

**EVALUACIÓN EN CONDICIONES DE LABORATORIO Y CAMPO DEL  
CRECIMIENTO VEGETATIVO DE PLÁNTULAS DE ESPÁRRAGO  
*Asparagus officinalis* L. OBTENIDAS *in vitro*.**

ALVARO LORA VALENCIA

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES EXACTAS, Y DE LA EDUCACIÓN  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA  
POPAYÁN  
2007.**

**EVALUACIÓN EN CONDICIONES DE LABORATORIO Y CAMPO DEL  
CRECIMIENTO VEGETATIVO DE PLÁNTULAS DE ESPÁRRAGO  
*Asparagus officinalis* L. OBTENIDAS *in vitro*.**

ALVARO LORA VALENCIA

**Trabajo de grado para optar el titulo de Biólogo.**

Director:

M.Sc. NELSON ROJAS MARTÍNEZ

Asesores:

Mg. LEONIDAS ZAMBRANO POLANCO

Ing. Agro. GERMAN TIRONE  
ESPÁRRAGOS CHAYANI S.A.

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES EXACTAS, Y DE LA EDUCACIÓN  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA  
POPAYÁN  
2007.**

**Nota de aceptación**

---

---

---

---

---

---

**Mg. Nelson Rojas Martínez**  
**Director.**

---

**Mg. Oscar Darío Bermúdez Zambrano**  
**Jurado.**

---

**Mg. Giovanni Varona Balcazar**  
**Jurado.**

**Fecha de sustentación: Popayán, 4 de junio del 2007.**

## **DEDICATORIA**

Dedico este trabajo:

A Dios fuente de sabiduría.

A mis padres Alberto y Gladys que con su apoyo, amor y paciencia han acompañado cada momento de mi vida para cumplir mis metas y sueños.

A mis hermanos por sus invaluable consejos, por brindarme su cariño y confianza.

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad del Cauca y el Departamento de Biología por la formación académica y humana.

Al profesor Mg. Nelson Rojas Martínez, por la dirección del trabajo, por su importante aporte en conocimientos, consejos y recomendaciones; como también por su constante ánimo y ayuda para la elaboración, realización y culminación del trabajo de grado.

Al profesor Mg. Leonidas Zambrano por su asesoría en interés en la realización del trabajo.

A la Bióloga María del Socorro Anaya del laboratorio de Biotecnología Vegetal Servicio Nacional de Aprendizaje (SENA) Regional Cauca, por brindarme el espacio y las mejores condiciones para la realización de mi trabajo, además de su importante aporte de conocimientos en el área de cultivo de tejidos vegetales *in vitro*. Como también por su calidad humana y experiencia profesional.

A la Bióloga Margarita Chágüenlo del laboratorio de Biotecnología Vegetal SENA-Regional Cauca, por su confianza, apoyo e interés durante la realización de mi trabajo, además por su amistad y colaboración.

Al Ingeniero Agrónomo German Tirone por su constante colaboración, por su importante aporte en todo lo referente al cultivo de espárrago lo cual fue de suma importancia para la elaboración del trabajo de grado.

A Sandro Roldan mayordomo y encargado de la de fumigación para el control de plagas y enfermedades del cultivo de espárrago.

Al profesor Mg. Silvio Carvajal por su desinteresada ayuda en la parte estadística.

A Diana Urrutia por su constante ánimo y apoyo los cuales fueron muy importantes para el desarrollo de mi trabajo, además de su gran amor y confianza.

A mi compañero de laboratorio Rodrigo Garzón, por su amistad, nobleza, apoyo y colaboración durante el tiempo de trabajo.

A mis compañeros del programa de Biología, amigos y todas las personas que de cualquier manera contribuyeron a la finalización de este trabajo

Al SENA-Regional Cauca por el apoyo brindado en el establecimiento del cultivo de tejidos vegetales *In vitro*, realizado en el laboratorio de Biotecnología Vegetal.

A la empresa ESPARRAGOS CHAYANI S.A. por facilitarme el material vegetal de espárragos (*Asparagus officinalis* L.) necesario para el desarrollo del trabajo de grado.

## RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue obtener plántulas de espárrago (*Asparagus officinalis* L.) a partir de la técnica biotecnológica de cultivo de tejidos vegetales *in vitro*; en la fase de laboratorio se calculó la contaminación y se valoraron las plantas según características fenotípicas; se estandarizó el transplante de las mismas a la fase de invernadero donde se evaluó el crecimiento vegetativo teniendo en cuenta parámetros biométricos.

Para el desarrollo del trabajo se seleccionaron plantas de espárrago que produjeran turiones de buena calidad, se aislaron y se hizo un tratamiento fitosanitario para que estuvieran libres de patógenos. El material vegetal (turiones) libre de contaminación se trasladó al laboratorio de Biotecnología Vegetal del SENA donde se desinfectaron y se extrajeron las yemas axilares de la parte media superior del turión, luego se cultivaron en medio basal Murashige & Skoog enriquecido con KIN + ANA (0.1mg/L) para la fase de iniciación por seis semanas y luego con BAP + AIA (1.0mg/L) para la fase de multiplicación por seis semanas. Una vez obtenidas las plántulas se trasplantaron a un sustrato estéril donde se les aplicó hormonagro 0.4% y Mycoform (1g/350mL) en condiciones de invernadero (temperatura máxima 35 °C y una mínima de 15 °C, humedad relativa 60-70%) por un tiempo de 4 meses. Los resultados que se obtuvieron en el cultivo *in vitro* en la fase de micropropagación fueron 16.4% de contaminación, en la fase de multiplicación 4.2% de contaminación; en la fase de invernadero se regeneraron y adaptaron 76% de las plántulas de un total de 240 plantas.

## CONTENIDO

	Pág.
<b>INTRODUCCIÓN.</b>	<b>13</b>
<b>1. FORMULACION DEL PROBLEMA</b>	<b>16</b>
<b>2. JUSTIFICACION</b>	<b>17</b>
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>18</b>
3.1 OBJETIVO GENERAL	18
3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	18
<b>4. MARCO TEORICO</b>	<b>19</b>
4.1 SITUACION ACTUAL DEL CULTIVO	19
4.2 CARACTERISTICAS BOTANICAS	20
4.3 VARIEDADES DE ESPARRAGO	20
4.4 CARACTERISTICAS Y NECESIDADES DEL CULTIVO EN INVERNADERO	21
<b>5. ANTECEDENTES</b>	<b>27</b>
5.1 CULTIVO DE TEJIDOS	27
5.2 FACTORES A TENER EN CUENTA PARA LA MICROPROPAGACIÓN	27
5.2.1 SELECCIÓN DEL EXPLANTE	27
5.2.2 DESINFECCION	28
5.2.3 MEDIO DE CULTIVO	28
5.2.4 CONDICIONES DE INCUBACIÓN	29
5.2.5 ADAPTACIÓN	29
5.3 PROPAGACIÓN <i>IN VITRO</i>	29
<b>6. METODOLOGIA</b>	<b>36</b>
6.1 SELECCIÓN Y CLASIFICACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL	36



6.2 PREPARACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL PARA LA PROPAGACIÓN <i>IN VITRO</i>	37
6.3 CULTIVO <i>IN VITRO</i>	37
6.3.1 FASE I DE INICIACIÓN	37
A. DESINFESTACIÓN	37
B. DESINFECCIÓN	37
C. INCUBACIÓN	37
6.3.2 FASE II DE MULTIPLICACIÓN	39
6.4 PREPARACION DEL MEDIO DE CULTIVO	41
6.5 CULTIVO <i>EX VITRO</i>	43
6.5.1 FASE DE ACLIMATACIÓN O PREADAPTACIÓN	43
<b>7. RESULTADOS</b>	<b>46</b>
7.1 CULTIVO <i>IN VITRO</i>	47
7.2 CULTIVO <i>EX VITRO</i>	47
7.3 ANALISIS ESTADISTICO	48
7.3.1 EVALUACION EN CONDICIONES DE LABORATORIO Y CAMPO DEL CRECIMIENTO VEGETATIVO DE PLANTULAS DE ESPARRAGO <i>Asparagus officinalis</i> L. OBTENIDAS IN VITRO	48
<b>8. DISCUSION</b>	<b>54</b>
<b>9. CONCLUSIONES</b>	<b>65</b>
<b>10. RECOMENDACIONES</b>	<b>67</b>
<b>11. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>69</b>

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Compuestos presentes en la turba negra, abono orgánico empleado en invernadero para el cultivo de espárragos. (González y Fernández 1993).	<b>Pág.</b>  <b>25</b>
Tabla 2. Componentes inorgánicos del medio MS (Murashige-Skoog, 1962) utilizado en las fases de iniciación y multiplicación de <i>A officinalis</i> L. variedad ATLAS F1.	  <b>41</b>
Tabla 3. Componentes orgánicos (vitaminas, antioxidantes, gelificante y fitoreguladores) añadidos al medio MS (Murashige-Skoog, 1962) utilizado en las fases de iniciación y multiplicación de <i>A officinalis</i> L. variedad ATLAS F1.	  <b>42</b>
Tabla 4. Contaminación de espárrago <i>Asparagus officinalis</i> L. var. ATLAS F1 obtenido mediante cultivo <i>in vitro</i> en etapas de Iniciación y multiplicación.	  <b>47</b>
Tabla 5. Adaptación, pudrición y contaminación de espárrago <i>Asparagus officinalis</i> L. var. ATLAS F1 en fase de cultivo <i>ex vitro</i> .	  <b>47</b>
Tabla 6. Valores promedio n=15 con su error estándar para las variables peso fresco, diámetro del tallo, número de raíces, longitud de raíces y altura cuantificados cada 30 días durante 4 meses en plantas de espárrago <i>Asparagus officinalis</i> L. var. ATLAS F1 en fase de adaptación a condiciones <i>ex vitro</i> empleando un sustrato orgánico (lombricompuesto) y otro desprovisto de lombricompuesto.	  <b>49</b>

## LISTA DE FIGURAS

	Pág.
<b>Figura 1.</b> Selección del material vegetal de espárrago <i>Asparagus officinalis</i> L. var. ATLAS F1 para la micropropagación <i>in vitro</i> .	<b>36</b>
<b>Figura 2.</b> Técnica de extracción de yemas axilares de espárrago <i>Asparagus officinalis</i> L. var. ATLAS F1 para la propagación <i>in vitro</i> .	<b>38</b>
<b>Figura 3.</b> Inoculación de yema axilares de espárrago <i>Asparagus officinalis</i> L. var. ATLAS F1 en medio M.S.	<b>39</b>
<b>Figura 4.</b> Vástagos de espárrago <i>Asparagus officinalis</i> L. var. ATLAS F1 obtenidos a partir de callos en la fase de iniciación. (Órganogénesis indirecta).	<b>40</b>
<b>Figura 5.</b> Vástagos de espárrago <i>Asparagus officinalis</i> L. var. ATLAS F1 obtenidas mediante propagación <i>in vitro</i> .	<b>40</b>
<b>Figura 6.</b> Plántulas de espárrago <i>Asparagus officinalis</i> L. obtenidas <i>in vitro</i> en fase de adaptación condiciones <i>ex vitro</i> (primeros 15 días).	<b>44</b>
<b>Figura 7.</b> Plántulas de espárrago <i>Asparagus officinalis</i> L. var. ATLAS F1 obtenidas <i>in vitro</i> en fase de adaptación a condiciones <i>ex vitro</i> empleando como sustrato lombricompuesto.	<b>45</b>
<b>Figura 8.</b> Vástagos de espárrago <i>Asparagus officinalis</i> L. var. ATLAS F1 obtenidas mediante propagación <i>in vitro</i> en etapa de multiplicación.	<b>46</b>

	<b>Pág.</b>
<b>Figura 9.</b> Plántulas de espárrago <i>Asparagus officinalis</i> L. var. ATLAS F1 obtenidas mediante propagación <i>in vitro</i> adaptadas a invernadero.	<b>48</b>
<b>Figura 10.</b> Peso fresco de plantas de <i>Asparagus officinalis</i> L. var. ATLAS F1 obtenidas <i>in vitro</i> , evaluadas mes a mes por un periodo de cuatro meses en fase de adaptación en invernadero.	<b>51</b>
<b>Figura 11.</b> Diámetro de tallo de plantas <i>Asparagus officinalis</i> L. var. ATLAS F1 obtenidas <i>in vitro</i> , evaluadas mes a mes por un periodo de cuatro meses en fase de adaptación en invernadero.	<b>51</b>
<b>Figura 12.</b> Numero de raíces de plantas de <i>Asparagus officinalis</i> L. var. ATLAS F1 obtenidas <i>in vitro</i> , evaluadas mes a mes por un periodo de cuatro meses en fase de adaptación en invernadero.	<b>52</b>
<b>Figura 13.</b> Longitud de raíces de plantas de <i>Asparagus officinalis</i> L. var. ATLAS F1 obtenidas <i>in vitro</i> , evaluadas mes a mes por un periodo de cuatro meses en fase de adaptación en invernadero.	<b>52</b>
<b>Figura 14.</b> Altura de plantas de de <i>Asparagus officinalis</i> L. var. ATLAS F1 Obtenidas <i>in vitro</i> , evaluadas mes a mes por un periodo de cuatro meses en fase de adaptación en invernadero.	<b>53</b>

## INTRODUCCION

*Asparagus officinalis* L. es una hortaliza originaria del Nor-Este de Asia y sur de África, que se adapta bien a zonas templadas y tropicales; etimológicamente su nombre proviene del latín *asparagus* y del griego *asparagos* (termino que deriva de la raíz persa *cperegh* que significa punta) (González y Fernández 1993).

