosecha de turiones. Al término de la cosecha los turiones que quedan crecen y se expanden dando origen al follaje. La producción de flores y frutos es similar a la del segundo ciclo, lo mismo que la senescencia del follaje y el posterior receso invernal (del Pozo-L, 1999).

Después del tercer ciclo, en la región de Caborca, Sonora se realiza la cosecha de forma anual. Aproximadamente en octubre-noviembre una vez que inicia la senescencia del follaje y disminuye la temperatura se limita el riego del cultivo para que las reservas almacenadas en el follaje se dirijan al rizoma. En diciembre, cuando se da el cambio en la coloración del follaje, este se corta y quema lo cual induce la activación de yemas vegetativas por el aumento de la temperatura (Gutierrez com. pers., 2014). La cosecha se realiza de forma diaria, iniciando la última semana de diciembre hasta la segunda y tercera semana de abril, y se cosechan los turiones que tienen un largo de 20 a 25 cm (de la base a la punta de color verde) (Grubben y Denton, 2004; Valenzuela y López, 2011).

## **Producción**

La producción de espárragos se ha constituido durante los últimos años en una actividad con un creciente auge por ser un producto con un nivel preferencial en el mercado internacional que le permite obtener elevados beneficios, dado el incremento de su consumo y la variedad de preparaciones. A nivel mundial, el cultivo del espárrago es de gran importancia económica siendo su superficie cultivada similar al de otras hortalizas como ajo, pimiento, zanahoria o berenjena. Según la FAO en el 2014 la producción mundial de espárrago fue de 8,301,482 t, siendo China el mayor productor con 7,353,200 t, seguido de Perú con 376,645 t (Cuadro 1 y 2).

México ocupa el tercer lugar en producción con 119,789 t obtenidas de una superficie de aproximadamente 16,233 ha (FAO, 2014) (Cuadro 1 y 2). A nivel nacional la producción se concentra en los Estados de Baja California, Baja California Sur, Guanajuato y Sonora, destacando este último por ser el principal productor de espárrago, una producción media de 84,022 t con una superficie de cosecha en promedio anual de 10,880 ha que se comercializan casi en un 90% en el mercado internacional, generando una importante cantidad de jornales y de divisas para la región y el país (OEIDRUS, 2009; SIAP, 2014).

La principal región productora de Sonora se localiza en Caborca, con un poco más del 60% de la producción estatal (46,175 t) y actualmente se encuentran establecidas alrededor de 7,000 ha que generan aproximadamente 1,636 millones de pesos (INIFAP, 2010; Valenzuela y López, 2011). Las características edafológicas y el clima desértico de la zona le imprimen una calidad especial al producto, haciendo que este cultivo alcance un excelente desarrollo vegetativo. Esto se representa en una planta vigorosa que se refleja en altas producciones debido a que este cultivo requiere temperaturas calientes durante el día y frías en la noche, así como baja humedad relativa (Valencia, 2007; Valenzuela, 2011).

Por otra parte, la utilización de tecnología de punta, el seguimiento de normas de inocuidad y el ajustarse a buenas prácticas agrícolas y de manufactura le ha permitido a sus productores ser competitivos y cumplir con los estándares de calidad internacionales (Valencia, 2007). En la actualidad el 90% de la producción se envía a Estados Unidos, Canadá, Europa y Japón, el resto se va al mercado nacional. No obstante de que se produce espárrago de excelente calidad, las tendencias del mercado se encaminan hacia la producción de nuevos cultivares de mayor calidad para satisfacer las necesidades actuales: individuos de alto rendimiento y más productivos en menor tiempo que desarrollen turiones con las características exigidas por el mercado en cuanto a tamaño, grosor y color.

**Cuadro 1.** Principales países productores de espárrago (FAO, 2014).

PAIS	Producción (t)		
	2010	2011	2012
China	7,002,657	7,252,903	7,353,200
Perú	335,209	392,306	376,645
México	74,660	85,417	119,789
Alemania	92,404	103,457	102,395
Tailandia	63,108	61,891	65,000
España	50,362	58,421	45,400
USA	36,240	38,100	34,520
Italia	43,973	33,022	29,914

**Cuadro 2.** Área cosechada de los principales países productores de espárrago (FAO, 2014).

PAIS	Área cosechada (ha)		
	2010	2011	2012
China	1,280,576	1,320,597	1,350,000
Perú	30,896	33,144	33,063
Alemania	18,794	18,611	19,329
Tailandia	16,657	16,558	16,600
México	12,858	14,736	16,233
España	10,178	11,047	10,700
USA	11,330	11,050	10,240
Italia	6,307	5,226	4,881



## **Problemática del cultivo**

Como se ha analizado hasta el momento el espárrago es una especie que normalmente se multiplica mediante semillas y en ocasiones por división vegetativa de su rizoma. La tradicional propagación por semillas puede producir plantaciones con una gran variabilidad genética y por lo tanto plantaciones con una productividad limitada y heterogénea al no presentar todos los individuos una calidad uniforme (Doré, 1990; Yang y Clore, 1973). La opción de una división vegetativa para la multiplicación del espárrago, tiene habitualmente un rendimiento bajo, requiere una gran cantidad de mano de obra para su realización y puede favorecer la transmisión de enfermedades. Lo anterior hace que el trasplante por rizoma sea un método poco rentable para las empresas productoras de espárrago (Corriols y Thévenin, 1979; Ellison, 1986).

Durante muchos años se intentó incrementar la uniformidad del cultivo efectuando la plantación a partir de porciones de coronas de plantas seleccionadas obtenidas por división de las mismas. Sin embargo, no se obtuvo el resultado deseado debido a la susceptibilidad al ataque de hongos y bacterias, siendo a la vez una práctica lenta cuando se requiere un gran número de plantas. Por tales motivos, sólo es posible producir dos o tres plantas por año a partir de cada planta madre (Asprelli *et al.*, 2002; Ornstrup, 1997).

En las últimas décadas se inició el desarrollo de técnicas biotecnológicas como auxiliares en los planes de mejoramiento. Estas han permitido la obtención de clones entre plantas selectas multiplicadas por cultivo *in vitro* (Corriols y Thévenin, 1979) dependiendo el éxito, de las características del material utilizado como punto de partida (Muñoz *et al.*, 2006). Por ejemplo, se han realizado estudios de micropropagación de plantas de importancia económica como de tomate (Apraez *et al.*, 2012), manzana (Dobránszki y Teixeira, 2010), sandía (Khalekuzzaman *et al.*, 2012), fresa (Hasan *et al.*, 2010), piña (Scherer *et al.*, 2013), plátano (Martins *et al.*, 2011), entre otros. Es por ello que esta investigación propone la propagación *in vitro* por

organogénesis directa mediante estructuras gemantes del rizoma como una opción factible para para la producción de espárrago.

### La Propagación *In Vitro* para la Producción de Espárrago

La técnica de cultivo de tejidos se ha utilizado desde hace 120 años aproximadamente en diversas investigaciones. Los primeros informes de cultivo de tejidos de *Asparagus officinalis* se remonta a 1945 con los estudios realizados por Loo (1945). Desde entonces, este sector ha experimentado un gran desarrollo y se han establecido varios métodos en la regeneración *in vitro* de espárrago: organogénesis directa (Murashige *et al.*, 1972; Hasegawa *et al.*, 1973; Yang y Clore, 1973), organogénesis indirecta (Reuther 1977) y embriogénesis somática (Takatori *et al.*, 1968).

La propagación *in vitro* mediante organogénesis directa es una de las técnicas más utilizadas para la producción de espárrago que consiste en generar clones o copias de genotipos específicos y se realiza mediante técnicas como el cultivo de meristemos apicales o de secciones nodales con yemas axilares del turión (Caro *et al.*, 2010). Durante la evolución de la micropropagación del espárrago destacan tres metodologías: Murashige *et al.* (1972), Yukimasa *et al.* (1990) y Desjardins (1992), pero todos presentan generalmente notables desventajas como dificultad técnica, bajo rendimiento, largos períodos de cultivo, entre otras.

El procedimiento de micropropagación de espárrago más aceptado es el de Desjardins (1992); sin embargo, según Caro *et al.* (2010) es un método utilizable pero lento, no se puede aplicar a todas las especies de espárrago y de resultados muy erráticos, ya que depende de la inducción y formación de una estructura gemante adventicia (a partir del yemas axilares o apicales del turión) y de un enraizado posterior lo que se suele producir de forma impredecible.

### **Etapas de la propagación *in vitro***

Hartmann y Kester (1994) mencionan cuatro etapas del proceso de micropropagación: establecimiento, multiplicación, pretrasplante y trasplante. La primera consiste en establecer un explante estéril en un medio de cultivo. Los factores que afectan esta etapa incluyen la selección del explante, la eliminación de contaminación y las condiciones ambientales del medio donde se cultiva. La siguiente fase es la multiplicación, que tiene como objetivo incrementar el número de vitroplantas, para luego ser enraizadas en un nuevo medio de cultivo. El pretrasplante, también llamado aclimatación, consiste en preparar a la plántula para ser llevada a condiciones *ex vitro*, donde se promueve la iniciación de raíces y el alargamiento del tallo. Finalmente, está la etapa de trasplante que es donde se lleva a cabo la transferencia de las plántulas aclimatadas a un medio de vida natural o a un campo de cultivo para su aprovechamiento.

### **Factores incidentes en la micropropagación**

La propagación *in vitro* puede verse afectada por distintos factores tanto bióticos como abióticos. A continuación se presentan algunos de ellos:

Planta madre. Según Murashige (1974) el estado fisiológico de la planta madre y la época en que el explante es extraído pueden afectar el potencial organogénético. En el caso del espárrago es preferible utilizar plantas masculinas por ser más productivas y resistentes a enfermedades, respecto de las plantas femeninas. El potencial productivo y calidad de este cultivo dependen de la interacción del genotipo con el ambiente y del manejo recibido, por lo que es importante efectuar una adecuada elección del individuo que servirá como planta madre, con la finalidad de obtener clones elite que desarrollen un alto rendimiento en número y peso medio de turiones (Castagnino et al., 2012; Cointry et al., 1996; Gatti et al., 2000; Milanesi et al.,

2008). Por lo tanto, las clonas elite de espárrago deben presentar reducida e inclusive ausente variabilidad genética, ya que un individuo con esta característica presenta la ventaja de brindar un producto homogéneo, aunque el ambiente de cultivo puede modificar la expresión de algunos caracteres (Castagnino et al., 2012).

Explante. La edad fisiológica del explante tiene una gran influencia en la morfogénesis. Si el tejido es más joven y menos diferenciado al sembrar, mejor será la respuesta que tenga al ser cultivado en condiciones *in vitro*. En la selección se toma en cuenta el tipo de propagación que tenga la planta. Para especies propagadas de forma vegetativa, la fuente de los explantes son los brotes jóvenes y los ápices meristemáticos; por otra parte, el tamaño del explante también juega un rol importante en la respuesta que se tenga en el cultivo *in vitro* (Becerra, 1999).

Diferentes procedimientos han sido descritos para *Asparagus officinalis* a partir de distintos tipos de explantes tales como hipocótilos (Willmar y Hellendoorn, 1968), yemas terminales (Kunitake *et al.*, 1996), tallos (Reuther, 1977; Saito *et al.*, 1991), anteras (Muñoz *et al.*, 2006; Peng y Wolyn, 1999), meristemas apicales de turiones (Asprelli *et al.*, 2002), secciones nodales con yemas axilares (Duangpaeng *et al.*, 2003; Pontaroli y Camadro, 2005; Yang y Cloré, 1.973) y embriones somáticos (Bojnauth *et al.*, 2003; Limanton-Grevet *et al.*, 2000; Štajner *et al.*, 2002; Kunitake y Mil; 1998).

No obstante, la aplicación de los explantes mencionados tiene la desventaja de ser un método lento e ineficiente y no válido para todos los genotipos. Todos estos métodos implican la inducción adventicia de una zona meristemática *in vitro* a partir de un explante de sección nodal del turión, ápice del turión o alguno de los anteriores y es el cuello de botella de los métodos de Yang y Cloré (1974), Chin (1982), Khunachack *et al.* (1987), Yukimasa *et al.*

(1990) y Desjardins (1992); y es también, el principal problema a resolver de cualquier tipo de micropropagación de espárrago.

Asimismo, al utilizar los meristemas apicales o las yemas laterales del turión para la propagación clonal de espárragos generalmente se producen individuos delgados, con raíces débiles o incluso ninguna formación de la raíz (Chin y Khunachak. 1984; Shigeta *et al.*, 1996). Por ejemplo, el método de Desjardins (1992) que utiliza secciones nodales del turión requiere de 4 a 14 meses para obtención de plántulas por lo que es considerado un método utilizable, pero muy lento. En el estudio de Asprelli *et al.* (2002), se usó como explante el meristemo apical del turión y reportan porcentajes muy bajos de vástagos y raíces desarrolladas. Se analizaron 10 genotipos, donde sólo una de ellos presentó un porcentaje de desarrollo de vástagos de 66.7%, mientras que en el resto de los genotipos hubo un desarrollo menor que osciló entre 0 y 28.6%. Para el enraizamiento de plántulas, sólo el 22.2% desarrolló raíz en dos genotipos diferentes y en el resto no se observó la presencia de raíz.

En otro estudio se utilizaron como explante tanto los meristemas apicales del turión como las secciones nodales (Bojnauth *et al.*, 2003). Se realizaron cinco tratamientos con diferentes concentraciones de hormonas para cada tipo de explante y se observó una mayor regeneración de plántulas a partir de explantes con meristemas apicales. El máximo número de plántulas regeneradas fue de siete y se obtuvo a partir de explantes de secciones nodales. Sin embargo, en este tipo de explante sólo hubo desarrollo de plántulas en dos de los tratamientos, mientras que el 80% de los tratamientos con meristemas apicales presentó de 3.5 hasta 6 plantas regeneradas.

Las anteriores investigaciones muestran largos tiempos y bajos porcentajes de producción de plántulas de espárrago, por lo cual estos métodos son poco eficientes para la propagación masiva, sin embargo, proporcionan un punto de partida para futuras investigaciones. Una alternativa es utilizar como explante yemas vegetativas ya preexistentes en el rizoma donde las raíces se forman a partir de un tejido de parénquima que se conserva en la parte basal

del rizoma que se utiliza como explante, lo que podría ser eficiente para la micropropagación clonal de las plantas (Caro *et al.*, 2010). Si se utiliza el rizoma como fuente de explantes se debe considerar que el tamaño de las yemas está positivamente correlacionado con el tamaño de los turiones (Nichols y Woolley, 1985). Por ello, se deben seleccionar rizomas de buena calidad caracterizados por la presencia de raíces bien formadas, yemas grandes y sin heridas ni evidencia de ataque de hongos, ya que a partir de esta parte de la planta se hará el establecimiento (CIREN, 1987).

