



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**CULTIVO IN VITRO Y PROPAGACION MASIVA
DE ESPARRAGO (Asparagus officinaliss L.)**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A
FELICITAS GUERRERO MARTINEZ



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

	Pág.
A.- INTRODUCCION	1
1.- El Espárrago (<u>Asparagus officinalis L.</u>)	
2.- Origen y Distribución	
3.- Clasificación	
4.- Métodos de Propagación	
5.- Importancia Económica	
B.- CULTIVO DE TEJIDOS	6
1.- Generalidades	
2.- Cultivo de Tejidos de Monocotiledoneas	
3.- Cultivo de Tejidos de <u>Asparagus officinalis L.</u>	
C.- MATERIALES Y METODOS	17
D.- RESULTADOS Y DISCUSION	21
E.- CONCLUSIONES	31
F.- BIBLIOGRAFIA	33

ABREVIATURAS

AIA = Acido Indol - 3 - Acético

AIB = Acido Indol - 3 - Butírico

ANA = Acido -Naftalén- Acético

BA = 6 Bencil Adenina

2.4-D = Acido 2,4 - Diclorofenoxiacético

K = 6 Furfuril Aminopurina. (Cinetina)

Z = 6 -(4-Hidroxi - 3 - Metil-But-2
Enilamino)- Purina. (Zeatina)

CTV = Cultivo de Tejidos Vegetales

MS = Medio de Cultivo Murashige & Skoog

RESUMEN

En el presente trabajo se analizaron las respuestas morfogénicas de Asparagus officinalis L., cultivar UC-72 y Mary Washington 500, utilizando como explantes meristemas ápicales y segmentos de tallo.

El medio básico fué MS sin glicina. Para promover brotación múltiple fué suplementado con reguladores de crecimiento ANA + K y ANA + BA.

En todos los tratamientos se observó la formación de callo a partir del cual se originaron los brotes y sólo en algunos casos se formaron plántulas con raíz.

El medio suplementado con ANA ($5.3 \mu\text{M}$) + K ($4.6 \mu\text{M}$) mostró la mejor respuesta obteniendo un promedio de 21 brotes -- por meristemo.

A los brotes obtenidos se les indujo formación de raíz lo cual se logró en un 60% al utilizarse (ANA μM) + K ($0.5 \mu\text{M}$).

Los segmentos de tallo generalmente originaron callo --- friable con un intervalo de 80-90%.

INTRODUCCION

1.- El espárrago

El espárrago, Asparagus officinalis L., pertenece a la familia Liliaceae. Planta perenne que inverna como un rizoma. Los tallos emergen en la primavera conociéndose como turiones o espárragos, se cosechan blancos y verdes; es subterráneo con aspecto rastrero y presenta varias yemas de las cuales se desarrollan nuevos brotes que antes de emerger tienen un color -- blanco. Al conjunto de raíces y la parte subterránea se denomina garra o peine. La zona aérea esta constituida por turiones que al brotar a la superficie adquieren un color verde -- (Simonds, 1979). Las hojas constan de escamas contiguas (Lane y Kitchen, 1973).

Se han descrito (Rigau, 1966) dos tipos de raíces; unas carnosas cuya función es acumulación de reservas alimenticias, de gran importancia debido a que de estas depende la producción de turiones, tienen una duración de 15 a 20 años a lo largo de los cuales van aumentando en grosor y longitud, y otras fibrosas que se localizan sobre las anteriores, absorben agua y sales minerales del suelo. Las raíces fibrosas son anuales.

Los órganos de reproducción se encuentran en flores separadas. La flor femenina lleva un ovario súpero con estigmas

trifidos, en su base se encuentran 6 estambres atrofiados, presenta 6 pétalos. La flor masculina tiene 6 estambres funcionales y a su alrededor 6 pétalos.

El fruto es una baya escarlata en un principio de color verde, posteriormente roja. Las bayas generalmente contienen de 4 a 6 semillas (Simonds, 1979).

Las semillas son pequeñas de color negro azulado, de 2 a 4 mm de diámetro, triangulares con una superficie cóncava que semeja una hendidura con dos caras convexas. Con una viabilidad de 5 a 8 años, un tiempo de germinación de 7 a 21 días y una temperatura requerida de 20 a 30°C (Támaro, 1974).

El espárrago se considera rico en vitamina B y C (Quer, 1980). El color del espárrago es una característica de importancia económica, dependiendo de éste es el consumo por la gente de distintas regiones, por ejemplo en Alemania y Países Bajos prefieren un color blanco, mientras que en Francia el color violeta, en los Estados Unidos prefieren aquellos espárragos que presentan un color verde oscuro hasta ligeramente violeta oscuro.

Las fibras de la porción comestible forman un cilindro pericíclico fibroso, este se encuentra unido al tallo por debajo de la superficie. La dureza de las fibras disminuye

hacia arriba, en general se prefieren aquellos espárragos de aproximadamente 2 cm de diámetro y de consistencia no fibrosa.

Debido a sus propiedades diuréticas, los espárragos se han considerado medicinales, siendo empleados en la elaboración del té llamado "de las cinco raíces" tónico difundido en España para el tratamiento de enfermedades del riñón. Los tallos son utilizados para dolor de muelas y problemas cardíacos (Quer, 1980; Rigau, 1966 y Simonds, 1979).

2.- Origen y Distribución

A juzgar por las pinturas de algunos sepulcros, los espárragos ya se cultivaban en Egipto hace cerca de 6 mil años, - de éste país fue llevado a Grecia, y posteriormente a España - (Quer, 1980).

Actualmente su cultivo se extiende en varios países de Europa llegando hasta Siberia. En México se encuentran zonas esparragueras en: Baja California Norte, Chihuahua, Guanajuato Querétaro y Sonora (Zamarripa, 1984, comunicación personal).

3.- Clasificación (Cronquist, 1981)

Reino	Vegetal
División	Magnoliophyta

Clase	Liliopsidae
Subclase	Liliidae
Orden	Liliales
Familia	Liliaceae
Género	<u>Asparagus</u>
Especie	<u>Asparagus officinalis</u> L.

Existen diferentes variedades de espárragos entre las cuales la Mary Washington es una de las más cotizadas por producir vástagos gruesos (Rigau, 1966).

Otras variedades de gran importancia son por ejemplo la UC-72 que debido a que es tolerante a Fusarium y al igual que la UC-66, han dado mayores rendimientos que otras como la UC-309 en el Bajío (Muñoz, 1965).

4.- Métodos de Propagación

Basicamente existen dos diferentes formas de multiplicación una de ellas es por semillas, las cuales se obtienen de bayas maduras y otra asexual por medio de porciones de corona, Actualmente la más empleada es por semillas.

5.- Importancia Económica

El cultivo de espárrago como alimento no es importante

para el mexicano debido a que no forma parte de su dieta regular ya que su costo es mayor que el de otras verduras, sin embargo en otros países como Estados Unidos, Francia, Inglaterra etc., éste producto se consume en mayor cantidad y es muypreciado para la elaboración de ensaladas y algunos platillos típicos del lugar, dada ésta situación el espárrago producido en México se exporta y tiene una fuerte demanda de Estados Unidos y Francia.

Según datos estadísticos (Zamarripa, 1984, comunicación personal). En México se siembran aproximadamente 4287 ha con una producción de 20, 099 300 kg, promedio anual para 1983. A continuación se enlistan las entidades productoras de espárrago.

Entidad	Superficie cosechada (ha)	Producción total/(T)
Baja California Norte	1484	5046
Chihuahua	15	15
Guanajuato	1924	12692
Querétaro	102	561
Sonora	762	2679

En la cosecha de enero a abril de 1984, en éste cuatrimestre se exportaron 4, 645 003 kg. de espárragos frescos lo que demuestra su gran importancia para el país (Martínez, 1984,

comunicación personal).

CULTIVO DE TEJIDOS

1.- Generalidades

El principio del cultivo de tejidos está basado en la -- teoría celular elaborada en 1838 - 1839 por Schleiden y Schwann ésta teoría plantea que todos los seres vivos están constituidos por unidades básicas denominadas células y en conjunto funcionan como un todo armónico, resultado de la suma de las interacciones de las unidades celulares. Cada célula funciona como un individuo capaz de generar a otro individuo idéntico con la misma información genética (Roberts, et al. 1977).

La idea de experimentar con los tejidos y órganos de plantas aisladas bajo condiciones controladas de laboratorio surgió durante la última parte del siglo XIX (Dodds y Roberts, -- 1982).

