

ORGANOGENESIS DE RIZOMA DE ESPÁRRAGO (*Asparagus officinalis* L.) POR COMBINACIÓN DE AUXINAS Y CITOCININAS

ASPARAGUS (*Asparagus officinalis* L.) RHIZOME ORGANOGENESIS BY COMBINING AUXINS AND CYTOKININS

Gabriela Millán-Soto¹, Manuel L. Robert², Martín E. Tiznado-Hernández¹, Aldo Gutiérrez¹, Martín Esqueda^{1*}

¹Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Apartado Postal 1735. 83304. Hermosillo, Sonora, México. (esqueda@ciad.mx). ² Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. Calle 43 No. 130, Colonia Chuburná de Hidalgo. 97200. Mérida, Yucatán, México.

RESUMEN

La propagación *in vitro* es una alternativa para incrementar los propágulos viables de espárrago (*Asparagus officinalis* L.). Uno de los principales factores que influyen en el éxito de los protocolos *in vitro* es la concentración de reguladores de crecimiento en el medio de cultivo; las auxinas y citocininas son las más utilizadas. La hipótesis del estudio fue que la generación y la biomasa de brotes del explante aumentan con el balance óptimo de auxinas y citocininas. El objetivo fue evaluar el efecto de auxinas y citocininas en el desarrollo *in vitro* de espárrago. El experimento se estableció con un diseño completamente al azar y arreglo factorial $2 \times 3 \times 2 \times 4$ (tipo de citocinina, concentración de citocinina, tipo de auxina, concentración de auxina) y 48 tratamientos con tres repeticiones cada uno. Los rizomas se cultivaron en medios adicionados con citocininas, 6-bencilaminopurina (BAP) y cinetina (KIN), y auxinas, ácido indolbutírico (IBA) y ácido naftalenacético (ANA), con tres concentraciones de citocininas (0.0, 0.5 y 1.0 mg L⁻¹) y cuatro de auxinas (0.0, 0.1, 0.5 y 1.0 mg L⁻¹). Con 21 d de incubación la producción mayor de turiones (43.3±1.1 brotes) se obtuvo con 1 mg L⁻¹ BAP + 0.1 mg L⁻¹ IBA. Con 0.5 mg L⁻¹ BAP + 0.5 mg L⁻¹ ANA a las 8 semanas de cultivo *in vitro* el incremento mayor de biomasa fresca fue 7.12±0.8 g. El enraizamiento alcanzó 66.6 % y la tasa de multiplicación de 3.3 rizomas por explante. BAP fue importante para yemas vegetativas y KIN indujo la elongación del turión. IBA y ANA fueron esenciales para la formación del sistema radicular. El balance de las concentraciones de citocininas y auxinas es necesario para lograr organogénesis de espárrago.

Palabras clave: *Asparagus officinalis* L., auxinas, brotes, citocininas, propagación *in vitro*, rizoma.

ABSTRACT

In vitro propagation is an option for increasing viable asparagus (*Asparagus officinalis* L.) propagules. One of the main factors that have an influence in the success of *in vitro* protocols is the concentration of growth regulators in the culture medium; of these regulators, auxins and cytokinins are the most used. The hypothesis of the study was that the generation and biomass of shoots from the explant increase with the optimal balance of auxins and cytokinins. The objective was to evaluate the effect of auxins and cytokinins on asparagus development *in vitro*. The experiment was established with a completely randomized design and a $2 \times 3 \times 2 \times 4$ factorial arrangement (type of cytokinin, concentration of cytokinin, type of auxin, concentration of auxin) and 48 treatments with three replications each. Rhizomes were cultivated in media to which cytokinins, 6 benzyl aminopurine (BAP) and kinetin (KIN) and the auxins, indole butyric acid (IBA) and acetic naphthalene acid (ANA) were added at three concentrations of cytokinins (0.0, 0.5 and 1.0 mg L⁻¹) and four of auxins (0.0, 0.1, 0.5 and 1.0 mg L⁻¹). After 21 d of incubation, the highest production of turions (43.3±1.1 shoots) was obtained with 1 mg L⁻¹ BAP + 0.1 mg L⁻¹ IBA. With 0.5 mg L⁻¹ BAP + 0.5 mg L⁻¹ ANA after eight weeks of *in vitro* culture, the largest increase of fresh biomass was 7.12±0.8 g. Rooting reached 66.6 % and the multiplication rate was 3.3 rhizomes per explant. BAP was important for vegetative buds and KIN induced turion elongation. IBA and ANA were essential for the formation of the root system. The balance of cytokinin and auxin concentrations is necessary for asparagus organogenesis.

