

ANATOMIA DEL DESARROLLO Y ESTRUCTURA DE EMBRIONES
SOMATICOS DE *Asparagus officinalis* L CULTIVADOS *in vitro*.

CATALINA SALGADO SALAZAR

UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

POPAYÁN

2002

ANATOMIA DEL DESARROLLO Y ESTRUCTURA DE EMBRIONES
SOMATICOS DE *Asparagus officinalis* L CULTIVADOS *in vitro*.

CATALINA SALGADO SALAZAR

Trabajo de grado presentado como requisito parcial
para optar el título de Biólogo

Director
NELSON ROJAS MARTINEZ
MsC Biología

UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

POPAYÁN

2002

Nota de aceptación

MsC. Nelson Rojas Martínez
DIRECTOR

Lic. Emilia Sierra
JURADO

MsC. Gisela Mabel Paz
JURADO

Fecha de sustentación: Popayán, _____ de _____ de 2002

A DIOS Y A MI MADRE MARIA

AGRADECIMIENTOS

Agradezco sinceramente al Mg. Nelson Rojas Martínez por su constante guía, apoyo y colaboración durante la realización y culminación de este proyecto.

A mis compañeros de laboratorio por su compañía y colaboración durante el tiempo de trabajo.

A Victoria Eugenia Niño por su amistad, compañía y apoyo

A Márlen Fuly, mi segunda madre, por cinco años de afecto, compañía y apoyo moral

A quienes directa o indirectamente hicieron posible la realización de un sueño.

CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN	10
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	12
2. JUSTIFICACIÓN	13
3. OBJETIVOS	14
4. ANTECEDENTES	16
5. METODOLOGÍA	27
5.1 ESTABLECIMIENTO DEL CULTIVO <i>in vitro</i> DEL ESPÁRRAGO	27
5.2 TOMA DE MUESTRAS PARA LA EVALUACIÓN DEL PROCESO DE EMBRIOGENESIS SOMATICA	28
5.3 TOMA DE MUESTRAS PARA EVALUACIÓN DE PIGMENTOS FOTOSINTÉTICOS: CLOROFILAS	28
5.4 PREPARACION HISTOLÓGICA DE MUESTRAS	29
5.5 HISTOQUIMICA	29
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30

7. CONCLUSIONES	44
BIBLIOGRAFÍA	46
ANEXOS	50

LISTA DE ANEXOS

Anexo A. Pruebas Histoquímicas

Anexo B. Proceso Histológico

Anexo C. Cuantificación de Clorofilas

RESUMEN

El objetivo de este trabajo es estudiar mediante técnicas histológicas algunos de los principales eventos de la embriogénesis somática directa del espárrago *Asparagus officinalis* L cultivados *in vitro*. Se utilizaron como material de explante meristemos apicales localizados en los segmentos internodales del área media superior de turiones de espárrago de entre 20 y 30 cm de longitud. Se cultivaron en un medio Murashige & Skoog enriquecido con ANA y KIN 0.1 mg/L. Se incubaron a 26 °C con un fotoperiodo de 16 horas luz/8 horas oscuridad con una intensidad lumínica de 300 lux. Se pudo observar los eventos característicos del desarrollo, detallándose los estadios iniciales de la diferenciación de los meristemos, con sus zonas particulares, la formación de órganos (primordios foliares, tallos), características celulares particulares del proceso tales como núcleo y nucleolo prominentes, citoplasma denso y acumulaciones de polisacáridos y proteínas y formación de yemas adventicias dentro de los cuatro primeros días de cultivo. A los 13 días de cultivo, los explantes sembrados finalmente produjeron plántulas de aproximadamente 1 cm de longitud, algunas de estas plántulas presentaron un enraizamiento fortuito.

INTRODUCCION

El cultivo del espárrago en Colombia y en el departamento del Cauca se ha convertido poco a poco en un factor económico importante que involucra posibilidades de mayor inversión para la extensión de áreas de cultivo y la generación de una mayor cantidad de empleos, directos e indirectos, que beneficiarán a muchas familias campesinas y urbanas.

Actualmente en el departamento del Cauca se han establecido cinco empresas de cultivo y comercialización del espárrago, siendo este generalmente en el exterior, las cuales son a saber: Exportagro, Chayani, Caicedo, Agrícola Palacé e Inversiones Tequendama, las cuales en conjunto poseen mas de 780 hectáreas cultivadas y con una posibilidad de extender mucho mas esta área de cultivo.

El presente proyecto se diseñó con el objeto de seguir a nivel histológico e histoquímico algunos de los procesos celulares y moleculares de la embriogénesis del espárrago *Asparagus officinalis* L (híbrido UC157F1), cultivo establecido por la empresa Agrícola Palacé. Este trabajo se propuso con el objeto de estudiar los principales eventos celulares y moleculares de la embriogénesis somática directa del espárrago en nuestras condiciones de clima, ya que este cultivo no se ha

tropicalizado. A pesar de que los eventos del crecimiento y desarrollo presentan un patrón general en cualquier clima, los eventos pueden presentar diferencias en tiempo de desarrollo y en las condiciones *in vitro* como se desarrolló el presente trabajo.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El espárrago en Colombia y sobre todo en el Departamento del Cauca se ha convertido hoy por hoy en un renglón importante de la economía; aun así, no se han encontrado investigaciones y estudios en el país a un nivel básico, como por ejemplo la fisiología del espárrago, en estudios *in vivo* o *in vitro* y a un nivel aplicado, los cuales permitirían generar conocimiento y para desarrollar tecnologías tendientes a mejorar la calidad y condiciones del cultivo. Solo existen investigaciones sobre espárragos desarrolladas en países que poseen características geográficas que difieren de nuestra condición de país tropical.

El espárrago tiene baja tasa de multiplicación cuando se usan métodos de propagación convencionales. Esta es una de las primeras especies monocotiledóneas en ser regenerada en embriones somáticos y plántulas *in vitro*. Sin embargo la secuencia del desarrollo de embriones somáticos obtenidos de forma directa y de los procesos de morfogénesis de esta especie introducida no han sido detallados histológicamente para nuestra región.

2. JUSTIFICACIÓN

La industria del espárrago ha experimentado recientemente un decrecimiento en el área de producción debido a los fuertes cambios climáticos que sufre no solo nuestro departamento, sino también el país entero; al igual que la calidad del suelo en constante cambio y deterioro. Cualquier implementación de una metodología para el mejoramiento del espárrago, tendiente a superar los problemas antes mencionados, como por ejemplo, establecimiento de propagación *in vitro*, mejoramiento genético, inducción de variaciones somaclonales y multiplicación clonal requieren, para llevarse a cabo satisfactoriamente el estudio de los procesos morfogénesis, iniciación, regeneración, con sus respectivas características, factores que los afectan y mejoran, para así obtener un mayor provecho de estas técnicas y por ende del material vegetal promisorio que se trabaja, en este caso el espárrago.

3. OBJETIVOS

3.1 GENERAL

Estudiar mediante técnicas histológicas algunos de los principales eventos de la embriogénesis somática del espárrago *Asparagus officinalis* L observados mediante microscopia óptica.

3.2 ESPECIFICOS

- Determinar la secuencia de sucesos de diferenciación celular durante el proceso de embriogénesis somática del espárrago mediante el seguimiento histológico de sus fases más relevantes
- Cuantificación total de clorofila durante la embriogénesis somática y determinación de su relación con el proceso

- Establecer a nivel celular y molecular, mediante la utilización de técnicas histoquímicas algunas características de los procesos de diferenciación celular

4. ANTECEDENTES

En el campo investigativo se han llevado a cabo diferentes tipos de investigaciones acerca del espárrago a nivel celular y molecular. Uno de los estudios más básicos es el establecimiento de metodologías de propagación *in vitro* tendientes a obtener mayor eficacia y productividad. Slabbert, Lindeque y Ferreira (1990) desarrollaron un método para la multiplicación rápida de espárrago desde yemas y ápices de tallos, propagando exitosamente *in vitro* sobre un medio MS modificado, el cual tenía 0.1 mg/L de ANA y 0.1 o 0.2 mg/L de Kinetina obteniendo cultivos de tallos vigorosos. El más alto porcentaje de enraizamiento se obtuvo usando medio MS modificado suplementado con 0.1 mg/L de ANA, 0.1 mg/L de Kinetina y 1.25 mg/L de ancimidol. Previo al transplante a suelo, las plántulas se transfirieron a un medio básico MS con una baja concentración de sucrosa y simultáneamente se las expuso a altas intensidades de luz.

Castro y Mosella (1991) hicieron un estudio sobre el cultivo *in vitro* del espárrago en donde observaron el efecto del agente gelificante, el enraizamiento y transplante. El establecimiento y proliferación de los explantes se logró en el medio de cultivo constituido por las sales minerales del medio de Murashige y Skoog, vitaminas, aminoácidos y ácido ascórbico del medio MIII6 de Mosella,

enriquecido con 170 mg/L de NaH_2PO_4 ; 0.1 mg/L de ANA y BAP respectivamente y 25 g/L de sacarosa. Observaron que en la etapa de proliferación, la utilización de Gelrite (agente gelificante 3g/L) permite obtener mayor número de proliferaciones axilares, en tanto que con el agar Merck (6 g/L) se obtiene mayor número de brotes basales. El mejor enraizamiento se logró al transferir los explantes completos (varios brotes con corona) al medio mineral MS reducido a la mitad; vitaminas, aminoácidos y ácido ascórbico del medio MIII6 suplementado con 85 mg/L de NaH_2PO_4 , 25 g/L de sacarosa, Gelrite (3 g/L) y 0.3 o 0.4 mg/L de ANA. Para la adaptación a condiciones externas, se utilizó una mezcla de arena: tierra de hoja (2:1 v/v), lográndose un 33.3% de sobrevivencia.