Haberlandt en 1902, fué el primero en intentar cultivar - células vegetales en un medio nutritivo para estudiar de una manera más cercana la capacidad de las células para ser autónomas y totipotenciales, a partir de entonces muchos investigadores aplicaron ésta técnica a sus trabajos.

En 1934, White trabajo con raíces de jitomate manteniendo el cultivo en continuo crecimiento por tiempo ilimitado. De acuerdo a White (1951), existe al inicio de la técnica de Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV) el problema de escoger el material vegetal y el medio nutritivo adecuado. El medio propuesto por White fué uno de los primeros que se conocieron para CTV (Gautheret, 1982).

En 1939 Gautheret en París, Nobecourt en Grenoble y White en Princeton, publicaron independientemente descripciones de cultivos de cambium de zanahoria y tabaco. Todas éstas líneas se cultivan y son representativas de los primeros cultivos de tejidos en sentido estricto del crecimiento desorganizado -- (Caldas, et al., 1975).

En gran medida el éxito o fracaso en el desarrollo de CTV se ha debido a la composición de los medios de cultivo.

En 1948 se concluyó que en presencia de adenina proliferan células y yemas. Skoog sugirió que los derivados de adenina promueven la división celular.

En 1955 se aisló una citocinina y se identificó como 6-furfuril amino purina y nombrada cinetina (K), más tarde se conoció la zeatina (Z) presente, por ejemplo en el esdospermo de coco (Coccus nucifera) y en maíz (Zea mays), de donde deriva

su nombre.

Un descubrimiento fundamental para el desarrollo de CTV dado a conocer por Skoog y Miller en 1957, fué el establecimiento del papel que juegan los reguladores de crecimiento en el desarrollo de un cultivo in vitro, los cuales regulan la expresión morfogénica, básicamente en una relación de auxinas/citocininas (Dodds y Roberts, 1982).

Las auxinas más empleadas en CTV son: AIA, ANA y 2,4D. Dentro de éstas el AIA es una auxina de origen vegetal, es afectada por factores que estimulan su degradación como la luz, peróxidos y ciertas enzimas vegetales, un ejemplo de éstas es la AIA oxidasa (Ching, 1974). Yamakawa, et al., señalan que AIA es estable a la esterilización en autoclave. El ANA es -- una auxina sintética. El 2,4D es un herbicida muy potente para el control de malezas de hojas anchas; en cultivo in vitro, estimula la formación de callo a bajas concentraciones, en algunos explantes (Dodds y Roberts, 1982).

Uno de los medios más ampliamente utilizados en CTV es el propuesto por Murashige y Skoog (1962) que fué desarrollado para el cultivo de tabaco, sin embargo, ha llegado a ser el más utilizado para muchas especies pues promueve la organogénesis de muchos cultivos in vitro (Karen, 1981).

Actualmente las técnicas de CTV son una alternativa en la propagación vegetativa, a partir de células que bajo condiciones de cultivo controladas hacen patente sus potencialidades - para diferenciarse en órganos y aun en plantas completas (Murashige, 1974). Estas técnicas se han utilizado para la producción de fármacos in vitro, logrando el mejoramiento genético - de plantas agrónomicamente importantes, para el establecimiento de plantas específicas libres de patógenos, en la propagación clonal de variedades y especies seleccionadas (Murashige, 1978), en la preservación de germoplasma, en el cultivo de embriones producto de hibridación de plantas y otras modificaciones de plantas importantes en la agricultura, y en cultivo de óvulos y polen para la obtención de haploides; otro adelanto - fué la técnica de cultivo y aislamiento de protoplastos (Dodds y Roberts, 1982), así como la fusión de especies diferentes para la obtención de híbridos somáticos, ha llegado ha ser una herramienta útil para estudios de modificación parasexual de - células vegetales y sistema experimental para la producción de nuevas plantas (Chien, et al., 1982).

El medio nutritivo, la edad, el tipo de explante, la luz, la temperatura, la humedad y el fotoperfodo, son factores -- importantes que van ha determinar el desarrollo del cultivo -- (Dodds y Roberts, 1982). El medio nutritivo para el CTV debe suplir al suelo, fertilizantes, agua y fuentes de carbono in vitro son necesarios para las plantas.

La mayoría de los medios utilizados en el CTV están formados por cinco componentes: sales inorgánicas, fuentes de -- carbono, reguladores de crecimiento y suplementos orgánicos (Gamborg, et al., 1976; Gamborg, 1982 y Karen, 1981).

Dentro de los nutrientes inorgánicos se encuentran distintas sales minerales en forma de macro y micronutrientes -- los cuales son: N, K, Mg, S, P, Ca, I, B, Mn, Zn, Mo, Cu, Co, y Fe.

Como fuente de carbono se utiliza la sacarosa que puede ser sustituida por glucosa, por fructosa u otros carbohidra-- tos (Gamborg, et al., 1976 y Karen, 1981). La concentración de sacarosa usualmente es de 2-4.5% e influye en la producción de metabolitos (Meinhart, 1978), pudiendo además tener efectos de regulación osmótica (Thorpe, 1978).

De las vitaminas se sabe que la tiamina es esencial, pero también se utilizan la piridoxina, ácido nicotínico y myo-inositol, las cuales ayudan a promover el crecimiento aplicandose en pequeñas cantidades (Dodds y Roberts, 1982 y Gamborg, 1982).

Se han utilizado suplementos naturales como agua de coco (AC), jugo de naranja, jitomate, hidrolizado de proteínas, - etc., estos complejos mejoran la tasa de crecimiento celular (Murashige, 1974; Gamborg, 1982), sin embargo Child (1979) ha

informado que las concentraciones de los nutrientes contenidos en el agua de coco así como otros complejos orgánicos varían de acuerdo al grado de maduración del mismo y esta situación se presenta también para otros extractos naturales cuya composición no está determinada, por lo que al intentar repetir un experimento con estos complejos orgánicos, los resultados pueden no ser los mismos.

Los reguladores de crecimiento son factores importantes debido a que controlan procesos que conducen al desarrollo de tallo, yemas, brotes y raíces, con los cuales es posible en muchos casos "dirigir o inducir" la respuesta deseada de un tejido in vitro (Dodds y Roberts, 1982). Existen diferentes reguladores de crecimiento tales como auxinas y citocininas. Las primeras son compuestos que estimulan la elongación celular ya que al ser aplicadas en tejidos vegetales, facilitan la entrada de agua y sustratos como consecuencia de reblandecimiento de la pared celular que se vuelve más permeable (Phillips, 1971).

Las citocinas regulan la división celular (citoquinesis), participan en la diferenciación celular y tienen efectos de correlación, latencia, floración, regulación de la senescencia y estimulación de expansión del cotiledon (Villalobos, 1982). El efecto más característico de las citocininas en CTV es la proliferación celular.

El pH en el medio es usualmente ajustado a un pH ácido entre 5 y 6. Los efectos directos o indirectos de pH pueden estar involucrados en la respuesta de crecimiento, por ejemplo, está implicado como un factor que controla el uso de nitrógeno por células vegetales. Durante el crecimiento de las células el pH del medio cambia conforme los iones son absorbidos por las células o debido a productos de metabolismo que son excretados al medio (Caldas, et al., 1975 y Karen, 1981).

La esterilización del medio de cultivo se realiza en autoclave o mediante filtros; los constituyentes termolábiles del medio, por ejemplo el GA₃ deben esterilizarse con filtros con porosidad de 0.22 - 0.45 μm y se agregan al medio después de que se haya esterilizado, si el cultivo es en suspensión se deja enfriar completamente y después se agrega el GA₃, pero si el cultivo es en medio sólido el GA₃ deberá agregarse antes de que el agar solidifique, generalmente se adiciona -- después de que el medio sale del autoclave y alcanza una temperatura de unos 60°C. Esta mezcla se realiza en condiciones asépticas.

Entre los factores que determinan el éxito de un cultivo están, la luz y temperatura. La iluminación debe ser considerada en términos de intensidad, calidad y período de iluminación. Los requerimientos de luz no son los mismos para todas las plantas. En CTV la fotosíntesis no es necesariamente una

actividad presente, sin embargo, la luz se necesita para regular ciertos procesos morfogénéticos.

Se necesita una combinación entre la intensidad luminosa y el período de exposición. El fotoperíodo influye en el desarrollo de cultivo de tejidos de plantas que normalmente responden a un fotoperíodo.