Es una planta herbácea de la familia *Asparagaceae*, que soporta factores climáticos extremos y aunque es perenne su fase de aprovechamiento comercial es de diez a quince años. Es un producto perecedero cuyo brote tierno denominado turión es considerado un alimento *gourmet* por su exclusivo consumo y sus altos precios relativos. Entre los principales atributos de esta hortaliza su bajo contenido en calorías (menos de 4 calorías/100g de espárrago) grasa y colesterol, con alto contenido de vitaminas C, A, B; tiamina, riboflavina y rico en potasio y fosfato de calcio. En general, se distinguen tres tipos de espárragos, el espárrago verde, que se comercializa principalmente en fresco, el espárrago blanco, destinado al procesamiento (enlatado, congelado, deshidratado, encurtido e incluso como jugo) y el espárrago morado que se consume casi exclusivamente en Italia (González y Fernández 1993).

Según la información disponible en el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, en 1999 Colombia produjo 2.492 toneladas de espárrago, cosechadas en 682 hectáreas, con rendimientos promedio de 3.6 tons/ha, nivel que ha venido disminuyendo en los últimos años debido a los fenómenos climáticos que afectaron desfavorablemente los cultivos.

El espárrago se cultiva principalmente en el departamento del Cauca y de manera menos extensa en los departamentos de Antioquia, Caldas y Risaralda.

El 76% del área sembrada se encuentra localizada en el Cauca, donde se ha constituido un núcleo productivo con una amplia infraestructura de proceso, desarrollo tecnológico del cultivo, cadena de frío para el despacho del producto y una amplia experiencia en la gestión comercial, administrativa y financiera. Se destaca la dinámica y expansión de esta actividad, dado que en 1995 se produjeron 323 toneladas en 71 hectáreas y en 1999 se llegaron a las 2.492 toneladas en 682 hectáreas. Es decir la producción se multiplicó en más de siete veces y el área en más de nueve veces. La mayoría de las empresas vienen produciendo espárrago verde y blanco para la exportación; Las variedades mas difundidas en el país son ATLAS f1 que es un dihíbrido y UC 157 que es un híbrido ambos desarrollados por la universidad de California (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural 1999).

El 97.6% de las exportaciones Colombianas de espárrago en 1999 fueron equivalentes a 1498.7 toneladas y se dirigieron a los Estados Unidos. Las ventas externas del espárrago del país tuvieron una dinámica interesante entre 1992 y 1999 ya que la tasa de crecimiento anual promedio en el valor de las mismas fue de 55.9%, mientras la tasa de crecimiento anual promedio del volumen comercializado en el mismo período fue de 55.9% (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural 1999).

Los factores que han contribuido a que el consumidor americano prefiera el espárrago Colombiano son sus cualidades físicas, en particular su color intenso y las puntas cerradas del turión por la cual la mayoría de las exportaciones se dirigen al mercado de los Estados Unidos, entrando por Miami vía aérea. Es importante mencionar que el mercado Europeo ofrece oportunidades interesantes de mercadeo, sin embargo los exportadores colombianos han preferido el mercado Norteamericano por las mayores facilidades en el transporte aéreo, ya que existen vuelos directos Cali-Miami con un tiempo de recorrido menor de 6 horas en comparación a las 12 horas de vuelo de

destinos en la Unión Europea, tales como Róterdam. Además, se debe hacer transbordo en Bogotá. (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural 1999).

A pesar de que el espárrago presenta una alta rentabilidad para las empresas es necesario mencionar los elevados costos de iniciación y manutención de los cultivos; así como los altos precios de las semillas adquiridas a través de proveedores certificados. Aunque el espárrago presenta una alta productividad y alta tolerancia a plagas e insectos es importante mencionar que las tecnologías para la producción de estas plantas se han venido desarrollando en países con condiciones climáticas diferentes a las nuestras. Por lo cual es necesario implementar la tecnología disponible en la región con el fin de mantener o aumentar la calidad de los cultivos y disminuir sus altos costos para optimizar su producción (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural 1999).

El proyecto se realizó con un híbrido de espárragos (ATLAS F1) producido en la Universidad de California (Estados Unidos). Esta variedad tiene características óptimas tales como: tallos con forma cilíndrica con un leve adelgazamiento hacia las puntas, retoños escalonados y muy apretados alrededor del tallo dando una apariencia de suavidad; el color de los tallos es verde oscuro con una ligera coloración púrpura a nivel de los brotes. El híbrido ATLAS F1 mantiene las puntas compactas, tiene una alta tolerancia al hongo *Fusarium*, al moho de los espárragos y a las enfermedades por *Cercospora foliar*. Se trabaja con un espárrago verde debido a que la exigencia en suelos y mano de obra es menor que la del espárrago blanco (California Asparagus seed and transplant, Inc. 1998).

El objetivo de este trabajo es evaluar el crecimiento vegetativo de plantas de espárrago variedad ATLAS F1, obtenidas a través de la técnica de cultivo *in vitro* para su adaptación en condiciones de invernadero.

## 1. FORMULACION DEL PROBLEMA

El espárrago es una fuente importante de ingresos en el departamento del Cauca debido a su demanda en países como Estados Unidos y la Unión Europea, esto ha incrementado un alza en los precios haciendo atractivo el cultivo y la exportación de este producto.

Las investigaciones que se han desarrollado sobre el cultivo del espárrago se han hecho por fuera de Colombia en sitios donde las condiciones geográficas y climáticas son distintas; por lo cual es necesario hacer estudios que identifiquen el comportamiento y necesidades de este cultivo en diferentes zonas del país no solo a un nivel básico si no también aplicado.

El problema radica en la duración de su ciclo de cultivo que es de año y medio y la carencia de una fuente de semillas lo cual crea dependencia de los países productores de semillas híbridas. Las plantas producidas a partir de estas son productivas por 8 años aproximadamente en el caso del espárrago. Todo esto conlleva a grandes inversiones de dinero en insumos y mano de obra. Es importante mantener la calidad de las plántulas obtenidas en el laboratorio ya que su obtención por métodos de propagación convencional tiene una baja tasa de multiplicación y los cultivos ya existentes en el país son híbridos y dihíbridos que son estériles debido a que sus semillas no son viables.

En esta región no se han realizado estudios concretos de plántulas de espárrago obtenidas *in vitro* y para ser llevadas a la fase *ex vitro*.



## 2. JUSTIFICACION

Muchas de las empresas de espárrago que había en el departamento del Cauca han declinado por diferentes problemas entre los que se encuentran los altos costos de inversión en los cultivos durante la fase de establecimiento (año y medio aproximadamente). La sobreexigencia de estos en el primer año de cosecha y los subsiguientes fueron acabando con los cultivos debido a que algunas empresas no tenían métodos sistematizados en los procesos de cosecha. Por esta razón el estudio y la aplicación de las herramientas de la Biología Celular y Molecular son de suma importancia para mantener la calidad y/o mejorarla, reducir los costos de inversión y mantenimiento de los cultivos de espárrago en el departamento del Cauca lo cual permitiría crear una alternativa en la siembra y producción de espárragos en cultivos tradicionales que se originan a partir de semillas.

Al no depender de una fuente con costos tan elevados para las empresas como son las semillas y plantear una alternativa la cual es la obtención de plántulas por medio del cultivo de tejidos vegetales *in vitro*, se podría establecer laboratorios y bancos de germoplasma subsidiados por las empresas para la obtención de material vegetal apto a las condiciones climáticas del Departamento del Cauca, lo que a futuro se reflejaría en mas hectáreas cultivadas y mas empleos generados.

### 3. OBJETIVOS.

#### 3.1 GENERAL.

Evaluar el crecimiento vegetativo en condiciones de laboratorio e invernadero (preadaptación) de plántulas de espárrago *Asparagus officinalis* L obtenidas *in vitro*.

#### 3.2 ESPECIFICOS

- Obtener plántulas de espárrago (*Asparagus officinalis* L) por medio de la técnica de cultivo *in vitro*.
- Evaluar y comparar los parámetros biométricos peso fresco, diámetro del tallo, número de raíces, longitud de raíces y altura como indicadores de crecimiento
- Comparar el crecimiento de las plantas tratadas con abono orgánico (lombricompuesto) con el tratamiento blanco o patrón, basados en parámetros biométricos
- Estandarizar la técnica de adaptación a condiciones *ex vitro* de plántulas de espárragos obtenidos *in vitro*.

## 4. MARCO TEORICO.

### 4.1 SITUACION ACTUAL DEL CULTIVO

El espárrago es uno de los cultivos hortícolas que mayores beneficios representan, es originario del Nor-Este de Asia y Sur de África. Centro de origen mediterráneo y suelos desérticos. La demanda y cultivo de espárrago crecieron en la última década, los países de alto consumo histórico en el hemisferio norte aumentaron la demanda de espárrago fresco. Anteriormente la mayor producción provenía del hemisferio norte, pero estaba limitado a la temporada de enero a julio, después se pudo obtener de septiembre a diciembre por provenir de países de Sudamérica, Sudáfrica, Australia y Nueva Zelanda (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural 1999).

Actualmente los mayores consumidores son: Estados Unidos, Alemania, Francia y España. Los mayores productores son China con 60.000 ha, Estados Unidos con 38.500 ha, Perú con 17.800 ha y Francia con 8.000 ha. El mercadeo ostenta un nivel preferencial por su variabilidad de formas de consumo:

- Fresco (Entero o en trozo): blanco o verde.
- En conserva: En lata o frasco.
- En cremas.
- Deshidratado o congelado.

El consumo de espárrago verde tuvo diferentes programas de investigación sobre el cultivo y mejoramiento, dichas investigaciones se hicieron en Francia, Alemania países bajos y Estados Unidos. Hubo dos razones para el cambio de demanda por el espárrago verde, la primera razón es el sabor y el segundo el aspecto económico (González y Fernández 1993).

## **4.2 CARACTERÍSTICAS BOTÁNICAS**

El espárrago cultivado *Asparagus officinalis* L. es una planta herbácea perenne que se cultiva en una amplia variedad de climas en casi todos los continentes menos en la Antártida; por lo cual es necesario conocer sus características botánicas, (Benages, 1990); esta es una planta dioica que pertenece a la familia *Asparagaceae*, cuya vida productiva es de 7 a 8 años; las esparragueras silvestres tienen una vida mayor de 20 a 30 años, se conocen 150 especies de espárrago pero solo una es comestible. El sistema radical es muy potente ya que en este se acumulan las reservas que permiten la brotación al año siguiente este está formado por un numeroso grupo de raíces principales sin ramificar, carnosas, de similar grosor en toda la longitud y que crecen horizontalmente. De estas raíces principales salen las raicillas secundarias que son las que le permiten absorber el agua y los nutrientes.

## **4.3 VARIEDADES DE ESPÁRRAGO**

Actualmente en el continente se está trabajando con diferentes variedades de espárrago, esto gracias a los estudios de la Universidad de California (Asparagus Seed and Transplant, Inc 1998) que durante más de dos décadas se ha dedicado a hacer estudios y producir híbridos de alta calidad; entre ellos se encuentran las variedades APOLLO, ATLAS, GRANDE, UC157 F1. En el departamento del Cauca se trabaja con UC157F1 y ATLASF1.

Benson (1990) hace una descripción acerca del ATLAS F1 el cual se desarrolló para proveer a los productores con una planta de espárrago de alto rendimiento con el fin de satisfacer la demanda de consumo en el mundo. El ATLAS F1 híbrido produce un espárrago verde de cabeza muy compacta incluso con un clima muy caliente durante la época de cosecha. Los tallos presentan una forma cilíndrica con un leve adelgazamiento hacia las puntas.

Los retoños son escalonados y muy apretados alrededor del tallo dando una apariencia de suavidad; la producción de tallos comienza muy ligero alrededor de la primavera debido al vigor de este híbrido, la cosecha se extiende hasta finales de la estación dando una cosecha de tallos con cabeza muy compacta (California Asparagus Seed and Transplant, Inc 1998).

El color de los tallos es verde oscuro con una ligera coloración púrpura a nivel de los brotes. El ATLAS F1 produce tallos con un diámetro un poco mayor que el UC 157. La supremacía del híbrido da al ATLAS F1 una alta tolerancia a *Fusarium*, además es altamente tolerante a moho del espárrago y a las enfermedades por *Cercospora* foliar. La producción de follaje en este cultivo puede llenar 1.5 metros entre las raíces por lo cual es recomendable dejar un espacio de 18 a 20 cm entre las raíces para obtener el máximo potencial de espárragos de buen diámetro. Los ensayos de la Universidad de California han provisto este híbrido para que sustituya los cultivos en California y New Jersey en Estados Unidos. (California Asparagus Seed and Transplant, Inc 1998).

La creación del ATLAS F1 tomó 12 años desde la garra original (conjunto del sistema radicular y del tallo subterráneo) hasta el actual. El ascendente femenino del ATLAS es una variedad simple seleccionada del UC 157 F1 y el ascendente masculino fue seleccionado del este de los Estados Unidos. Esta línea hace al ATLAS un híbrido clonado de un dihíbrido. (California Asparagus Seed and Transplant, Inc 1998).