Mediante estudios realizados sobre la multiplicación *in vitro* del espárrago, se llegó a la conclusión que el mejor método para micropropagar espárrago es a través de la embriogénesis somática; se han realizado muchos trabajos que buscan encontrar la vía y material celular mas eficiente para este proceso. Kunitake y Mii (1990) describen un método eficiente para el cultivo de protoplastos de callos embriogénicos y su subsiguiente regeneración en plantas vía embriogénesis somática. Cultivaron protoplastos en medio $\frac{1}{2}$ MS con 1 mg/L de ANA, 0.5 mg/L de Zeatina, 1 g/L de L-glutamina, 0.6 M de glucosa y 0.1% de Gellan gum (agente gelificante). Los protoplastos se comenzaron a dividir después de 4 días de cultivo y formaron colonias visibles luego de 30 días de cultivo. El porcentaje de formación de colonias fue del 7.2%. Las colonias se transfirieron a medio MS que contenía 1 mg/L de 2,4D y 3% de sucrosa para futuro crecimiento. Fueron inducidos embriones somáticos de todas las colonias de 0.5-1.0 mm de tamaño

después de la transferencia a medio $\frac{1}{2}$ MS carente de reguladores de crecimiento. Luego de tener estos embriones somáticos (1-3 mm) en agua destilada por una semana, 30-40% de ellos germinaron normalmente y se convirtieron en plántulas 20-30 días después del trasplante a medio $\frac{1}{2}$ MS que contenía 1 mg/L de IBA, 1mg/L de GA₃ y 1% de sucrosa. Estas plantas derivadas de protoplastos fueron diploides con 20 cromosomas.

No solo se han hecho investigaciones en *A. officinalis* L sino también en otras especies del genero *Asparagus* como por ejemplo *A. cooperi* Baker. Ghosh y Sen (1991) reportan un estudio detallado del desarrollo de embriones y regeneración de plantas a través de embriogénesis somática en *A. cooperi* y el estatus citológico de las plantas regeneradas. La embriogénesis somática y regeneración de plantas la obtuvieron de callos derivados de la región subapical de tallos de *A. cooperi*. Obtuvieron los callos en medio MS suplementado con ANA y Kinetina. Incrementaron la concentración de nitrato de potasio en cultivos subsecuentes resultando en la formación de embriones. La rápida multiplicación de embriones fue asegurada por la transferencia a un medio conteniendo diferentes fuentes de nitrógeno y un bajo nivel de ácido giberélico (0.01 mg/L). Un medio conteniendo zeatina o ácido giberélico llevó a la formación de plántulas completas desde embriones. Las plántulas regeneradas fueron citológicamente y fenotípicamente estables.

Delbreil y Jullien (1994) estudiaron la habilidad embriogénica de varios genotipos de *A. officinalis* L y de plantas regeneradas desde diferentes líneas embriogénicas

las cuales se originaron espontáneamente *in vitro*. Los ápices fueron cultivados primero sobre un medio de inducción enriquecido con auxinas y luego transferidos a un medio de desarrollo libre de hormonas. Todos los fenotipos evaluados en esta vía produjeron pocos embriones somáticos. En algunos experimentos, durante la fase de desarrollo, un nuevo género de tejidos embriogénicos altamente friable apareció de manera esporádica. Estos tejidos pueden ser continuamente subcultivados sobre un medio libre de hormonas y fueron llamados líneas embriogénicas. Cinco de estas líneas embriogénicas se regeneraron en plantas a través de embriogénesis somática. Estas plantas regeneradas exhibieron un incremento en la respuesta embriogénica comparados con las plantas parentales, por ejemplo, cultivos de ápices producen embriones somáticos sin tratamiento con auxinas. Para una de las líneas embriogénicas, un análisis genético mostró que el mejoramiento en la respuesta embriogénica de las plantas regeneradas fue controlado por una mutación mendeliana dominante monogénica.

Otros aspectos también ampliamente estudiados son los efectos de los carbohidratos, reguladores de crecimiento y métodos de cultivo tendientes a mejorar la eficiencia de la embriogénesis somática de espárrago. Levi y Sink (1992) estudiaron el efecto de varias concentraciones hormonales y de carbohidratos sobre la iniciación y desarrollo en plántulas de embriones somáticos de *A. officinalis* L. Demostraron que altos niveles de ANA (54 a 107 μM) aumentan y sincronizan la formación de embriones somáticos de espárrago en suspensiones. Estas observaciones indican que las auxinas a tales niveles pueden ser requeridas para una embriogénesis somática exitosa en algunas

monocotiledóneas. En cuanto a la concentración de carbohidratos hallaron que el cultivo de embriones por dos semanas sobre medio sólido con altos niveles de carbohidratos (sucrosa 0.18M, fructosa o glucosa 0.33M) seguidos de una transferencia a un medio con un nivel bajo de concentración de carbohidratos (sucrosa, fructosa o glucosa 0.06 - 0.1M) aumenta significativamente la conversión de los embriones a plántulas. Por esto dedujeron que los carbohidratos están involucrados en la regulación del potencial osmótico de las células vegetales *in vitro*.

Levi y Sink (1991) hicieron un estudio en el que considerando que la embriogénesis somática en el espárrago puede ocurrir en varias vías, usando diferentes explantes y reguladores de crecimiento, algunos esquemas son mas eficientes. Cultivaron tres tipos de explantes, secciones de tallo, coronas y yemas laterales en medios de inducción y de desarrollo de embriones con varias concentraciones y tipos de reguladores de crecimiento. Combinaron 2,4 D y Kinetina y ANA y Kinetina. Mediante estudio estadístico de la producción de embriones globulares, bipolares y plántulas determinaron que las coronas y yemas laterales son mejores recursos que las secciones de tallos para iniciar los callos embriogénicos y ANA y Kinetina (concentraciones de 0-1.0 mg/L respectivamente) fueron superior a 2,4 D en la inducción de embriones normales.

Li y Wolyn (1996) estudiaron los efectos del ácido abscísico (ABA) y ancimidol en el medio de germinación de embriones sobre la conversión de embriones primarios a plántulas y embriogénesis secundaria en espárrago. ABA y ancimidol aumentan

significativamente ambas respuestas. El tratamiento más efectivo para la conversión de embriones fue ABA en concentraciones de 0.19 y 0.28 μM , con 75-77% de embriones bipolares y 55-57% de embriones globulares convertidos a plántulas respectivamente. Para la embriogénesis secundaria, el tratamiento más efectivo fue ancimídol en concentraciones de 1.95 y 2.93 μM , con 99-101% y 84-86% de embriones somáticos producidos de los embriones globulares y embriones bipolares respectivamente. Los embriones bipolares generalmente se convirtieron a plántulas mejor que los embriones globulares, pero más embriones secundarios fueron producidos de embriones globulares que de embriones bipolares en todos los tratamientos. ABA y ancimídol también afectaron la morfología de las plántulas producidas. Las plántulas de embriones incubados sobre medio con ancimídol tuvieron tallos y raíces fuertes y gruesos, mientras que aquellas sobre medio con ABA eran largas, con tallos delgados y cortos y raíces delgadas.

Levi y Sink (1990) hicieron otro estudio sobre los efectos de diferentes carbohidratos durante la embriogénesis somática en *A. officinalis* L. Cuando 1.5 mg/L^{-1} de 2,4 D + 0.3 mg/L^{-1} de 2iP y 2 - 6% de glucosa, sucrosa o fructosa fueron usados en el medio de inducción, el número promedio de embriones fue 1286, 719 y 515 por g^{-1} de callo, respectivamente, relativo al tipo de carbohidratos. Sobre un medio de subcultivo bajo en auxina. 0.08 mg/L^{-1} + 0.2 mg/L^{-1} de 2iP, el número promedio de embriones somáticos fue 38, 310 y 262 para glucosa, sucrosa y fructosa respectivamente. En general la glucosa promueve el crecimiento de raíces, la fructosa promueve tallos y la sucrosa promueve el crecimiento de raíces y tallos. La concentración de carbohidratos fue también importante en la

maduración y germinación. La tasa de germinación promedio sobre concentraciones de carbohidratos de 2% y 5% fue de 1.8 y 7.4 plántulas por g⁻¹ de callo respectivamente. La combinación de 5% de sucrosa en el medio de inducción de embriones y 5% de fructosa en el medio de subcultivo originó la más alta tasa de germinación; 10.2 plántulas por g⁻¹ de callo.

Shigeta, et al (1996) describen debido al pobre porcentaje y características de enraizamiento con el uso de métodos convencionales de propagación *in vitro* del espárrago, un consistente y eficiente método para producir plántulas con raíces a partir de segmentos de tallo de plántulas stock asépticas, mediante la adición de Gellan gum y glucosa al medio en altas concentraciones. Usando altas concentraciones de Gellan gum en medio MS solidificado que contenía 0.1 mg/L de ANA, 0.1 mg/L de Kinetina y 30 g/L de sucrosa, los explantes de tallo de espárrago, *A. officinalis* L produjeron raíces de almacenamiento gruesas. La frecuencia de enraizamiento (40-96%) usando 8 g/L de Gellan gum fue aproximadamente el doble que usando 2 g/L (20-45%). La adición de 20 g/L de glucosa incrementó efectivamente la formación de raíces (70%) para los clones con una frecuencia de enraizamiento relativamente baja (40%) a una alta concentración de Gellan gum 8g/L.

Baochun y Wolyn (1997) hicieron un estudio en el cual llevaron a cabo dos experimentos conducidos a investigar los efectos interactivos del ancimidol con ANA y sucrosa sobre la producción y desarrollo de embriones somáticos de espárrago y la germinación de estos embriones en plántulas. Observaron una

interacción significativa entre la sucrosa y ancimidol solo para la producción de embriones bipolares: 4% de sucrosa con 0.75 mg/L^{-1} de ancimidol dieron el mejor resultado, 78 por g^{-1} de callo. La frecuencia de embriones globulares decreció cuando las concentraciones de glucosa y ancimidol aumentaron. La concentración de sucrosa afectó la germinación de embriones; 3% y 4% de sucrosa fueron óptimos con aproximadamente 60% y 40% de embriones globulares y bipolares germinantes respectivamente. También observaron una interacción significativa entre ancimidol y ANA para la producción de embriones bipolares y globulares y su germinación. Las concentraciones variables de ancimidol afectaron la producción y germinación de embriones en combinación con 0.1 mg/L^{-1} de ANA, pero no con 1.0 mg/L^{-1} de ANA. El tratamiento combinación de 0.1 mg/L^{-1} de ANA con 0.75 mg/L^{-1} de ancimidol produce el mayor número de embriones bipolares, 64 g^{-1} por callo y el mas grande porcentaje de embriones bipolares y globulares germinados fue 63% y 42% respectivamente.