Se mantienen los cultivos en un medio ambiente el cual la temperatura es constante, usualmente es de 25°C no tomando en cuenta las fluctuaciones de temperatura diurna y estacional bajo las cuales las plantas se desarrollan en su habitat. Se han reportado diferentes temperaturas para varias especies, en el caso particular de espárrago Murashige (1974), señala un intervalo de temperatura óptima de 26 a 30°C y un fotoperíodo de 16 horas luz, 1000 lux con 8 horas de obscuridad.

Cuando la atmósfera del sitio de incubación está muy seca el medio se deshidrata rápidamente, concentrando las sales y disminuyendo el crecimiento del tejido. Al mantener la humedad en las cámaras de crecimiento entre 70 y 90% se reduce el problema (Caldas, et al., 1975).

2.- Cultivo de tejidos en Monocotiledóneas

Las monocotiledóneas han sido parte fundamental en el

desarrollo de la humanidad, ya que se ha utilizado de diferentes formas: medicinales, alimenticias, forrajeras, ornamentales, etc.

A través de su historia el hombre ha incrementado y favorecido los cultivos de monocotiledóneas utilizando diferentes técnicas, actualmente el empleo de las técnicas de CTV promete reducir en gran medida el tiempo de "liberación" de nuevas variedades mejoradas.

Schenk y Hildebrant (1972) sugieren un medio útil para el cultivo de callos en algunas monocotiledóneas, haciendo notar que a diferencia de los requerimientos de las dicotiledóneas, altas concentraciones de auxinas y bajas de citocininas favorecen el crecimiento, por ejemplo el trigo, cebada, pastos sorgo y avena, es decir los tejidos de las dicotiledóneas son generalmente más independientes de un suministro externo de citocininas que los tejidos de monocotiledóneas.

Dentro del cultivo in vitro de monocotiledóneas los explantes más utilizados para la inducción de brotes adventicios son: yemas axilares, escamas, base de la hoja, tallo, inflorescencias y partes de la flor (pedicelos, ovarios, pétalos, polen, etc.). Las yemas axilares cultivadas en medio con citocininas desarrollan ramificaciones incrementándose en subcultivos, esto ha sido analizado en Gladíolus, en Frassia e Iris

(Hussey, 1982).

El principal método de propagación en este grupo de plantas es la inducción de brotes adventicios directamente de los explantes sin ocurrir la formación de callo.

3.- Cultivo de Tejidos de Asparagus officinalis L.

Las técnicas de CTV se han aplicado en espárrago desde 1945 cuando Loo cultivó in vitro ápices de tallo en medio básico (MB), el cultivo fué mantenido 9 meses, teniendo una mejor respuesta cuando se adicionó la sacarosa al 1%.

Galton en 1948 utilizó el MB mencionado por Loo (1945), suplementándolo con AIA y observó como respuesta la formación de raíces y algunos brotes. Steward, et al., (1968) informaron el desarrollo de embriones a partir de callos de espárrago, derivados de hipocótilo de semillas germinadas asépticamente, desarrollandolos en un medio suplentado con 2,4 D y K manteniendo el cultivo a una temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Murashige, et al., 1972 utilizaron como explante meristemas ápicales bajo una intensidad luminosa de 1600 lux a una temperatura de 27°C , después de 6 meses obtuvieron formación de brotes.

Yang y Clore (1973, 1974), trabajaron con los cultivares UC-500 W UC-711, como explantes usaron segmentos de tallo y yemas laterales, el medio empleado fué MS complementado con ANA e incubaron el cultivo a 27°C con intensidad luminosa de 1600 lux; la respuesta obtenida fué de un 77% de plántulas a partir de yemas laterales, teniendo un promedio de 2.6 plántulas por explante y solo el 35% formaron raíces.

Considerando la importancia real que el cultivo de espárrago tiene en nuestro país, así como el interés que reviste el efectuar cultivos clonados de esta especie, el presente --trabajo intentó obtener brotación múltiple a partir de meristemas apicales y secciones de tallo desarrollados in vitro en presencia de diferentes reguladores de crecimiento, se trató de establecer las condiciones que favorecieran la diferenciación en los cultivares Mary Washinton 500 y UC-72, para así lograr una propagación masiva de esta especie.

C. MATERIALES Y METODOS

Se utilizaron semillas de Asparagus officinalis L. de los cultivares Mary Washington 500 y UC-72, las cuales fueron germinadas asépticamente colocandolas en una solución de cloro -- activo de 1.5% (Cloralex Comercial 30% v/v) durante 20 minutos con agitación constante, enjuagándose 3 veces con agua estéril, posteriormente en una área aséptica se colocaron en frascos con algodón y agua destilada previamente esterilizada a una temperatura de 126°C con una presión de 1.4 kg/cm² durante 15 minutos, se incubaron en una estufa a 26°C en obscuridad durante 12 días. A las plantas obtenidas se les hizo un corte que incluía tallo y región meristemática estos cortes se desinfectaron con una solución de cloro activo de 0.75% (Cloralex Comercial 15% v/v) - durante 15 minutos, finalmente se enjuagaron al menos 3 veces - con agua destilada esterilizada y se procedió a la obtención de los explantes.

Otro método utilizado de esterilización fue con hipoclorito de calcio al 15% (J.T. Baker) durante 15 minutos para controlar la contaminación, sin embargo este último método redujo el porcentaje de germinación por tal razón el más utilizado fue el previamente mencionado.

Los explantes utilizados fueron meristemas apicales (incluyendo el primer par de primordio foliares) de 400 a 500 μ y

segmentos transversales de tallo de 5000 μ , estos explantes se aislaron de plántulas de 12 a 15 días de edad para el cultivar UC-72, en este caso se obtuvo un 80% de germinación, mientras que para Mary Washington 500 la germinación fué muy baja (12%) por lo que sólo fueron probadas algunas de las mejores respuestas obtenidas en el cultivar UC-72.

El medio utilizado fué MS (Murashige y Skoog, 1962) sin glicina, se ha informado que la ausencia de glicina favorece al desarrollo in vitro del espárrago (Loo, 1945; Galston, 1948 y Murashige, et al., 1972). Las soluciones stock se prepararon de acuerdo a los señalados en el apéndice I, así como la composición del medio: macro y micronutrientes, solución de Fe con EDTA, Inositol y vitaminas, fueron conservadas en refrigeración a 6°C hasta que se utilizaron. Se tomaron alícuotas con pipetas de diferentes volúmenes vaciándose en un vaso de precipitados, agitándose con ayuda de un magneto en una parrilla de agitación (CORNING PC-353), posteriormente se agregó la sacarosa 3%, se adicionaron los regulares de crecimiento aforándose a la cantidad deseada, finalmente se ajustó el pH a 5.7-5.8 con una solución de NaOH (0.1 y 0.5 N) o HCL (0.1 y 0.5 N), a continuación el medio fué calentado agregándose agar (Agar Bacteriológico, Bioxon) al 0.8% hasta su ebullición y disolución homogénea, más tarde el medio fue vertido en frascos con una capacidad de 100 ml en cada frasco se vaciaron 20 ml de medio. En algunos casos se usaron suplementos como agua de coco.

Para la preparación de esto se usaron cocos maduros (Dodds y Roberts, 1982), los cuales fueron perforados con un sacabocados, el endospermo fue filtrado en una gasa simple esterilizada, posteriormente se hirvió durante 10 minutos, se dejó enfriar hasta observar la precipitación de las proteínas y cuando se enfrió fue filtrado con papel Whattman No. 1 y se adicionó al medio en una concentración de 10% (v/v), antes de agregar el agar y ajustar el pH.

Los reguladores de crecimiento utilizados fueron ANA + K y ANA + BA (ICN, Pharmaceuticals, Inc.), los cuales fueron combinados a las concentraciones de 0.1, 1.0, 5.0, 10.0 μM .

Además se probaron otras auxinas para la fase de enraizamiento, AIA, AIB, (Tabla 1). Otro medio utilizado para promover brotación múltiple fue el suplementado con ANA (5.3 μM) + K (4.6 μM).

Los frascos fueron marcados con claves que permitieron identificarlos, a continuación se esterilizaron en autoclave a una temperatura de 126°C y una presión de 1.4 kg/cm² durante 15 minutos.

Para la siembra se utilizó una campana de flujo laminar (VECO) la cual fue previamente desinfectada con alcohol etílico al 70%, puesto a funcionar al menos 30 minutos antes de efectuar

la siembra. Todo el instrumental se mantuvo en alcóhol etílico (70%) y se trabajó cerca de mecheros bunsen, para minimizar los riesgos de contaminación.