Otra de las limitantes que se ha presentado para el establecimiento *in vitro* del espárrago son los altos porcentajes de contaminación debido a las enfermedades que atacan al cultivo en sus diferentes etapas fenológicas. Las enfermedades de mayor incidencia en la región de Sonora son fusariosis (*Fusarium spp.*), tizón (*Cercospora asparagi*), mancha púrpura (*Stemphylium vesicarium*) y roya (*Puccinia asparagi*). Desafortunadamente no existen cultivares altamente resistentes y los tratamientos químicos no son tan exitosos (Milanesi *et al.*, 2008; Valenzuela y López, 2011). En un estudio de micropropagación de espárrago realizado por Asprelli *et al.* (2002) se analizaron 10 genotipos de espárrago blanco y verde y sólo en uno de los genotipos no se presentó ningún tipo de contaminación. Para el resto de los genotipos el porcentaje de explantes contaminados fue de entre 10 y 100%. Por lo tanto, la desinfección es considerada el otro gran reto de la micropropagación del espárrago.

Medio de cultivo y fitohormonas. La composición química del medio de cultivo es un factor importante en la morfogénesis. Éste se compone de macro y microelementos, aminoácidos, vitaminas, fitohormonas, carbohidratos y un gelificante (Seemann, 1993). No existe un medio de cultivo universal a ser utilizado en la propagación de plantas *in vitro*, sin embargo, el medio basal MS propuesto por Murashige y Skoog (1962) ha sido el más empleado para esta técnica.

La aplicación de balances hormonales en el medio de cultivo, estimulan la formación de nuevas estructuras. Una adecuada mezcla de auxinas y citosinas controlan la regeneración de tallos y raíces ya que la respuesta organogénica varía en función de la suplementación de los medios basales. Las auxinas promueven la diferenciación de callo, el crecimiento de cultivo de células en suspensión y de raíces, mientras que las citocininas que estimulan la división celular y la diferenciación de brotes (Seemann, 1993).

Para el establecimiento *in vitro* de espárrago se han reportado diferentes tipos y concentraciones de fitohormonas. En investigaciones recientes, Duangpaeng *et al.* (2003) evaluaron el efecto del ácido naftalénacético (ANA) y 6-bencilaminopurina en la formación de órganos de espárrago. Sus resultados indican que bajas concentraciones de BAP (0.05 y 0.1 mg/L) son necesarias para la formación de brotes, mientras que ANA no tiene un efecto significativo en la formación de estas estructuras, pero en bajas concentraciones (0.05 y 0.1 mg/L) mejora el efecto de BAP. Durante este experimento no se observó la formación de raíz. Sin embargo, en otros estudios se ha reportado que el ancymidol induce el desarrollo de la raíz (Asprelli *et al.*, 2002; Shigeta *et al.*, 1996).

Por otra parte, Caro *et al.* (2010) mencionan que la combinación de 0.5 mg/L de ANA más Kinetina 0.7 mg/L, más 2 mg/L de ancymidol, con 60 g/L de sacarosa generó los mejores resultados en dos genotipos de espárrago estudiados. Se observó un porcentaje de explantes con brotación de 90 y 85 % para cada genotipo con un número medio de brotes de 2.7 y 1.2 y un número medio de raíces de 5.5 y 4.4, respectivamente. La longitud media de la los brotes fue de 6.6 y 7.2 y la de las raíces 6.8 y 7.5 en cada genotipo.

Para la formación de tallos, brotes y raíces de espárrago, además de ANA, BAP y ancymidol, se propone el uso de otras fitohormonas como el ácido indolacético (AIA), el ácido indolbutírico (AIB) y el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (Benmoussa *et al.*, 1996; Bojnauth, 2003; Limanton-Grevet *et al.*, 2000).

Factores físicos. La organogénesis puede ser afectada por distintos factores abióticos como lo son luz, temperatura, humedad relativa y, consistencia y pH del medio de cultivo. La temperatura de incubación para la mayoría de las especies propagadas fluctúa entre los 24 y 28 °C. La luz, que también cumple un rol determinante en el crecimiento y desarrollo del explante, está involucrada en la diferenciación de órganos. Los componentes que afectan al explante en cuestión son la intensidad, el fotoperiodo y su calidad (Hartmann y Kester, 1994).

### Situación Actual de la Propagación *In Vitro* en Sonora

A pesar de que existen diferentes técnicas de micropropagación de espárrago se debe considerar que estos métodos no se pueden utilizar para propagar vegetativamente todas las variedades y líneas genéticas de la especie *Asparagus officinalis*, ya que la respuesta de la planta está determinada por las condiciones agroclimáticas de la zona de producción, es decir, las metodologías son específicas para las diferentes variedades de espárrago. Por otra parte, los métodos existentes no son eficientes, son lentos y no son utilizables a nivel de propagación comercial, por su dificultad técnica, escaso rendimiento y/o coste final (Caro *et al.*, 2010; Desjardins, 1992).

Por lo anterior, la aplicación de la propagación *in vitro* por organogénesis directa mediante yemas del rizoma puede ser una opción viable para aumentar la producción, tener disponibilidad de material vegetal en todas las épocas del año y mejorar la calidad del cultivo del espárrago en Sonora. Para que este protocolo de micropropagación sea eficiente se necesita reducir los tiempos y costos de producción *in vitro*, pero sobre todo producir líneas clonales elite de espárrago con altos porcentajes de brotación, enraizamiento y aclimatación. Para esto, se propone la producción de rizomas *in vitro*, es decir, el objetivo no es producir vitroplantas de espárrago, sino inducir el desarrollo de plántulas en la fase de aclimatación a partir de rizomas obtenidos en las fases de establecimiento y multiplicación. De esta manera, se considera habrá una



mayor regeneración de plántulas, ya que el rizoma *in vitro* estará compuesto por varios centros meristemáticos y, una mayor eficiencia para la formación de raíz, debido a que este tejido es el que de forma natural desarrolla el sistema radicular en la planta.

## **HIPÓTESIS**

El uso de yemas vegetativas del rizoma para la producción de rizomas *in vitro* ofrece una mejor regeneración de plantas y capacidad para la formación de raíz debido a la presencia de un mayor número de meristemas en la superficie del explante y tejido de parénquima en la base.

## OBJETIVOS

### Objetivo General

Establecer un protocolo de propagación *in vitro* de espárrago (*Asparagus officinalis* L.) por organogénesis directa a partir de yemas del rizoma.

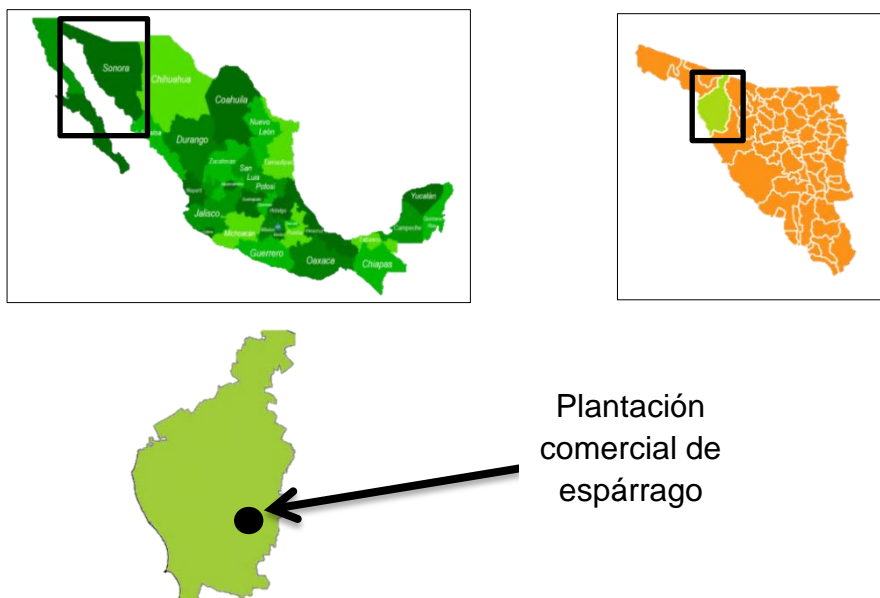
### Objetivos Específicos

1. Establecer un método eficiente de desinfección de yemas del rizoma en la fase de inducción.
2. Optimizar el medio de cultivo para un eficiente establecimiento, multiplicación y enraizamiento de rizomas *in vitro*.
3. Determinar las condiciones óptimas para la aclimatación de rizomas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Selección y Colecta del Material Biológico

El material vegetal utilizado fueron rizomas de espárrago variedad Early California proporcionados por una plantación comercial en el municipio de Caborca ubicado al noroeste de Sonora (Figura 2). En el área de cultivo de espárrago se seleccionaron plantas madre vigorosas y aparentemente libres de enfermedades con buena producción de follaje o brotes. Los rizomas se transportaron al laboratorio de Micropropagación del CIAD para su procesamiento.



**Figura 2.** Localización de la plantación comercial de espárrago en Caborca, Sonora, México. Fuente: INEGI. Marco Geoestadístico Municipal 2010, versión 5.0.

## Obtención del Explante

Como explante se utilizaron yemas vegetativas extraídas del rizoma de espárrago. A los rizomas se les eliminó el exceso de suelo, tallos aéreos y raíces, así como material necrótico y fueron cortados en secciones de yemas más pequeñas. Este material se lavó con agua destilada y detergente comercial para garantizar el desprendimiento de polvo y otras impurezas. Durante los enjuagues con agua destilada jabonosa se redujo el tejido en grupos de yemas más pequeños, las cuales se lavaron en un solución desinfectante de hipoclorito de calcio ( $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ ) al 40% por 30 min, después recibieron 3 enjuagues con agua destilada estéril y se realizó otra reducción del tejido donde se eliminaron las brácteas más superficiales. El explante estaba compuesto por una a seis yemas apicales con varias brácteas y un trozo de tejido parenquimático en la base de dicha(s) yema(s) de donde se formaron los meristemas de raíz y primordios radiculares (Figura 3).



A



B

**Figura 3.** A) Aspecto del rizoma compuesto por brotes y raíces. B) Aspecto del conjunto de yemas del rizoma, limpias y preparadas para la primera desinfección.

## Medios de Cultivo

Para la preparación de los medios de cultivo se empleó como medio basal en todos los experimentos las sales Murashige y Skoog (MS) (1962) modificadas y se definieron las concentraciones hormonales de auxinas y/o citocininas de acuerdo a la fase en estudio (establecimiento y multiplicación). Una vez preparados los medios de cultivo, el pH se ajustó a 5.75 con KOH 1 molar (M) o HCl 1 M. El medio de cultivo se vació en frascos de vidrio colocando 25 mL en cada uno para la fase de establecimiento y en cajas magenta con 50 mL en la fase de multiplicación y se esterilizaron en autoclave durante 20 min a 121 °C y 15 lb de presión. Posteriormente se dejó solidificar el medio a temperatura ambiente.

## Siembra *In vitro*

Bajos condiciones asépticas en una cámara de flujo laminar (LABCONCO ® Purifier™ Clean Bench. USA) se sembró un explante por frasco y/o caja magenta en medio de cultivo MS modificado, se colocaron tapones de polipropileno y se sellaron con parafilm. Durante las diferentes etapas de los experimentos, los cultivos se mantuvieron en un cuarto de crecimiento con fotoperíodo de 12 h suministrado por tubos fluorescentes a una temperatura de 25±2 °C.

## FASE 1: Establecimiento

### **Desinfección de explantes**

Una vez obtenidas las yemas vegetativas se realizó la primera desinfección sumergiendo los explantes en una solución fungicida y se redujeron brácteas y zonas de tejido dañado. Después se llevó a cabo la segunda desinfección donde las yemas vegetativas fueron tratadas con una solución fungicida-bactericida para ser finalmente lavadas en condiciones asépticas. En la cámara de flujo laminar (LABCONCO ® Purifier™ Clean Bench. USA) se practicó una tercera desinfección con una solución de NaClO al 30% durante 25 min y se realizó un último corte de las yemas vegetativas donde se retiró el tejido dañado por el tratamiento de desinfección para la posterior siembra del explante. Después de aplicar cada solución desinfectante el tejido recibió tres enjuagues sucesivos con agua destilada estéril para eliminar los residuos. Se evaluó el efecto de dos dosis (A y B mL L<sup>-1</sup>) del desinfectante 1 y desinfectante 2 respectivamente, en un tiempo de exposición de 10 min cada uno (Figura 4). Las características de cada desinfectante se observan en el Cuadro 3.

Los explantes se sembraron de forma individual en 25 mL de medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) (MS) modificado, adicionado con sacarosa comercial y agar-agar (AGARMEX, MEX). Los explantes se mantuvieron por 30 d en el cuarto de crecimiento bajo condiciones controladas a 25±2 ° C, 80% de humedad relativa y fotoperíodos de 12 h luz blanca. Se evaluó el porcentaje de explantes contaminados, tipo de contaminación (bacteria y hongo), porcentaje de explantes con brotación y coloración verde en el tejido.

**Cuadro 3.** Desinfectantes comerciales utilizados para el proceso de desinfección de yemas vegetativas de rizomas de espárrago.

<b>Desinfectante</b>	<b>Nombre comercial</b>	<b>Acción</b>	<b>Ingrediente activo</b>	<b>Porcentaje en peso</b>
1	HEADLINE <sup>MR</sup>  Fabricante/ Formulador:  BASF	Fungicida	Pyraclostrobin:  Metil N-{2-[1-(4-Clorofenil)-1H-Pirazol-3-il]oximetil]fenil} (N-metoxi) carbamato	23.6%
2	CUPERTRON  Fabricante/ Formulador:  ARYSTA-GMB	Fungicida- Bactericida	Oxicloruro de cobre	13.18%

BASF: BASF S.A. The Chemical Company  
 ARYSTA-GBM: ARYSTA-Grupo Bioquímico Mexicano



## FASE 2. Multiplicación

Los rizomas *in vitro* originados de los explantes fueron transferidos a medio nutritivo MS modificado adicionado con sacarosa comercial, agar-agar (AGARMEX, MEX) y gelano Gelzan™ CM (Sigma, USA), sin concentración hormonal y ajustado a un pH de 5.75 cada 45 d.