Kunitake, et al (1997) describen las condiciones de cultivo necesarias para la germinación y desarrollo normales de embriones somáticos derivados de callos embriogénicos de espárrago. En particular estudian los efectos de varios azucares sobre la formación de embriones somáticos. Cultivaron y mantuvieron callos embriogénicos derivados de yemas internodales sobre medio MS que contenía 2 mg/L de 2,4 D, 3% de sucrosa y 0.2 % de Gellan gum. Se indujeron embriones somáticos normales de callos embriogénicos mediante un pretratamiento con medio liquido $\frac{1}{2}$ MS por 7 días, tamizándose luego a través de redes de poro de $600 \mu\text{M}$ y luego desecados parcialmente sobre medio MS

carente de reguladores de crecimiento, conteniendo una alta concentración de Gellan gum (1.0% w/v) por una semana. Además, el uso de maltosa como un azúcar y/o un osmótico en el medio de inducción de embriones, promueve el desarrollo de embriones somáticos normales. Usando estos métodos, fueron inducidos embriones bipolares no vitrificados 30 días después de la transferencia (aprox. 1500 embriones en 1 ml). Los embriones somáticos inducidos sobre medio conteniendo maltosa exhibieron una mas alta tasa de germinación (mas del 80%) con tratamiento en frío (14 días a 4°C) que aquellos inducidos sobre medio que contenía sucrosa.

Baochun y Wolyn (1995) examinaron los efectos del ancimidol, ABA, uniconazol y paclobutrazol sobre la inducción y desarrollo de embriones somáticos de espárrago y la habilidad de estos embriones para convertirse en plántulas. Ellos colocaron callos en medio de inducción (MS plus, 3% de sucrosa, 0.1 mg/L⁻¹ de ANA, 0.5 mg/L⁻¹ de Kinetina y 3% de Gelrite) con diferentes concentraciones de estos componentes. Luego de 8 semanas, los embriones globulares y bipolares recogidos se colocaron en un medio de germinación (MS plus, 6% de sucrosa, 0.1 mg/L⁻¹ de ANA, 0.1 mg/L⁻¹ de Kinetina, 0.75 mg/L⁻¹ de ancimidol, 40 mg/L⁻¹ de sulfato de adenina hidratado, 0.17 mg/L⁻¹ de fosfato de sodio monobásico y 3% de Gelrite) para la conversión a plántulas. La inclusión de ancimidol, uniconazol, ABA, y paclobutrazol en el medio de inducción de embriones no afectó el número total de embriones somáticos producidos con relación al control que estaba carente de estos compuestos. Sin embargo, ancimidol, ABA y uniconazol mejoraron significativamente el desarrollo de embriones por un incremento en la

producción de embriones bipolares 250-750% y decrecimiento de los embriones globulares 8-35% relativo al control. Los embriones bipolares producidos con cualquiera de los cuatro componentes en el medio de inducción de embriones se convirtieron a plántulas en tasa 700-1100% mas altas que el control. Ninguno de los embriones globulares se desarrollo en plántula. Ancimidol (0.75 mg/L^{-1}) y ABA (0.05 mg/L^{-1}) fueron los tratamientos mas efectivos; 61 y 46 embriones bipolares fueron producidos por g-1 de callo, y 38% y 37% de embriones bipolares convertidos a plántulas respectivamente. Estos resultados indican que ancimidol, uniconazol, ABA, y paclobutrazol aumentan significativamente la producción de embriones somáticos de espárrago y su conversión a plántulas, y ancimidol y ABA fueron mas efectivos que uniconazol y paclobutrazol.

Peng y Wolyn (1999) hicieron un experimento conducido a investigar los efectos de componentes de medio, periodos de pretratamiento en frío para yemas de flores, y un periodo de co-cultivo de anteras sobre cultivo respuesta. Todos los factores afectaron la frecuencia de división de las microsporas de espárrago y la producción de callos derivados de microsporas. Los mejores resultados fueron obtenidos con el pretratamiento de yemas florales a 4°C por 7 - 9 días, co-cultivando anteras con microsporas por 14 días, e incluyendo 6% de sucrosa, 2 mg/L^{-1} de ANA y 1 mg/L^{-1} de BA en el medio de cultivo. Luego de 4 días de cultivo muchas microsporas contenían cuerpos de lamidos y murieron. El 2% de microsporas carentes de estas estructuras se dividieron y produjeron microcallos. Para los mejores tratamientos en los diferentes experimentos, cerca de 140 callos por 100 anteras fueron recogidos. |||| Cultivados sobre 4 diferentes medios de

regeneración, 19.6-21% y 3.9-8.0% de callos derivados de microsporas produjeron tallos y embriones, respectivamente, y finalmente plántulas, entre las cuales 49% fueron haploides, 34% diploides, 4% triploides y 11% tetraploides.

Levi. A y Sink. K. C (1991) hicieron un estudio histológico y morfológico de la embriogénesis somática del espárrago en cultivos de callos. Los callos en etapas tempranas sobre el medio de inducción fueron amarillentos y friables y estuvieron compuestos de muchos grupos discretos de células embriogénicas rodeados de células vacuoladas grandes. En contraste con las células circundantes del tejido, las células embriogénicas poseen un citoplasma denso, un núcleo conspicuo y una pared celular que se tiñe bastante, lo cual es característico de la embriogénesis temprana en especies de monocotiledóneas. Luego de 4 semanas estos embriones pasan al estado globular temprano que consiste de una región esférica de 8 a 64 células pequeñas, citoplasmáticamente densas, unidas a una región elongada de 6 a 14 células grandes. Luego de 2 semanas sobre un medio de desarrollo, los embriones globulares desarrollaron una forma bipolar estando compuestos de células de 2 a 6 veces más grandes que aquellas en el estado globular. Los embriones bipolares tienen una región extendida hacia arriba que forma el cotiledón y el epicótilo y una región hacia abajo que forma la radícula. Los embriones ya maduros eran opacos en apariencia y poseían un cotiledón bien distinguido, un ápice de tallo y una radícula elongada. Poseían también un tejido vascular que aparentemente conecta la raíz y el ápice. Después de la formación de la plántula, el ápice de tallo de los embriones maduros se diferenció completamente y estaba rodeado de un coleóptilo largo.

5. MATERIALES Y METODOS

5.1 ESTABLECIMIENTO DEL CULTIVO *in vitro* DE ESPÁRRAGO

Se colectaron turiones de espárrago en la esparraguera Agrícola Palacé ubicada en la zona rural de Popayán, a la altura del kilómetro tres de la vía que conduce al municipio de Totoró. La finca está ubicada a una altura de 1800 msnm con una temperatura promedio de 25 °C. Los turiones colectados (híbrido UC157 F1) tenían entre 20 y 25 cm de longitud. Se llevaron los turiones colectados al laboratorio, se lavaron y se procedió a la extracción de los ápices caulinares de los segmentos internodales ubicados de la parte media a superior del turión con la ayuda de un estereomicroscopio. En una cámara de flujo laminar clase II (Labconco) se procedió a la desinfestación y desinfección de los explantes. Se colocaron los explantes en etanol 70% durante 1 minuto, luego se trasladaron a una solución de hipoclorito de sodio 0.25% + 3 gotas de twen 20 por 5 minutos y se lavaron finalmente de 3 a 5 veces en agua destilada estéril.

Se colocaron los explantes sobre medio de crecimiento Murashige & Skoog que tenía un pH 5.8, enriquecido con 0.1 mg/L de Kinetina y 0.1 mg/L de Acido Naftalenacético. Se sembraron 100 repeticiones para el tratamiento con hormonas

y 100 repeticiones para el tratamiento control sin hormonas. Los explantes se mantuvieron a 27°C en promedio, con 16 hora luz / 8 horas oscuridad, a 3000 lux de intensidad lumínica y 70% de humedad relativa.

5.2 TOMA DE MUESTRAS PARA LA EVALUACIÓN DEL PROCESO DE EMBRIOGENESIS SOMATICA

Se tomaron muestras del material vegetal desde el establecimiento del cultivo el cual se tomó como referencia del punto de partida hasta el día 4 de crecimiento en tres tomas diferentes distanciadas de sí por intervalos de aproximadamente 4 horas, 8 am, 12 m, y 5 pm. A partir del día 5 se tomaron muestras adicionales cada 24 horas hasta el día 10 y por último se tomó una muestra final el día 15. Las muestras se fijaron en una solución de formol 10% y ácido crómico 0.5% y se refrigeraron a 4°C de 24 a 48 horas.

5.3 TOMA DE MUESTRAS PARA EVALUACIÓN DE PIGMENTOS FOTOSINTÉTICOS: CLOROFILAS.

Al mismo tiempo que se tomaron muestras para el proceso histológico, se tomaron muestras para analizar la presencia de clorofilas y su cuantificación. Se tomaron muestras de 0.003 g y se maceraron en 1 ml de Acetona. Se filtró este macerado y se procedió a leer la absorbancia a 645 nm y 663 nm en un espectrofotómetro UV Visible Espectronic Génesys 5

5. 4 PREPARACIÓN HISTOLÓGICA DE LAS MUESTRAS

Todo el material vegetal se deshidrató en una serie de alcoholes ascendentes, 30% hasta absoluto, se aclararon en tres series de soluciones de etanol-cloroformo, 1:3, 1:1, 3:1, se infiltraron en series de cloroformo-parafina y parafina pura y se incluyeron finalmente en bloques de parafina pura. Las muestras se cortaron en un Micrótopo Rotario Manual 820 American Optical, realizándose cortes de 5 μ de espesor. Las muestras histológicas se recogieron en portaobjetos.