#### **4.4 CARACTERÍSTICAS Y NECESIDADES DEL CULTIVO EN INVERNADERO**

Gonzáles y Fernández (1993) realizaron estudios acerca del crecimiento de plántulas espárrago verde en invernadero, entre los cuales están las exigencias (climáticas), producción de plantas, estructura del invernadero, desinfección del

suelo, preparación del terreno, herbicidas y riego. Ellos partieron de semillas y garras obtenidas en vivero.

Se comprobó que el espárrago es sensible a las oscilaciones térmicas manifestadas en la suspensión del crecimiento vegetativo, más que en la tolerancia a las bajas o altas temperaturas. A partir de los 12°C se da la aparición de nuevas brotaciones esto puede traducirse en ventaja y desventaja porque se pueden realizar estímulos térmicos como el de los 12°C ya mencionado pero es necesario mantenerlo constante porque si se disminuye ocasionaría el detenimiento en el desarrollo de la plántula, una temperatura óptima es de 18°C, con temperaturas medias altas de 20°C se produce la floración y fructificación, cuando descienden a los 5°C o 7°C se da la muerte del follaje (Benages 1990).

También se ha verificado que la humedad relativa no representa exigencias específicas, el viento no tiene un efecto directo bajo condiciones de invernadero. Las exigencias edáficas son un factor limitante en el desarrollo de espárrago verde en invernadero porque incluso en zonas con suelos muy arcillosos y con bajos contenidos en materia orgánica se pueden realizar enmiendas adicionando 50-60 t/ha de estiércol vacuno bien fermentado y unos 100-150 m<sup>3</sup>/ha de turba preferiblemente negra para no rebajar el pH (González y Fernández 1993).

En caso de condiciones mas desfavorables se pueden moderar las características edafológicas del terreno y ser un soporte adecuado para implantar el esparragal ya que bajo la protección del invernadero estas condiciones se mantendrán más estables. Es necesario tener en cuenta que el espárrago es sensible al encharcamiento del suelo, con la modalidad de cultivo enarenado en invernadero, se presenta un caso especial ya que se combina la configuración de una estructura artificial del suelo con el racional mantenimiento de las necesidades hídricas del cultivo, esto quiere decir que si

en condiciones de invernadero se trabaja con una estructura superficial conformada por 5cm de arena lavada y los otros componentes del suelo, el agua se percolará fácilmente por la acción de la arena, si por lo contrario la parte superficial del suelo es pesada y arcillosa actuara como una lamina de contención del agua, lo que provocara daños a nivel de la planta, presentándose una clorosis y amarillamiento de los cladiolos con una posterior caída, sin embargo el daño será mas severo a nivel radicular, mostrándose esta sectorizada es decir que por un lado la raíz se alejará de la fuente de agua excesiva mostrándose sana y con producción de yemas, mientras que la parte que esta en mayor contacto con el agua presentara signos de pudrición.(González y Fernández 1993).

En cuanto a los cuidados fitosanitarios son tres los factores perjudiciales para el cultivo, el derivado de la fatiga del suelo, tierras con menos de cinco años de descanso tras un cultivo de espárragos y por ultimo el estado sanitario del suelo. Con respecto a esta última es necesario realizar un estudio del suelo para comprobar la ausencia de hongos telúricos como *Rhizoctonia violacea*, la cual podemos combatir con benodanilo y tolclfosmetil en caso de ataque o tratado preventivamente mediante espolvoreo con quintoceno, *Fusarium oxysporum*, cuya presencia en algunas plantas determinara su arranque inmediato, y *Fusarium moniliforme*. Las plantas pueden sufrir alguna infección de la parte aérea como *Botrytis*, que se trata con benomilo, vinclozolina, etc., o roya, la cual se puede controlar con tratamientos periódicos basándose en maneb y zineb. En general tratamientos preventivos periódicos al suelo con propamocard y quinosol, dan buenos resultados contra hongos que producen marcas de nascencia (González y Fernández 1993).

En cuanto a plagas puede sufrir ataques de gusanos verdes como *Plusia sp.*, *Heliothis sp.*, *Spodoptera sp.*, etc. también los moluscos de tierra, caracoles y babosas pueden causar daño en plantas jóvenes, estos se eliminan con la distribución de cebos de metaldehído. Respecto a las arvenses se pueden

retirar manualmente o con la preparación del terreno un mes antes de la plantación para provocar la germinación y se eliminan con paraquat + diquat (González y Fernández 1993).

Al someter esta hortaliza al cultivo protegido en invernadero, va encaminado a lograr la mayoría de las veces una producción precoz y otras una producción fuera de época. El factor físico que nos proporciona este comportamiento es el térmico es por eso que es muy importante manejar la estructura del invernadero para mantener un control de la temperatura. En relación a los materiales son de bajo costo ya que la lamina plástica cubre todo el invernadero con dos funciones si es invierno lo protege de bajas temperaturas y si es verano aprovecha esa capacidad térmica para el desarrollo del cultivo. (González y Fernández 1993).

Enfatizando en la fertilización numerosos trabajos indican una menor relevancia de esta frente a otros factores de producción, sin embargo la inadecuada práctica de la fertilización tanto en lo que se refiere a épocas de aplicación como a cantidades de nutrientes incorporados, pueden llevar consigo a una disminución en los niveles de producción y un menor desarrollo de las características potenciales del material vegetal empleado. Las condiciones agropedológicas del suelo, textura y estructura, el riego y su manejo o las técnicas culturales, tienen mas influencia en los rendimientos que la fertilización, estando esta supeditada a estos otros factores (González y Fernández 1993).

En el empleo de la materia orgánica hay una cierta relación entre el buen desarrollo del cultivo y unos aceptables niveles de materia orgánica en el suelo. El aporte de materia orgánica puede hacerse en forma de estiércol, o de turba en caso de invernadero, obteniéndose los mejores resultados cuando la enmienda se hace antes de la plantación. Cuando los aportes de materia orgánica pueden hacerse en el transcurso de la vida de la planta, suele haber



menos respuesta a este, esto se realiza cuando se trate de suelos arenosos y ligeros debido a que en la mayoría de los casos estos suelos son pobres en materia orgánica y necesitan un constante aporte de nutrientes. (González y Fernández 1993).

Como la adición de estiércol es más complicada en invernadero y es menos recomendable se utiliza turba que tiene diferentes macro y micro elementos además de ácidos humicos y materia orgánica (tabla 1). Para aligerar el suelo del invernadero se puede utilizar cualquier turba ya que lo que se pretende es esponjar el suelo del invernadero, teniendo en cuenta que la rubia reduce más el pH que la negra (González y Fernández 1993).

### TURBA NEGRA

Macroelementos. g/100g	Microelementos. g/100g	Otros	pH
N (0.91) P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (0.03) K <sub>2</sub> O (0.02)	MgO (n.b) Fe (49.5) Mn (1.24) B (0.52) Cu (0.28) Zn (1.44) Mo (0.03)	Materia orgánica 70% Ácidos humitos. 24%	5.5-6.5

**Tabla 1.** Compuestos presentes en la turba negra, abono orgánico empleado en invernadero para el cultivo de espárragos. (González y Fernández 1993).

El empleo del lombricompostado representa una buena alternativa de abono orgánico ya que es de fácil fabricación y sus características las obtiene de la acción de la lombriz de tierra la cual ingiere residuos orgánicos sólidos los cuales son aprovechados por su organismo y expele excretas como resultado de su metabolismo. Este proceso recibe el nombre de lombricompostaje en el cual los productos que se aprovechan como abono son las excretas o lombricompostado y el aumento del volumen o biomasa de la lombriz.

Las lombrices que así trabajan corresponden al grupo de las epigeas de esta forma aportan todos los elementos nutritivos necesarios para el suelo y las plantas (Gómez 2000).

En relación a las necesidades edáficas el espárrago es una especie que tradicionalmente prefiere suelos frescos, ligeros y arenosos, e incluso se ha considerado como únicamente adaptable a soportes edáficos con estas características; pero en la actualidad no podemos remitirnos solo a esta opción, basando en el gran desarrollo que ha alcanzado el cultivo del espárrago verde por la multitud de regiones y suelos variados donde se cultiva. Se puede entonces concluir diciendo que el suelo no es factor limitante para realizar el cultivo de espárrago verde en invernadero (Benson y Bravo 1987).

## 5. ANTECEDENTES

### 5.1 CULTIVO DE TEJIDOS

Lo mencionado en el capítulo anterior hace referencia a la parte del cultivo de espárrago en invernadero por métodos convencionales. Es necesario mencionar la parte técnica de laboratorio que actualmente se encuentra bien desarrollada con diversos estudios y técnicas moleculares entre ellas la técnica de cultivo *in vitro*. Los fines de estas técnicas son variados pero entre ellos se encuentran: Saneamiento y micropropagación de plantas con interés económico y comercial, mejoramiento genético, conservación e intercambio de germoplasma, obtención de haploides y líneas isogénicas, producción de metabolitos secundarios, crióconservación, cultivo de células y protoplastos, semilla artificial e ingeniería genética.

Según Mroginski (1991) y Kitto (1997), entre las ventajas más importantes de este método de propagación cuando se compara con los convencionales están: altos coeficientes de multiplicación que permiten manipular volúmenes elevados de plantas en cortos periodos de tiempo; rápida introducción de nuevas variedades y clones; reducción del tiempo de multiplicación; producción independiente de las condiciones ambientales; incremento en los rendimientos debido al rejuvenecimiento, saneamiento y uniformidad en las plantaciones producidas.

### 5.2 FACTORES A TENER EN CUENTA PARA LA MICROPROPAGACIÓN

**5.2.1 Selección del explante:** Se puede utilizar cualquier parte de la planta para iniciar los trabajos de cultivo *in vitro*; esta selección está determinada por el objetivo deseado y la especie vegetal que se trate. Generalmente, se emplean plantas sanas y vigorosas y dentro de éstas, las zonas que se

encuentran en activa multiplicación, como los meristemos. Las plantas jóvenes son las que aportan los explantes más reactivos (Salgado 2002).

**5.2.2 Desinfección:** La contaminación por microorganismos ocasiona cuantiosas pérdidas en la propagación masiva de plantas y hace ineficientes económicamente muchos procesos; para esto hay diferentes tratamientos químicos que se utilizan para desinfectar superficialmente los explantes, se emplean con mayor frecuencia el etanol (70% v/v) y el hipoclorito de sodio entre (1-3%). Se pueden añadir algunas gotas de tween 20 que es un detergente para reducir la tensión superficial y eliminar las burbujas que se forman en la superficie y cavidades del explante, luego es necesario lavarlos varias veces con agua destilada y observar el desarrollo de los explantes para percatarse que no existen daños (Salgado 2002).

**5.2.3 Medio de cultivo:** El medio de cultivo sintético le debe propiciar al explante los requerimientos nutricionales esenciales, en proporción y dosis específicos. Su efectividad depende tanto de los ingredientes básicos, como del pH del medio y del agente. Para el cultivo de meristemos y ápices hay diferentes medios en el mercado, sin embargo el medio MS basal propuesto por Murashige y Skoog (1962), con algunas modificaciones en sus ingredientes ha sido el más frecuentemente utilizado en la mayoría de las especies propagadas *in vitro*. Los fitoreguladores en pequeñas proporciones aumentan, inhiben o modifican de alguna manera cualquier proceso fisiológico del vegetal. Un balance apropiado entre auxinas y citoquininas es necesario para la formación de plantas a partir de meristemos, ápices o yemas (Smith y Street, 1992).

**5.2.4 Condiciones de incubación:** Este requisito se debe cumplir estrictamente para el éxito en el establecimiento de los cultivos *in vitro*. Para ello es conveniente que los explantes se incuben en ambientes controlados de

luz (1000 – 5000 lux) y temperatura (20 – 28 °C), (Pierik, 1990; Roca, 1991) así como de humedad relativa (70 – 80%) acordes con los objetivos de trabajo.

**5.2.5 Adaptación.** El mayor obstáculo para el establecimiento de las plántulas que se obtienen por métodos *in vitro* es usualmente la transición del cultivo aséptico a un medio no estéril y en condiciones de campo, por lo que esta etapa reviste una gran importancia. En ella se realiza el trasplante de las plántulas al suelo y su posterior adaptación al medio ambiente. Para lograr un alto índice de sobrevivencia se necesita que las plantas tengan un sistema radical bien desarrollado y una alta humedad, necesaria para su protección lo que evita su desecación en los días posteriores al trasplante a suelo. Estos efectos influyen en todos los tipos de procesos: absorción de agua, evaporación, fotosíntesis, respiración, crecimiento, floración, cuajado del fruto (Pierik 1990).

### **5.3 PROPAGACIÓN *IN VITRO***

De los estudios básicos que se han realizado con la metodología de propagación *in vitro*, con el fin de obtener mayor eficacia y productividad está el de Slabbert, *et al* (1990) quienes desarrollaron un método para la multiplicación rápida del espárrago desde yemas y ápices de los 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 mas alto porcentaje de enraizamiento se logró usando medio MS modificado y enriquecido con 0.1 mg/L de ANA, 0.1 mg/L de kinetina y 1.25 mg/L de ancimidol.

Castro y Mosella (1991) realizaron 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 con el medio de cultivo constituido por las sales minerales del medio Murashige y Skoog (MS), vitaminas, aminoácidos y ácido ascórbico del medio

MIII6 de Mosella el cual estaba enriquecido con: 170 mg/L de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 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 (6g/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 85mg/L de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25g/L de sacarosa, Gelrite (3g) y 0.3 o 0.4 mg/L de ANA.