### **Experimento 1. Efecto del tamaño del rizoma en la producción de brotes.**

Se seleccionaron aleatoriamente cuatro rizomas *in vitro* con un área superficial de 1, 2, 3, 4 y 6 cm<sup>2</sup>, respectivamente, para un total de 20 rizomas y cinco tratamientos. Se cultivaron en medio de cultivo MS modificado adicionado con sacarosa comercial, agar-agar (AGARMEX, MEX) y gelano Gelzan™ CM (Sigma, USA), sin la adición de reguladores de crecimiento. Se cortaron los brotes de cada rizoma *in vitro* hasta la base y se realizaron evaluaciones del número y tamaño de los brotes (cm) cada tercer día durante 21 d.

### **Experimento 2. Efecto de la sacarosa en la producción de brotes.**

Se seleccionaron aleatoriamente 28 rizomas *in vitro* de 1 cm<sup>3</sup> y se cultivaron en medio nutritivo MS modificado con agar-agar (AGARMEX, MEX) y gelano Gelzan™ CM (Sigma, USA), complementado con A, B, C y D g L<sup>-1</sup> de sacarosa comercial para un total de cuatro tratamientos con siete rizomas *in vitro* cada uno. Se cortaron los brotes de cada rizoma *in vitro* hasta la base y se realizaron evaluaciones del número y tamaño de los brotes (cm) cada tercer día durante 21 d.

### **Experimento 3. Efecto de BAP (6-bencilaminoapurina) en la producción de brotes y enraizamiento.**

Se seleccionaron aleatoriamente 28 rizomas *in vitro* de 1 cm<sup>3</sup> y se cultivaron en medio de cultivo MS modificado adicionado con sacarosa comercial, agar-agar (AGARMEX, MEX) y gelano Gelzan<sup>TM</sup> CM (Sigma, USA). Se complementó con cuatro niveles de concentración de BAP (Sigma): A, B, C y D mg L<sup>-1</sup>. Se establecieron cuatro tratamientos con siete rizomas *in vitro* cada uno en un período de cultivo de 21 d. Se cortaron los brotes de cada rizoma *in vitro* como en la etapa anterior y se realizaron evaluaciones cada tercer día del número de brotes, tamaño de brotes (cm), porcentaje de explantes con enraizamiento y peso fresco (g).

### **Experimento 4. Efecto de la temperatura en la producción de brotes y enraizamiento.**

Se seleccionaron aleatoriamente 5 rizomas *in vitro* sin raíz ni brotes y se colocaron en una cámara bioclimática (Lab-line ® Biotronette Plant Growth Chamber, III, Estados Unidos) en medio de cultivo MS modificado adicionado con 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa comercial y 1.6 g L<sup>-1</sup> de agar-agar (AGARMEX, MEX) y gelano Gelzan<sup>TM</sup> CM (Sigma, USA), respectivamente. Durante 10 d los rizomas se mantuvieron a 35 °C con fotoperiodos de 12 h, posteriormente se colocaron en cuarto de incubación a 25±2 °C con el mismo fotoperíodo y humedad relativa de 60 a 80% durante 11 d. Esto se llevó a cabo con la finalidad de imitar el proceso de corte y “quema” del cultivo de espárrago que se realiza de forma anual en el campo, con lo cual se induce la activación de yemas apicales y radicales. Se evaluó el número de brotes, tamaño de brotes (cm) y porcentaje de explantes con enraizamiento.

### FASE 3: Aclimatación

Se seleccionaron 48 rizomas provenientes de la fase de multiplicación y enraizamiento y se dividieron en dos grupos sin y con raíz. Se caracterizaron los rizomas considerando sus propiedades organogénicas como el área vegetal (cm<sup>2</sup>), altura del brote (cm), peso fresco (g), longitud de raíz (cm) y desarrollo de follaje. Posteriormente, cada grupo se sembró en cuatro sustratos diferentes: sustrato A, B, C y D (Cuadro 4). Previamente, se hizo un análisis físico y químico del sustrato natural. Los rizomas se colocaron en el invernadero y se regaron cada 3 d con 50 mL de agua potable. Se establecieron cuatro tratamientos con 12 rizomas cada uno y los 21 d se evaluaron el porcentaje de sobrevivencia, número de brotes y tamaño de los brotes (cm). Se registró la humedad y temperatura diariamente con un sensor HOBO<sup>®</sup> H08-004-02 (Onset Computer Corporation, USA).

**Cuadro 4.** Formulación de los sustratos para la fase de aclimatación de rizomas.

<b>Sustrato</b>	<b>Componente</b>	
	<b>% Natural</b>	<b>% Turba</b>
<b>A</b>	100	0
<b>B</b>	80	20
<b>C</b>	70	30
<b>D</b>	50	50

## Análisis de Datos

Para todos los análisis estadísticos se aplicó un diseño completamente al azar (DCA) y se empleó el programa NCSS 2007 (Hintze, 2007). Para evaluar la mejor concentración de desinfectante en la etapa de establecimiento, así como el efecto del tamaño del rizoma, la sacarosa, BAP y temperatura en la producción de brotes durante la fase de multiplicación se utilizó un diseño de una vía. En la fase de aclimatación se usó un arreglo factorial 2X4 para evaluar la altura y los factores estuvieron representados por presencia/ausencia de raíz y el tipo de sustrato (A, B, C y D). Para la evaluación de la sobrevivencia se aplicó la  $\chi^2$ . Se realizó el análisis de varianza a las variables evaluadas y en los casos donde fue necesario se utilizó la prueba de comparación de medias de Fisher ( $p < 0.05$ ).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### FASE 1: Establecimiento

#### Desinfección de explantes

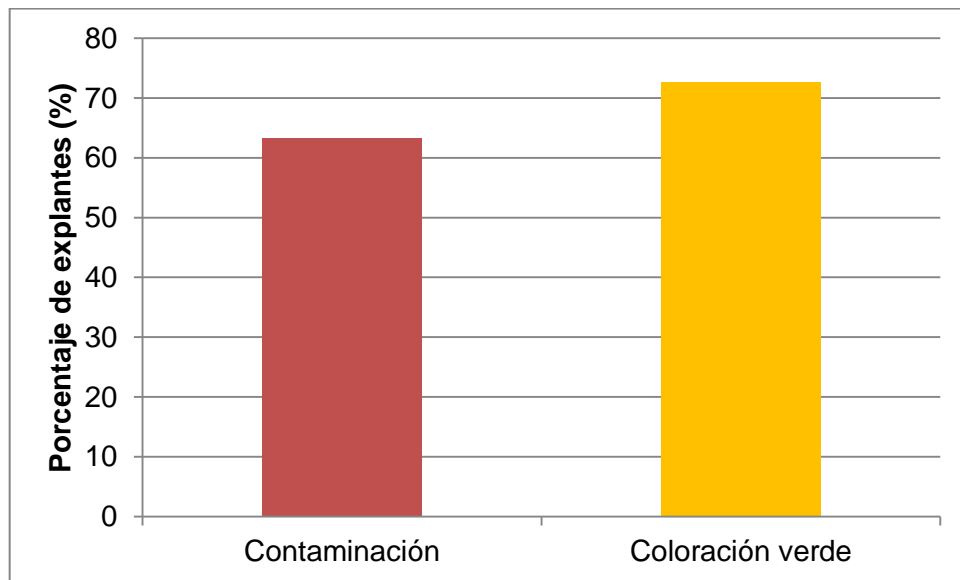
Una de las principales limitantes del establecimiento *in vitro* de espárrago son los altos porcentajes de contaminación y el tipo de tejido que se utiliza como explante. Para este protocolo se observó un porcentaje de contaminación de 63.34% aplicando el tratamiento B del fungicida Headline y fungicida-bactericida Cupertron, respectivamente (Figura 4). Esta alta proporción de explantes contaminados se debe principalmente a la naturaleza del tejido utilizado, el cual está compuesto por yemas vegetativas del rizoma.

El rizoma es un tallo modificado que actúa como unión entre el sistema radical y la parte aérea de la planta y posee raíces que pueden arraigar hasta más de un metro de profundidad (Fernández y Bañón, 1992; Grubben y Denton, 2004), es decir, las yemas vegetativas ubicadas en el ápice de crecimiento del rizoma son subterráneas y por lo tanto están expuestas al suelo y su biota, lo por lo que es natural la presencia de hongos y bacterias en el tejido.

La contaminación estuvo representada en un 53% de hongo y un 47% de bacteria. Es posible encontrar *Fusarium* spp., *Cercospora asparagi*, *Stemphylium vesicarium* o *Puccinia asparagi*, ya que son los principales agentes que provocan las enfermedades del cultivo de espárrago en la región de Sonora (Gutierrez com. pers., 2014; Valenzuela y López, 2011).

El porcentaje de contaminación se considera alto, no obstante también se observó un 72.73% de explantes con coloración verde en el tejido, lo cual indica la capacidad de activación de las yemas vegetativas para su posterior diferenciación (Figura 4). Esto sugiere que el 36.36% de explantes libres de contaminación obtenidos con la metodología propuesta es suficiente para

establecer una producción de rizomas *in vitro* de espárrago, pero será necesaria una mayor introducción de material inicial.



**Figura 4.** Contaminación y coloración verde en el tejido en explantes de rizoma de espárrago desinfectados con el tratamiento de B de Headline y Cupertron respectivamente durante 30 d de cultivo *in vitro*.

En otros estudios se han reportado bajos porcentajes de contaminación, y se debe a que utilizan como explante las secciones nodales o meristemas apicales del turión aéreo, es decir, se toma como material de inducción turiones emergidos del suelo, lo cual disminuye considerablemente la presencia de microorganismos. No obstante, las técnicas que han utilizado el turión como explante se consideran ineficientes debido a que buscan el desarrollo de una estructura similar al rizoma a partir de estos meristemas axilares y apicales, lo que conlleva a largos períodos de establecimiento *in vitro* y aclimatación.

Por lo anterior, se considera más efectivo el uso de rizoma como explante, debido a que éste no sólo se compone de yemas vegetativas, sino de tejido de parénquima en la base. Esto presenta una gran ventaja frente al uso del turión, ya que si el propósito de la propagación *in vitro* de espárrago es obtener rizomas, es mejor utilizar como explante las yemas vegetativas que de forma natural componen a esta estructura de la planta. Esta inducción de rizoma y subsecuente formación de raíces no ocurre en muchos de los casos donde se utilizan las yemas vegetativas del turión, mientras que con el uso del rizoma se garantiza la presencia de yemas radiculares en el parénquima. De esta manera se disminuye el tiempo del proceso de micropropagación.

Otra gran ventaja del uso del rizoma como explante, es que el material vegetal se puede obtener durante todas las épocas del año, mientras que el uso del turión está fuertemente limitado por el componente estacional del desarrollo del espárrago, es decir, el cultivo *in vitro* puede iniciarse en cualquier época del año, preferentemente cuando se emiten los turiones en temporada de cosecha de lo contrario, el muestreo se complica al tener que invertir tiempo en procesar el follaje y esperar la brotación. Por lo anterior, las yemas vegetativas del rizoma reducen los tiempos para el inicio del proceso de micropropagación.

El uso de estructuras meristemáticas del rizoma como explante, ya ha sido investigado por Caro *et al.* (2010) quienes reportan un porcentaje de desinfección de 95% para la variedad de espárrago “Morado de Huétor” y 90% para la variedad “UC-157” aplicando una solución antioxidante compuesta por

150 mg L<sup>-1</sup> de ácido nítrico y 10 mg L<sup>-1</sup> de ácido ascórbico, una solución fungicida de Benomilo al 0.1% y 0.05% y una solución de hipoclorito de sodio al 2%. Este valor es superior al obtenido con el presente estudio, por lo cual, para obtener el procedimiento óptimo de descontaminación de explantes que permitan el establecimiento aséptico del material, será necesario aplicar otros tratamientos con fungicidas y bactericidas, así como realizar modificaciones en los tiempos y frecuencias de exposición.

La diferencia en el porcentaje de explantes contaminados, puede deberse al tamaño del explante. Caro *et al.* (2010) utilizaron yemas vegetativas de entre 0.4 y 1.0 cm y después del proceso de desinfección obtuvieron explantes de entre 0.1 y 0.3 cm, los cuales se cultivaron de forma individualizada. En este estudio se propone el uso de explantes de mayor tamaño (1-2 cm), compuestos por 1-6 yemas vegetativas. Esto sugiere, que el uso de rizomas de mayor tamaño aumenta la carga microbiana, por lo cual se observaron altos porcentajes de contaminación. Sin embargo, se considera que el utilizar un mayor número de yemas vegetativas como explante puede considerarse una ventaja, ya que se garantiza la formación de rizomas de mayor área superficial y con mayor regeneración de turiones y eficiencia para la formación de raíz.