5. 5 HISTOQUÍMICA

El material histológico obtenido se procesó en 5 pruebas histoquímicas: prueba de Schiff- Ácido Peryorico, Azul de Bromofenol, Verde Metilo – Fucsina Ácida, AMB y como prueba adicional Azul de Toluidina. (Ver Anexo A). Las muestras que se obtuvieron en los procedimientos de histoquímica se cubrieron con cubreobjetos y se sellaron con Entellan.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para el estudio de las fases más relevantes de la embriogénesis somática del espárrago, se tomó como referencia los meristemas apicales únicamente, excluyendo los meristemas radicales. Se obtuvo durante el periodo de cultivo un porcentaje de contaminación del 4%.

A simple vista, se presentaron cambios en las muestras a partir del primer día de establecido el cultivo. Los explantes en el medio con hormonas y control incrementaron su coloración verde indicando actividad fotosintética y presentaron un aumento de tamaño.

La biosíntesis de clorofila y su cuantificación como un indicador biológico en la etapa del establecimiento del cultivo permite verificar inicialmente el estado del material que se siembra. El tejido que responde adecuadamente a las condiciones del cultivo relativas a las condiciones del ambiente (fotoperiodo 16h luz/8h oscuridad, 3000 lux de intensidad lumínica y 24 a 28°C temperatura día y 15°C temperatura noche), macro y micronutrientes y hormonas se observa en las variaciones en intensidad del verde del pigmento. Los tejidos muertos o

deteriorados por el tratamiento de desinfestación-desinfección se tornan blanquecinos y mueren rápidamente.

En este trabajo la evaluación más importante es la relacionada con el tratamiento hormonal con Acido naftalénacético (ANA 0.1 mg/L) y Kinetina (KIN 0.1 mg/L) del bloque experimental principal y la comparación con un bloque experimental control sin hormonas. La mezcla hormonal ANA + KIN utilizada para el estudio de la embriogénesis somática en este trabajo resultó ser la combinación que estabiliza la biosíntesis del pigmento fotosintético a partir de las 50 horas. El bloque control, sin hormonas, presentó una tendencia parecida a las plántulas que crecieron con la mezcla hormonal ANA + KIN, conservando su pigmentación durante algunos días de cultivo. Sin embargo, el crecimiento y desarrollo fue lento, y hacia el final del periodo de cultivo perdieron totalmente su pigmentación, tornándose los explantes café, amarillos y finalmente blancos. Por último, todos los explantes que se establecieron en el medio control sin hormonas murieron, indicando el decisivo papel de las hormonas en el inicio del desarrollo de las plántulas y desarrollo del turión, del cual depende la productividad del espárrago.

En la Figura 1 se muestra la gráfica donde se indican los resultados del seguimiento de la clorofila con los distintos tratamientos.

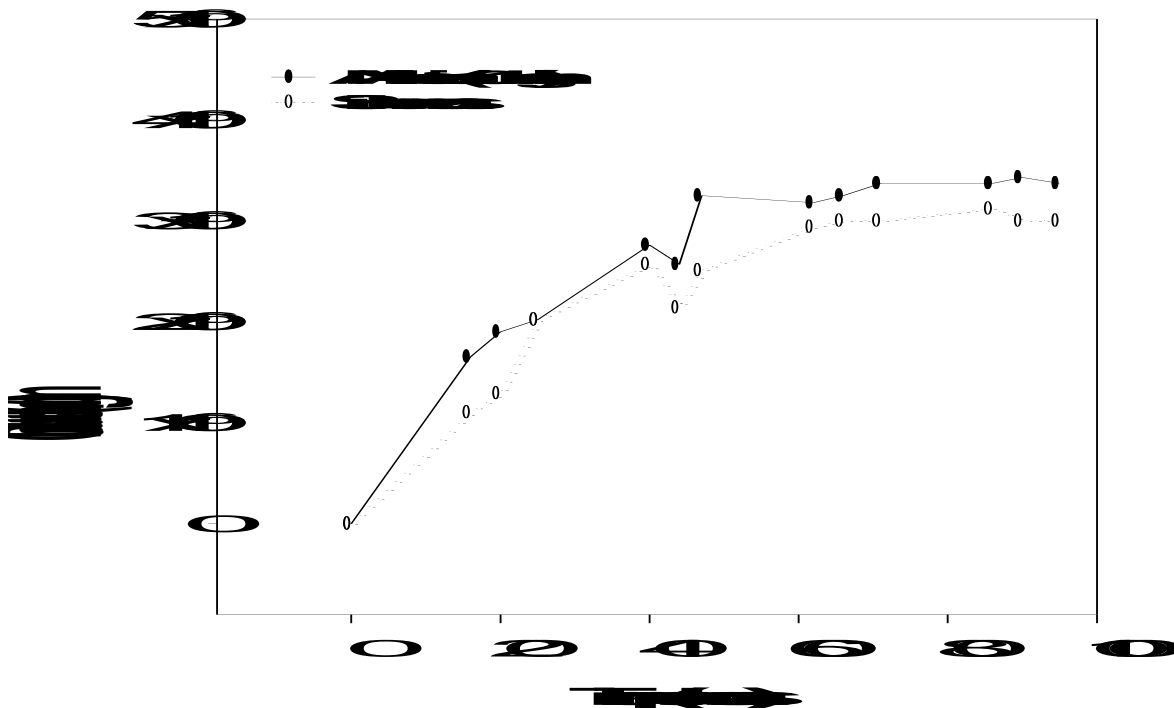


Figura 1. Cuantificación de clorofila durante los primeros estadios de desarrollo.

Una parte muy importante del presente trabajo es el estudio de los eventos del desarrollo del espárrago cultivado *in vitro* a partir de yemas laterales del turión. La mezcla hormonal utilizada (ANA 0.1 mg/L + KIN 0.2mg/L) es la misma que usó exitosamente Slabbert, Lindeque y Ferreira (1990). Los resultados de esta investigación ratifican la eficacia del sistema, comprobando además que las hormonas exógenas, tales como auxinas y citoquininas son indispensables para el establecimiento del cultivo, confirmado también por lo visto por Levi y Sink (1992), quienes determinaron que las auxinas son el sistema que más eficientemente promueve la embriogénesis somática indirecta del espárrago. Esta afirmación se sustenta por los resultados obtenidos en el grupo control, donde el crecimiento y

diferenciación celular muestran un estancamiento en las primeras fases del desarrollo.

Esto se puede explicar debido a que el efecto típico de las hormonas vegetales o reguladores de crecimiento, en este caso auxinas (ANA) y citoquininas (KIN) es promover la elongación y división celular. El efecto típico de las auxinas es promover la expansión celular a concentraciones fisiológicas y participan, aunque no directamente, en la división celular, siendo necesaria para una o más fases del ciclo celular, posiblemente para la síntesis de DNA y RNA asociadas a la fase S. Las citoquininas participan activamente en la división celular, existiendo un sitio de control sensitivo a las citoquininas dentro del ciclo celular, en G2, aumentando la tasa de síntesis de DNA. También existen evidencias que se pueden formar embriones somáticos desde ápices sin tratamiento con auxinas (Delbreil y Jullien, 1994) pero estas clases de tejidos embriogénicos aparecen de manera esporádica tras varias rondas de cultivo.

Según datos observados en campo y comentarios personales de ingenieros agrónomos que trabajan el espárrago en campo, el espárrago posee un crecimiento considerable, de entre 1 y 3 cm por día, principalmente el espárrago blanco. No se han encontrado en la bibliografía antecedentes de investigaciones hechas, para relacionar este crecimiento *in vivo* con una presencia elevada de hormonas vegetales endógenas o un estudio para determinar que hormonas están presentes en los turiones y en que cantidad y su relación con éste considerable crecimiento.

En espárrago como en todas las plantas superiores, la formación de órganos es crítica para generar la región vegetativa de la planta. La formación de las partes aéreas se presenta en una colección de células denominada el meristema del tallo (MT), el cual se establece durante la embriogénesis (Figura 2 A y B).

El meristemo del tallo (MT) es una estructura dinámica que se encuentra en crecimiento continuo y formación de órganos y está compuesto de un sistema de zonas interrelacionadas, las células de la zona central dan origen a las células de esta misma zona, a las periféricas, y las células que ocupan la zona periférica (ZP) posteriormente se encuentran en la zona de formación de órganos. La zona central o también llamada región distal o centro del meristema comprende un grupo de células embriogénicas iniciales en una o más capas.(Figura 2 A). Este es el centro o punto focal del meristema, del que depende la integridad del desarrollo del eje primario de la planta. La zona periférica y en otros casos también conocida como región subdistal posee capas de células meristemáticas. En la zona de formación de órganos (Figura 2B) también llamada región organogénica, es como su nombre lo indica, donde se desarrollan órganos, especialmente primordios de hojas. En la zona de maduración (Figura 2 A) o región subapical se caracteriza usualmente por un considerable crecimiento y elongación del tallo, un alargamiento conspicuo del primordio y formación activa de cortex parenquimatoso y diferenciación del tejido vascular.

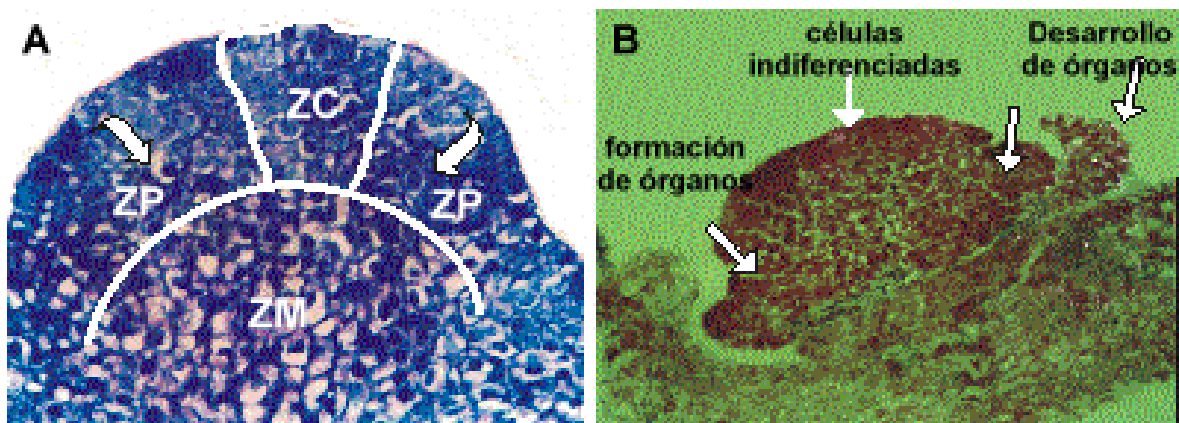


Figura 2. Regiones funcionales del meristema del tallo (MT). (A) Zona periférica (ZP) de división celular más rápida. Zona central (ZC) de división lenta. Zona de maduración (ZM). Azul de toluidina 20X. (B) Regiones funcionales. Coloración de Schiff. 20X.