Los meristemas fueron extraídos con ayuda de un microscopio de disección (Zeiss), el aislamiento se efectuó con navajas de pedicurista (Merkur) sostenidas en mangos de acero inoxidable y agujas de disección de punto fino. De igual manera se procedió a la fragmentación del tallo. El número de explantes colocados por frasco fue de 3 meristemas ápicales y 5 explantes por frasco para segmentos de tallo.

Los cultivos fueron incubados en una cámara de crecimiento a una temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$ y un fotoperíodo de 16 horas luz / 8 horas oscuridad, la intensidad luminosa fue de 1000 lux.

Se consideraron brotes a todas aquellas estructuras que median menos de 1 cm y plántulas a las que se rebasaban 1 cm.

D. RESULTADOS Y DISCUSION

Se observaron diferentes respuestas morfogénicas para -meristemas ápicales (Tablas 2, 3 y 4) y para segmentos de tallos (Tablas 5, 6 y 7), las cuales se obtuvieron en función de las combinaciones hormonales estudiadas. Comparando estas respuestas entre el medio suplementado con ANA + BA y ANA + K la primera combinación mostró una respuesta pobre, ya que sólo hubo formación de callo en el mayoría de los tratamientos, mientras que el medio suplementado con ANA y K se observó una variedad de respuesta desde formación de callo, y yemas, brotes, plántulas y raíces; el callo observado para estas combinaciones (ANA+K) fué blanco y friable (Figuras 1 y 2).

Las citocininas y auxinas son muy efectivas, en la inducción de callo así como la formación plántulas y raíces y en algunos casos las auxinas tienen un tipo específico de organogénesis.

En los explantes usados la mejor respuesta morfogénica se observó en meristemas que mostraron signos de crecimiento a los 5 días.

En general al analizar la interacción de ANA y K para meristemas ápicales (Tabla 2 y 4) se observó una respuesta morfogénica muy amplia que incluyó la formación de callo, con

brotos, plántulas y raíces, sin embargo la respuesta en términos cuantitativos fué variable, por ejemplo el porcentaje de callo con plántula fluctuó (Tabla 2) entre el 6 y 56% habiéndose presentado casos en los cuales no hubo inducción de plántulas --- (ANA 0.1 μ M + K 1.0 μ M, ANA 0.1 μ M + K 10 μ M y ANA 5 μ M + K 10 μ M). Un caso extremo (Tabla 4) se presentó cuando interaccionaron ANA (10 μ M) y K (10 μ M) en el cual se observó sólo la formación de callo. Sin embargo nuestros mejores resultados se obtuvieron (Tabla 4) cuando se combinaron ANA (5.3 μ M) y K (4.3 μ M) por lo cual resulta difícil interpretar los resultados en términos auxina / citocinina.

Hubo una clara diferencia entre las respuestas de meristemas y segmentos de tallo, pues al analizar los resultados de -- estos últimos en las combinaciones de ANA y K (Tablas 5 y 6) -- aun cuando hubo una cierta respuesta morfogénética esta fué pobre o nula (Tabla 5 y 7) obteniéndose las mejores respuestas (Tabla 5) en la combinación ANA 0.1 μ M y K 5 μ M.

Los meristemas ápicales muestran como primer paso la formación de callo alrededor de los 9 días, después de 14 días aparecían sobre la superficie del callo yemas que eventualmente originaban brotes después de 21 días y en algunos casos se formaron raíces en las combinaciones ANA 0.1, 1.0, 10 y 5 μ M con K 0.1, 1.0 y 5 μ M (Tabla 2). En las combinaciones ANA 1.0 / μ M + K 5 / μ M (Tabla 2) se observó brotación múltiple como se

puede apreciar en la figura No. 1.

En la tabla 2 se muestra la respuesta de meristemas apicales a los reguladores de crecimiento ANA y K, en ellos se puede observar que las combinaciones ANA $1.0 \mu\text{M}$ + K $0.1 \mu\text{M}$ mostró brotación múltiple con un promedio de 7 plántulas por meristemo, además como se muestra en la figura No. 1 también hubo formación de raíces.

En la tabla 2 se observa que las combinaciones ANA $10 \mu\text{M}$ + K 1.0 y $5 \mu\text{M}$ muestran 4 plántulas por meristemas, sin embargo se presentó un mayor porcentaje (78%) en la combinación ANA $10 \mu\text{M}$ + $5 \mu\text{M}$. En la concentración $5 \mu\text{M}$ de ANA con 0.1 de K los meristemas respondieron formando callo posteriormente se presentaron abundantes raíces y finalmente formaron brotes, aunque el número fué reducido pues sólo se observaron 2 plántulas por explante, inicialmente el callo era compacto y posteriormente formaron raíces gruesas.

Estas observaciones concuerdan con lo informado por Paterson y Thomas (1981) para Crasula argantica, la cual mostró un desarrollo similar a las observaciones presentadas en este trabajo para espárrago, como paso inicial formación de callo friable y a continuación raíces y eventualmente brotes.

Evans et al. (1981) informa que las especies capaces de

una organogénesis somática directa no requiere de un callo intermedio y son regeneradas directamente de explantes colocados en un medio de cultivo. La mayoría de las especies de grano han crecido en un estado de callo anterior a la regeneración de plantas. La regeneración puede ser por vía directa como cita Hussey (1982) para algunas monocotiledóneas o también pueden ser mediadas por un callo. En nuestro caso prácticamente en todos los tratamientos aplicados a meristemos apicales hubo formación de callo (tablas 2, 4, 5 y 7) sin embargo este en ocasiones no fue abundante (Figuras No. 1 y 2) en tanta que en otros casos fué fríasble y abundante.

Otro aspecto importante a considerar son las cualidades endógenas de auxinas / citocininas ya que es un factor que se implica en el tipo de respuesta (Dodds y Roberts, 1982) por ejemplo hubo algunos meristemos en donde no hubo formación de plántulas esto sucedió en la concentración ANA 0.1 μM K 1.0, 10 y ANA 5 y 10 μM K sin embargo hubo formación de callo en la cual se manifestó la formación de callo en un 87% fué en 5 μM ANA con 5 μM K formando 2 plántulas por meristemo apical.

En la tabla 3 se muestran las respuestas de meristemos --apicales con diferentes concentraciones de ANA + BA, en ella se observa que sólo en 6 casos de 16 hubo formación de plántulas. En la combinación 1.0 μM ANA con 0.1 μM BA se formaron 4 plántulas por meristemo, mientras que la formación de callos

fué alta en la mayoría de los casos en la concentración de u ANA con 0.1μ BA la respuesta fué pobre y solo hubo un 17% que formaron callo con pigmentos verdes que al parecer dicha pigmentación está influenciada considerablemente por el nivel de dextrosa, presencia de almidón soluble, deficiencia de nitrógeno, temperatura, luz y auxinas exógenas (Narayanaswamy, 1977). Podemos pensar que para este caso las auxinas exógenas jugaron un papel importante debido que el cultivo se mantuvo en condiciones similares a las informadas por Murashige (1974).

En la tabla 4 se analiza la respuesta morfogenética para meristemas apicales en los cultivos Mary Washington 500 y UC 72, en ella se muestra la respuesta del cultivar UC-72 a la combinación hormonal 5.3μ M ANA y 4.6μ M, la cual fué muy satisfactoria debido a que los meristemas apicales respondieron en un 80% con bastante uniformidad teniendo a los 60 días un promedio de 21 brotes para cada explante (con intervalo entre 19 y 25 plántulas), esto sugiere que se ha superado el promedio ya informado por Yang y Clore (1974) de 2.6 plántulas por meristemas, aunque también se han cultivado in vitro otras estructuras de espárrago tales como tallo, yemas laterales y -- raíces en cuyos resultados se hace aparente la formación de plántulas aunque no especifican su rendimiento. Murashige, et al (1972) menciona que los meristemas de espárrago tienen una gran capacidad regenerativa (80-90°C), sin embargo no

aclara el no. de plántulas por meristemo.

Es importante hacer notar que en la concentración 5.3 μM ANA y 4.6 μM no sólo es la mejor sino que se encontró una estructura organizada muy peculiar que al microscopio semeja una forma esponjosa como si al parecer su contenido de agua fuese muy alto.