Shigeta, *et al* (1996) describieron que debido al bajo porcentaje y características del enraizamiento con el uso de métodos convencionales de propagación *in vitro* del espárrago, establecieron un consistente y eficiente método para producir plántulas con raíces a partir de segmentos de tallos de plántulas stocks asépticos, 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 0.1mg/L de ANA, 0.1mg/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 usando 8 g/L de Gellan gum fue (40-96%) 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 8 g/L.

Górecka (2003), realizó un estudio de Micropropagación del espárrago (*Asparagus officinalis* L.) multiplicado *in vitro* a partir de explantes de fragmentos de retoños comestibles del brote lateral, fragmentos básicos de los cladiolos bien desarrollados, fragmentos apicales de los cladiolos y brotes de la flor, crearon las líneas F1 a partir de dichos fragmentos, estas fueron: (1-M, 1/89, 2/89 M, 12/89 F, 13/89 M, 88/89 M y 91/89 M) en los medios de cultivo *in*

*in vitro* del espárrago más las citoquininas (ANA Y KIN). En el primer experimento, las líneas de crianza fueron cultivadas en ambos medios usando los diversos explantes. En el segundo experimento, crearon las líneas F 1/89, 2/89 M, 12/89 F, 88/89 M y 91/89 M, fueron cultivados en los 2 diversos medios, con los retoños estériles de un fragmento del retoño verde comestible con un brote lateral empleado como explante. Los medios de cultivo usados eran: MS1, MS + ANA en 0,1 mg/L + kinetina en 10 mg/L; y MS2, con ANA en 0,1 mg/L + BA [benziladenina] en 0,5 mg/L. Para la mayoría de las líneas probadas, más explantes fueron obtenidos en MS2 que MS1. El explante más eficaz para la iniciación del cultivo del espárrago era el fragmento de los brotes comestibles verdes con un brote lateral. En el primer experimento, la línea más proliferativa era F 1/89, produciendo 5,2 retoños a partir del explante en MS2. En el segundo experimento, el coeficiente más alto de la multiplicación (12,1) fue obtenido con 88/89 M en MS1.

Chitralekha, *et al* (2003) estudiaron la regeneración de un clon tetraploide del cultivo del callo de *A officinalis* L. con embriogénesis somática; donde una línea tetraploide del callo del espárrago fue identificada a partir de 4 líneas regeneradas del mismo. Las plantas fueron regeneradas de estas líneas del callo que seguían embriogénesis somática y la copia tetraploide de esta especie fue establecida en el campo con una tasa supervivencia del 80%.

Shalaby, *et al* (2003) estudiaron la influencia de los fitoreguladores en la inducción del callo y del embrión en cultivos de la antera del espárrago *A officinalis* L. Analizaron el efecto de los fitoreguladores de crecimiento vegetal, ácido naftalenacético (ANA), ácido 2,4-D y benziladenina (BA), y los cultivares (Hannibal, Ariane, alfa de Huchels y Huchels Leistungsauslese) en callo, la inducción del embrión fue estudiado en cultivos de la antera del espárrago. La concentración de diversos fitoreguladores estimuló perceptiblemente la cantidad de callo producido, el índice más alto de la inducción del callo fue de

58,8% obtenido con Murashige y Skoog suplido con sacarosa y 0,5mg de 2,4-D, BA y ANA al 3% para el cultivar Hannibal.

Duangpaeng, *et al* (2003) estudiaron los efectos del tratamiento de la baja temperatura en el crecimiento de plantas de semillero y el desarrollo del *A officinalis* L. obtenido *in vitro*. Los efectos de la temperatura constante en el crecimiento de las plantas de semillero del espárrago en cultivos de variedades como Mary Washington 500W y Welcome fueron el objeto de estudio. Después de que las plantas de semillero fueran cultivadas en 20°C por 2 semanas, fueron transferidas a una temperatura constante de 5, 10, 15, 20, 25 y 30°C por 8 semanas. El número de retoños por planta de semillero aumentó con el incremento de la temperatura. El número de retoños por planta de semillero de Mary Washington 500W era el más alto en 20°C, mientras que el de la welcome era el más alto en los efectos de 30°C. Los efectos de la baja temperatura en el crecimiento de las plantas de semillero del espárrago en cultivos Mary Washington 500W y welcome era el investigado *in vitro*. Después del cultivo a 20°C por 4 semanas, las plantas de semillero fueron tratadas a baja temperatura de (5°C) por 2, 4, 6 y 8 semanas. Después del tratamiento, fueron cultivadas a 20°C otra vez. Cuando las plantas de semillero fueron tratadas a temperatura de 5°C por un período corto el desarrollo fue suprimido incluso en 20°C, se prolongo con el tratamiento de la baja temperatura, el crecimiento de la planta de semillero se activo de nuevo en 20 °C.

Duangpaeng, *et al* (2003) estudiaron el efecto de los fitoreguladores, ácido naftalenacético (ANA) y de 6-benzilaminopurina (BAP) en el crecimiento del órgano del espárrago obtenido *in vitro*. Los segmentos del vástago con dos nodos fueron cultivados en el medio Murashige y Skoog (MS) con la combinación de 0,01 y 1,0 mg/L de ANA y 0,1, 1,0 y 10 mg/L de BA. La concentración baja del BA era adecuada para el crecimiento del retoño. ANA no afectó el crecimiento del retoño pero la baja concentración de ANA realizó el efecto del BA en la promoción del mismo. No se observó ninguna formación de



la raíz en este experimento. Los efectos de diversas posiciones del muestreo de explantes fueron investigados usando las plántulas estériles de Mary Washington 500W. Los nodos, los entrenudos, las extremidades del retoño, los retoños de los jóvenes y el callo fueron cultivados en medio del MS con la combinación de 0,05 y 0,1 mg/L de ANA y de 0,05 y 0,1 mg/L de BA. En los explantes de nodos, las extremidades del retoño y los retoños de los jóvenes, el número de retoños por explante eran más altos que la de entrenudos y del callo. El número de retoños por explante no era diferente en toda la combinación de las raíces de ANA y del BA iniciadas en nodos, extremidades del retoño, entrenudos y callo.

González (2002) hizo un estudio acerca de la antera del espárrago; influenciada por las condiciones del ambiente, genotipo y crecimiento de plantas donantes del explante en la respuesta androgenética. Los brotes de la flor del espárrago *Asparagus officinalis* L, de diversos cultivos, fueron recogidos en diversas fechas y condiciones ambientales. Las anteras contenían microesporas unicleadas tempranas a las etapas binucleadas; estas fueron cultivadas con éxito en medio sólido MS suplementado con el fitoregulador de crecimiento y colocadas en 32°C en oscuridad. El porcentaje de la inducción del callo fue registrado 4 semanas más adelante. La respuesta del callo de anteras de las plantas que crecían en el campo bajo condiciones de primavera era más alta que de las plantas que crecían bajo condiciones de verano; siendo el 12,7% de las anteras tomadas en primavera; los porcentajes registrados por los cultivos eran 17,9% para Largo Grueso, 14,8% para Sartaguda, 12,5% para Blanco de Navarra, 12,5% para Minerva y 10,0% para California 500.

Fortes y Pereira (2001) realizaron otro estudio respecto al efecto de los retardadores del crecimiento y de la baja temperatura en la conservación in vitro del espárrago. Los explantes del vástago del espárrago micropropagado var. cvDeco fueron cultivados en medio MS con sacarosa (30 g/L) y myoinositol (100 mg/L), suplementado con Cycocel [chlormequat] o ácido

succínico (0,5, 10, 15 y 20 M), y sostenido de 5 a 7°C o 24 a 26°C, el crecimiento y número de brotes fue evaluado después de 4 meses y el porcentaje de supervivencia del explante fue evaluado después de 9 meses. Los explantes mantenidos entre 4 y 6°C tenían una tasa de crecimiento más baja (15,6%) y el número de brotes (2,55) en comparación con los mantenidos entre 24 y 26°C (435,18% y 47,29, respectivamente). La tasa de supervivencia era del 25%, sin importar el tratamiento. Los fitoreguladores no tenían ningún efecto en las variables estudiadas.

Bekheet (2000) estudio la preservación *In vitro* del *Asparagus officinalis* L. Un sistema simple para el almacenamiento de germoplasma de espárrago fue desarrollado. Un alto porcentaje (90%) de los retoños cultivados en un medio estándar de la multiplicación, sobrevivió en el cultivo *in vitro* a 5°C en la oscuridad por 12 meses. Este porcentaje disminuyó hasta el 60% cuando los cultivos fueron almacenados por 18 meses. En la temperatura normal, los retoños y los cultivos del callo también sobrevivieron por un 1 año bajo tensión osmótica en un medio que contenía 40 g de manitol.

Muñoz, et al (2006) realizaron un estudio sobre los híbridos F<sub>1</sub> donde obtuvieron un rendimiento superior a las poblaciones cultivadas. Su producción es un proceso lento, por lo cual emplearon técnicas biotecnológicas. El cultivo de anteras *in vitro* produce plantas homocigotas masculinas (MM) y femeninas (mm). El objetivo fue identificar de 15 genotipos élites estaminados aquellos con mayor capacidad de desarrollar plántulas a partir de anteras. Los explantes se sembraron en el medio Murashige y Skoog (MS), con 2 mg/L de ácido naftalenacético y 1mg/L de bencilamino purina. La incubación se efectuó en cámaras de crecimiento. Se evaluó la respuesta androgenética (RA) medida como callos desarrollados por anteras sembradas. La regeneración se efectuó sobre el medio MS con 0,1 mg/L de ácido naftalenacético, 0,1 mg/L de Kinetina y 0,65 mg/L de ancymidol. Evaluaron la tasa de regeneración (TR), número de vástagos por total de anteras sembradas, y la proporción de plantas enraizadas

(TE). En función de RA y TR efectuaron un análisis de agrupamiento y se conformaron cuatro grupos de plantas élites. Se obtuvieron diferencias significativas para RA ( $c^2=1026,9$ ;  $p<0.001$ ). El 32 % de los callos fueron amarillentos con un comportamiento diferencial de los genotipos ( $c^2=402,6$ ;  $p<0.001$ ), el 49,6 % verde y el resto marrones. Los callos amarillentos originaron un 29,1 % de plántulas con diferencias entre materiales ( $c^2=186,8$ ;  $p<0.001$ ) y con un porcentaje de enraizamiento del 82.1 %. La eficiencia del método fue 7 % siendo el 40% de las plántulas haploides, lo que permite concluir que pueden derivarse líneas homocigotos diploides.

## 6 METODOLOGIA.

### 6.1 SELECCION Y CLASIFICACION DEL MATERIAL VEGETAL

La eficacia del cultivo *in vitro* depende directamente de la selección del material vegetal con el cual se va a trabajar en el laboratorio (Figura 1). La metodología desarrollada fue obtenerlo de la variedad ATLAS F1 basados en las características fenotípicas óptimas de una planta de espárrago. Esta es una planta de la familia *Asparagaceae* la cual tiene un sistema radical muy potente donde acumula las reservas que permiten la brotación cada año; el tallo esta formado por un disco o “cepa” sobre el que se forman las yemas que darán lugar a los turiones o espárragos que es la parte comestible, su calidad se basa en el grosor, color verde oscuro y puntas bien cerradas.



**Figura 1.** Selección del material vegetal de espárrago *Asparagus officinalis* L. var. ATLAS F1 para la micropropagación *in vitro*.

## **6.2 PREPARACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL PARA LA PROPAGACION *IN VITRO*.**

De las plantas de espárrago se seleccionaron turiones de 15 a 20 cm de largo por presentar condiciones similares de desarrollo. Una vez seleccionados los turiones se les realizó un tratamiento preventivo fitosanitario 15 días antes de la cosecha para mantenerlos libres de hongos principalmente. Se cortaron utilizando bisturís que estaban sumergidos en hipoclorito de sodio (NaOCl) 5.25% para sellar la parte basal expuesta de los turiones con el fin de prevenir cualquier contaminación en su transcurso al laboratorio.

## **6.3 CULTIVO *IN VITRO*.**

**6.3.1 Fase I. de iniciación.** Esta fase tuvo una duración aproximada de 6 semanas para estimular la multiplicación celular y la formación de los callos o estructuras indiferenciadas (órganogénesis indirecta), continuando con los siguientes pasos:

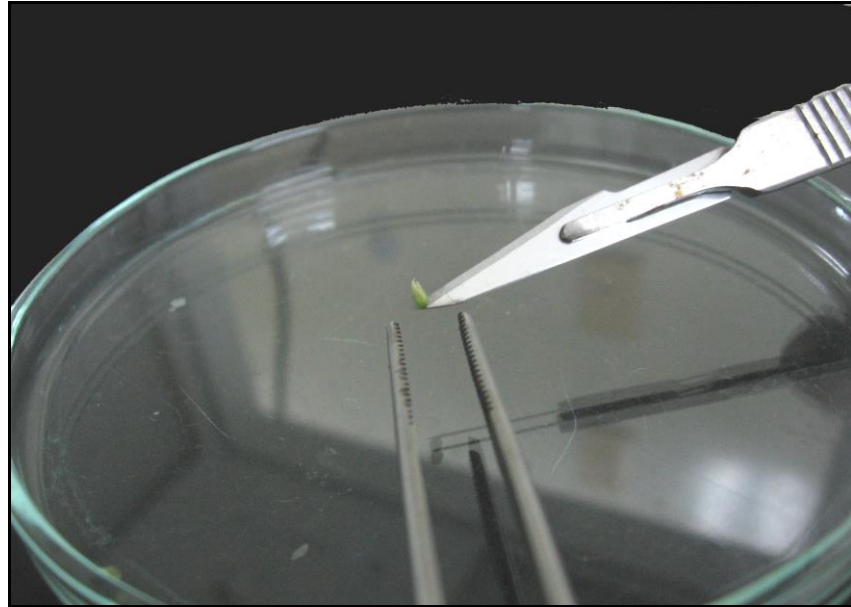
### **A. Desinfestación de explantes.**

Los turiones se desinfectaron con agua y agrodyne 1% (fungicida: complejo yodo-polietoxi-polipropoxi-polietoxi-etano 132g/L y ácido yodhídrico 15.9g/L) por 5 minutos y se lavaron de 3 a 5 veces con agua destilada, luego fueron cortados a una longitud de 10 cm y se introdujeron en un beaker de 500 ml el cual contenía 100 ml de hipoclorito de sodio NaOCl 2% por 10 minutos y se lavaron de 3 a 5 veces con agua destilada.