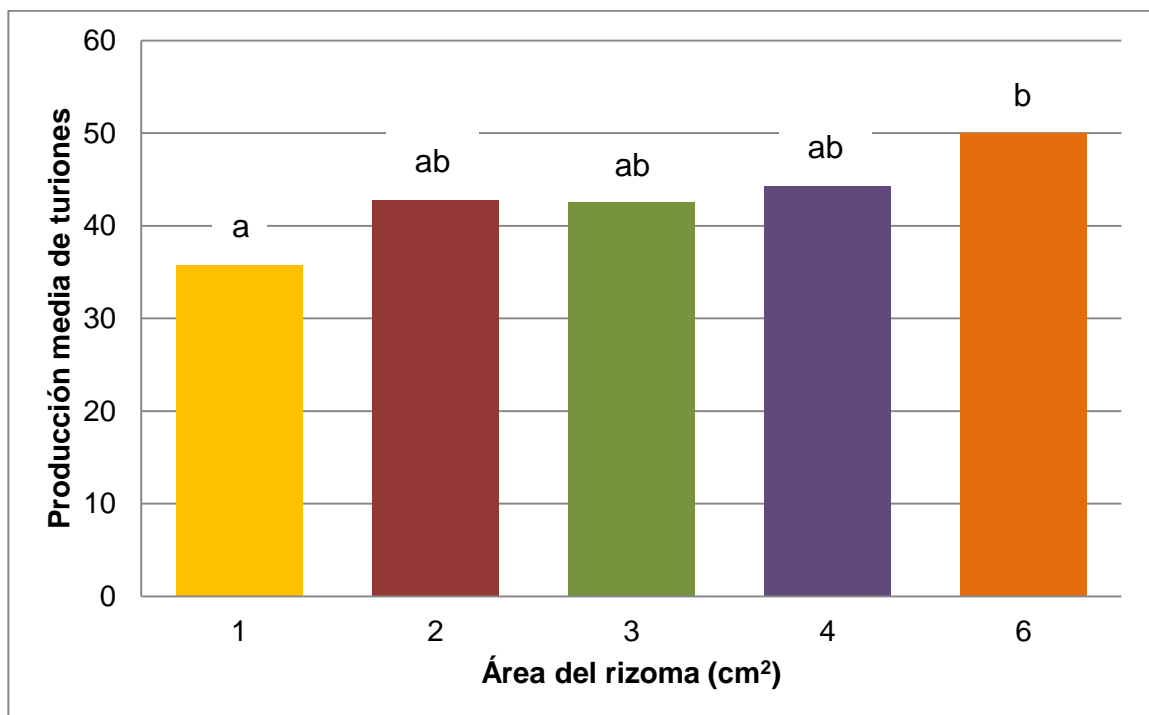
En cuanto a lo anterior se conoce que el tamaño de las yemas está positivamente correlacionado con el tamaño de los turiones (Nichols y Woolley, 1985). Según del Pozo-L (1999) el diámetro de los turiones depende del cultivar, manejo agronómico y vigor de la planta. Dentro de un mismo cultivo, los turiones más gruesos son formados a partir de yemas más grandes. Al final de la temporada de cosecha, normalmente se obtienen turiones más delgados, al parecer, como resultado de una disminución de las reservas de carbohidratos en las raíces, aunado a que queda un remanente menor de yemas grandes. Por ello, se deben seleccionar explantes de buena calidad caracterizados por la presencia de yemas grandes y sin heridas ni evidencia de ataque de hongos (CIREN, 1987).



## FASE 2. Multiplicación

### Efecto del tamaño del rizoma en la producción de brotes.

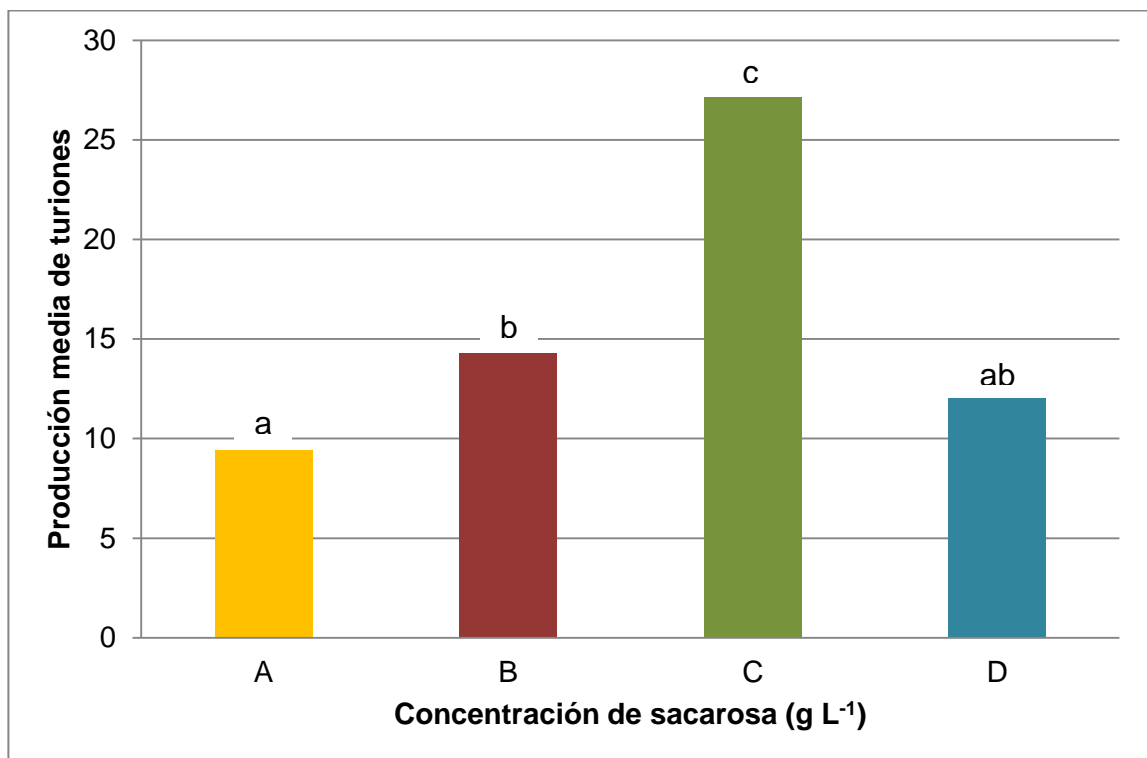
En la Figura 5 se observa que existen diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los rizomas con un área superficial de 1 y 6  $\text{cm}^2$  con una producción media de turiones de 35.75 y 50, respectivamente. Esto indica que existe un efecto del tamaño del rizoma en la producción de brotes y que el número de brotes está influenciado por el mismo proceso de micropropagación, es decir, el manejo y corte del explante puede ser determinante en la formación de turiones al activar las yemas vegetativas. Según del Pozo-L (1999) la producción de turiones depende de la disponibilidad de recursos que se encuentran en el rizoma, esto es carbohidratos y número de yemas principalmente. Finalmente, el número de yemas por rizoma es lo que determina el número potencial de turiones.



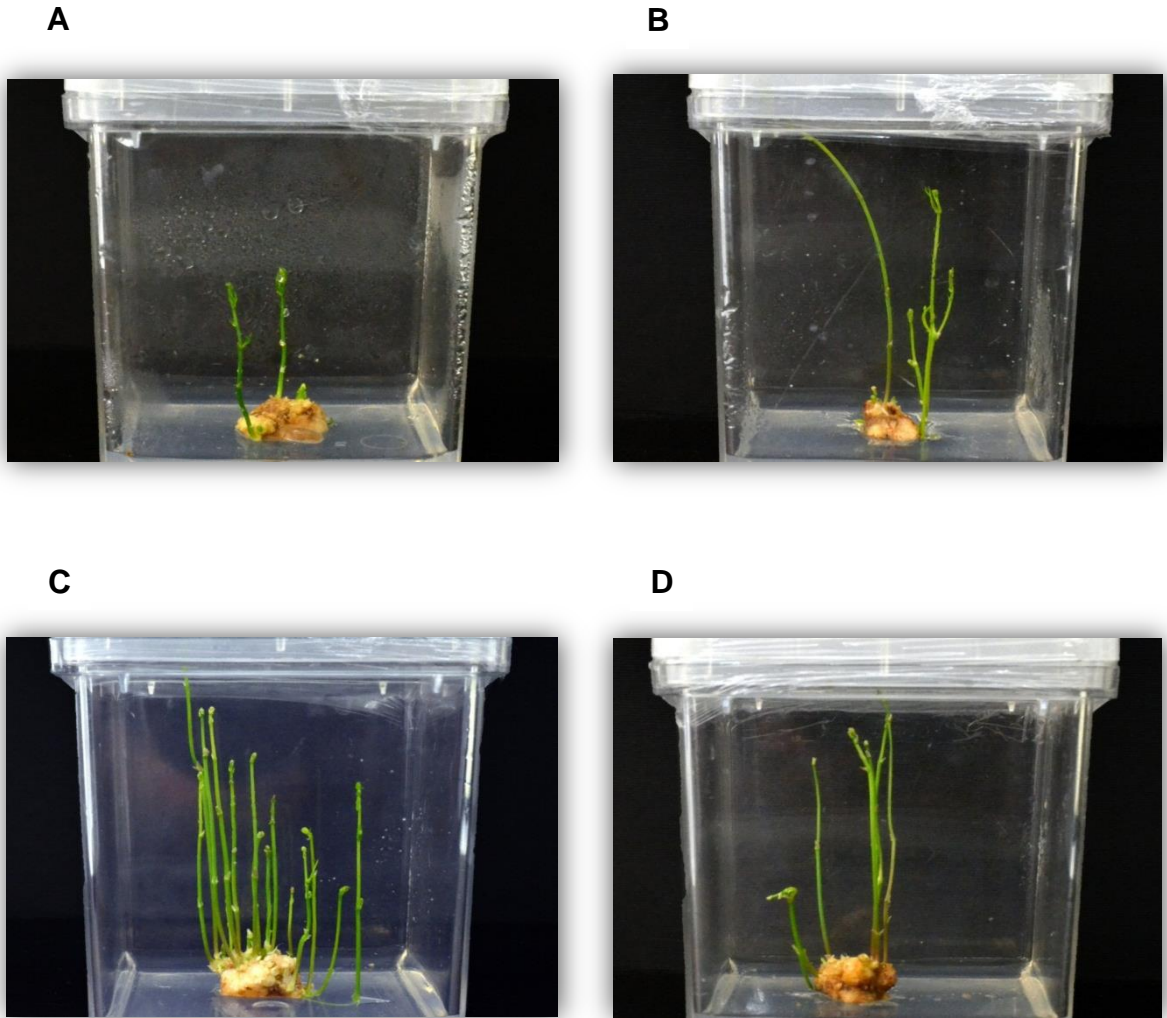
**Figura 5.** Efecto del tamaño del rizoma en la producción de brotes de espárrago a los 21 d de cultivo *in vitro*. Barras con letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) ( $n=4$ ).

### Efecto de la sacarosa en la producción de brotes.

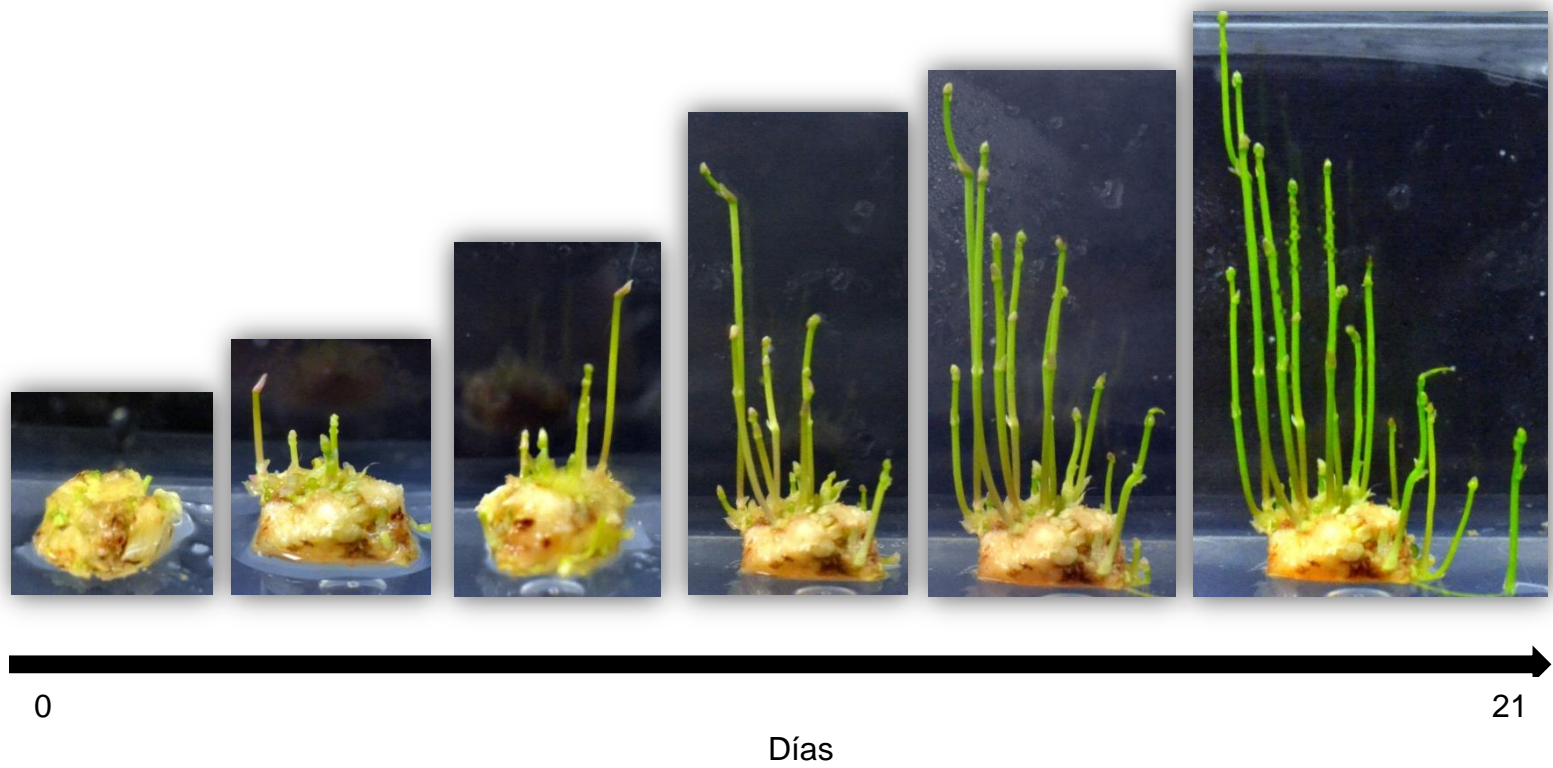
La concentración C de sacarosa fue estadísticamente superior al resto de los tratamientos con una producción media de turiones de 27.14 ( $p < 0.05$ ). El tratamiento D de sacarosa no mostró diferencias significativas con las concentraciones A y B (Figura 6, 7 y 8). Por lo tanto, se recomienda adicionar el medio de cultivo con la concentración C de sacarosa, de esta manera se obtendrá mayor producción de turiones en menor tiempo. Además, al utilizar menor cantidad de este disacárido se reducen los costos de producción *in vitro*.



**Figura 6.** Efecto de la sacarosa en la producción de brotes de espárrago a los 21 d de cultivo *in vitro*. Barras con letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) ( $n=7$ ).



**Figura 7.** Producción de brotes de espárrago a los 21 d de cultivo *in vitro* en los diferentes tratamientos con sacarosa: A, B, C y D.



**Figura 8.** Efecto del tratamiento C de sacarosa en la producción de brotes de espárrago a los 21 d de cultivo *in vitro*.