Los explantes meristemáticos han llegado a ser utilizados para obtener regeneración de algunas gramíneas. Se requiere de una citocinina en el medio de cultivo de cada especie capaz de organogénesis somática. Las citocininas pueden ser K o BA. En la mayoría de los casos se usa una auxina con una citocinina (Evans, et al., 1981), para nuestro caso particular se utilizó ANA + K o BA. Evidentemente existe un requerimiento de reguladores de crecimiento para disparar la organogénesis o embriogénesis. En general a concentraciones bajas de auxinas y altas de citocininas se promueve la formación de brotes y plántulas, sin embargo para el caso de espárrago hubo un mayor número de brotes cuando la auxina estuvo en mayor concentración (5.3 μM ANA) que la citocinina (4.6 μM). lo cual no concuerda con lo informado, por lo que es necesario considerar que cada especie tiene sus propias necesidades y depende de los factores medio ambientales (Gamborg et al., 1976).

En la misma tabla 4 se puede apreciar la respuesta para el cultivar Mary Washington 500 en la que sólo un 70% respondieron formando un callo y un 60% llegaron a formar plántulas con

un promedio de 4 por explante en la combinación 5.3 μM ANA con 4.6 μM K. Para ambos cultivares utilizados en el presente trabajo en esta concentración no hubo formación de raíces. Esto concuerda con lo señalado por Stenlid (1982), quien sugiere que la presencia de auxinas y citocininas estimula la producción de etileno, el cual inhibe la formación de raíces, evidentemente el balance de reguladores de crecimiento juega un papel importante en el tipo de respuesta (Evans et al. 1981).

En la tabla 5 se analiza la respuesta in vitro de segmentos de tallo para el cultivar UC-72, en esta tabla se puede apreciar que el comportamiento en general para las secciones fué la formación de callo compacto y sólo en pocos casos como en la combinación 0.1 μM ANA y 1.0 μM K se formaron yemas y brotes teniendo un promedio por explante de 2 plántulas.

En la tabla 6 se muestra la respuesta de los segmentos de tallo expuestos a la combinación hormonal ANA/BA, en la que en concentración 1.0 μM ANA con 10 μM BA hubo un 80% de los explantes que formaron callo y sólo un 25% llegaron a formar brotes con un promedio de 2 plántulas por segmento de tallo. En otras combinaciones tales como 0.1 μM ANA combinado con 0.1 y 5 μM BA no hubo respuesta. Evans et al., (1981) citan que cuando son usadas altas concentraciones de auxinas y bajas concentraciones de citocininas se promueve la formación de callo, sin embargo en nuestro caso la formación de callo

se dio a partir de segmentos de tallo favoreciendo el desarrollo de callo a altas concentraciones de auxinas y bajas de citocininas.

En la tabla 7 se presentan los resultados de fragmentos de tallo (0.5 cm) por lo que se puede apreciar, todos los explantes que respondieron formaron callo, pero la frecuencia más alta fué para el cultivar UC-72 el cual fué de 95% en tanto para la combinación $10 \mu\text{M}$ ANA y $10 \mu\text{M}$ K sólo se formó callo en 53%. Estos resultados demuestran la diferencia en la respuesta morfogénica de explantes de origen diferente (tabla 4 y 7). El fenómeno de diferenciación puede darse en explantes de tallo, hojas, cormos, tubérculos, embriones y otros órganos. La formación de callo puede ser un paso intermedio.

La respuesta de un fragmento de tejido en cultivo depende de las sustancias endógenas de crecimiento presentes al momento de corte, por ejemplo los cortes relativamente pequeños pueden producir gran crecimiento de callo en la superficie del corte. La excisión sola producirá una respuesta de herida acompañada por la inducción de división celular y puede resultar un callo (Caldas et al., 1975).

En la tabla 8 se observan los diferentes porcentajes de enraizamiento para el cultivar UC-72, se muestra la mejor respuesta en la combinación de $2 \mu\text{M}$ con $0.5 \mu\text{M}$ K en la cual se obtuvo un 60% de brotes enraizados esto sugiere que la

presencia de ANA es un factor importante para la formación de raíces, lo cual concuerda con Yang y Clore (1974), sin embargo esto se opone a lo propuesto por Stenlid quien sugiere que las citocininas estimulan la producción de etilino aunque aparentemente la K no evitó la formación de raíces, esto pudo deberse a que se utilizó en bajas concentraciones.

Cuando se utilizó AIB $1\mu\text{M}$ sin sacarosa el porcentaje de enraizamiento fué del 12%, en tanto Karta et al., (1981) han informado que esta concentración de AIB favoreció el enraizamiento del cultivo in vitro de café teniendo una frecuencia de 90-100% en la formación de raíces, esto implica que al omitir la sacarosa el brote es capaz de generar su raíz para tomar las sustancias nutritivas requeridas.

En algunos casos (tablas 2, 3, 4, 5, y 6) se obtuvieron raíces como resultado del desarrollo del explante original, sin embargo estas raíces no tenían conexión fisiológica con la plántula por lo que no tiene significado alguno desde el punto de vista práctico.

Las auxinas que son usadas para promover la formación de raíz incluyen ANA, AIB y AIA (Gamborg y Shylyk, 1981).

En general podemos concluir que el cultivo in vitro de meristemos apicales tuvo diferentes respuestas, formación de callo,

organogénesis y morfogénesis; el callo que se formó era generalmente compacto y hialino y en algunas ocasiones se tornaba de color verde con puntos más intensos que podrían sugerir la formación de meristemoides que eventualmente pueden llegar a formar yemas o brotes (Dodds y Roberts, 1982).

E. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos se puede concluir que el medio Murashige-Skoog (1962) es adecuado para el cultivo in vitro de espárrago.

Se estableció un método de cultivo de meristemas apicales de plántulas obtenidas asépticamente, en el cual se desarrollaron brotes que pueden proporcionar para su cultivo in vitro 21 plántulas después de 60 días (con un intervalo de entre 19 a 25 plántulas).

De los cultivares utilizados el UC-72 tuvo una mejor respuesta que el cultivar Mary Washington 500, lo cual pone de manifiesto la especificidad de la respuesta inclusive a nivel de cultivares.

Se determinaron las condiciones hormonales, que favorecen el desarrollo de brotes.

Se encontró que el balance auxina-citocinina influye fuertemente en el patrón de morfogénesis del explante en el desarrollo, localizándose niveles óptimos por diferentes tipos de respuesta de acuerdo a las concentraciones de reguladores de crecimiento.

Se encontró que el explante que mejor responde a las condiciones de cultivo son los meristemas apicales, teniendo una variedad de respuesta.

Se ensayaron dos citocininas (K y BA) con una auxina (ANA) en combinaciones diferentes, determinando las proporciones que favorecen el desarrollo de brotes.

Se ensayaron diferentes medios de cultivo con el propósito de lograr la formación de raíces, encontrando que al bajar la concentración de ANA y K, mantienen el cultivo en buenas condiciones y favorecen el desarrollo de raíces de un 60%.

Para poder contar con la metodología completa y propagación in vitro de esparrago, deberá optimizarse la fase de enraizamiento de brotes. Se tendrá que buscar el balance adecuado de reguladores de crecimiento para dicha fase.

Una vez obtenido el brote enraizado o la planta completa in vitro, deberá desarrollarse diferentes formas de transplante en el invernadero para su posterior adaptación.

BIBLIOGRAFIA

BAYLER, L. H. 1977. Manual of Cultivated Plants. Mac-Millan. Pub. CO. INC. New York: 215-216.

CALDAS, I., O.J. CROCOMO Y W.R. SHARP. 1975. Hand-Book of Plant Tissue Culture, Part I. Application of Nuclear Energy for the Study of Cellular and Developmental Biology. CENA, Piracaba. Ed. W. R. Sharp y O. J. Crocomo: 13-25.

CHIEN, Z., C. QUIAN, K. N. y L. R. WETTER. 1982. Chromosomal and Isozyme Studies of Nicotiana tabacum - Glycine max Hybrid Cell Lines. In: Plant Tissue Culture. Proc. 5 th Intl. Cong. Plant Tissue Culture. Ed. A. Fujiwara. Japanese Assoc. of Plant Tissue Culture, Tokyo: 633-634.

CRONQUIST, A. 1981. An Integrated System of Classification of Flowering Plants. Columbia Univ. Press. New York: 1208-1211.

DEPARTAMENTO DE AGRICULTURA DE LOS ESTADOS UNIDOS DE AMERICA. 1977. Semillas, CECSA, México: 1020.

DODDS, J. H. y L. W. ROBERTS. 1982. Experiments in Plant Tissue Culture. Cambridge Univ. New York: 1-10, 21-35, 149-161.

ESSAU, K. 1972. Anatomía Vegetal. Barcelona, España: 85-124.