Desde hace mucho tiempo se han descrito los eventos morfogénéticos e histológicos en angiospermas como eventos dinámicos y simétricos.

El espárrago también presenta el comportamiento típico de las plantas superiores. Los eventos mitóticos y los comienzos de la morfogénesis se observan a nivel de microscopia óptica desde muy temprano. En esta investigación se partió de la obtención de meristemas apicales ubicados en las yemas laterales recubiertas por las brácteas del turión. Los meristemas constituidos por fragmentos centrales de meristemas apicales se cortaron bajo el estereomicroscopio en trozos de 4x4 mm dejando 3 mm la parte inferior, lo cual permitía identificar la orientación del tejido para la siembra sobre el medio de cultivo.

El crecimiento y desarrollo en espárrago se caracteriza por la división celular intensa, expansión y diferenciación a lo largo de dos ejes principales, el eje basal-apical y el eje radial. Inicialmente se observó la formación de callos, siguiendo con los procesos de embriogénesis y la formación de plántulas. Según Reuther (1977) la regeneración de plantas a través de embriogénesis somática se ha reportado en pocas especies de la familia Liliaceae, incluyendo *Asparagus officinalis* L. En esta investigación los embriones somáticos se desarrollaron directamente a partir del explante. Estos explantes se cultivaron en medio Murashige-Skoog, enriquecido con una mezcla hormonal de ANA + KIN 0.1 mg/L y se desarrollaron a plántulas sin cambiarlos de medio de cultivo.

Como se mencionó anteriormente, la mayoría de las estructuras de la planta se derivan de las actividades de grupos especializados de células, conocidos como meristemas apicales, localizados en los puntos de crecimiento. Estos meristemas originan la parte aérea en una planta típica como el espárrago. También representan los sitios donde se originan los órganos y se establece el patrón del sistema del tallo. En la Figura 3, se presentan los diferentes eventos que puede presentar el desarrollo de los meristemas apicales. En este caso el patrón de crecimiento derivó en la formación de 3, 4, 5 ó más tallos, observado también en las preparaciones histológicas, tallos que más adelante constituyeron plántulas independientes.

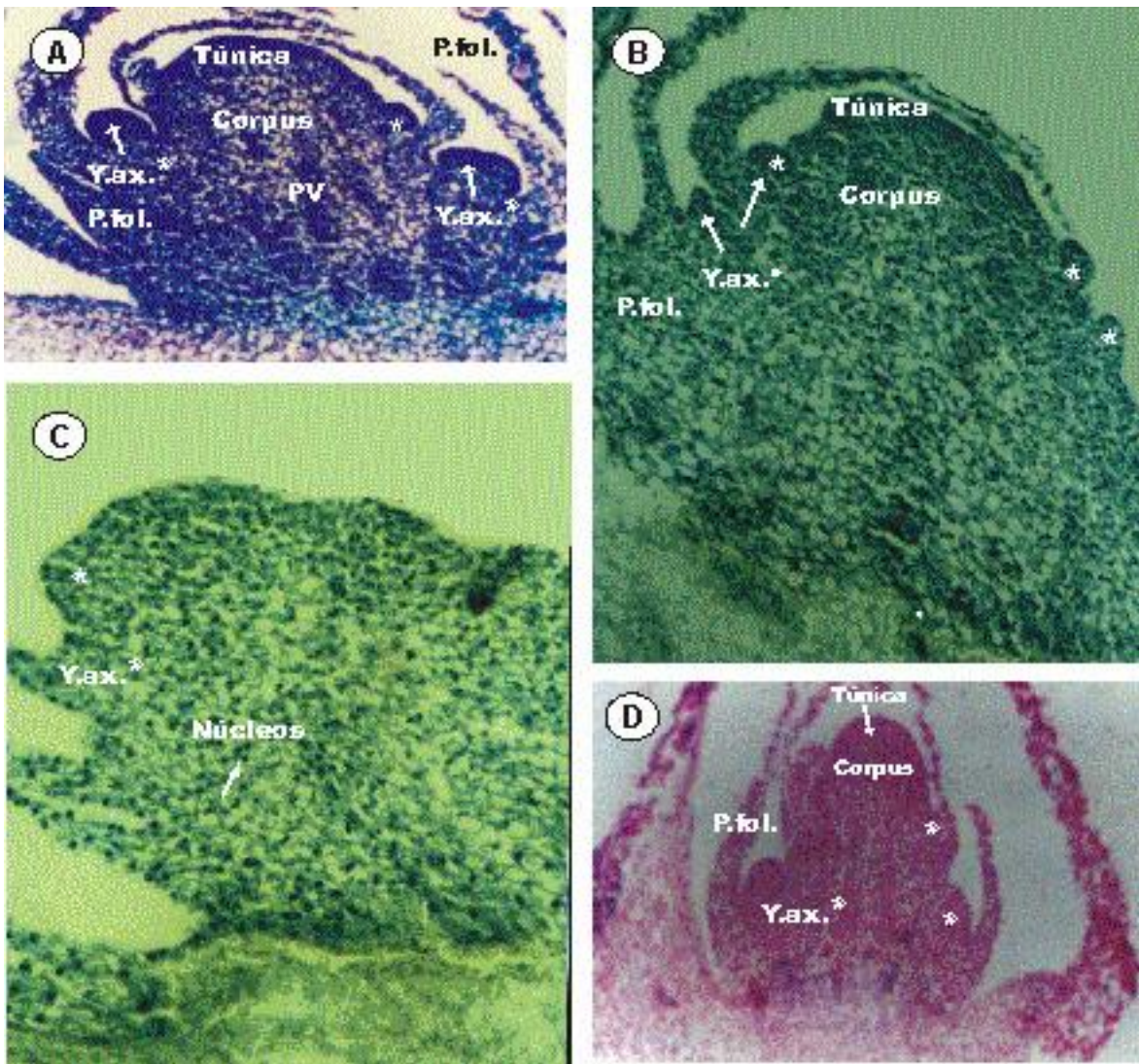


Figura 3. Eventos iniciales del desarrollo de *Asparagus officinalis* L. En (A) Segundo día de desarrollo. Coloración de azul de toluidina 20X. (B) Primer día de desarrollo. Azul bromofenol , 20X. (C) eventos iniciales primer día. Azul bromofenol 20X. (D) Segundo día, coloración de Schiff. 20x.

Este patrón de desarrollo es curioso e interesante ya que desde el punto de vista de obtención de plántulas se pueden generar varios turiones a partir de un solo meristema apical extraído de los meristemas axilares que se encuentran protegidos por hojas modificadas o brácteas en turiones maduros que se utilizaron

como plantas madres. En la figura 3 (A; B; C y D) se muestran las yemas axilares localizadas entre cada primordio foliar en distintos estados de desarrollo. También algunas plántulas presentaron enraizamiento, aproximadamente un 4% del total de plántulas, siendo un caso raro, debido a que, como reporta la bibliografía, las plántulas de espárrago, dan a lugar al enraizamiento bajo un crecimiento en medio de cultivo con distinta concentración y combinación hormonal ó carente de ella. (Slabbert, Lindeque y Ferreira, 1990)

En C y B de la figura anterior se pueden observar los eventos tempranos de la diferenciación celular. Abundantes núcleos que indican según su densidad las tasas de división celular. La incipiente formación de yemas axilares (Y.ax.*) que derivarán en primordios foliares o posibles tallos, ya que no existe una sola vía de diferenciación. En A, B y D las yemas axilares alcanzan un mayor crecimiento y se ubican entre cada primordio foliar. La tinción de Schiff (Figura 3D) indica la presencia de polisacáridos que se ubican en mayor cantidad en las paredes celulares y disminuye a nivel citoplasmático; estas acumulaciones proteicas se acumulan en los bordes superiores de las yemas. De la misma manera la túnica y el área del meristemo apical se observan claramente en A, B y D.

La zonación citológica de las características estructurales de la organización de los meristemas apicales permite distinguir una zona central (Figura 4 ZC), zona central, zona periférica (ZP). Los procesos de diferenciación celular dependen de la expresión de genes de los meristemas y de los importantes mecanismos de señalización molecular.