En el Cuadro 5 se observa la ganancia de peso fresco por efecto de la sacarosa. El mayor incremento se presentó con el tratamiento C, que fue estadísticamente superior al resto de los tratamientos ( $p < 0.05$ ). Esto indica que la concentración C de sacarosa permite una ganancia de peso del rizoma de aproximadamente 46% de su peso inicial. Por lo tanto, este tratamiento es ideal para la producción de turiones, así como para aumentar el tamaño del rizoma. Sin embargo, para una producción masiva de espárrago se hace evidente la necesidad de aumentar el factor de multiplicación del rizoma, por lo cual es importante evaluar otras estrategias como puede ser el efecto de la temperatura, auxinas y citocininas o corte de turiones en el rizoma.

**Cuadro 5.** Efecto de la sacarosa en el peso fresco de rizomas de espárrago a los 21 d de cultivo *in vitro*.

Concentración sacarosa (mg L <sup>-1</sup> )	Peso fresco (g)		
	T <sub>o</sub>	T <sub>f</sub>	Incremento
A	0.9608±0.2978 <sup>a</sup>	1.1513±0.3457 <sup>a</sup>	0.1905±0.0629 <sup>a</sup>
B	1.1806±0.2170 <sup>ab</sup>	1.5126±0.2498 <sup>b</sup>	0.3320±0.0789 <sup>b</sup>
C	1.2874±0.1134 <sup>b</sup>	1.8829±0.2274 <sup>c</sup>	0.5955±0.1883 <sup>c</sup>
D	1.0778±0.1805 <sup>ab</sup>	1.3105±0.1885 <sup>ab</sup>	0.2326±0.0569 <sup>ab</sup>

Los valores representan la media ± desviación estándar. Letras diferentes en cada columna muestran diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) según la prueba de Fisher ( $n=7$ ). T<sub>o</sub>=Tiempo inicial T<sub>f</sub>=Tiempo final.

La presencia de azúcar en el medio nutritivo, es esencial para el desarrollo de una planta *in vitro* debido a que la fotosíntesis en estas condiciones de cultivo, suele ser insuficiente para satisfacer la demanda de carbono por la planta. Esto, se relaciona con que los tejidos verdes *in vitro* no son suficientemente autotróficos, con que la concentración de CO<sub>2</sub> en la atmósfera del recipiente de cultivo no es siempre la más adecuada y con una iluminación insuficiente (Pierik, 1990). En consecuencia, la planta *in vitro* necesita tomar carbono del medio de cultivo para satisfacer sus necesidades. Galiba y Erdei (1986) mencionan que la concentración de sacarosa en el medio basal no sólo es de suma importancia en el crecimiento de las plantas, sino en la formación de cloroplastos y en la inducción de brotes, además se ha observado que los cambios en su concentración producen alteraciones en el desarrollo de las plantas, los cuales afectan tanto su metabolismo como las condiciones osmóticas del medio.

Por lo anterior, la sacarosa se adiciona para permitir un rápido crecimiento heterotrófico, ya que la producción de energía y carbohidratos por la fotosíntesis *in vitro* es muy poca debido a que los niveles de iluminación en las habitaciones destinadas a su crecimiento generalmente son bajos y no garantizan que se desarrolle adecuadamente este proceso (Leifert *et al.*, 1995). Por lo tanto, los azúcares actúan como fuente energética y de carbono y regulan el potencial osmótico del medio. En este sentido, un disacárido como la sacarosa se convierte (por hidrólisis) durante la esterilización en los monosacáridos glucosa y fructosa, lo que provoca un cambio en el potencial osmótico. Por otra parte la sacarosa, en concentraciones del 2 al 4 % (p/v), constituye la fuente más utilizada (Cárdenas y Villegas, 2002; Ertola *et al.*, 1994). Estos valores concuerdan con lo reportado en este estudio, lo cual sugiere que la concentración óptima de sacarosa (tratamiento C) mantuvo el potencial osmótico adecuado para el crecimiento y organogénesis del explante. Al aumentar la concentración (tratamiento D) probablemente el potencial osmótico del medio se hizo más negativo por la presencia de mayor soluto, lo que generó una disminución en la absorción de agua, por lo cual el explante

tiene un contacto menos eficiente con el medio, lo que dificulta la disponibilidad de macro y micronutrientes y como consecuencia el desarrollo y multiplicación de los brotes.

Del mismo modo los resultados de esta investigación se pueden asociar con la relación existente entre la concentración de azúcar en el medio y la capacidad de fotosíntesis del material *in vitro* y en consecuencia con sus posibilidades de desarrollo. Con respecto a la fotosíntesis se sabe que cuando la concentración de sacarosa es elevada, tiende a disminuir la capacidad fotosintética. Por el contrario, cuando las concentraciones de sacarosa son más bajas, se tiende a incrementar y con ello se reducen los cambios fisiológicos de la planta para adaptarse al suelo con lo que mejora su respuesta al trasplante (Conner y Thomas, 1982). Esto se atribuye a una adecuada reducción de sacarosa en el medio, lo cual incrementa la capacidad fotosintética de los brotes debido a que al ser los hidratos de carbono sintetizados productos finales de almacenamiento, en la fase oscura de la fotosíntesis, su falta induce una mayor actividad fotosintética obligando a la planta a desarrollar más la parte aérea para disponer de mayor cantidad de clorofila. No obstante, se pueden producir otros efectos dependiendo de la especie, variedad, material vegetal, entre otros factores.

La concentración efectiva de este carbohidrato utilizada en este estudio concuerda con lo reportado en otras investigaciones de micropropagación de espárrago (Benmoussa *et al.*, 1996; Bojnauth, 2010; Duangpaeng *et al.*, 2003; Pontaroli y Camadro, 2005; Shigeta *et al.*, 1996; Štajner, 2013), pero difiere con lo observado por Caro *et al.* (2010) donde se utiliza el rizoma como explante. Ellos reportan el uso de 60 g L<sup>-1</sup> de sacarosa en un medio de cultivo MS para las variedades de espárrago “Morado de Huétor” y “UC-157” con una producción de 1-2 brotes por explante para ambos genotipos. El protocolo propuesto en la presente investigación resultó ser más eficiente, ya que se obtuvieron valores superiores de producción de brotes (27.14 brotes/explante) en un medio adicionado con menos sacarosa.

Otros azúcares capaces de sostener el crecimiento o incrementar la producción de metabolitos son glucosa, fructosa, trehalosa, maltosa y lactosa. Varios investigadores han estudiado la influencia de la fuente de carbono en el crecimiento y la producción, observando que el nivel de azúcar puede influenciar a ambos pero no siempre es previsible su efecto (Ertola *et al.*, 1994). Mamiya y Sakamoto (2000) estudiaron el efecto de la concentración y tipo de azúcar (glucosa, fructosa y sacarosa) en embriones somáticos de espárrago y llegaron a la conclusión de que el crecimiento de brotes está promovido por las concentraciones bajas de azúcar ( $10 \text{ g L}^{-1}$ ), mientras que las concentraciones altas ( $30$  y  $50 \text{ g L}^{-1}$ ) favorecen el crecimiento de las raíces e inhiben el desarrollo de los brotes. Los tipos de azúcar probados no tuvieron un efecto significativo en el crecimiento de brotes y raíces. Sin embargo, las plantas producidas en medios con concentraciones bajas no sobrevivieron en la etapa de aclimatación, por lo que recomiendan el uso de altas concentraciones de azúcar en el medio de cultivo para garantizar la sobrevivencia en invernadero.

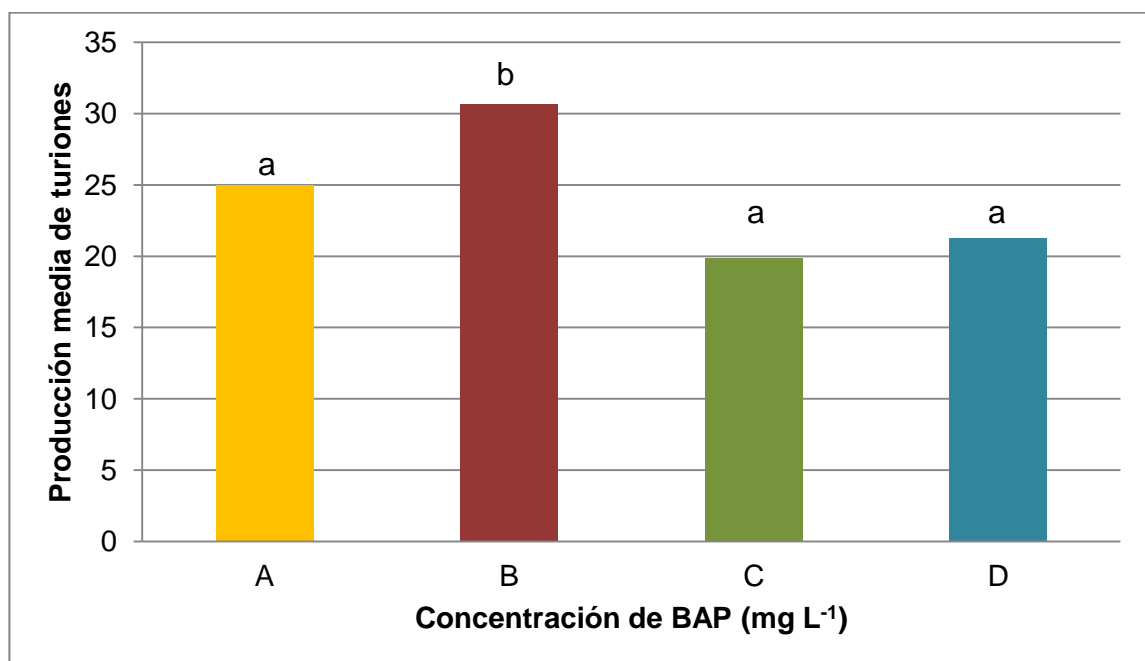
En otro estudio se evaluó el efecto de la sacarosa en la formación de raíces de minicoronas de espárrago. Los resultados indican que las raíces que se desarrollan en concentraciones inferiores de sacarosa generalmente son largas, fibrosas, delgadas y de débil crecimiento, mientras que los efectos nutricionales de la alta sacarosa estimulan el desarrollo de raíces de almacenamiento engrosadas y más cortas (Conner y Falloon, 1993). En comparación con las anteriores investigaciones, en el presente estudio no se observó un efecto en la formación de raíz.

En general, el medio con la concentración C de sacarosa favoreció el crecimiento de la parte aérea del rizoma *in vitro*. Este mayor desarrollo y crecimiento de los turiones en el explante, no se produjo en el sistema radical, cuyo desarrollo fue independiente de la concentración de azúcar en el medio y más relacionable con la variedad de espárrago. Tampoco se observó ninguna predisposición a la vitrificación del tejido. Por ello, se recomienda evaluar mayores concentraciones de sacarosa para determinar su efecto en el enraizamiento de rizomas de espárrago.



### Efecto de 6-bencilaminoapurina (BAP) en la producción de brotes y enraizamiento.

La concentración B de BAP mostró diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) con el resto de los tratamientos con una producción media de turiones de 30.7. Mientras que los tratamientos A, C y D fueron estadísticamente iguales (Figura 9). En cuanto al incremento de peso fresco, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos con BAP y éstos fueron superiores al tratamiento A (control) (Cuadro 6). Esto sugiere que a mayor concentración de BAP se aumenta la producción de turiones y por ende se incrementa el peso fresco del rizoma. La presencia de BAP aumentó el peso fresco del rizoma en 81, 89 y 75% de su peso inicial aproximadamente para los tratamientos B, C y D, respectivamente. Con el uso de este regulador de crecimiento se tiene una ganancia de peso fresco de hasta 43% más que sin el uso de fitohormonas. Por lo cual, la aplicación de BAP en el medio basal puede aumentar el factor de multiplicación del rizoma.



**Figura 9.** Efecto de 6-bencilaminoapurina (BAP) en la producción de brotes de espárrago a los 21 d de cultivo *in vitro*. Barras con letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) ( $n=7$ ).

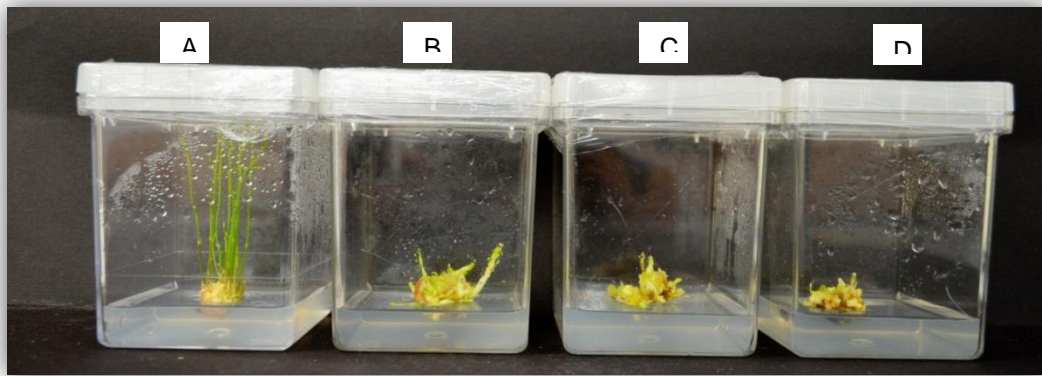
**Cuadro 6.** Efecto de 6-bencilaminoapurina (BAP) en el peso fresco de rizomas de espárrago a los 21 d de cultivo *in vitro*.