EVANS, D. A., W. R. SHARP Y C. F. FICK. 1981. Growth Behavior of Cell Cultures: Embryogenesis and organogenesis. In: Plant Tissue Culture Methods and Applications in Agriculture. Ed. T.A. Thorpe. Academic - Press, New York: 45-113.

FOSKET, D. E. y D. H. TEPPER. 1978. Hormonal Regulation of Growth in

Cultured Plant Cells. *In Vitro* 14: 1.: 63-75.

GALSTON, A. W. 1948. On the Physiology of Root Initiation in Excised Asparagus Stem Tips. *Amer. J. Bot* 35: 281-287.

GAMBORG, O. L. y F. CONSTABEL, L. POWKE, K. N. KAO, K. OHYAMA, K. -
KARTHA y L. PELCHER. 1974. Protoplast and Cell Culture Methods in
Somatic Hybridization in Higher Plants. *Can J. Genet. Cytol.* 16:
737-750.

GAMBORG, O. L., T. MURASHIGE, T. A. THORPE y I. K. VASIL. 1976.
Plant Tissue Culture Media. *In Vitro* 12: 473-478.

GAMBORG, O. L. y J. P. SHYLUK. 1981. Nutrition Media and Characteris-
tics of Plant Cell and Tissue Cultures. In: *Plant Tissue Culture,*
Methods and Applications in Agriculture. Ed. T. A. Thorpe. Academic.
Press. New York: 21-42.

GAUTHERET, R. J. 1982. Plant Tissue Culture: The History. In: *Plant*
Tissue Culture. Proc. 5th Intl. Cong. Plant Tissue and Cell Culture.
Ed. A. Fujiwara, Japanese Assoc. of Plant Tissue Culture, Tokyo:
7-12.

HUSSEY, G. 1982. *In Vitro* Propagation of Monocotyledonous Bulbs and
Corms. *Proc. 5th Intl. Cong. Plant Tissue and Cell Culture.* Ed. A.
Fujiwara, Japanese Assoc. of Plant Tissue Culture, Tokyo: 677-680.

KARTHA, K. K., L. A. MROGINSKI, K. PAHL y N. L. LEUNG. 1981. Germplasm
Preservation of Coffee (Coffea arabica L.) by *In Vitro* Culture of
Shoot Apical Meristems. *Plant Science Letters*, 22: 201-207.

KARTHA, K. K., O. L. GAMBORG y F. CONSTABEL. 1974. Regeneration of
Pea (Pisum sativum L.) Plants from shoot Apical Meristems. *Z.*

Pflanzenphysiol 72: 172-176.

KARTHA, K. K., O. L. GAMBORG. 1978. Meristem Culture Techniques in the Production of Disease-Free Plants and Free Preservation of Germplasm of Tropical Tuber Crops and Grain Legumes. In: Diseases of Tropical Food Crops. Ed. H. Haraiite y J. A. Meyer, Proc. Intl. Symp. Universite Catholique, Louvain-La Neuve, Belgium: 267-283.

KARTHA, K. K. 1981. Meristem Culture and Cryopreservation. Methods and Applications. In: Plant Tissue Culture, Methods and Applications in Agriculture. Ed. T. A. Thorpe. Academic Press, New York: 181-211.

KARTHA, K. K. 1982. Organogenesis and Embryogenesis. In: Plant Tissue Culture Methods. Ed. L. R. Wetter y F. Constabel. National Research Council, Canada: 10-14.

KARTHA, K. K. 1982. Meristem Culture. In: Plant Tissue Culture Methods. Ed. L. R. Wetter y F. Constabel. National Research Council, Canada:

KAREN, W. H. 1981. Ornamental In: Clonning Agricultural Plants. Via In Vitro Techniques. Ed. B. N. Conger. CRC Press Inc. Boca Raton Florida: 5 - 51.

LANE, F. C. y B. H. KITCHEN. 1973. Plants. We Life on. The John Day Co. New York: 58-59.

LAWRENCE, C. H. 1951. Taxonomy of Vascular Plants. Mac-Millan co. USA: 411-420.

LEVINE, B. S. 1982. Desarrollo Metodológico para la Propagación Vegetativa In Vitro del aguacatero. Tesis Profesional. ENEP-Iztacala UNAM: 97.

- LOO, S. W. 1945. Cultivation of Excised Tips of Asparagus In Vitro. Amer. J. Bot. 32: 13-17.
- MEINHART, H. Z. 1978. The Impact of Plant Tissue Culture on Industry and Agriculture. In: Frontiers of Plant Tissue Culture. Ed. T. A. Thorpe. IAPTC, Calgary: 1-15.
- MUNOZ, F. 1965. Las Especies Hortícolas, sus Variedades y su Cultivo en México (Cat. Descript. de Variedades). Novedades Hortícolas 9: 1-56.
- MURASHIGE, T. y F. SKOOG. 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Biossays with Tobacco Tissue Cultures. Physiol. Plant. 15: 473-494.
- MURASHIGE, T. , M.N. SHABDE, P. M. HASEGAWA, F. H. TAKATORI y J. B. JONES. 1972. Propagation of Asparagus Throught Shoot Apex Culture. Nutrient Medium for Formation of Plantlets. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 97 (2): 158-161.
- MURASHIGE, T. 1974. Plant Propagation Throught Tissue Cultures. Ann, Rev. Plant Physiol 25: 135-166.
- MURASHIGE, T. 1978. The Impact of Plant Tissue Culture on Agriculture. In: Frontiers of Plant Tissue Culture. Ed. T. A. Thorpe, IAPTC, Calgary: 15-26.
- QUER, P. F. 1980. Plantas Medicinales. Labor, S. A. México: 898-900.
- REINERT, J. y Y. P. BAJAJ. 1977. Plant Cell Tissue and Organ Culture. Springer Verlag. Berlin: 186-190; 600-616.
- ROTH, I. 1976. Anatomía de las Plantas Superiores. Universidad Cen-

tral de Venezuela: 39-91.

RUBLUO, A. K. K. KARTHA. 1984. In Vitro Plant Propagation of Phaseolus Ssp. Using Shoot Apical Meristems and Observation of Genotypic Variation (en Prensa).

SCHENK, R. V. y A. C. HILDEBRANT. 1972. Medium and Techniques for Induction and Growth of Monocotyledonous and Dicotylenous Plant Cell Cultures. Canadian Journal of Botany. 50: 199-204.

SIMMONDS, N. W. 1979. Evolution of Crop Plants. Logman. London y New York: 315.

STENLID, G. 1982. Cytokinins as Inhibitors of Root Growth. Physiol. Plant. 56: 500-506.

STREET, H. E. 1978. Essays in Plant. Plant Tissue and Cell Culture Blackwell. Scientific Publication, London: 389-429.

STEWART, F. C. y M. O. MAPES. 1971. Morphogenesis and Plant Propagation in Aseptic Culture of Asparagus. Bot. Gaz. 132 (11): 70-79.

TAMARO, D. 1974. Manual de Horticultura. Ed Gustavo Gill, S.A. Barcelona España. 215.

THAN THANK VAN, K. M. 1981. Control of Morphogenesis In Vitro Cultures. Ann. Rev. Plant Physiol 32: 291-311.

WILMAR, C. y H. HELLENDORRN. 1968. Growth and Morphogenesis of Asparagus Cells Cultures In Vitro. Nature 217: 369-370.

YANG, H. J. y W. J. CLORE. 1973. Rapid Vegetative Propagation of Asparagus Thorough Lateral Bud Culture. Hort Science (2): 141-143.

YANG, H. J. y W. J. CLORE. 1974. Development of Complete Plantlets from Moderately Vigorous Shoots of Stock Plant of Asparagus In Vitro. Hort Science 9 (2): 138-140.

TABLA No. 1

COMBINACIONES Y CONCENTRACIONES (μM) DE LOS REGULADORES DE
 CRECIMIENTO PARA PROMOVER LA FASE DE ENRAIZAMIENTO.

MEDIO	C O M P O S I C I O N
1	MS + 2 ANA + 0.5 K + 3% SAC
2	1/2 MS + 0.1 ANA + 3% SAC
3	MS + 1.0 AIB + 3% SAC
4	MS + 1.0 AIB SIN SAC
5	MS + AC + 0.1 AIA _ 3% SAC

TABLA No. 2 *RESPUESTA MORFOGENETICA DE MERISTEMOS APICALES DE Asparagus officinalis L. CULTIVAR UC-72 (LECTURAS TOMADAS A LOS 60 DIAS).