### **B. Desinfección de explantes.**

Posteriormente se trasladaron a la cámara de flujo laminar y se llevó a cabo la extracción de las yemas axilares (Figura 2). Las yemas obtenidas se

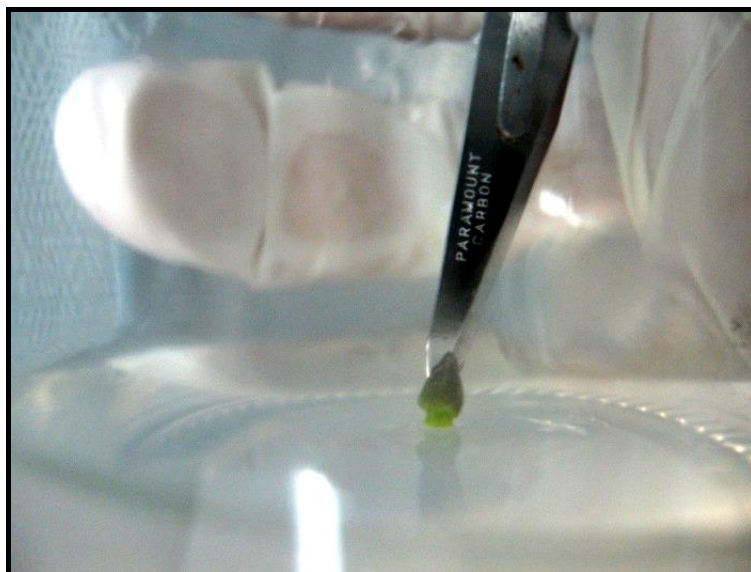
lavaron en agua destilada y se introdujeron en una solución de etanol al 70% durante un minuto; luego fueron trasladados a una solución de hipoclorito de sodio (NaOCL) 1% con agitación continua de 3 a 5 minutos; finalmente se lavaron con agua destilada de 3 a 5 veces.



**Figura 2.** Técnica de extracción de yemas axilares de espárrago *Asparagus officinalis* L. var. ATLAS F1 para la propagación *in vitro*.

### **C. Inoculación.**

En tubos de ensayo con 10 ml de medio MS (Murashige-Skoog, 1962) mas los fitoreguladores de crecimiento: Cinetina-6 furfurilaminopurina (KIN) 0.1 mg/L y (ANA) 0.1 mg/L Ácido Naftalén Acético, se introdujeron las yemas (Figura 3) con las siguientes condiciones: fotoperiodo 16 horas, temperatura 24-30 °C, intensidad lumínica de 1000-1200 lux y una humedad relativa del 65% por un periodo de seis semanas.



**Figura 3.** Inoculación de yema axilares de espárrago *Asparagus officinalis* L. var. ATLAS F1 en medio M.S.

**6.3.2 Fase II. Multiplicación.** Gracias a los procedimientos realizados en el cultivo de espárrago y en la fase de iniciación se obtuvieron callos libres de bacterias y hongos (figura 4). Se seleccionaron los callos y se eliminaron las partes necróticas y túlgentes; se procedió a dividirlos en cuatro partes y sembrarlos en frascos de vidrio para la formación de plántulas (figura 5).

En los frascos de vidrio se vertió un volumen 20 ml de medio (Murashige-Skoog, 1962) con los fitoreguladores de crecimiento: (AIA) 1.0 mg/L Ácido Indol Acético y Benzil amino purina (BAP) 1.0 mg/L. en las siguientes condiciones: fotoperiodo 16 horas, temperatura 24-30 °C, intensidad lumínica de 1000-1200 lux y una humedad relativa del 67% por un periodo de 8 semanas.





**Figura 4.** Vástagos de espárrago *Asparagus officinalis* L. var. ATLAS F1 obtenidos a partir de callos en la fase de iniciación.



**Figura 5.** Vástagos de espárrago *Asparagus officinalis* L. var. ATLAS F1 obtenidas mediante propagación *in vitro*.



## 6.4 PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO

Se utilizó el medio MS (Murashige-Skoog, 1962). Este medio ha tenido gran aceptación debido a las concentraciones de macroelementos y microelementos tanto orgánicos e inorgánicos, además se añadieron antioxidantes, vitaminas y fitoreguladores de crecimiento (tabla 2 Y 3). La preparación del medio se realizó en condiciones asépticas para evitar cualquier contaminación del medio y de las plántulas.

### COMPONENTES INORGÁNICOS

ml / L MEDIO		REACTIVO	g / 100 ml
Sol. Madre	ml/ L		
A	20	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	8.25
B	20	KNO <sub>3</sub>	9.5
C	5	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.124
		KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3.4
		KI	0.0166
		NaMoO <sub>4</sub> - 2H <sub>2</sub> O	0.005
		CoCl <sub>2</sub> - 6H <sub>2</sub> O	0.0005
D	5	CaCl <sub>2</sub> - 2H <sub>2</sub> O	8.8
E	5	MgSO <sub>4</sub> - 7H <sub>2</sub> O	7.4
		MnSO <sub>4</sub> - 4H <sub>2</sub> O	0.338
		ZnSO <sub>4</sub> - 7H <sub>2</sub> O	0.172
		CuSO <sub>4</sub>	0.0004
F	5	Na EDTA	0.745
		FeSO <sub>4</sub> - 7H <sub>2</sub> O	0.557

**Tabla 2.** Componentes inorgánicos del medio MS (Murashige-Skoog, 1962) utilizado en las fases de iniciación y multiplicación de *A. officinalis* L. variedad ATLAS F1.

## COMPONENTES ORGÁNICOS

<b>vitaminas</b>	<b>g / 100 ml</b>	<b>CANTIDAD A UTILIZAR</b>
Acido Nicotínico	0.005	10 ml / L
Piridoxina	0.005	
Glicina	0.002	
Tiamina	0.01	
<b>Antioxidantes</b>	<b>g /500mL</b>	<b>CANTIDAD A UTILIZAR</b>
Ácido cítrico	0.075g	10 ml / L
Inositol	0.5g	10 ml / L
<b>Agente gelificante</b>		<b>g /L</b>
Phytigel		3.5
Sacarosa		30
<b>Fitoreguladores</b>	<b>g/50mL</b>	<b>CANTIDAD A UTILIZAR</b>
Cinetina (KIN)	0.01g/50mL	0.1 mg / L
BAP	0.01g/50mL	1.0 mg / L
AIA	0.01g/50mL	1.0 mg / L
ANA	0.01g/50mL	0.1 mg / L

**Tabla 3.** Componentes orgánicos (vitaminas, antioxidantes, gelificante y fitoreguladores) añadidos al medio MS (Murashige-Skoog, 1962) utilizado en las fases de iniciación y multiplicación de *A. officinalis* L. variedad ATLAS F1.

## 6.5 CULTIVO *EX VITRO*.

**6.5.1 Fase de adaptación.** Para el cultivo de las plántulas de espárrago obtenidas en laboratorio fue necesario tener un invernadero, el cual estaba ubicado en el SENA alto de Cauca que presentaba condiciones estables de temperatura (24-36°C), luz (6000 lux) aproximadamente y humedad relativa (70-80%); además de una infraestructura adecuada que protegiera y favoreciera el desarrollo de las plántulas.

La primera parte consistió en sumergir la base de las plántulas obtenidas *in vitro* en dos soluciones, una contenía MYCOFOR (1g/350ml, promotor de la asociación entre mycorizas y raíces) por un tiempo de 20 minutos y luego se sumergieron en Hormonagro (0.40%, enraizador) por 20 minutos; el trasplante se hizo en vasos plásticos transparentes de 12 onzas, los cuales se llenaron con un volumen de 250 cm<sup>3</sup> de suelo y arena en proporción 1:1, sustrato previamente esterilizado y humedecido, además los vasos que contenían las plántulas fueron cubiertos con vasos transparentes del mismo tamaño para permitir la fotosíntesis, mantener la humedad y protegerlas de diferentes agentes (Figura 6).

El riego se realizó durante este periodo con agua destilada y esterilizada manteniendo el sustrato a capacidad de campo. En estas condiciones se mantuvieron las plántulas por 15 días para evitar posibles brotes de contaminación especialmente por hongos.

Después de este periodo se cambió el suelo esterilizado por suelo sin esterilizar y se hicieron 2 tratamientos: El primer tratamiento (blanco o patrón) llevó proporciones de suelo y arena 1:1 y el segundo tratamiento llevó una proporción 1:3 suelo, arena y lombricompost, este último producido en la esparraguera ESPARRAGOS CHAYANI S.A (Figura 7).

Antes de sembrar las plántulas en los dos diferentes sustratos, fueron sumergidas de nuevo en MYCOFORM (1g/350ml) por 20 minutos, se sembraron y a la parte foliar de la planta se le aplicó Ionlife (2-3ml/L); producto no tóxico, no corrosivo y biodegradable; es un compuesto orgánico activado y estabilizado por medios físicos y químicos, tiene propiedades bactericidas, fungicidas y viricidas, contiene ácido cítrico, ascórbico y láctico.



**Figura 6.** Plántulas de espárrago *Asparagus officinalis* L. obtenidas *in vitro* en fase de adaptación condiciones *ex vitro* (primeros 15 días).

En la presente investigación se obtuvieron 115 callos en la fase de Iniciación con un diámetro promedio de 11mm. En la fase de Micropropagación se obtuvieron 258 plántulas; en la fase de Invernadero 248 plántulas con una

adaptación del 76% para un total de 180 plántulas. Se trabajó con dos grupos de 90 plántulas; el primer grupo tenía abono orgánico (lombricompost) y el segundo sin abono. La unidad de muestreo fue cada planta, que de forma aleatoria se evaluó cada mes hasta el final del experimento.



**Figura 7.** Plántulas de espárrago *Asparagus officinalis* L. var. ATLAS F1 obtenidas *in vitro* en fase de adaptación a condiciones *ex vitro* empleando como sustrato lombricompost.

La investigación incluyó una variable independiente o factor de tipo cualitativo que fue el sustrato 1 (suelo, arena y lombricompost) en proporciones (1:3) y sustrato 2 blanco o patrón (suelo y arena) en proporciones (1:1); las variables dependientes son: peso fresco (gramos), diámetro tallo (milímetros mm), número de raíces, longitud de raíces (mm) y altura (mm); las cuales se evaluaron cada 30 días por un periodo de 4 meses. Para el análisis estadístico se trabajó con la prueba no paramétrica de Kruskal- Wallis; sometiendo los datos a un nivel de significancia ( $P < 0.05$ ) y para la estadística descriptiva se complementó con la prueba de comparaciones múltiple de Tukey.

## 7. RESULTADOS

Los resultados obtenidos en el presente trabajo fueron: En la etapa de iniciación se sembraron 115 yemas axilares las cuales presentaron multiplicación celular y formación de callos, con una contaminación del 16.40%. En la etapa de multiplicación se aislaron los callos y se dividieron de 2 a 3 veces empleando un bisturí, se sembraron 258 y por órganogénesis indirecta se obtuvieron 247 vástagos (95.8%), se presentó una contaminación en 10 plántulas (4.2%) (Tabla 4). Finalmente en la fase de adaptación a condiciones *ex vitro* se obtuvieron 240 vástagos (figura 8), de las cuales el 76% se adaptó para un total de 182 plántulas, murieron por pudrición de raíces 21% y contaminación 3% (tabla 5).



**Figura 8.** Vástagos de espárrago *Asparagus officinalis* L. var. ATLAS F1 obtenidas mediante propagación *in vitro* en etapa de multiplicación.

### 7.1 CULTIVO *IN VITRO*.

	Nº de yemas	% contaminación
Etapa de Iniciación	115	16.40
	Nº de callos	
Etapa de multiplicación	258	4.2

**Tabla 4.** Contaminación de espárrago *Asparagus officinalis* L. var. ATLAS F1 obtenido mediante cultivo *in vitro* en etapas de Iniciación y multiplicación.

### 7.2 CULTIVO *EX VITRO*.

	Plantas	% adaptación	% pudrición de raíces	% contaminación
Etapa de adaptación	240	76	21	3

**Tabla 5.** Adaptación, pudrición y contaminación de espárrago *Asparagus officinalis* L. var. ATLAS F1 en fase de cultivo *ex vitro*.