Concentración BAP (mg L <sup>-1</sup> )	Peso fresco (g)		
	T <sub>o</sub>	T <sub>f</sub>	Incremento
A	1.1288±0.1422 <sup>a</sup>	1.6109±0.1602 <sup>a</sup>	0.4821±0.1011 <sup>a</sup>
B	1.1127±0.1428 <sup>a</sup>	2.0223±0.5509 <sup>ab</sup>	0.9096±0.4771 <sup>b</sup>
C	1.1592±0.1188 <sup>a</sup>	2.1956±0.2176 <sup>b</sup>	1.0364±0.2705 <sup>b</sup>
D	1.1082±0.1399 <sup>a</sup>	1.9438±0.4231 <sup>ab</sup>	0.8356±0.3471 <sup>b</sup>

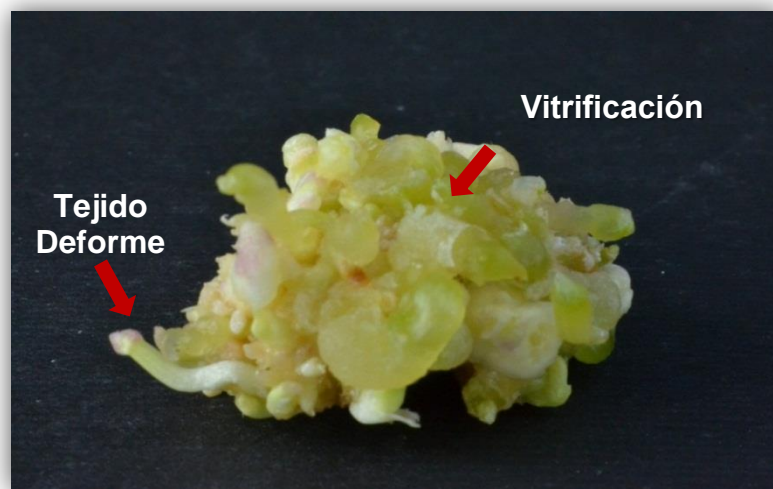
Los valores representan la media ± desviación estándar. Letras diferentes en cada columna muestran diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) según la prueba de Fisher ( $n=7$ ). T<sub>o</sub>=Tiempo inicial T<sub>f</sub>=Tiempo final.

La citocinina más utilizada en el cultivo de tejidos vegetales es BAP. Las citocininas fueron descubiertas en la década de 1950 como factores que promueven la proliferación celular y mantienen el crecimiento de tejidos vegetales cultivados *in vitro*. Un balance alto de cito citocininas favorece la formación de tallos (Mok y Mok, 2001), además desarrollan un papel como reguladores de la formación de nuevos órganos, intervienen en la apertura de estomas, supresión de la dominancia apical e inhibición de la senescencia de las hojas, entre otros procesos (Azcon-Bieto y Talon, 2001). Pierik (1990) sostiene que BAP a mayores concentraciones estimula la división celular propiciando el crecimiento y desarrollo de nuevos tejidos, promoviendo la formación de yemas axilares, ya que disminuye la dominancia apical, iniciando así una descendencia homocigota idéntica a la planta madre.

A pesar de lo anterior, no se recomienda el uso de BAP debido a que se observó un efecto negativo en el desarrollo y crecimiento de los turiones como se aprecia en las Figuras 10 y 11. La presencia de este regulador de crecimiento generó una disminución en la talla de los turiones: en el grupo control la talla de los turiones osciló entre 0.1 cm y >8 cm, mientras que en los tratamientos con BAP la talla fue entre 0.1 y 3 cm (Figura 10). Además, se observó la presencia de tejidos deformes y vitrificados (Figura 11).



**Figura 10.** Efecto de 6-bencilaminoapurina (BAP) en la altura de los turiones de rizomas de espárrago a los 21 d de cultivo *in vitro*.



**Figura 11.** Efecto negativo de 6-bencilaminoapurina (BAP) en rizomas de espárrago a los 21 d de cultivo *in vitro*.

La vitrificación o hiperhidratación da origen a plantas frágiles con apariencia vidriosa. La hoja es el órgano más afectado, ya que desarrolla un mesófilo desorganizado de parénquima esponjoso, con grandes espacios intercelulares. Las plantas hiperhidratadas usualmente mueren, debido a que la fotosíntesis y la respiración no se lleva a cabo correctamente. Se ha mencionado que las causas de estas malformaciones están ligadas a factores nutricionales, la baja densidad luminosa durante la incubación, la humedad relativa en el recipiente de cultivo y a elevadas dosis de reguladores de crecimiento que producen un efecto tóxico en el explante (Ziv, 2000).

En este estudio, la hiperhidratación de los rizomas se puede explicar por el aumento de BAP, ya que con el incremento en la concentración de esta fitohormona ocasionó desórdenes fisiológicos en el desarrollo de los brotes. Los efectos fisiológicos de BAP han sido reportados en otros trabajos de investigación y se señala que al modificar el balance hormonal reduciendo la concentración de auxinas y/o citocininas se reduce la vitrificación del tejido (Paques y Boxus, 1987). Por ello, para futuras investigaciones se recomienda evaluar concentraciones inferiores de BAP en el medio de cultivo debido a que su uso ha sido ampliamente reportado con efectos positivos en espárrago y otras especies vegetales.

El efecto de las citocininas es evidente en cultivo *in vitro* y se ha demostrado que gran número de especies con la adición de BAP al medio de cultivo, son capaces de superar la dominancia apical y liberar las yemas laterales de la dormancia (George *et al.*, 2008). Son varios los autores que utilizan BAP para la multiplicación de distintas especies y por lo general, se utilizan concentraciones que varían entre 0.5 y 5 mg L<sup>-1</sup>.

En un estudio de organogénesis indirecta de espárrago se utilizó como explante semillas a partir de las cuales se regeneraron plántulas de donde se tomaron secciones nodales del turión. Se observó que bajas concentraciones de BAP favorecen el desarrollo de los brotes en combinación con otros reguladores de crecimiento. Con una concentración de 0.5 mg L<sup>-1</sup> de BAP más

0.015 mg L<sup>-1</sup> de ANA (ácido naftalénacético) se encontró la mayor producción media de brotes por explante de 20.5 (Bojnauth *et al.*, 2010). En otra investigación similar, se observó una producción media de 22 brotes por explante mediante la inducción de callo y la posterior regeneración de plántulas aplicando un tratamiento de 1 mg L<sup>-1</sup> de BAP más 0.5 mg L<sup>-1</sup> de NAA (Fazelzadeh *et al.*, 2013).

Por otra parte, Caro y *et al.* (2010) que utilizaron el rizoma como explante señalan que la combinación que dio los mejores resultados en el mayor porcentaje de genotipos ensayados de la variedad “Morado de Huétor” fue de 0.5 mg L<sup>-1</sup> de ANA, 0.7 mg L<sup>-1</sup> de kinetina, 2 mg L<sup>-1</sup> de ancymidol y 60 g L<sup>-1</sup> de sacarosa, mientras que para la variedad “UC-157” fue de 0.3 mg L<sup>-1</sup> de ANA, 0.5 mg L<sup>-1</sup> de kinetina, 1.3 mg L<sup>-1</sup> de ancymidol y 40 g L<sup>-1</sup> de sacarosa. Para ambas variedades la producción media de turiones fue muy baja de sólo 1-2 brotes por explante.

Con nuestro estudio, se logró una producción media de brotes de 27.14 superior a los resultados de las anteriores investigaciones. Es importante señalar, que se llegó a este resultado sin el uso de fitohormonas, el medio de cultivo sólo estaba adicionado con las sales MS y sacarosa. El prescindir del uso de reguladores de crecimiento, es una gran ventaja frente a otros protocolos debido a que se simplifica el proceso de producción y se reducen considerablemente los costos.

### **Efecto de la temperatura en la producción de brotes y enraizamiento.**

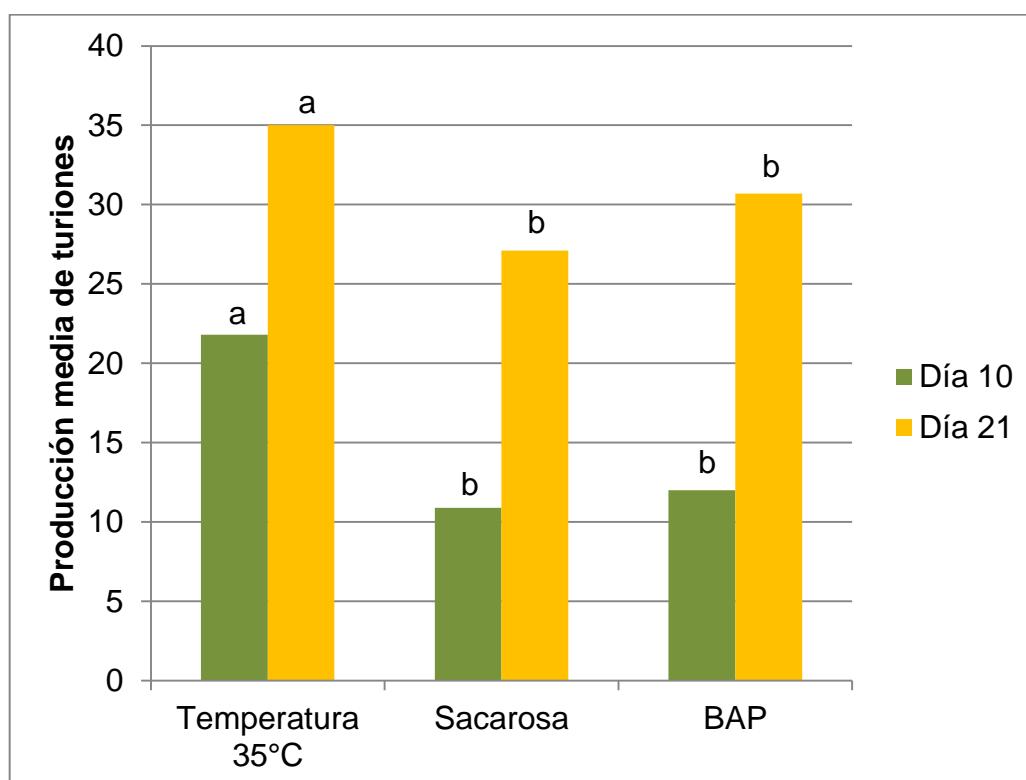
El aumento de temperatura tuvo un efecto en la producción de brotes de espárrago y las variables respuesta se muestran en el Cuadro 7. En la Figura 12 se observa que la mayor producción de brotes ( $p < 0.05$ ) se obtuvo con el tratamiento de temperatura (35 °C) a los 10 y 21 d de cultivo *in vitro* en comparación con los tratamientos exitosos de sacarosa y BAP. A los 10 d se observaron 21.8 brotes/explante aplicando 35 °C, mientras que para la sacarosa y BAP 10.9 y 12 brotes/explante, respectivamente. Al finalizar el

período *in vitro* (21 d) la producción media de brotes fue de 35, 27.1 y 30.7 para los tratamientos de temperatura, sacarosa y BAP respectivamente. Lo anterior indica que la temperatura no sólo aumenta la producción de brotes activando mayor número de yemas vegetativas, sino que reduce considerablemente su tiempo de activación ya que a los 10 d de cultivo la producción de turiones es de aproximadamente el doble que con los tratamientos de sacarosa y BAP. Este aumento de temperatura podría estar induciendo una actividad metabólica superior, promoviendo el desdoblamiento más rápido de reservas y poniendo una mayor cantidad de azúcares a disposición de las yemas vegetativas. Esto es un aporte importante para la propagación *in vitro* de espárrago debido a que la temperatura surge como una posible estrategia para disminuir los tiempos del proceso de micropropagación y generar rizomas de mayor calidad en cuanto a la producción de turiones.

El desarrollo y crecimiento del espárrago son afectados por diversos factores ambientales. La temperatura controla tanto los procesos de desarrollo (germinación, brotación del turión, floración, etc.) como de crecimiento, tales como la elongación del turión. Por otro lado la acumulación de carbohidratos y de biomasa depende de la actividad fotosintética de la planta, la que a su vez es afectada por factores ambientales y de manejo (del Pozo, 1999). Durante el año agrícola del espárrago en Caborca se realiza un corte y quema del follaje en el mes de diciembre, lo cual induce la activación de yemas vegetativas por el aumento de la temperatura (Gutierrez com. pers., 2014). Con este estudio se comprueba que bajo condiciones *in vitro* también es posible activar las yemas vegetativas haciendo uso de este factor. Por esta razón, entender la interacción entre la temperatura y el crecimiento de turiones permitirá una mejor planificación de la micropropagación de espárrago y la producción de rizomas *in vitro*.

**Cuadro 7.** Efecto de la temperatura (35°C) en la producción de brotes de espárrago a los 10 y 21 d de cultivo *in vitro*. Los valores del número de turiones representan la media  $\pm$  desviación estándar.

Tiempo de cultivo <i>in vitro</i>	Número de turiones	Rango de altura del turión
10 d	21.80 $\pm$ 1.30	0.1-3.0
21 d	35.00 $\pm$ 2.45	0.1-6.0



**Figura 12.** Efecto de la temperatura (35 °C), sacarosa y 6-bencilaminoapurina (BAP) en la producción de brotes de espárrago a los 10 y 21 d de cultivo *in vitro*. Barras del mismo color con letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) (35 °C  $n=5$ ; sacarosa  $n=7$ ; BAP  $n=7$ ).

### FASE 3. Aclimatación

La aclimatación es uno de los pasos crítico en la propagación *in vitro* de plantas (Van Huylenbroeck y Deberg, 1996). Los cambios bruscos que se producen constituyen fuentes de estrés para las plantas al finalizar la etapa de cultivo *in vitro*. Los rizomas *in vitro* sin raíz y con raíz aclimatados en condiciones de invernadero presentaron las características organogénicas mostradas en el Cuadro 8. No hubo diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) para el área superficial del rizoma con  $2.104 \pm 0.887 \text{ cm}^2$  y  $2.708 \pm 2.237 \text{ cm}^2$  para los rizomas sin raíz y con raíz, respectivamente. Los rizomas con raíz fueron estadísticamente superiores ( $p < 0.05$ ) en altura del turión ( $18.804 \pm 6.761 \text{ cm}$ ) y peso fresco ( $4.712 \pm 2.982 \text{ g}$ ). La longitud de la raíz fue de  $18.813 \pm 9.125 \text{ cm}$  y hubo desarrollo del follaje en el 58.33% de estos rizomas (Figura 13). Los valores de altura del turión y longitud de la raíz son superiores a lo reportado por Caro y *et al.* (2010) quienes observaron 6.6 cm de longitud del turión y 6.8 cm de longitud de la raíz para la variedad “Morado de Huétor” y 7.2 cm y 7.5 cm, respectivamente, para la variedad “UC-157”.