Key words: *Asparagus officinalis* L., auxins, shoots, cytokinins, *in vitro* propagation, rhizome.

* Autor responsable ♦ Author for correspondence.

Recibido: febrero, 2018. Aprobado: abril, 2018.

Publicado como ARTÍCULO en Agrociencia 53: 549-561. 2019.

INTRODUCCIÓN

El espárrago (*Asparagus officinalis* L.) es una planta herbácea, perenne, monocotiledónea y dioica que crece en climas templados y subtropicales. Esta especie es la más importante del género, se cultiva como hortaliza para producir turiones con propiedades nutricionales sobresalientes (Máthé *et al.*, 2015). Los turiones son brotes vegetativos que se originan de yemas de tallos subterráneos, los cuales actúan como unión entre el sistema radical y la sección vegetativa de la planta (López y Cointry, 2008). El cultivo del espárrago en el mundo tiene importancia económica porque la superficie destinada a su cultivo es similar a la de otras hortalizas como ajo (*Allium sativum* L.), pimiento (*Capsicum annuum* L.), zanahoria (*Daucus carota* L.) o berenjena (*Solanum melongena* L.). Según la FAO, en 2016 la producción mundial de espárrago fue 8 726 726 t, y China fue el productor mayor con 7 682 797 t. México ocupó el tercer lugar en producción con 216 871 t obtenidas en 24 791 ha (FAO, 2018). En 2017 el estado con mayor producción de espárrago fue Sonora, con 144 765 t en 14 762 ha y de esta cantidad, cerca de 90 % se exportó a EUA, Canadá, Europa y Japón. Lo anterior genera jornales y divisas para la región y el país (SIAP, 2018).

La demanda nacional de espárrago ha aumentado y las tendencias del mercado se encaminan hacia la producción de cultivares de alto rendimiento. En este contexto, la propagación *in vitro* es una alternativa para aumentar la producción de propágulos a corto plazo y calidad alta. Los protocolos usados actualmente para la micropropagación se consideran lentos e ineficientes por sus porcentajes bajos de regeneración de plantas y formación de raíces, tiempo prolongado de manipulación y dificultad técnica (Desjardins, 1992; Asprelli *et al.*, 2002; Bojnauth *et al.*, 2004; Pontaroli y Camadro, 2005; Fazeltzadeh *et al.*, 2013).

Una opción para mejorar la eficiencia del proceso de propagación *in vitro* es modificar la composición química del medio de cultivo. Entre los componentes a evaluar están las fitohormonas o reguladores de crecimiento porque son mensajeros químicos que regulan el crecimiento y desarrollo de las plantas (Ren *et al.*, 2012). Las auxinas, como el ácido naftalenacético (ANA) y ácido indolbutírico (IBA), inducen la formación de raíces y elongación de los brotes en diversas especies; las citocininas, como la 6-bencilaminopurina

INTRODUCTION

Asparagus (*Asparagus officinalis* L.) is a herbaceous, perennial, monocotyledon and dioicous plant that grows in temperate and subtropical climates. This is the most important species of the genus, cultivated as a vegetable to produce turions that have outstanding nutritional properties (Máthé *et al.*, 2015). Turions are vegetative shoots that grow from underground stem buds, which act as the link between the root system and the vegetative section of the plant (López and Cointry, 2008).

Worldwide, the cultivation of asparagus is economically important because the area dedicated to its production is similar to that of other vegetables such as garlic (*Allium sativum* L.), pepper (*Capsicum annuum* L.), carrots (*Daucus carota* L.) or eggplant (*Solanum melongena* L.). According to the FAO, in 2016 world production of asparagus was 8 726 726 t, and China was the largest producer with 7 682 797 t. Mexico is third in production with 216 871 t obtained from 24 791 ha (FAO, 2018). In 2017 the state with the highest asparagus production was Sonora, with 144 765 t on 14 762 ha. Of this production, almost 90% is exported to the USA, Canada, Europa and Japan. This generates employment and foreign currency for the region and the country (SIAP, 2018).