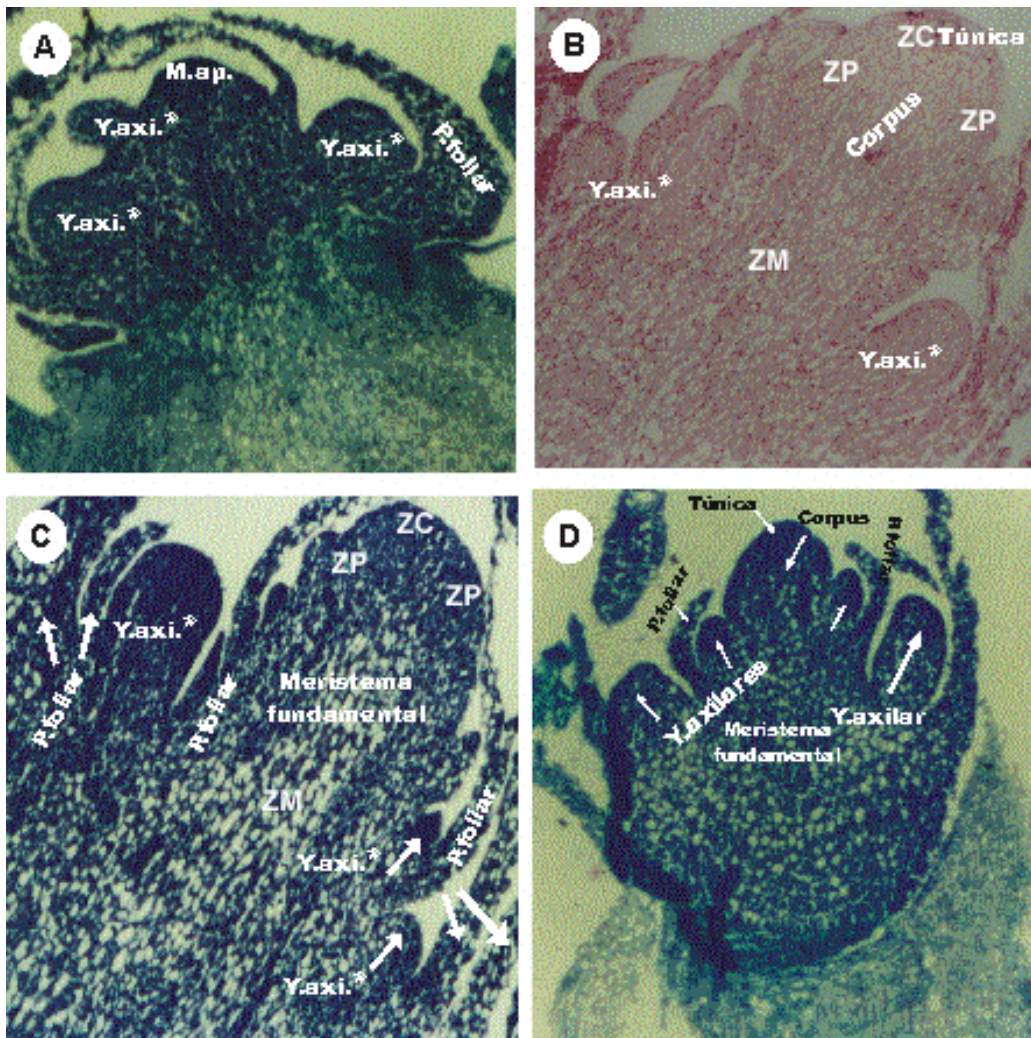


Figura 4. Tercer día de desarrollo de *Asparagus officinalis* L. A,C,D, (20X) tinción de azul de toluidina. B. Tinción de Schiff. Abreviaturas: (**M.ap.**) meristema apical. (**Y.axi.**) yema axilar. (**P.foliar**) primordio foliar.

Las células de la zona central (ZC) se dividen menos que aquellas de las zonas circundantes. Las divisiones de la ZC permiten mantener una población de células indeterminadas mientras se produce el abastecimiento de las células que se incorporan en el primordio foliar del tallo. En la zona morfogénica (ZP) (zona periférica) como se observa en la figura 4B, está constituida por células más pequeñas, las cuales poseen una división celular más rápida y se localizan en los bordes del meristema apical.

Los procesos morfogenéticos que ocurren en los meristemas apicales contribuyen directamente a la especificación de la forma de la planta, aunque las yemas axilares y tejidos del tallo también tienen su origen en el meristema apical del tallo.

Aunque en las fotomicrografías no se observa claramente, la iniciación de un nuevo primordio foliar está marcada por un cambio en el plano de la división celular, más que por el incremento en la tasa de división.

En la Figura 4 se muestran los eventos tempranos de la iniciación de la hoja y del sistema vascular. El primordio de hoja es reconocible dentro del meristema a causa de su crecimiento activo en un sitio localizado de tamaño y forma característico, una zona de metabolismo especial a menudo llamada centro de crecimiento (Figura 4 A). La evidencia histológica más temprana es un cambio en la orientación de la división celular como se observa en las yemas axilares de B y C (Figura 4). Estos cambios se evidencian en la epidermis y en el meristema del tallo. El tamaño del primordio foliar varía en cada réplica experimental. Las secciones longitudinales de la hoja se originan de células específicas del meristema apical más que de células del ápice del primordio foliar como se observa en la Figura 4C correspondiente al día tercero en donde se muestra una “hoja inmadura” o primordio foliar.

El crecimiento y desarrollo se ha pronunciado considerablemente en el cuarto día (Figura 5 A, B, C, D) y ya se puede observar el incipiente tallo del futuro turión que se evidencia desde el día 4 de iniciado el cultivo hasta el día 13, en cual ya se

podían observar plántulas de aproximadamente 0.5 a 1 cm de altura. En la Figura 5B, se observa el tejido provascular denominada por algunos autores como hebras provasculares.

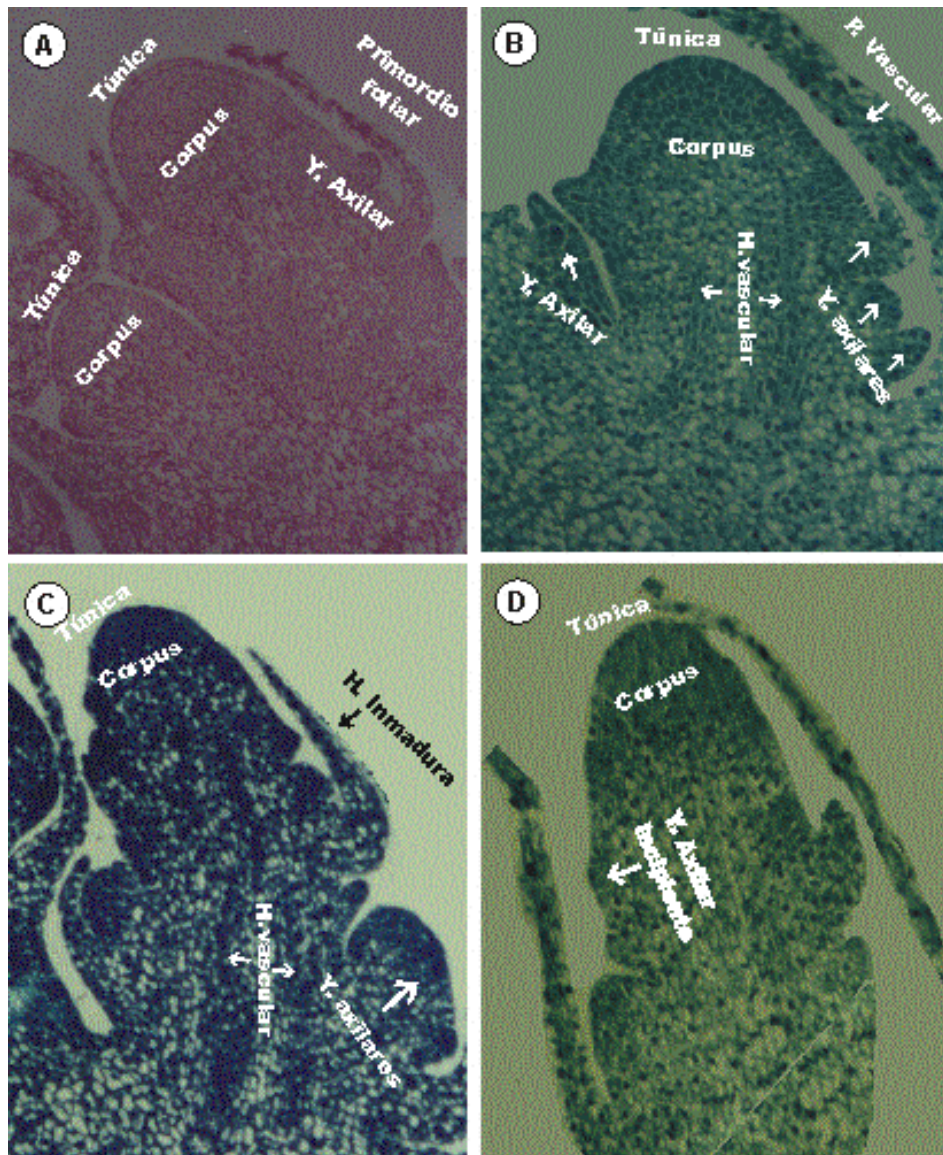


Figura 5. Estados de desarrollo del cuarto día de *Asparagus officinalis* L. (A) Tinción de Schiff. 20X (B) tinción con azul bromofenol 20x (C) Coloración con azul de toluidina 20X y (D) Azul bromofenol.

El tejido vascular se observa a partir del cuarto día, donde se observan los elementos traquearios. El tejido vascular de los meristemas se desarrolla primeramente en procambium vascular a partir de tejidos conductores maduros que se localizan en las bases de los primordios juvenes de hojas. Estos tejidos provasculares, a menudo debiles en su diferenciación ofrecen incipientes vias de translocacion y son funcionalmente importantes en el desarrollo organogénico en el ápice. En la Figura 6B, se muestra un sistema vascular maduro diferenciado a partir del procambium vascular Figura 6A.

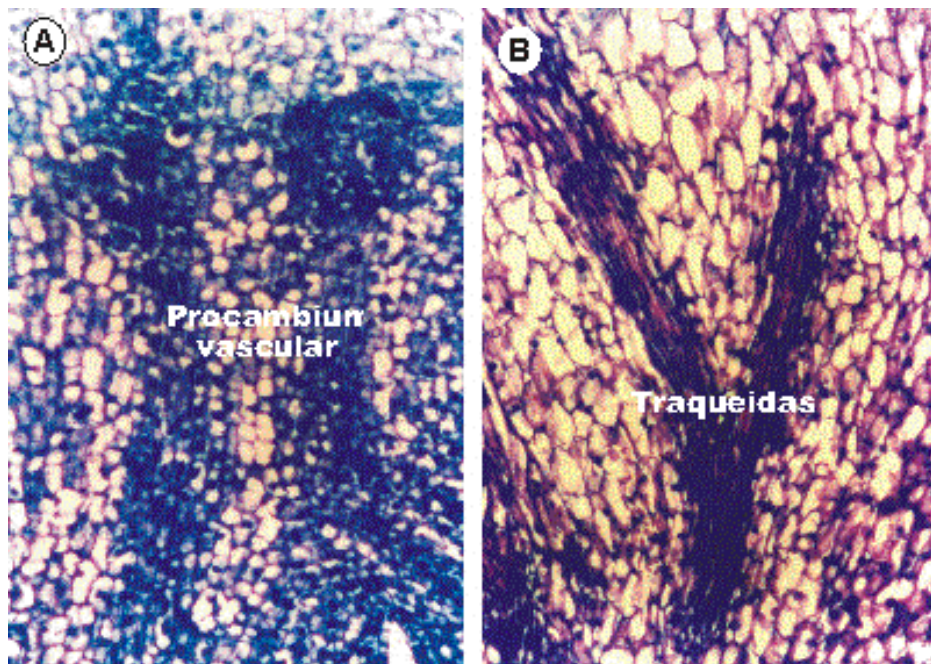


Figura 6. (A) Detalles de tejido provascular, tincion azul de toluidina 40X (B) Elementos asociados, traqueidas, tincion azul de toluidina 40X.