REG. ANA	DE CREC. (μM)		No. DE EXPLANTES QUE FORMARON CALLO Y %	% DE CALLO CON				No. P _{x̄} / CALLO
	+	K		B	P	B + P	B + P + R	
0.1	0.1		7/20 (35)	15	15	15	15	1
0.1	1.0		4/15 (27)	7	—	—	—	—
0.1	5		12/18 (67)	61	6	6	6	1
0.1	10		10/20 (50)	20	—	—	—	—
1.0	0.1		11/20 (55)	40	35	35	35	7
1.0	1.0		16/21 (76)	48	38	38	14	1
1.0	5		9/15 (60)	53	33	33	33	3
1.0	10		12/21 (57)	52	14	14	—	1
5	0.1		11/21 (52)	43	29	29	29	2
5	1.0		11/17 (65)	18	18	12	12	2
5	5		13/15 (87)	73	13	13	13	2
5	10		6/18 (33)	28	—	—	—	—
10	0.1		13/18 (72)	44	28	28	28	3
10	1.0		12/18 (67)	50	28	28	28	4
10	5		14/18 (78)	56	56	56	33	4
10	10		6/18 (33)	11	11	11	11	1

* Cond. ambientales ver materiales y métodos

B= BROTE; P= PLANTULA y R= RAIZ

TABLA No.3 RESPUESTA MORFOGENETICA DE MERISTEMOS APICALES DE Asparagus officinalis L. CULTIVAR UC-72 (LECTURAS A LOS 60 DIAS).

REG. DE CREC. (μ M)		No. DE EXPLANTES QUE FORMARON CALLO Y %		% DE CALLO CON				No. P _x CALLO
ANA	+ BA			B	P	B + P	B + P + R	
0.1	0.1	5/15	(33)	27	7	7	—	1
0.1	1.0	13/18	(72)	61	33	33	—	1
0.1	5	12/18	(67)	33	—	—	—	—
0.1	10	12/20	(60)	20	—	—	—	—
1.0	0.1	11/18	(61)	50	50	50	50	4
1.0	1.0	17/21	(81)	43	19	10	10	1
1.0	5	24/33	(73)	48	—	—	—	—
1.0	10	26/42	(62)	33	—	—	—	—
5	0.1	3/18	(17)	6	—	—	—	—
5	1.0	10/15	(67)	33	—	—	—	—
5	5	14/18	(78)	17	—	—	—	—
5	10	7/18	(39)	11	—	—	—	—
10	0.1	11/18	(61)	66	44	33	—	1
10	1.0	12/15	(80)	60	7	7	—	—
10	5	10/18	(55)	55	—	—	—	—
10	10	13/15	(87)	87	—	—	—	—

B= BROTE; P= PLANTULA y R= RAIZ

TABLA No. 4 RESPUESTA MORFOGENETICA DE MERISTEMOS APICALES DE Asparagus officinalis L.
(LECTURAS TOMADAS A LOS 60 DIAS).

NO. DE TRATAMIENTO	REG. DE CREC. (μ M)		NO. DE EXPLANTES CON RESPUESTA con (callo)	% DE CALLO CON				No. $\frac{P_x}{x}$ / CALLO
	ANA	+ K		B	P	B + P	B + P + R	
1	5.3*	4.6	32/40	80	80	80	—	21
2	5.3**	4.6	15/20	70	60	60	—	4
3	5	10	30/36	72	53	53	53	3
4	10	10	16/30	—	—	—	—	—

* UC-72

** MARY WASHINGTON 500

TABLA No. 5 RESPUESTA MORFOGENETICA DE SEGMENTOS DE TALLO DE *Asparagus officinalis* L.
CULTIVAR UC-72 (LECTURAS TOMADAS A LOS 60 DIAS).

REG. DE CREC. (μ M)		No. DE EXPLANTES QUE FORMARON CALLO Y %	% DE CALLO CON			No. P- x / CALLO
ANA	+ K		B	P	B + P + R	
0.1	0.1	3/14 (21)	14	14	14	2
0.1	0.1	13/14 (93)	29	29	29	2
0.1	5	13/14 (100)	49	49	49	1
0.1	10	21/21 (100)	5	-	-	-
1.0	0.1	14/14 (100)	-	-	-	-
1.0	1.0	18/21 (86)	19	14	14	2
1.0	5	13/14 (93)	-	-	-	-
1.0	10	28/28 (100)	-	-	-	-
5	0.1	6/21 (29)	-	-	-	-
5	1.0	9/14 (64)	-	-	-	-
5	5	12/14 (86)	-	-	-	-
5	10	20/21 (95)	60	20	20	-
10	0.1	1/21 (5)	-	-	-	-
10	1.0	18/21 (86)	-	-	-	-
10	5	14/13 (100)	-	-	-	-
10	10	14/14 (100)	-	-	-	-

B = BROTE; P= PLANTULA y R= RAIZ

TABLA No. 6 RESPUESTA MORFOGENETICA DE SEGMENTOS DE TALLO DE Asparagus officinalis L.
CULTIVAR UC-72 (LECTURAS TOMADAS A LOS 60 DIAS)

REG. DE CREC. (μ M)	NO. DE EXPLANTES QUE FORMARON CALLO Y %	% DE CALLO CON				No. P- _x / CALLO	
		B	P	B + P.	B ÷ P + R		
ANA	BA						
0.1	0.1	0/21 (0)	—	—	—	—	
0.1	1.0	10/21 (48)	—	—	—	—	
0.1	5	0/21 (0)	—	—	—	—	
0.1	10	18/21 (86)	—	—	—	—	
1.0	0.1	10/21 (48)	—	—	—	—	
1.0	1.0	18/21 (86)	—	—	—	—	
1.0	5	7/14 (50)	—	—	—	—	
1.0	10	16/20 (80)	80	25	25	25	2
5.0	0.1	9/21 (43)	5	—	—	—	—
5	1.0	6/14 (43)	—	—	—	—	—
5	5	21/21 (100)	33	19	19	14	2
5	10	21/21 (100)	5	5	5	—	1
10	0.1	11/20 (55)	5	—	—	—	—
10	1.0	20/21 (85)	—	—	—	—	—
10	5	18/21 (86)	—	—	—	—	—
10	10	10/21 (48)	—	—	—	—	—

B= BROTE; P= PLANTULA y R= RAIZ

TABLA No. 7 RESPUESTA IN VITRO DE SEGMENTOS DE TALLO DE
Asparagus officinalis L.
 (LECTURAS TOMADAS A LOS 60 DIAS)

NO. DE TRATAMIENTO	REG. DE CREC. (µM)		NO. DE EXPLANTES QUE QUE FORMARON CALLO Y %
	ANA	K	
1	5.3*	4.6	38/40 (95)
2	5.3**	4.6	32/40 (80)
3	5.0**	10	30/36 (83)
4	10 **	10	10/30 (53)

* UC-72

** MARY WASHINGTON 500

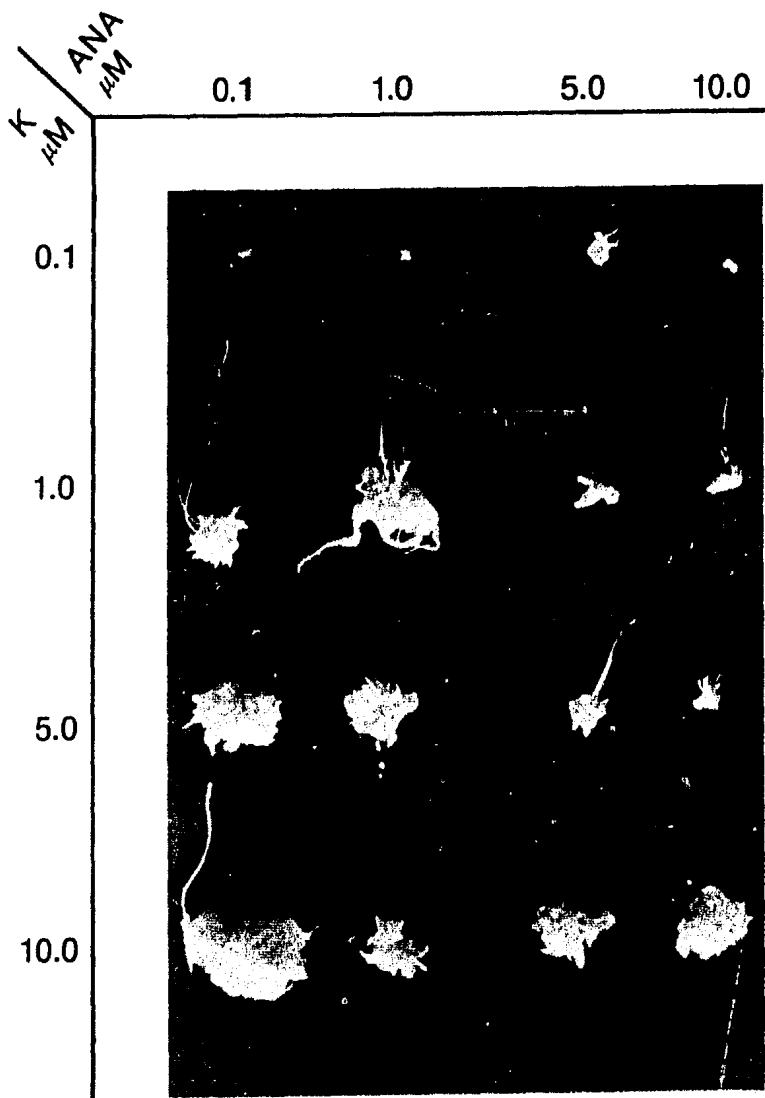
TABLA No. 8 PORCENTAJES DE ENRAIZAMIENTO DE PLANTULAS DE Asparagus officinalis
L. CV. UC-72 EN MEDIO MS SINGLICINA DESPUES DE 8 SEMANAS.