El número de plántulas regeneradas mediante la propagación *in vitro* fue significativamente alto debido a que de un turión se obtuvo un promedio de 5 yemas las cuales produjeron el mismo número de callos; estos últimos tuvieron una alta tasa de multiplicación ya que se dividieron entre 2 y 3 veces por medio de un bisturí y formaron de 2 a 3 vástagos por callo en las condiciones apropiadas.

El fotoperíodo en la cámara de crecimiento por encima de los 1200 lux fue óptimo para el crecimiento de las plántulas pues está directamente relacionado



con la fotosíntesis; también fueron importantes las mezclas de los fitoreguladores, los aportes de sacarosa, vitaminas, gelificantes y antioxidantes, que se aplicaron al medio de cultivo M.S. Todos estos elementos contribuyeron a que la planta presentara un buen desarrollo fisiológico y estuviera en condiciones óptimas para ser llevadas a la fase *ex vitro* donde lograron adaptarse en los 15 primeros días desarrollando raíces verdaderas (figura 9).



**Figura 9.** Plántulas de espárrago *Asparagus officinalis* L. var. ATLAS F1 obtenidas mediante propagación *in vitro* adaptadas a invernadero

### 7.3 ANALISIS ESTADISTICO.

**7.3.1 Evaluación en condiciones de laboratorio y campo del crecimiento vegetativo de plántulas de espárrago *Asparagus officinalis* L. obtenidas *in vitro*** (a partir de yemas axilares). Los datos obtenidos se sometieron a la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y se complementaron con la prueba de comparaciones múltiples de HDS de Tukey para la estadística descriptiva (Tabla 6).



## ANALISIS ESTADISTICO

VARIABLES	SUSTRATO							
	ORGANICO (1)				BLANCO (2)			
	MES				MES			
	1 X ± EE (n)	2 X ± EE (n)	3 X ± EE (n)	4 X ± EE (n)	1 X ± EE (n)	2 X ± EE (n)	3 X ± EE (n)	4 X ± EE (n)
<b>PESO FRESCO</b>	0.07 ± 0.004 (15)	0.11 ± 0.004 (15)	0.22 ± 0.009 (15)	0.33 ± 0.017 (15)	0.05 ± 0.002 (15)	0.09 ± 0.002 (15)	0.18 ± 0.005 (15)	0.19 ± 0.04 (15)
<b>DIAMETRO DEL TALLO</b>	0.42 ± 0.01 (15)	0.49 ± 0.01 (15)	0.54 ± 0.01 (15)	0.72 ± 0.02 (15)	0.38 ± 0.005 (15)	0.40 ± 0.006 (15)	0.45 ± 0.01 (15)	0.50 ± 0.01 (15)
<b>NUMERO DE RAICES</b>	1.73 ± 0.15	2.60 ± 0.16 (15)	3.27 ± 0.20 (15)	4.47 ± 0.23 (15)	1.33 ± 0.12 (15)	1.67 ± 0.18 (15)	2.07 ± 0.11 (15)	3.47 ± 0.35 (15)
<b>LONGITUD DE RAICES</b>	18.55 ± 0.67 (15)	24.26 ± 0.52 (15)	31.33 ± 0.51 (15)	41.26 ± 0.91 (15)	16.65 ± 0.47 (15)	19.36 ± 0.34	22.37 ± 0.73 (15)	32.20 ± 0.59 (15)
<b>ALTURA</b>	65.95 ± 0.84 (15)	77.83 ± 0.90 (15)	96.90 ± 1.99 (15)	124.40 ± 4.18 (15)	58.68 ± 0.52 (15)	64.59 ± 0.96 (15)	81.61 ± 1.26 (15)	90.99 ± 1.79 (15)
<b>P</b>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

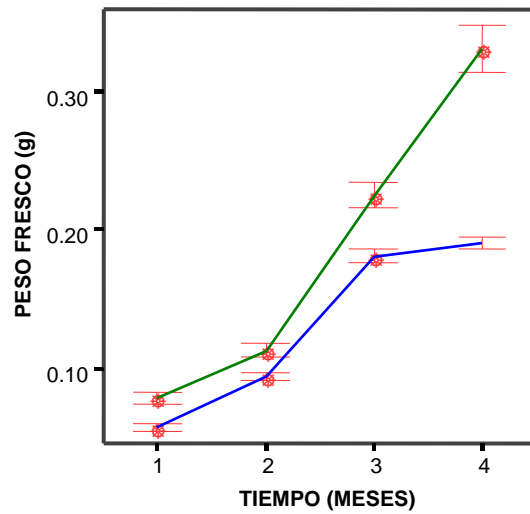
**Tabla 6.** Valores promedio n=15 con su error estándar para las variables peso fresco, diámetro del tallo, número de raíces, longitud de raíces y altura cuantificados cada 30 días durante 4 meses en plantas de espárrago *Asparagus officinalis* L. var. ATLAS F1 en fase de adaptación a condiciones *ex vitro* empleando un sustrato orgánico (lombricompuesto) y otro desprovisto de lombricompuesto.

Las variables peso fresco, diámetro del tallo, número de raíces, longitud de raíces y altura no cumplen con la pruebas de normalidad y homogeneidad de varianza es decir que no se ajustan a una distribución normal por esta razón se aplicó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis ( $p < 0.05$ ).

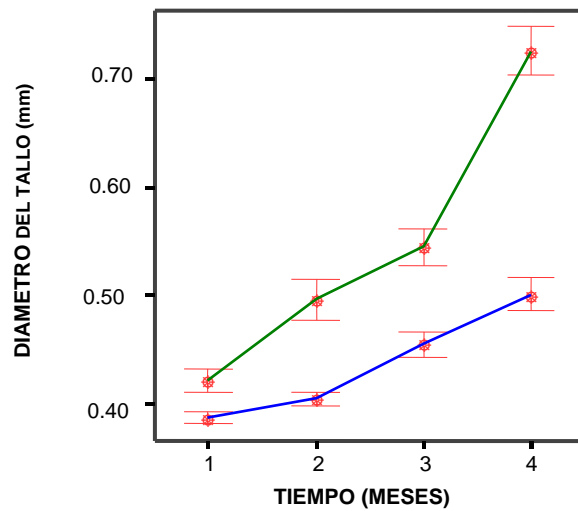
Los resultados del análisis estadístico demostraron que a través del tiempo había diferencia significativa entre los 2 sustratos para todas las variables.

El crecimiento de las plantas de espárrago en invernadero se dio en las mismas condiciones de luz, temperatura y humedad para todas ellas, la diferencia que se reflejó en el proceso de crecimiento pudo estar relacionada con la adición del abono orgánico (lombricompuesto) que se aplicó al grupo de plantas con el sustrato número 1.

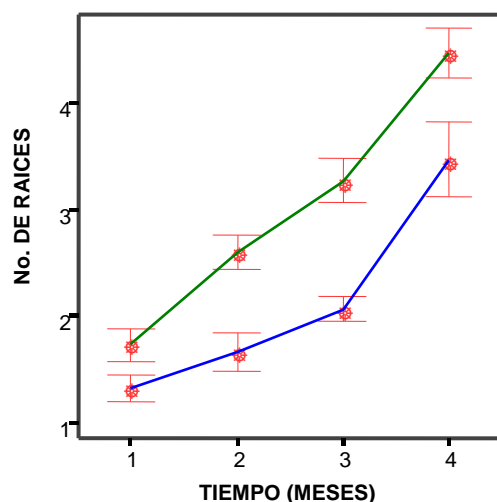
El análisis estadístico mostró gran diferencia en el crecimiento de las plantas con abono orgánico (lombricompuesto) frente al grupo que no tenía abono; principalmente en el desarrollo de las raíces y su longitud como también en la altura, las cuales comenzaron a aumentar significativamente después del primer mes de la aplicación del lombricompuesto y el Mycoform el cual pudo propiciar la asociación de estas con las micorrizas.



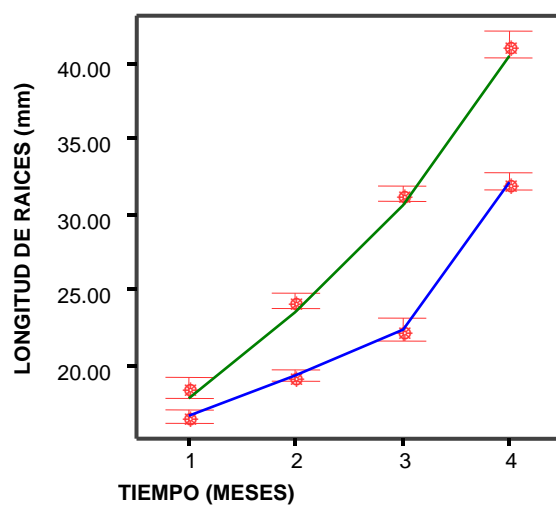
**Figura 10.** Peso fresco de plantas de *Asparagus officinalis* L. var. ATLAS F1 determinado cada mes durante la fase de adaptación a condiciones *ex vitro*, empleando un sustrato suplementado con lombricompost ■ y otro sustrato desprovisto de lombricompost ■. Los puntos corresponden al valor promedio de 15 repeticiones y las líneas verticales al error estándar.



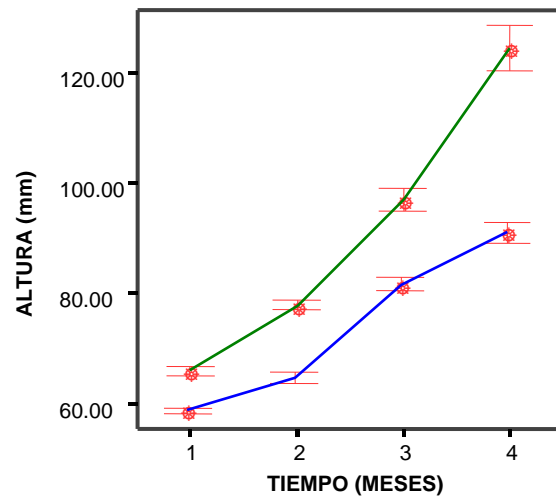
**Figura 11.** Diámetro de tallo de plantas *Asparagus officinalis* L. var. ATLAS F1 determinado cada mes durante la fase de adaptación a condiciones *ex vitro*, empleando un sustrato suplementado con lombricompost ■ y otro sustrato desprovisto de lombricompost ■. Los puntos corresponden al valor promedio de 15 repeticiones y las líneas verticales al error estándar.



**Figura 12.** Numero de raíces de plantas de *Asparagus officinalis* L. var. ATLAS F1 obtenidas *in vitro*, determinadas cada mes durante la fase de adaptación a condiciones *ex vitro*, empleando un sustrato suplementado con lombricomposto ■ y otro sustrato desprovisto de lombricomposto ■. Los puntos corresponden al valor promedio de 15 repeticiones y las líneas verticales al error estándar.



**Figura 13.** Longitud de raíces de plantas de *Asparagus officinalis* L. var. ATLAS F1 determinado cada mes durante la fase de adaptación a condiciones *ex vitro*, empleando un sustrato suplementado con lombricomposto ■ y otro sustrato desprovisto de lombricomposto ■. Los puntos corresponden al valor promedio de 15 repeticiones y las líneas verticales al error estándar.



**Figura 14.** Altura de plantas de de *Asparagus officinalis* L. var. ATLAS F1 determinado cada mes durante la fase de adaptación a condiciones ex vitro, empleando un sustrato suplementado con lombricomposto ■ y otro sustrato desprovisto de lombricomposto ■. Los puntos corresponden al valor promedio de 15 repeticiones y las líneas verticales al error estándar.

## 8. DISCUSION

La producción de espárrago (*Asparagus officinalis* L.) representa un gran beneficio para las empresas y agricultores debido al aumentado en la demanda en los últimos años; el problema radica en los altos costos de la semilla y la manutención del cultivo en el primer año y medio; tiempo atrás se crearon diferentes líneas genéticas de variedades de espárrago empleando técnicas convencionales y moleculares. Las esparragueras silvestres tienen una vida mayor de 20 a 30 años y aquellas de interés comercial tienen una vida útil en su producción de 7 a 8 años (Benages, 1990).

Debido a la problemática que presenta el cultivo de espárrago a nivel de costos y calidad (Benages, 1990); los resultados iniciales de este trabajo se aplican como una alternativa de solución empleando las técnicas que ofrece la Biotecnología vegetal en especial el cultivo de tejidos vegetales *in vitro*, esta herramienta ha desmotrado su eficacia para la obtención de plántulas de excelente calidad con parámetros definidos y libre de patógenos.

Los altos costos en la producción e inspección de grandes extensiones de tierra cultivada contrastan con la facilidad que brinda la investigación en la obtención de plántulas *in vitro* y *ex vitro*; ya que permite tomar decisiones confiables y certeras sobre la calidad del producto; es importante mencionar que para el desarrollo exitoso de estas técnicas se debe ser muy estricto en cada fase, desde la selección y clasificación del material vegetal hasta la adaptación de las plántulas a condiciones *ex vitro*. Debido a que el material vegetal se seleccionó en época de invierno este presentaba ataques de hongos endógenos y exógenos: *Cladosporyum* y *Cercospora* los cuales se identificaron por muestras enviadas al ICA y *Botrytis* y *Stemphylium*. Estos últimos identificados por el ingeniero agrónomo de la esparraguera, por tal

motivo se realizó un tratamiento fitosanitario para obtener material vegetal de buena calidad.