Para el día 22 de cultivo, todas las plántulas obtenidas poseían tallos vigorosos y tenían un tamaño de 4 a 6 cm. A los 13 días de establecido el cultivo, las muestras del medio con hormonas comenzaron a emerger, formando plántulas de

aproximadamente 0.5 cm de tamaño, hasta el día 22 en el cual todas las plántulas emergieron.

7. CONCLUSIONES

La falta de investigaciones sobre histología de la embriogénesis somática directa del espárrago, no permiten comparar y analizar semejanzas o establecer diferencias. Los principales estudios llevados a cabo se realizan principalmente sobre histología y morfología de embriogénesis somática indirecta del espárrago, es decir pasando por una etapa indiferenciada o callo, también sobre factores que favorecen e influyen el proceso de embriogénesis somática indirecta en el espárrago, principalmente derivada de protoplastos y cultivos de suspensiones celulares.

La presencia exógena de reguladores de crecimiento en el medio de cultivo en el que se desarrollan los explantes es un factor crítico e indispensable para el inicio de los procesos de división celular, elongación y desarrollo en plántulas. A su vez, los reguladores de crecimiento presentaron una relación con el incremento en la cuantificación de clorofilas totales y su final estabilización.

A nivel celular se pudieron observar zonas características de desarrollo y crecimiento de áreas meristemáticas, zona periférica, zona central, desde donde se originan los distintos órganos de la planta. Se observaron claramente las

regiones funcionales del meristemo del tallo, como son la zona periférica, la cual posee una división celular más rápida, una zona central en donde hay una división lenta y una zona de maduración. Se observaron claramente las acumulaciones proteicas, de polisacáridos en las zonas anteriormente mencionados, acumulaciones características de este tipo de tejidos, que por encontrarse en gran actividad metabólica y morfogenética requieren de estas reservas. Se observó también claramente, la formación del tejido vascular que se visualizó histológicamente, primariamente como procambium vascular, sistema que es necesario para un completo desarrollo de la plántula.

Se estableció que el proceso es una buena técnica para producir embriones de espárrago, estableciéndose como un sistema de micropropagación *in vitro* que puede llegar a ser promisorio, dadas las características particulares que presentó el cultivo durante su desarrollo, presentando la producción de varias plántulas a partir de un solo explante (meristemo), desarrollándose a plántula y enraizando todo sobre un solo medio. Estas características en particular deberán ser objeto de un estudio mas detallado, incluyendo un estudio a nivel estructural y molecular para entender mejor los procesos de diferenciación celular.

BIBLIOGRAFÍA

BAOCHUN, Li. and WOLYN, David J. Abscisic acid and ancymidol promote conversion of somatic embryos to plantlets and secondary embryogenesis in *Asparagus officinalis* L. En: In Vitro Cell and Developmental Biology Plant. Vol. 32. October-December 1996. p. 223-226

_____. The effects of ancymidol, abscisic acid, uniconazole and paclobutrazol on somatic embryogenesis of asparagus. En: Plant Cell Reports. No. 14. 1995. p. 529-533

CASTRO, Mónica y MOSELLA, Luis. Cultivo *in Vitro* del espárrago. En: Boletín Científico de la Asociación Colombiana de Estudios Vegetales IN Vitro. Vol. 3. No. 1. Mayo 1991. p. 31-51

DELBREIL, B and JULLIEN, M. Evidence for in vitro induced mutation which improves somatic embryogenesis in *Asparagus officinalis* L. En: Plant Cell Reports. No 13. 1994. p. 372-376

GHOSH, Biswajit and SEN, Sumitra. Plant regeneration through somatic embryogenesis from spear callus culture of *Asparagus cooperi* Baker. En: Plant Cell Reports. No. 9. 1991. p. 667-670

KUNITAKE, H. et al. Normalization of asparagus somatic embryogenesis using a maltose-containing medium. En: Journal of Plant Physiology. Vol. 150. 1997. p. 458-461

KUNITAKE, Hisato and MII, Masahiro. Somatic embryogenesis and plant regeneration from protoplasts of asparagus (*Asparagus officinalis* L). En: Plant Cell Reports. No. 8. 1990. p. 706-710

LEVI, A. and SINK, K. C. Asparagus somatic embryos: production in suspension culture and conversion to plantlets on solidified medium as influenced by carbohydrate regime. En: Plant Cell Tissue and Organ Culture. Vol. 51. 1992. p. 115-122

_____. Differential effects of sucrose, glucose and fructose during somatic embryogenesis in asparagus. En: Journal of Plant Physiology. Vol. 137. 1990. p. 184-189

_____. Histology and morphology of asparagus somatic embryos. En: Hortscience. Vol. 26. No. 10. 1991. p. 1322-1324

_____. Somatic embryogenesis in asparagus: the role of explants and growth regulators. En: Plant Cell Reports. No 10. 1991. p. 71-75

LI, B. and WOLYN, D. J. Interactions of ancymidol with sucrose and α -naphthaleneacetic acid in promoting asparagus (*Asparagus officinalis* L) somatic embryogenesis. En: Plant Cell Reports. No. 16. 1997. p. 879-883

O'BRIEN, T. P and Mc CULLY, Margaret E. Plant structure and development. Estados Unidos: Macmillan Company. 1969. p 41-47

PENG, M. and WOLYN, D: J: Improved callus formation and plant regeneration for shed microspore culture in asparagus (*Asparagus Officinalis* L). En: Plant Cell Reports. No. 18. 1999. p. 954-958

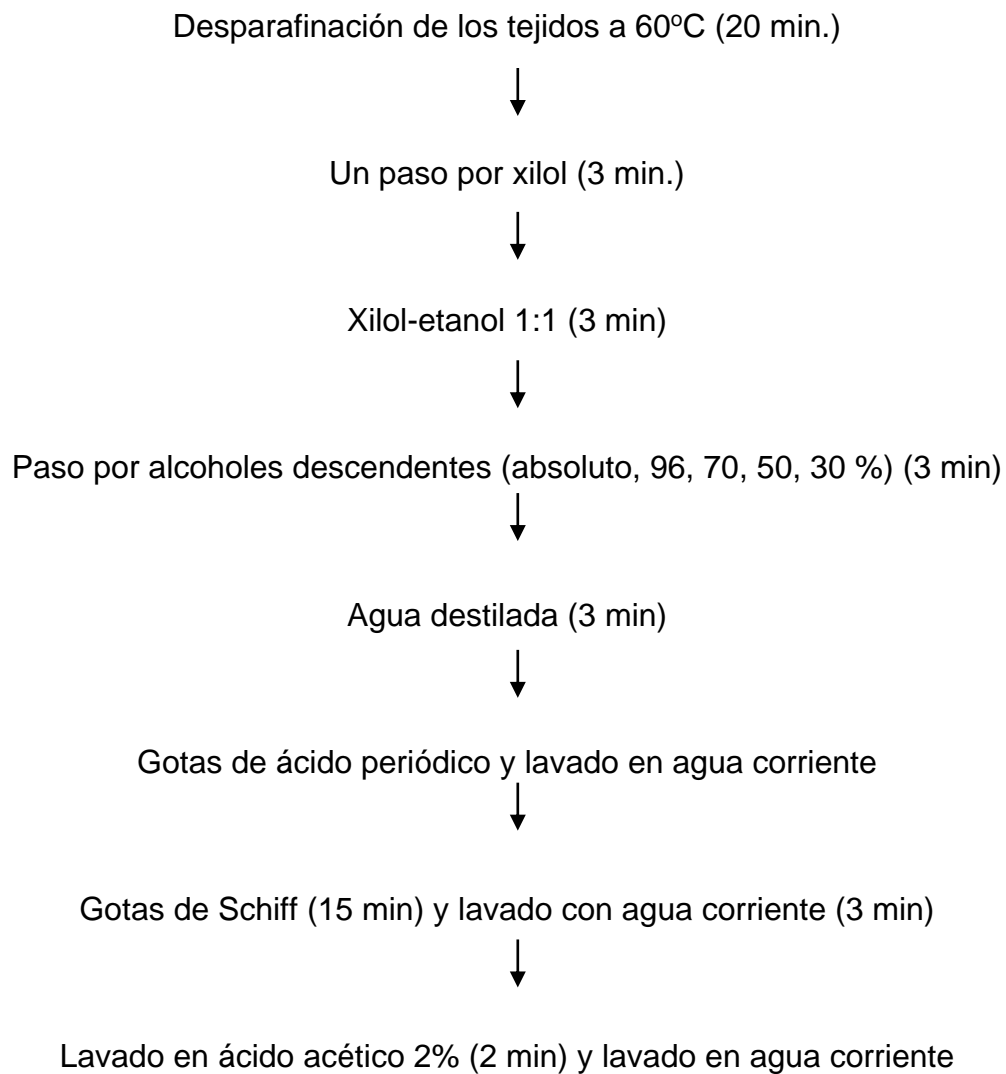
SHIGETA, Jun-ichi, et al. Efficient plant regeneration of asparagus by inducing normal roots from in vitro multiplied shoot explants using gellan gum and glucose. En: Plant Science. Vol. 113. 1996. 99-104

SLABBERT, M. M, LINDEQUE, J. M and FERREIRA, D. I. Rapid in vitro multiplication of Asparagus. *En*: Plant Science. Vol. 56. No. 3. 1990. p. 331-335

WARDLAW, C, A. Morphogenesis in Plants. Londres: Methuen & Co Ltda. 1968. p.p 117-139

ANEXO A. Pruebas Histoquímicas

1. Prueba de Schiff (Ácido Peryódico)





Xilol-etanol 1:1 (3 min) xilol (3 min) y montaje

2. Prueba de Azul de Bromofenol

Desparafinación de tejidos a 60°C (20 min.)