**Cuadro 8.** Características organogénicas de rizomas para aclimatación.

Rizoma	Área (cm <sup>2</sup> )	Altura del turión (cm)	Peso fresco (g)	Longitud raíz (cm)	Desarrollo del follaje
Sin Raíz	$2.104 \pm 0.887^a$	$8.308 \pm 1.992^a$	$3.289 \pm 1.020^a$	N/A	No
Con Raíz	$2.708 \pm 2.237^a$	$18.804 \pm 6.761^b$	$4.712 \pm 2.982^b$	$18.813 \pm 9.125$	58.33 %

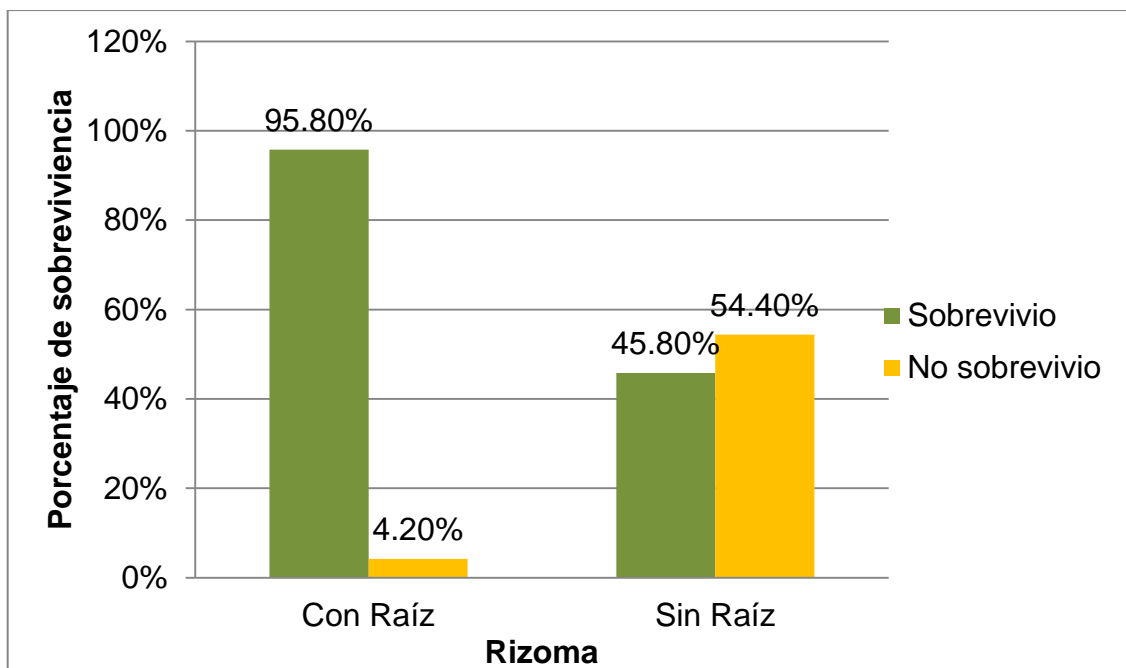
Los valores representan la media  $\pm$  desviación estándar. Letras diferentes entre columnas muestran diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) según la prueba de Fisher ( $n=24$ ). N/A= No aplica.





**Figura 13.** Morfología de rizomas con sin raíz (A) y con raíz (B) utilizados para la fase de aclimatación.

El porcentaje de sobrevivencia fue de 95.80% para los rizomas con raíz y de 45.80% para los rizomas sin raíz a los 21 d de aclimatación en condiciones de invernadero ( $p < 0.05$ ) (Figura 14). Esto permite concluir que la sobrevivencia de los rizomas está determinada por la presencia de raíz y no por el tipo de sustrato. Esto concuerda con Conner *et al.* (1992) quienes indican que las raíces de almacenamiento son indispensables para la aclimatación de las plantas *in vitro* en espárragos (Conner *et al.*, 1992). En el Cuadro 8 se presentan los porcentajes de sobrevivencia para los diferentes sustratos donde se puede apreciar un 100% de sobrevivencia de los rizomas con raíz cultivados en sustrato con mezcla de turba.



**Figura 14.** Supervivencia de rizomas con raíz y sin raíz a los 21 d de aclimatación en invernadero según la Prueba  $\chi^2$  ( $p < 0.05$ ) ( $n=24$ ).

**Cuadro 9.** Supervivencia de rizomas de espárrago a los 21 d de aclimatación en invernadero para cada sustrato.

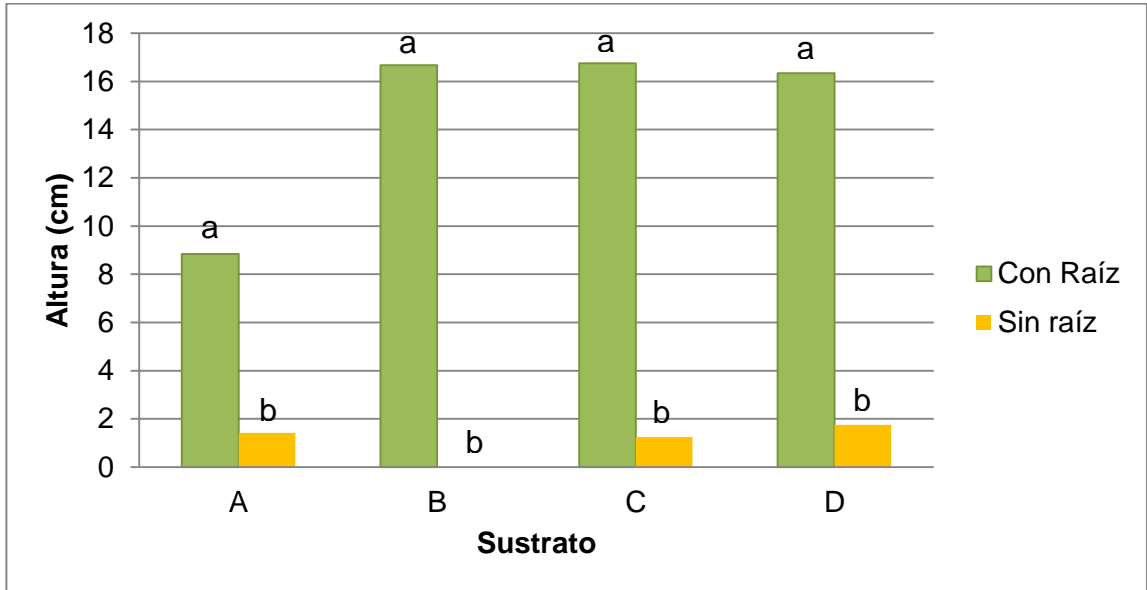
Rizoma	Sustrato			
	A	B	C	D
Con Raíz	83.33%	100%	100%	100%
Sin Raíz	33.33%	0%	50%	100%

Sustrato A: 100% sustrato natural; B: 80% sustrato natural más 20% turba; C: 70% sustrato natural más 30% turba; D: 50% sustrato natural más 50% turba.

En el protocolo de Caro y *et al.* (2010) se reporta un 95% de sobrevivencia para la variedad “Morado de Huétor” similar al valor obtenido en este estudio y un valor inferior del 80% para la variedad “UC-157”. Es importante señalar que las condiciones de aclimatación difirieron en varios aspectos. Ellos aplicaron un proceso de aclimatación más complejo a base de un túnel con cubierta plástica y tratamiento fitosanitario preventivo con fungicida sistémico (Benomilo 50% p/p). Mientras que en el presente trabajo se propone una etapa de aclimatación simple con riegos de agua corriente cada tercer día, lo cual reduce el costo de producción y hace más eficiente la metodología propuesta.

En otro estudio realizado por Štajner (2013) se describe un protocolo para micropropagación de espárrago a partir de secciones nodales del turión. La eficiencia de aclimatación y formación de nuevos turiones fue examinada cinco semanas después de transferir las vitroplantas a invernadero. La aclimatación de plantas fue efectiva con un 87% de sobrevivencia, pero el número de brotes formado por planta estuvo en el rango de 2.3 y 12.4. El porcentaje de sobrevivencia es inferior al 95% observado en este estudio a los 21 d de aclimatación *ex vitro*.

En cuanto a la altura de los turiones de los rizomas aclimatados, se observó que esta variable depende del efecto de la presencia de raíz y no hay un efecto significativo del sustrato ni de la interacción de ambos factores (sustrato y presencia-ausencia de raíz) como se observa en la Figura 15. La altura de los turiones de los rizomas con raíz fueron estadísticamente superiores a los turiones de rizomas sin raíz en todos los tratamientos ( $p < 0.05$ ).



**Figura 15.** Efecto de la presencia/ausencia de raíz y el sustrato en la altura de rizomas aclimatados en invernadero ( $p < 0.05$ ) ( $n=6$ ). Sustrato A: 100% sustrato natural; B: 80% sustrato natural más 20% turba; C: 70% sustrato natural más 30% turba; D: 50% sustrato natural más 50% turba.

Los resultados del análisis físico y químico del suelo natural de la región de Caborca que se utilizó como sustrato base se observa en el Cuadro 10. Se trata de un suelo arenoso ligeramente ácido lo que puede explicarse por el alto contenido de hierro, calcio y magnesio y los valores bajos de potasio. Presenta una adecuada cantidad de materia orgánica que se puede relacionar con los niveles de nitrógeno, fosforo, hierro, cobre y zinc. El nitrógeno es uno de los nutrientes más importantes para la mayoría de las plantas, ya que interviene en la captación de CO<sub>2</sub> y el crecimiento (Nobel, 1990). El contenido de este nutriente puede estar inducido por el tipo de cubierta vegetal, lo que explica el bajo valor de nitrógeno al tratarse de un suelo proveniente de un campo de cultivo.

**Cuadro 10.** Características físicas y químicas del suelo del sustrato para aclimatación de rizomas *in vitro* en condiciones de invernadero.

	Variable	Nivel	Nivel de referencia
<b>Fertilidad</b>	Materia orgánica (%)	2.7	2.0
	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg kg <sup>-1</sup> )	18.1	35.0
	P-PO <sub>4</sub> <sup>-</sup> (mg kg <sup>-1</sup> )	72.4	30.0
	Potasio (ppm)	55	150
	Calcio (ppm)	2310	1600
	Magnesio (ppm)	330	250
	S (mg kg <sup>-1</sup> )	15	70
	Fe (mg kg <sup>-1</sup> )	11.2	6.0
	Cu (mg kg <sup>-1</sup> )	0.3	2.0
	Zn (mg kg <sup>-1</sup> )	1.3	1.8
	Mn (mg kg <sup>-1</sup> )	7.2	7.0
	Na (mg kg <sup>-1</sup> )	211	<100
	<b>Salinidad</b>	pH	6.1
Conductividad eléctrica (dS m <sup>-1</sup> )		1.2	1.0
Relación/adsorción de sodio <sup>(++)</sup>		2.7	<5.0
Sodio + (meq/lit)		5.05	<5.0
Nitratos (meq/lit)		0.96	3.0
Fosfatos (meq/lit)		0.15	0.1
Sulfatos (meq/lit)		4.3	2.0
Carbonatos (meq/lit)		0.0	<1.0
Bicarbonatos (meq/lit)		3.0	<3.0
Cloruros (meq/lit)		3.7	<5.0
K <sup>+</sup> (meq/lit)		0.2	0.5
Ca <sup>++</sup> (meq/lit)		5.1	5.0
Mg <sup>++</sup> (meq/lit)		1.7	2.0
Arcilla (%)		6	-
Limo (%)		4	-
Arena (%)		90	-

## **CONCLUSIÓN**

El uso de yemas vegetativas del rizoma como explante, permite establecer un protocolo de propagación *in vitro* de espárrago eficiente para la producción de rizomas con alta capacidad para la formación de turiones con una técnica simple, menos costosa y libre de fitoreguladores.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Apraez, J., D. Romo y B. Lagos. 2012. Regeneración de plantas de tomate de árbol (*Cyphomandra betacea* cav. Sendt.) mediante organogénesis inducida a partir de callos. *Revista de Ciencias Agrícolas* 29 (2): 110-117.
- Asprelli, P. D., V. P. Cravero, I. Gatti y E. L. Cointry. 2002. Micropropagación de plantas elite de espárrago. *Revista Científica Agropecuaria* 6: 17-23.
- Azcon-Bieto, J. y M. Talon. 2001. *Fisiología y Bioquímica vegetal*. Edit. Interamericana. Mcgraw Hill. Madrid, España. 84-486 pp.
- Becerra, L. 1999. Respuesta al enraizamiento *in vitro* y *ex vitro* de espárrago (*Asparagus officinalis* L.) y copihue (*Lapageria rosea* Ruiz et Pav.). Tesis Lic. Agr. Valdivia. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Austral de Chile. 216 p.
- Benages-Sanahuja, Salvador. 1990. *El Espárrago*. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España. 224 pp.
- Benmoussa, M., S. Mukhopadhyay e Y. Desjardins. 1996. Optimization of callus culture and shoot multiplication of *Asparagus densiflorus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 47: 91-94.
- Bojnauth, G., S. Puchool y T. Bajorun. 2010. *In vitro* regeneration of *Asparagus officinalis* Preliminary results. Food and Agricultural Research Council, Réduit, Mauritius 7-15.
- Cárdenas, M. A. y A. Villegas. 2002. Potencial osmótico del medio de cultivo con diferentes componentes para la propagación *in vitro*. *Revista Fitotecnia Mexicana* 25 (2): 213-217.
- Caro, E., N. Westendorp, I. Vidoy, C. López, E. Carmona, A. Barceló e I. M. González. 2010. Procedimiento para la propagación *in vitro* de espárrago. Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). Patente No. 11728006. Madrid, España.
- Castagnino, A. M., K. Díaz, A. Falavigna, L. Laboratto, J. Marina y A. Guisolis. 2012. Alternativas para enfrentar las actuales exigencias del mercado de espárrago (*Asparagus officinalis* L.) verde en Argentina. 1. Empleo de híbridos. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos* 3 (2): 210-223.
- Chin, C. K. 1982. Promotion of shoot and root formation in *Asparagus in vitro* by ancyamidol. *Horticultural Science* 17: 590-591.