T R A T A M I E N T O

ANA	AIA + AC	IBA	K	SACAROSA	ENRAIZAMIENTO (%)
2			0.5	3%	60
0.1*				3%	40
		1		3%	8
	0.1 + 10%			3%	6

* EL MEDIO MS REDUCIDO A LA MITAD.

1. Efecto de ANA y K sobre los meristemos apicales de *Asparagus officinalis* L.; incubadas en MS sin glicina con fotoperíodo 16 hrs. luz (1000 lux), 8 hrs. oscuridad a una temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$.

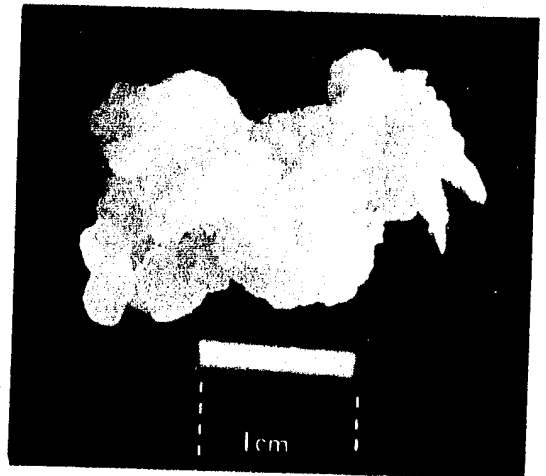
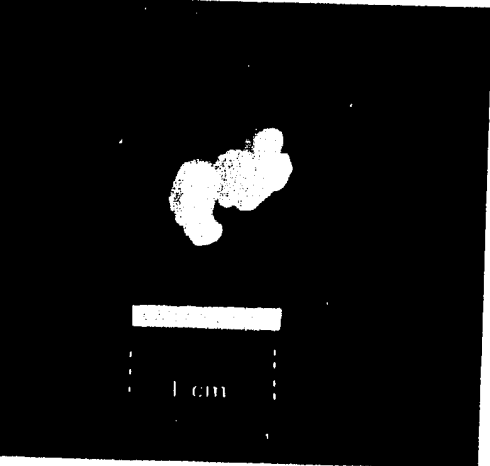
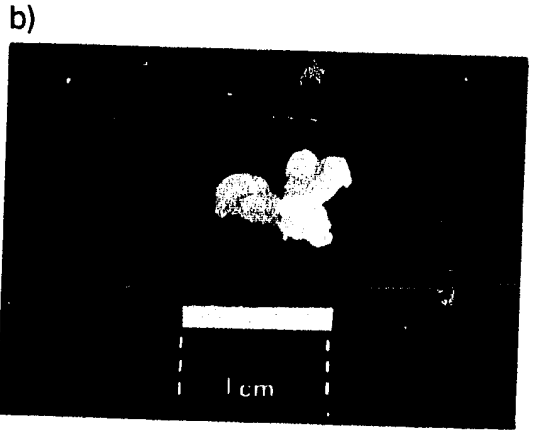
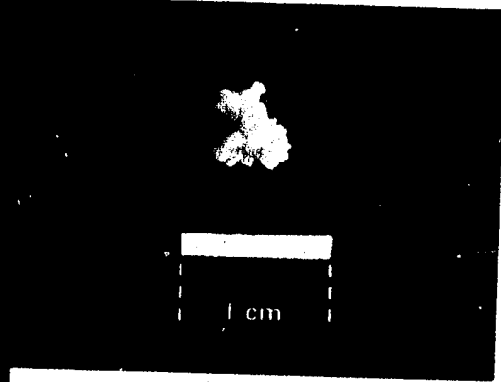


g. 2

efecto de ANA y BA sobre los meristemos apicales de *Asparagus officinalis* L.; incubadas en MS sin glicina con fotoperíodo 16 hrs. luz (1000 Lux), 8 hrs. oscuridad a una temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$.

diferencias de crecimiento en proliferación de callo en base a diferentes concentraciones ANA y BA

a) $5\mu\text{M ANA}/10\mu\text{M BA}$, b) $5\mu\text{M ANA}/5\mu\text{M BA}$, c) $5\mu\text{M ANA}/0.1\mu\text{M BA}$, d) $10\mu\text{M ANA}/5\mu\text{M BA}$.



d)

PREPARACION DE LAS SOLUCIONES STOCK

Los reguladores de crecimiento utilizados se prepararon en soluciones $10^{-3}M$.

El ANA, se disolvió en etanol, se calentó ligeramente y se disolvió gradualmente en 100 ml de agua destilada. Después se guardó en refrigeración hasta ser utilizado (Gamborg y Shyluk, 1981).

La K y BA se disolvieron en pequeños volúmenes de una solución de 0.5 N HCL, se calentaron ligeramente y se diluyeron en 100 ml de agua destilada y también se almacenaron en refrigeración (Gamborg y Shyluk, 1981).

APENDICE 1. MEDIO DE CULTIVO MS

MACRONUTRIENTES

SOLUCION STOCK A	NH ₄ NO ₃ _____	1,650 mg/l__	16,500 mg/10 l.
20 litros x 400 ml	KNO ₃ _____	1,900 mg/l__	19,000 mg/10 l.
	MgSO ₄ 7H ₂ O_____	370 mg/l__	3,700 mg/10 l.
	KH ₂ PO ₂ _____	170 mg/l__	1,700 mg/10 l.
SOLUCION STOCK B	CaCl ₂ .2H ₂ O_____	440 mg/l__	4,400 mg/10 l.
10 litros x 100 ml			

MICRONUTRIENTES

SOLUCION STOCK C	KI_____	0.83 mg/l__	8.3 mg/10 l.
	H ₃ BO ₃ _____	6.2 mg/l__	62.0 mg/10 l.
	MnSO ₄ 4H ₂ O_____	22.3 mg/l__	223.0 mg/10 l.
	ZnSO ₄ yH ₂ O_____	8.3 mg/l__	83.0 mg/10 l.
	NaMo ₄ .2H ₂ O_____	0.25 mg/l__	2.5 mg/10 l.
	CuSO ₄ .5H ₂ O_____	0.025 mg/l__	0.25 mg/10 l.
	CoCl ₂ .6H ₂ O_____	0.025 mg/l__	0.25 mg/10 l.

SOLUCION STOCK C

20 litros x 100 ml	Na ₂ EDTA_____	37.3 mg/l__	373 mg/10 l.
	FeSO ₄ _____	27.8 mg/l__	278 mg/10 l.

SOLUCION STOCK D

20 litros x 100 ml	Inositol_____	100.0 mg/l__	1000 mg/10 l.
--------------------	---------------	--------------	---------------

VITAMINAS MS

SOLUCION STOCK E

10 litros x 100 ml	Acido nicotínico	0.5 mg/l__	5.0 mg/10 l.
	Piridoxina HCL	0.5 mg/l__	5.0 mg/10 l.
	Tiamina	0.1 mg/l__	1.0 mg/10 l.
	Agua de coco	100.0 mg/l__	
	Agar	7000.0 mg/l	
	Sacarosa	30000.0 mg/l	