El propósito de este trabajo se enfocó a evaluar las plantas de espárrago (*Asparagus officinalis* L.) obtenidas en el laboratorio y seguir su proceso de desarrollo en la fase de invernadero. Los logros obtenidos en este trabajo fueron obtener plántulas libres de hongos y bacterias; en la fase de iniciación se observó una contaminación del 16.40% dato relativamente factible ya que las yemas (explantes) se sembraron de 2 a 3 en frascos de vidrio con medio de cultivo Murashige-Skoog (MS) razón por la cual se manifestó la contaminación, otro logro obtenido fue adaptar las plántulas obtenidas *in vitro* a la fase *ex vitro* específicamente a invernadero para evaluar su crecimiento teniendo en cuenta parámetros biométricos como indicadores de desarrollo, el éxito de estas etapas se debió a la selección de material joven y libre de patógenos, empleando plantas con buenas características fenotípicas y dentro de estas las partes que se encuentran en multiplicación activa como los meristemas.

Para el cultivo *in vitro* fue necesario hacer una minuciosa desinfección y desinfección para evitar cualquier daño a los explantes por causa de microorganismos patógenos los cuales ocasionan pérdidas de material y reactivos haciendo ineficiente los procesos de producción. En el presente trabajo los turiones seleccionados libres de hongos principalmente fueron llevados al Laboratorio de Biotecnología Vegetal del SENA, en el cual se emplearon las técnicas descritas en la metodología para controlar y disminuir el efecto de los patógenos en los explantes inoculados en el medio de cultivo M.S.

El medio empleado en el presente trabajo para la fase *in vitro* fue el propuesto por Murashige y skoog (1962), el cual ha demostrado ser eficiente para el cultivo de espárragos como lo han demostrado distintos autores entre los que

se encuentran: Slabbert (1990), Castro y Mosella (1991), Shigeta, *et al* (1996), Shalaby (2003) y Duangpaeng (2003).

Diferentes partes del espárrago se han utilizado con éxito para la micropropagación *in vitro* del espárrago, como lo demostró Goreka (2003); en este trabajo se utilizaron las yemas axilares de la parte media del turión, que para ambos casos demostró ser eficaz. Los resultados obtenidos con este tipo de explantes fueron una multiplicación rápida y masiva ya que se obtuvo un material vigoroso, libre de contaminación el cual presento homogenicidad en sus características fenotípicas. Otros autores han empleado diferentes partes con un éxito favorable, entre los que se encuentran González (2002) y Shalaby (2003) quienes utilizaron las anteras del espárrago.

Las condiciones ambientales que se establecieron para el cultivo *in vitro* de espárrago var. ATLAS F1 en las fases de iniciación y multiplicación fueron controladas; estas fueron luz (1000-1200 lux), temperatura promedio de (24-30°C), humedad relativa del 65% y fotoperíodo de 16 horas, las cuales fueron empleadas con éxito por salgado (2002). Estas condiciones influyen directamente en los procesos de absorción de agua, transpiración, fotosíntesis, respiración, crecimiento, floración, entre otros (Pierik, 1990; Roca, 1991). En este trabajo las condiciones ya mencionadas favorecieron el crecimiento de los explantes, observándose la formación de callos que posteriormente desarrollaron vástagos.

La relación que se dio entre la temperatura y la luz fue de gran importancia pues esta última interviene en la fotosíntesis proceso que tuvo gran importancia para el crecimiento de las plantas, al haber una mayor cantidad de luz en el invernadero aumento la temperatura y esto pudo favorecer el crecimiento vegetativo en las plántulas. Esto se reflejo en el buen desarrollo de las plantas tanto a nivel radicular y en su parte aérea ya que en los cuatro meses que



estuvieron en el invernadero fue un periodo de verano con escasas lluvias y suficiente luz lo que favoreció los procesos ya mencionados

González y Fernández (1993) plantean que la planta de espárrago tanto en campo como en invernadero es sensible a las oscilaciones térmicas, esto se ve reflejado en la suspensión del crecimiento vegetativo, teniendo en cuenta que es una planta con rizomas perennes es decir que pierden sus partes aéreas en climas fríos conservando tan solo el órgano subterráneo que almacena nutrientes para la próxima temporada. Partiendo de esta afirmación se podría decir que las temperaturas que se presentaron en los meses de crecimiento tuvieron un promedio de 28 °C; no tuvieron incidencia alguna en este proceso, además se mantuvo la humedad a nivel radicular lo cual beneficio el crecimiento vegetativo a nivel de toda la planta.

El espárrago no presenta exigencias específicas sobre la humedad relativa, con esto se quiere decir que no es un factor determinante en su crecimiento, pero favorece la brotación de turiones cuando esta por encima del 70%, esto en términos de producción (González y Fernández 1993), lo cual sucedió el transcurso de este trabajo. La humedad relativa en el invernadero estuvo entre 70 y 80%; en un número reducido de plantas se presentó la brotación de nuevos turiones un 10% de un total de 180 plantas. El viento no represento incidencia sobre el cultivo debido a la protección física que brindo el invernadero.

La obtención de plántulas in vitro de espárrago se ha realizado con diferentes variedades desde silvestres hasta clones e híbridos; la regeneración de un clon tetraploide del cultivo del callos de *A officinalis* L. con embriogénesis somática con una supervivencia del 80% la realizó Chitralkha (2003), la inducción del callo y de embriones de la antera, analizando los fitoreguladores de crecimiento para las variedades (Hanibal, Ariane, Alfa de Huchels y Huchels) con in porcentaje de inducción del callo del 58.8% realizada por Shalaby (2003), el

estudio acerca del cultivo de la antera del espárrago; influenciada por las condiciones del ambiente, genotipo y crecimiento de plantas donantes del explante en la respuesta androgenética para las variedades (Largo Grueso, Sartaguda, Blanco de Navarra, Minerva Y California 500) con porcentajes que van desde 10.00 % hasta 17.9% realizado por González (2002) y el trabajo realizado por Muñoz *et al* para la obtención de plantas de espárrago a partir de Los híbridos F1, en el cual se obtuvieron un 40% de plántulas haploides. Los cuatro trabajos evidencian que es posible trabajar con material vegetal de distintas variedades y características genéticas. En el presente trabajo se realizo con un híbrido var. ATLAS F1 donde se obtuvieron un 83.6% de callos (iniciación) y un 95.8% de plántulas sanas (multiplicación).

En la primera fase se obtuvieron callos que presentaron organogénesis indirecta y en la segunda fase se desarrollaron vástagos. Al finalizar la fase *in vitro*, las plántulas obtenidas pasaron a la fase *ex vitro* en condiciones de invernadero con temperatura promedio de 24 - 26°C, humedad relativa entre 70 y 80% y luz (6000 lux); el porcentaje de plántulas que se adaptaron fue del 76% para un total de 180 plantas. Para este logro en la adaptación fue necesario tener en cuenta factores como el invernadero cuya función principal era la protección a la temperatura; en las temporadas de invierno proporciona un control y un asilamiento a las bajas temperaturas y lluvias constantes y en verano donde se presentan altas temperaturas ha demostrado también una excelente protección para los cultivos de espárrago como lo han planteado y demostrado Gonzáles y Fernández (2003).

Otro factor de suma importancia es el cambio por la transición que se da de las plántulas obtenidas *in vitro* a la fase *ex vitro* es por eso que las plántulas obtenidas en el laboratorio deben ser vigorosas, para este trabajo se tuvieron en cuenta el abono, contenedor del abono, y dos componentes químicos sintetizados.

El abono orgánico utilizado en el presente trabajo fue el lombricompost, el cual era de origen bovino, teniendo en cuenta este factor y según Gómez (2000) pudo presentar las siguientes características: materia orgánica (20%), sustancias húmicas (ácidos húmicos 2.62% y fúlvicos 1.78% basados en porcentajes de carbono orgánico), poblaciones microbianas: (bacterias  $1.8 \times 10^8$ , actinomicetos  $2.8 \times 10^6$  y hongos  $2.0 \times 10^5$  células/g) y reguladores de crecimiento (giberelinas 2.75µg/g de GA<sub>3</sub>, citoquininas 1.05µg/g de IPA y auxinas 3.80µg/g de AAI) macro y micro elementos y pH cercano a 7 (neutralidad) este tipo de abonos tienen una ventaja que es la lenta liberación de los nutrientes almacenados, esta característica mantiene un equilibrio de los nutrientes en el suelo, lo que podría facilitar la absorción de los macro y micro elementos a través de las raíces, lo cual pudo promover un mejor crecimiento de las plantas.

A una parte de las plantas de este trabajo de investigación se les aportó lombricompost, suelo y arena en proporción (1:3) y al otro grupo se le aplicó suelo y arena en proporción (1:1) las plantas con el tratamiento de lombricompost presentaron una diferencia significativa en las variables biométricas evaluadas especialmente en la longitud y número de raíces como en la altura.

El desarrollo de las raíces se ve influenciado por la presencia del fósforo (Benages 1990), el cual podría estar presente en lombricompost utilizado, en este caso se pudo haber dado una asociación de las raíces con las micorrizas por acción del micoform lo que pudo aumentar su captación, lo que podría favorecer el crecimiento a nivel radicular; el potasio es el elemento más extraído por la planta y se refleja en la buena calidad de los turiones, este elemento promueve un aumento en la altura.

El calcio en suelos arenosos o arenosos-limosos influye en los rendimientos, aunque esta acción no dependa solo de él, si no de la relación Calcio/fósforo

(Ca/P) que debería estar en proporción de 3/1, y de la acidez del suelo que permitirá la solubilidad del fósforo (González y Fernández 1993). La importancia de este elemento pudo verse reflejada en la estructura de los tejidos vegetales como en la del suelo, pues se presentaron plantas bien desarrolladas y con buenas características fenotípicas.

El Nitrógeno influye en procesos de desarrollo y producción de las esparragueras, si es muy alta su proporción disminuye el número de turiones y el grosor de los mismos y malformaciones, aunque autores como González y Fernández (1993) no recomiendan su aplicación en pleno desarrollo de los plumeros lo cual consiste en el crecimiento de las yemas que más adelante formaran turiones que evolucionaran y constituirán la parte aérea de la planta. Una proporción alta de Nitrógeno podría estar presente en el lombricompostado empleado en el presente trabajo, debido a que de 180 plantas solo el 10% de ellas presentaron la brotación de nuevos turiones.

En el caso del magnesio la ausencia total de sintomatología externa producida por su carencia puede ocultar su importancia real; su papel queda definido por su carencia, ya que interviene en los contenidos minerales de la solución del suelo en relación con el potasio (potasio / magnesio) según Benages (1990). La ausencia de este elemento puede constituir un factor limitante del cultivo teniendo en cuenta que este elemento tiene una dinámica muy compleja ya que se puede lixiviar más fácilmente que el calcio pero si proviene de abonos orgánicos tiene menos peligro de pérdida Gómez (2000). Este elemento podría haber estado presente en el lombricompostado

El aporte de boro pudo ser suficiente ya que su deficiencia ocasiona clorosis mostrándose al principio amarillento de los cladiolos con posterior desecación y caída González y Fernández (1993). En este trabajo no se presentaron síntomas de clorosis y desecación por la ausencia del boro este elemento podría estar en el lombricompostado. Las plantas que se marchitaron

principalmente por pudrición, las raíces al estar expuestas a un volumen mayor de agua presentaron pudrición y posteriormente se presentó la desecación en la parte aérea de la planta. El porcentaje de plantas que murieron por este fenómeno fue del 21%.

Otros oligoelementos como Zinc y Manganeso podría haber estado presentes, pero su papel es menos importante en el caso del espárrago, a excepción de la carencia de Boro, el resto tiene una mínima expresión foliar en el caso del espárrago Benages (1990). La ausencia total de Magnesio no presenta una sintomatología externa, su carencia puede ocultar su importancia real; su papel queda definido por su carencia, ya que interviene en los contenidos minerales de la solución del suelo en relación con el potasio (potasio / magnesio), puede constituir un factor limitante del cultivo. Benages (1990).

Gómez (2000) plantea que los ácidos fúlvicos y húmicos tienen mejor acción cuando se refuerza con elementos nutritivos para mejorar el desarrollo en las plantas. Los ácidos fúlvicos actúan sobre los minerales del suelo y las plantas debido a su reactividad y bajo peso molecular; los ácidos húmicos actúan específicamente sobre el suelo con moléculas de mayor peso molecular. Teniendo en cuenta que estos componentes podrían estar presentes en el lombricompost se puede decir que tal vez facilitaron la asimilación de los nutrientes en las plantas de espárrago.

Según Gómez (2000) las poblaciones microbianas en el caso de que estuvieran presentes en el abono favorecerían la descomposición de la materia orgánica, pudiendo favorecer la liberación de nutrientes al suelo que posteriormente serían absorbidas por las plantas. Los reguladores de crecimiento que posiblemente se encontraban en el abono orgánico (lombricompost) estimularían la elongación celular, diferenciación de xilema y floema, enraizamiento, expansión foliar, retrasaron la senescencia foliar estimulando la movilización de nutrientes y la síntesis de clorofila todo esto por

acción de auxinas y citoquininas. Las giberelinas podrían haber incrementado la multiplicación y elongación celular ya que estas incrementan el número de células y la longitud de las mismas. (Pierik, 1990; Roca, 1991).

Los contenedores utilizados para el sustrato fueron vasos plásticos transparentes de 12 onzas con un volumen de 250 cm<sup>3</sup>, estos contenedores brindan un soporte estable además por ser claros no acumulan mucha temperatura en su interior, esto afectaría las plantas debido a que habría una mayor evaporación del agua contenida en estos recipientes. A todas las plantas se les aplico dos componentes para desarrollar y mejorar el enraizamiento; estos fueron el hormonagro y el mycoform.