- Chin, C.K. y A. Khunachak. 1984. Effect of ancymidol on asparagus somatic embryo development. Horticultural Science 19: 555.
- CIREN, 1987. Manual del cultivo del espárrago (*Asparagus officinalis*). Chile. No. 67. 53 pp.
- Cointry, E. L., F. S. López-Anido, I. Gatti, S. M. García e I. T. Firpo. 1996. Comparative study of morphological and productive characters in blanched asparagus populations. Asparagus Research Newsletter. 13:30-34.
- Conner, A.J., D.J. Aberneithy y P.G. Falloon. 1992. Importance of *in vitro* storage root development for the successful transfer of micropropagated asparagus plants to greenhouse. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science 20: 477-481.
- CONNER, A.J., y M. B. THOMAS. 1982. Re-establishing plantlets from tissue culture: a review. International Plant Propagators' Society 31: 342-357.
- Conner, A.J. y P.G. Falloon. 1993. Osmotic versus nutritional effects when rooting *in vitro* asparagus minicrown on high sucrose media. Plant Science 89: 101-106.
- Corriols, L. y L. Thévenin. 1979. Different methods in asparagus breeding. En: Proc. 5th International Asparagus Symposium. Reuther G. (ed): 8-20. Eucarpia Section Vegetables, Geinsenheim Forschungsanstalt, Germany.
- del Pozo-L., Alejandro. 1999. Morfología y funcionamiento de la planta. En: El cultivo del espárrago (pp. 9-28). Boletín INIA N° 6. Chillán, Chile: Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA)-Ministerio de Agricultura.
- Delcid, D. 2011. Espárrago: Uno de los vegetales más sabrosos, sanos y nutritivos. Reconversión 24: 24-25.
- Delgado, A. V. 2007. Producción y comercialización de espárrago en el Valle de Viru. TESIS. Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas. Escuela de Posgrado.
- Desjardins, Y. 1992. Micropropagation of Asparagus (*Asparagus officinalis* L.) En: Biotechnology in Agriculture and Forestry. Vol 19: High-Tech and Micropropagation III. Springer-Verlag. Berlín. 26-41 pp.
- Dobránszka, J. y J. A. Teixeira. 2010. Micropropagation of apple. Biotechnology Advances 28 (4): 462–488.
- Doré, C. 1990. Asparagus anther culture and field trials of dihaploids and F1 hybrids. Biotechnology in Agriculture and Forestry 12:322-345.

- Duangpaeng, A., N. Okuda, Y. Fujime y H. Suzuki. 2003. Effects of plant growth regulators on organ formation of *Asparagus officinalis* L. *in vitro*. Technical Bulletin of the Faculty of Agriculture 55: 3743.
- Ellison, J. H. 1986. Asparagus breeding. In: Breeding Vegetable Crops. Bassett, M.J. (Ed.). AVI Publisher Co. Westport CT, AVI, 521-569.
- Ertola, R., O. Yantorno y C. Mignone. 1994. Crecimiento microbiano. En Microbiología Industrial. Ed. OEA. Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico. Washington, USA. 43-54 pp.
- FAO, 2014. FAOSTAT: Food and Agriculture Organization of the United Nations. Producción Agrícola de Espárrago en el 2010-2012. URL: <http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/download/Q/QC/S> Fecha de acceso: 16 de julio de 2014
- Fazelzadeh D., S. A., B. Habibi K., and Z. Karimaneh. 2013. Optimization of callus induction and seedling regeneration in Asparagus (*Asparagus officinalis*). Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Sciences 2(2): 05-08.
- Fernández, J. A. y S. Bañón. 1992. Cultivo del espárrago verde en invernadero. Ediciones Mundi Prensa. 21-36 pp.
- Fimbres, F.A. y Mollinedo U.F.L. 2005. Estimación del consumo de agua en espárrago de baja población de plantas con riego por cinta. Biotecnia. 7 (2):15-17.
- Galiba, G y Erdei L (1986) Dependence of wheat callus growth, differentiation and mineral content on carbohydrate supply. Plant Science 45:65-70.
- Gatti, I., V. P. Cravero, F. S. López-Anido y E. L. Cointry. 2000. Evaluación de siete poblaciones de espárrago (*Asparagus officinalis* L.). Pesquisa Agropecuária Brasileira 35 (6):1151-1157.
- George, E., M. A. Hall y G. De Klerk. 2008. Plant propagation by tissue culture. 3ed. Springer. Netherlands 1-3 pp.
- Grubben, G. J. y O. A. Denton. 2004. Plant Resources of Tropical Africa: Vegetables. PROTA. Netherlands. 95-99 pp.
- Harada, T. y T. Yakuwa. 1983. Studies on the morphogenesis of *Asparagus* VI. Effect of sugar on callus and organ formation in the *in vitro* culture of shoot segments of the seedlings. Journal of the Faculty of Agriculture, Hokkaido University 61: 307-314.
- Hartmann, H. y D. Kester. 1994. Propagación de plantas. Principios y prácticas. 2da ed. Continental. México. 814 p.

- Hasan, M. N., S. Nigar, M. A. Rabbi, S. B. Mizan y M. S. Rahman. 2010. Micropropagation of strawberry (*Fragaria ananassa* Duch.). International Journal of Sustainable Crop Production 5 (4): 36-41.
- Hasegawa, P. M., T. Murashige y F. H. Takatori. 1973. Propagation of Asparagus through shoot apex culture. II. Light and temperature requirements, transplantability of plants, and cytohistological characteristics. Journal of the American Society for Horticultural Science. 98: 143-148.
- Hintze, J. 2006. NCSS, PASS, And GESS. NCSS. Kaysville, Utah. URL: [www.ncss.com](http://www.ncss.com)
- Hurtado, D. y M. Merino. 1987. Cultivo de tejidos Vegetales. Trillas. México. 232 pp.
- INEGI. Marco Geoestadístico Municipal 2010, versión 5.0.
- INIFAP, 2010. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Guía para la asistencia técnica agrícola. Área de influencia del Campo Experimental Costa de Hermosillo. Hermosillo, Sonora, México. 126 pp.
- KhalekuzzamanI, K., M. KhatunII, M. Harunur, M. I. Sheikh, S. A. Sharmin e I. Alam. 2012. Micropropagation of an elite F1 watermelon (*Citrullus lanatus*) hybrid from the shoot tip of field grown plants. Brazilian Archives of Biology and Technology 55 (3): 335-340.
- Kunitake, H. y M. Mil. 1998. Somatic embryogenesis and its application for breeding and micropropagation in Asparagus (*Asparagus officinalis* L.). Plant Biotechnology 15 (2): 51-61.
- Kunitake, H., T. Nakashima, K. Mori, M. Tanaka, A. Saito y M. Mii. 1996. Production of interspecific somatic hybrid plants between *Asparagus officinalis* and *Asparagus mocawanii* through electrofusion. Plant Science 116: 213-222.
- Leifert, C., K. P. Murphy y P. J. Lumsden. (1995) Mineral and Carbohydrate Nutrition of Plant Cell and Tissue Cultures. Critical Reviews in Plant Sciences 14(2): 83-109.
- Limanton-Grevet, A., B. Sotta, S. Brown y M. Jullien. 2000. Analysis of habituated embryogenic lines in *Asparagus officinalis* L.: growth characteristics, hormone content and ploidy level of calli and regenerated plants. Plant Science 160: 15-26.
- Loo, S. W. 1945. Cultivation of excised stem of asparagus *in vitro*. American Journal of Botany 32: 13-17.

- López, F y E. Cointry . 2008. Asparagus. En: Vegetables II: Fabaceae, Liliaceae, Solanaceae, and Umbeliferae Handbook of Plant Breeding 2: 87-119 pp.
- Mamiya, K. y Y. Sakamoto. 1999. Effects of sugar concentration and strength of basal medium on conversion of somatic embryos in *Asparagus officinalis* L. Scientia Horticulturae 84 (2000): 15-26.
- Mantell, S. H. y H. Smith. 1983. Plant Biotechnology. Cambridge University Press. London. 3-9 pp.
- Martins, A. N., Poz, L., E. Suguino, N. M. Dias y M. J. Perdoná. 2011. Acclimatization of micropropagated "Nanicão Williams" banana trees in different substrates and nutrient sources. Revista Brasileira de Ciencias Agrarias 6 (1): 65-72
- Masclef, A. 1891. Atlas des plantes de France: Utiles, nuisibles et ornementales. Bookseller Inventory. 367 pp.
- Milanesi, L., M. A. Espósito, F. S. López-Anido, S. M. García y E. L. Cointry. 2008. Espárrago (*Asparagus officinalis* L.): Aspectos biotecnológicos de su mejora. Horticultura Argentina 27 (64): 19-24.
- Mok, D.W.S. y M.C. Mok. 2001. "Cytokinin metabolism and action". En: Annual Review of plant physiology and plant Molecular Biology 52: 89-118.
- Muñoz, S., M. A. Espósito, V. Cravero, S. García, F. López-Anido y E. Cointry. 2006. Obtención de plantas a partir de anteras de espárrago (*Asparagus officinalis* L.). Revista de Investigaciones de la Facultad de Ciencias Agrarias No. IX.
- Murashige, T. 1978. The impact of plant tissue culture on agriculture. In: T.A. Thorpe (ed.), Frontiers of Plant Tissue Culture. IAPTC Calgary. 15-26 pp.
- Murashige, T. y F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum 15: 473-497.
- Murashige T, M. N. Shabde, P. M. Hasegawa, F. H. Takatori y J. B. Jones. 1972. Propagation of Asparagus through shoot apex culture. I. Nutrient medium for formation of plantlets. Journal of the American Society for Horticultural Science 97: 158-161.
- Navarro, A. J. y C. A. López. 2002. Tecnología para el manejo del espárrago en el noroeste de Sonora. INIFAP. CIRNO. CECAB. Publicación Técnica No. 6. pp. 1.
- Nobel, P.S. 1990. Environmental influences on CO<sub>2</sub> uptake by agaves, CAM plants with productivities. Economic Botany 44: 488-502.

- OEIDRUS. 2009. Oficina Estatal de Información para el Desarrollo Rural Sustentable del Estado de Sonora, Anuario por producto: espárrago. URL: <http://www.oeidrus-sonora.gob.mx>
- Ornstrup, O. 1997. Biotechnological methods in asparagus breeding. *Asparagus Research Newsletter* 14:1-25.
- Pamplona, J. D. 2006. Salud por los alimentos. 4ta. Impr. 1ra ed. Editorial Safeliz. España. 234-236 pp.
- Paques, M. y P. H. Boxus. 1987. Vitrification: Review of Literature. *Acta Horticulturae* No. 212.
- Peng, M. y D. Wolyn. 1999. Development of a microspore culture method to produce haploid and double-haploid asparagus (*Asparagus officinalis* L.) plants. *Acta Horticulturae* 479: 357-361.
- Pierik, R. 1990. Cultivo *in vitro* de plantas superiores. Ed. Mundi Prensa. Madrid, España.
- Pontaroli, A. C. y E. L. Camadro. 2005. Somaclonal variation in *Asparagus officinalis* plants regenerated by organogenesis from long-term callus cultures. *Genetics and Molecular Biology* 28 (3): 423-430
- Saito, T., S. Nishizawa y S. Nishimura. 1991. Improved culture conditions for somatic embryogenesis from *Asparagus officinalis* L. using an aseptic ventilative filter. *Plant Cell Report* 10: 230-234.
- Scherer, R. F., A. Corrúa, H. Pacheco, L. L. Dal, D. A. Steinmacher y M. P. Guerra. 2013. Nodule cluster cultures and temporary immersion bioreactors as a high performance micropropagation strategy in pineapple (*Ananas comosus* var. *comosus*). *Scientia Horticulturae* 151 (28): 38-45.
- Seemann, P. 1993. Utilización de técnicas de micropropagación. En: Barriga, P y Neira, M. (eds). *Avances en Producción y Sanidad Vegetal. Cultivos no Tradicionales*. Universidad Austral de Chile, Instituto de Producción y Sanidad Vegetal, Valdivia 87-145 pp.
- SIAP, 2014. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. URL: <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-cultivo/> Fecha de acceso: 16 de julio de 2014.
- Shigeta, J., K. Sato, S. Tanaka, M. Nakayama y M. Mii. 1996. Efficient plant regeneration of asparagus by roots from *in vitro* multiplied shoot explants and glucose. *Plant Science* 113: 99-104.
- Štajner, N. 2013. Micropropagation of *Asparagus* by In Vitro Shoot Culture. In: Maurizio Lambardi *et al.* (eds.), *Protocols for Micropropagation of Selected Economically-Important Horticultural Plants, Methods in Molecular Biology*. Springer Science+Business 994.

- Štajner, N., B. Bohanec y M Jakše. 2002. *In vitro* propagation of *Asparagus maritimus* - A rare Mediterranean salt-resistant species Plant Cell, Tissue and Organ Culture 70: 269-274.
- Reuther, G. 1977. Adventitious organ formation and somatic embryogenesis in callus of Asparagus and Iris and it's possible application. Acta Horticulturae 78: 217-224.
- Takatori, F. H., T. Murashige y J. I. Skillman. 1968. Vegetative propagation of Asparagus through tissue culture. Journal of the American Society for Horticultural Science 3: 20-22.
- Valencia, 2007. El Espárrago de Caborca: Vida, Ingreso, Trabajo y Fama Mundial. SonoraEs 37:6-9.
- Valenzuela, M. 2011. Evaluación de cuatro cultivares de espárrago, en la región de Caborca, Sonora. Reconversión 24: 9-15.
- Valenzuela, M. J. y A. López. 2011. El proceso de plantación del espárrago en Caborca. Reconversión 24: 04-07.
- Van Huylenbroeck, J.M. y P,C, Debergh. 1996. Impact of sugar concentration *in vitro* on photosynthesis and carbon metabolism during ex vitro acclimatization of Spathiphyllum plantlets. Physiol Plantarum 96:298-304.
- Watson, L. y , M.J. Dallwitz. 1992. The families of flowering plants: descriptions, illustrations, identification, and information retrieval. IB-CAS: Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences. DELTA – DEscription Language for Taxonomy. URL: <http://delta-intkey.com>
- Willmar, C. y M. Hellendoorn. 1968. Growth and morphogenesis of asparagus cells culture *in vitro*. Nature 217: 369-371.
- Withers, L. 1978. Freeze-preservation of cultured cells and tissues. In: T. A. Thorpe (ed.), Frontiers of Plant Tissue Culture 1978. IAPTC, Calgary. 297-306 pp.
- Yang, H. J. y W. J. Clore. 1973. Rapid propagation of asparagus through bud culture. Journal of the American Society for Horticultural Science 8:141-143.
- Yang, H.J. y W. J. Clore. 1974. Development of complete plantlets from moderately vigorous shoot of stocks plants of asparagus *in vitro*. Journal of the American Society for Horticultural Science 9:138-139.
- Yukimasa, H., T. Shigeru, M. Rie y K. Atsuko. 1990. Method of multiplying plant belonging to the genus Asparagus. Patente No. EP0375218.
- Ziv, M. 2000. Bioreactor technology for plant micropropagation. Horticultural Reviews. Wiley & Sons, 24:1-30.