Un paso por xilol (3 min)



Etanol 96% (3 min)



Azul de Bromofenol (15 min)

Ácido acético 0.5% (20 min) y lavado en agua corriente (3 min)



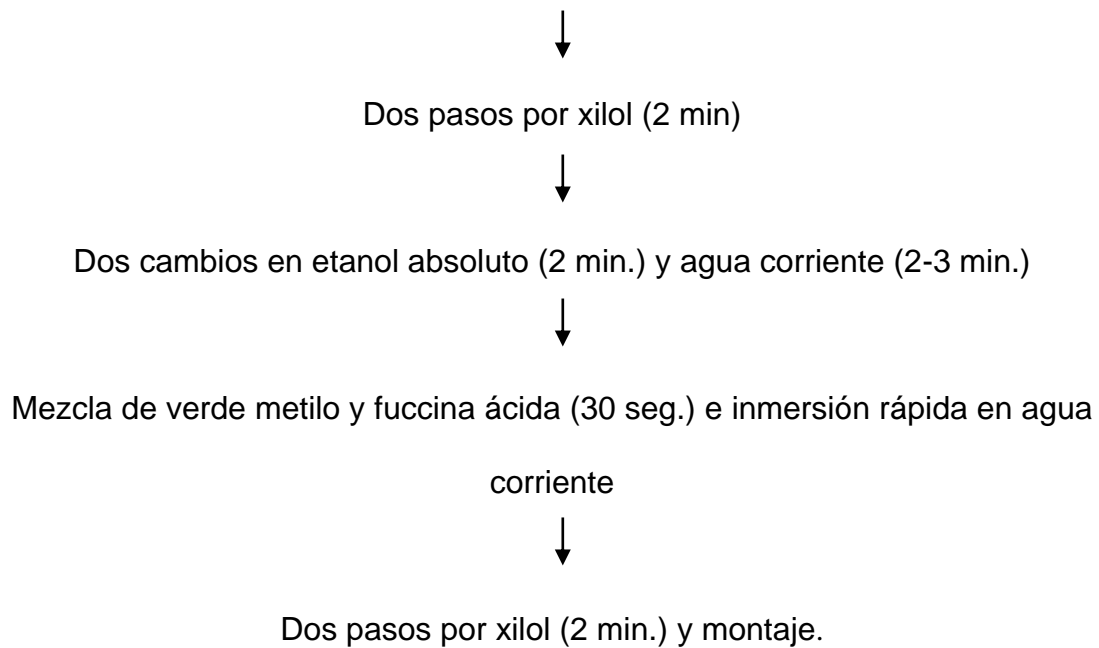
Deshidratación en alcoholes graduales (3 min) cada uno



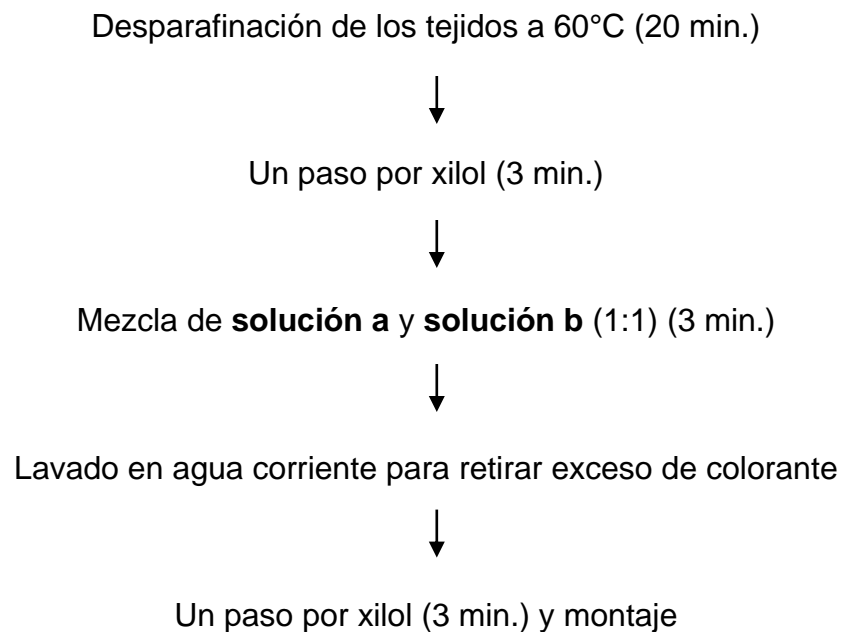
Xilol (3 min.) y montaje

3. Prueba de verde metilo-fuccina ácida

Desparafinación de los tejidos a 60°C (20 min)



4. Tinción AMB (**solución a**: 1 g Azul de Metileno + 1 g de Borato de sodio en 100 ml de agua destilada; **solución b**: 1 g de Azure b en 100 ml de agua destilada)



5. Prueba de Azul de Toluidina

Desparafinación de los tejidos a 60°C (20 min.)



Un paso por xilol (3 min.)



Solución de Azul de Toluidina 1% (15 seg.)

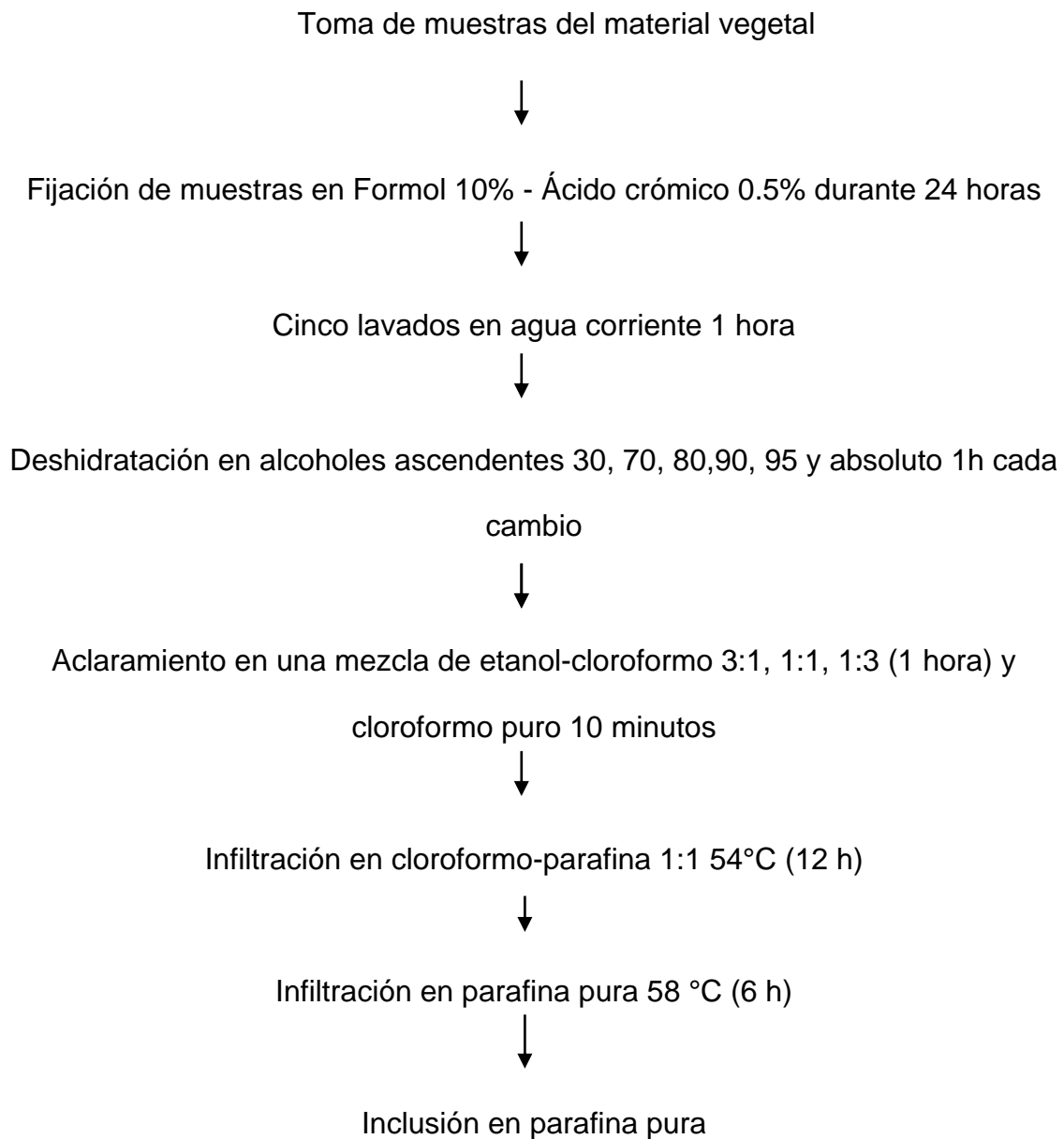


Tres lavados en agua corriente



Xilol (3 min.) y montaje

ANEXO B. Proceso histológico



ANEXO C. Cuantificación de clorofilas

Colectar 0.003 g de material vegetal



Extracción de pigmentos en 1 ml de acetona



Macerar muestras y filtrar



Análisis espectroscópico de la absorbancia a 645 y 663 nm



Calculo de concentración de clorofilas

Clorofila a + b = $5.13 \times 663 + 20.41 \times 645 \times b / 1000 \times pf$; donde **b** es igual al volumen final del extracto de clorofila y **pf** es el peso fresco en gramos de la muestra. Los valores obtenidos con esta fórmula se expresan en mg/L, convertirlos a mg/ml.