El primero es un enraizador utilizado frecuentemente en agricultura, el cual contiene el fitoregulador llamado ácido indol acético (AIA) entre sus funciones principales están estimular los siguientes procesos: elongación celular, multiplicación celular en el cambium, diferenciación de xilema y floema, enraizamiento en los esquejes de tallos y desarrollo de raíces laterales, media en la respuesta fototrópica y geotrópica de las plantas, inhibe el desarrollo de las yemas laterales (dominancia apical), retrasa la senescencia de hojas e inhibe o promueve (vía estimulación del etileno) la abscisión de hojas y frutos García (2004).

Este producto se aplicó en la fase de invernadero en 2 etapas, en la primera etapa (15 días) todas las plantas estuvieron con suelo y arena esterilizada luego se realizó el cambio con dos tratamientos donde el grupo control (blanco o patrón) tenía suelo y arena en proporción (1:1) y suelo, arena y lombricompost en proporción (1:3) para el segundo tratamiento. El hormonagro fue aplicado en el inicio de cada fase con el fin de promover el crecimiento de nuevas raíces. Posiblemente este producto tuvo efecto sobre las plántulas, ya que se observó el desarrollo de raíces verdaderas a las dos semanas siguientes de haberlas transferido del laboratorio al invernadero.

Al mismo tiempo y con la misma frecuencia se aplicó mycoform en las dos etapas, este es un producto que contiene un isoflavanoide, la Formononetina naturalmente extraída de las raíces de las plantas. Lara (2006) afirma que este producto estimula la actividad y colonización de los hongos micorrícicos (VAM) en la zona de raíces

El producto mycoform es aplicado para acelerar el crecimiento de los hongos micorrícicos nativos del suelo; es compatible con polímeros, colorantes y tratamientos químicos (insecticidas y funguicidas) estimula el crecimiento de las hifas de hongos micorrícicos VAM e incrementa los niveles de colonización del sistema radical de las plantas; aumenta el tamaño, salud y los rendimientos de sus cultivos; es efectivo en suelos naturales o inoculados previamente; incrementa la absorción de fósforo y otros micro y macronutrientes; aumenta la emisión de nódulos y la fijación biológica de nitrógeno, y soporta el estrés hídrico de las plantas Lara (2006); este producto podría haberles permitido a las plantas la asociación de las raíces con las micorizas, aprovechar al máximo los nutrientes del suelo y los aportados por el abono orgánico.

Es importante mencionar que su acción pudo haberse reflejado en la segunda etapa pues las plantas con suelo y arena esterilizada no contenían ningún tipo de microorganismo como bacterias y hongos pues fueron sometidos a esterilización a 120°C, si su efecto se dio, fue en la segunda etapa cuando a las plantas se les aplicó tierra y arena sin esterilizar las cuales pondrían contener estos microorganismos.

Los resultados obtenidos de la evaluación en condiciones de laboratorio e invernadero del crecimiento vegetativo de plántulas de espárrago *Asparagus officinalis* L. obtenidas *in vitro*, se observó que los compuestos hormona y mycoform posiblemente promovieron el enraizamiento y pudieron estimular la asociación de las raíces con las micorizas que incidieron directamente en la absorción de nutrientes lo que favorecía a las plantas con abono orgánico (lombricompost), se obtuvieron plantas de excelente calidad libres de

patógenos, lo que nos permitiría a futuro establecer bancos de germoplasma para no depender de las semillas que representan un elevado costo para empresas y agricultores.



## 9. CONCLUSIONES

Se logró obtener plántulas de espárrago (*Asparagus officinalis* L.) de buena calidad por medio de la técnica de cultivo de tejidos por propagación *in vitro*.

La técnica de cultivo de tejidos en las fases de iniciación y multiplicación, presentó un alto rendimiento en la producción de plantas: en la fase de iniciación se obtuvo un 83.6% de callos de buena calidad a partir de las yemas axilares de la parte media superior del turión y en la fase de multiplicación se obtuvo un porcentaje del 95.8% de vástagos provenientes de la multiplicación y diferenciación celular.

Los compuestos hormonagro y mycoform podrían haber estado involucrados en la formación de raíces y la posible asociación de estas con las mycorizas, de ser así esto influyó en una mayor y mejor absorción de los nutrientes en la fase de adaptación a condiciones *ex vitro*.

El abono orgánico (lombricompuesto) empleado en uno de los tratamientos indicó ser un recurso orgánico adecuado para proporcionar la cantidad necesaria de nutrientes esenciales para el cultivo de espárragos *Asparagus officinalis* L tales como nitrógeno, fósforo y potasio al suelo y a las plantas, basado en que las plantas no presentaron una sintomatología por la ausencia de estos elementos como lo plantea González y Fernández (1993).

Se estandarizo la técnica de adaptación a condiciones de invernadero de plántulas de espárrago *Asparagus officinalis* L obtenidas en laboratorio, lo cual se plantea como una excelente alternativa en comparación con los cultivos tradicionales basados en la siembra de semillas y garras (corona del espárrago) lo que genera altos costos de inversión y manutención.

Para el cultivo *ex vitro* se lograron adaptar un 76% de las plantas de espárrago en la fase de invernadero para un total de 180.

Los análisis estadísticos en la evaluación del crecimiento vegetativo de las plantas de espárrago *Asparagus officinalis* L. demostraron una alta significancia estadística en todos los meses y para todas las variables biométricas alcanzando los mayores valores con el abono orgánico (lombricompuesto).

## 10. RECOMENDACIONES

Para el establecimiento del cultivo *in vitro* y la propagación de espárrago (*Asparagus officinalis* L.), es conveniente seleccionar el material vegetal en las esparragueras en época de verano debido a que en la época de invierno aumentan las precipitaciones lo que favorece el incremento en los brotes de hongos como *Cladosporium*, *Cercospora*, *Botrytis* y *Stemphylium* que afectan notablemente al cultivo y que se manifiestan en las plantas cultivadas en laboratorio.

Para los cultivos *in vitro* es necesario hacer una evaluación de la calidad fitosanitaria de la planta y tomar medidas de prevención con el fin de evitar que el material vegetal seleccionado este contaminado especialmente por hongos, por lo cual es necesario tomar muestras y fotos para que sean analizados por Ingenieros Agrónomos y Fitopatólogos que nos pueden ayudar a identificar y solucionar diferentes problemas.

En el laboratorio es indispensable manejar todos los protocolos de asepsia que incluyen la desinfección y desinfección los cuales hay que seguir estrictamente tanto en el material vegetal como en el personal que vaya a tener contacto con este.

Se recomienda trabajar con plantas jóvenes ya que poseen un mejor desarrollo de sus explantes lo que permite obtener explantes más reactivos, en este caso en particular yemas axilares de buen tamaño y con una mayor capacidad en la producción de plántulas en laboratorio.

En la utilización y manipulación de los explantes es indispensable contar con determinada destreza para la extracción de las yemas axilares.

Para la inoculación de los explantes es necesario hacerlo en el menor tiempo posible a fin de evitar su contaminación y oxidación.

En fase de preadaptación es conveniente contar con un invernadero, estructura en que ofrece un control físico ante las variaciones climatológicas que puedan afectar total o parcialmente el desarrollo de las plantas. Este debe tener una lámina plástica que disminuya la acción de los rayos ultravioleta y mantenga un control térmico, además de contar una buena ventilación y en lo posible que tenga riego para mantener la humedad relativa.

Las plantas que se trasladen al invernadero deben ser de aspecto vigoroso y con un buen desarrollo fisiológico; se recomienda también que la adaptación tenga dos etapas la primera de 15 días con sustrato, arena y suelo en proporción (1:1) previamente esterilizado y autoclavado a fin de evitar cualquier contaminación en las plántulas y luego emplear suelo, arena y abonos de buena calidad.

Para los contenedores del sustrato y las plantas se recomienda que posean un determinado volumen con el fin de promover un buen desarrollo radicular y que posean un buen número de orificios a fin de evacuar los excesos de agua y evitar la pudrición de las raíces y presencia de hongos.

Continuar con el estudio de las plantas obtenidas en laboratorio y adaptadas a invernadero, para evaluar su producción y resistencia a los patógenos en la fase de campo.

La experiencia del trabajo permitió reconocer la buena calidad biológica con base a características fenotípicas de las plántulas obtenidas a través de la técnica de cultivo de tejidos vegetales *in vitro*, lo que permitiría establecer a futuro un banco de germoplasma en asociación con una entidad de interés que se dedique a su investigación y manejo con el fin de brindar una alternativa viable en la producción de espárrago y el desarrollo de programas que beneficien a las empresas y agricultores.

## 11.BIBLIOGRAFIA.

BENAGES, S. 1990. El espárrago. Madrid: Mundi-Prensa, p.75-87.

BENSON, B; SOUTHER, F y BRAVO, A. 1987. "Tecnología de producción de espárrago." Curso, Departamento Agroindustrial Fundación Chile, Santiago de Chile, p.20-39.

BENSON, B.1998. California Asparagus seed and transplant, inc. Yield data on Asparagus cultivars, Apollo, Atlas F1 and Grande compared to UC 157 F1.

BEKHEET, S.A. 2000. In vitro preservation of *Asparagus officinalis* L. En: Biologia Plantarum. Vol. 43, No 14, p.179-183.

CASTRO, M y MOSELLA, L. 1991. Cultivo *in vitro* del espárrago. En: Boletín científico de la Asociación Colombiana de Estudios Vegetales *in vitro*. Vol.3, No.1, p.31-35

CHITRALEKHA, D; MUKHOPADHYAY, M.J and MUKHOPADHYAY, S. 2003. Regeneration of a tetraploid clone from callus culture of *Asparagus officinalis* L. through somatic embryogenesis. En: Cytologia. Vol. 68, No 19. p. 219-223.

DUANGPAENG, A; OKUDA, N; FUJIME, Y and SUZUKI, H. 2003. Effects of low temperature treatment on seedling growth and development of *Asparagus officinalis* L. *in vitro*. En: Technical Bulletin of the Faculty of Agriculture, Kagawa University. Vol. 55, No 12. p. 31-35.

FORTES, G. and PEREIRA, J. 2001. Effect of low temperature and growth retardants on in vitro conservation of asparagus. En: Revista Científica Rural. Vol. 6, No 13, p.181-186.

GARCIA, J F. 2004. Fitorreguladores, Universidad Politecnica de Valencia,ESPAÑA.

GOMEZ, J. 2000. Abonos orgánicos. Cali: Feriva, p.13-20.

GONZÁLES, A; FERANADEZ, J. A y BAÑON, S. 1993. Cultivo del espárrago verde en invernadero. Madrid: Mundi-Prensa, p.47-60.

GONZALEZ, M. L. 2002. Asparagus anther culture Influence of genotype and growth environment conditions of the donor plants on the androgenetic response. En: Acta Horticulture. Problema No.589, No 12, p.211-215.

GOREKCA, K. 2003. Micropropagation of asparagus (*Asparagus officinalis* L.) I. Multiplication *in vitro*. En: Vegetable Crops Research Bulletin. Vol. 59, No 13.p.27-35

LARA, A.2006.Tratamiento de semillas: nueva herramienta en le tratamiento de granos y cereales. Informacion tecnica:www.PHCmexico.com.mx.

KITTO, S.L. 1997. Commercial micropropagation. Hort Science, p32 (6): 1-3.

MROGINSKI, L.A. 1991. Establecimiento de cultivo de tejidos vegetales *in vitro*/W.M. Roca. En: Roca, W.M. Y L.A. Mroginski (Eds.). Cultivos de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones. Cali: CIAT, p. 10-12.

MURASHIGE, T. and SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, p15: 473-497.

MUÑOZ, S, *et al.* 2006. Obtención de plantas a partir de anteras de espárrago. (*Asparagus officinalis* L.). En: Revista de investigaciones de la facultad de ciencias agrarias. Numero IX. Universidad Nacional de Rosario.

PIERIK, R.L.M. 1990. Cultivo *in vitro* de las plántulas superiores. Madrid. p. 91-213.

ROCA, W. M. 1991. Establecimiento de un laboratorio de cultivo de tejidos vegetales. /L.A. Mroginski. En: Roca, W.M. y L.A. Mroginski (Eds.). Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones. Cali: CIAT. p. 2-17.

SALGADO, Catalina. 2002. Anatomía del desarrollo y estructura de embriones somáticos de espárrago *Asparagus officinalis* L cultivados *in vitro*. Trabajo de pregrado en Biología, Universidad del Cauca, Popayán, p.27-28.

SHALABY, T; HANEKLAUS, S and SCHNUG, E. 2003. Influence of growth regulators and cultivar on callus and embryo induction in anther cultures of asparagus (*Asparagus officinalis* L.) En: Landbauforschung Völkenrode. Vol. 53, No 4, p.217-221.

SHIGETA, Jun-ichi, *et al.* 1996. Efficient plant regeneration of *Asparagus* by inducing normal roots from *in vitro* multiplied shoot explants using gellan gum and glucose. En: Plant Science. Vol.56, No. 113, p.99-101.

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

SMITH, S.M. y STREET, H.E. 1992. The decline of embryogenic potential as callus and suspension cultures of cariot (*Daucus carota* L.) a serially subcultured. Ann. Bot. 38: 223-241.