Domestic demand for asparagus has increased and market trends are motivating production of high-yielding cultivars. In this context, *in vitro* propagation is an option for increasing production of high-quality propagules in a short time. The protocols used for micropropagation are considered slow and inefficient because of the low percentages of plant regeneration and root formation, prolonged time of manipulation and technical difficulties (Desjardins, 1992; Asprelli *et al.*, 2002; Bojnauth *et al.*, 2004; Pontaroli and Camadro, 2005; Fazeltzadeh *et al.*, 2013).

One option for improving the efficiency of the *in vitro* propagation process is to modify the chemical composition of the culture medium. Among the components to evaluate are phytohormones or growth regulators, chemical messengers that regulate plant growth and development (Ren *et al.*, 2012). Auxins, such as acetic naphthalene acid (ANA) and indole butyric acid (IBA), induce root formation and elongation of shoots in diverse species. Cytokinins, such as 6-benzyl aminopurine (BAP) and kinetin

(BAP) y la cinetina (KIN), estimulan la división celular y la formación de yemas vegetativas (Taiz y Zeiger, 2010).

Según Fazelzadeh *et al.* (2013), la combinación de 1 mg L⁻¹ BAP y 0.5 mg L⁻¹ ANA permite obtener 22 brotes de espárrago. Caro *et al.* (2010) obtuvieron uno o dos brotes por explante con 0.7 mg L⁻¹ KIN, 0.5 mg L⁻¹ ANA y 2 mg L⁻¹ ancimídol. Estos resultados sugieren que la respuesta de la planta *in vitro* depende del tipo, la concentración y la combinación de reguladores de crecimiento. La hipótesis de este estudio fue que la generación y la biomasa acumulada en los brotes del explante de espárrago aumentan con el balance óptimo de auxinas y citocininas. El objetivo fue evaluar el efecto de auxinas y citocininas en el desarrollo de rizomas de espárrago micropropagado.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los rizomas de espárrago utilizados fueron de la variedad Early California, proporcionados en una plantación comercial del municipio de Caborca, Sonora, México. Los rizomas se establecieron en condiciones *in vitro* y de ellos se obtuvieron las yemas vegetativas que constituyeron los explantes; el exceso de suelo, los tallos aéreos y las raíces se eliminaron con agua destilada jabonosa y una desinfección preliminar con una solución de Ca(ClO)₂ a 40 %, por 30 min. Después tres enjuagues con agua destilada estéril y se eliminaron las brácteas más superficiales.

Los brotes vegetativos se desinfectaron, en condiciones asépticas, con solución de NaClO a 30 %, por 25 min. El tejido dañado por el tratamiento de desinfección se eliminó de los brotes vegetativos. Cada explante se sembró en 25 mL de medio de cultivo modificado de Murashige y Skoog (1962) (MS), más un suplemento con sacarosa comercial y agar-agar (AGARMEX, México). Los explantes se mantuvieron 30 d en una cámara para crecimiento, a 25±2 °C, 80 % de humedad relativa y ciclo de 12 h de luz blanca-oscuridad.

El material se multiplicó con resiembra *in vitro* cada 45 d, en condiciones asépticas en una cámara horizontal de flujo laminar (LABCONCO® Purifier™ Clean Bench, USA). Un explante por caja magenta se sembró en 50 mL de medio de cultivo MS modificado, adicionado con 30 g L⁻¹ de sacarosa comercial, 1.6 g L⁻¹ de agar-agar (AGARMEX, México), 1.6 g L⁻¹ de gelano Gelzan™ CM (Sigma, EUA) y sin hormonas. El pH de los medios se ajustó a 5.75 y se esterilizaron en autoclave (20 min a 121 °C y 1.05 kg cm⁻² de presión). Los rizomas se mantuvieron en un cuarto de crecimiento con fotoperiodo de 12 h suministrado por tubos fluorescentes a 25±2 °C. Los rizomas se dividieron con cortes específicos en el tejido al finalizar cada ciclo de multiplicación.

(KIN), stimulate cell division and formation of vegetative buds (Taiz and Zeiger, 2010).

According to Fazelzadeh *et al.* (2013), with the combination of 1 mg L⁻¹ BAP and 0.5 mg L⁻¹ ANA 22 asparagus shoots can be obtained. Caro *et al.* (2010) obtained one or two shoots per explant with 0.7 mg L⁻¹ KIN, 0.5 mg L⁻¹ ANA and 2 mg L⁻¹ ancymidol. These results suggest that *in vitro* plant response depends on the type, concentration and combination of growth regulators. The hypothesis of this study was that generation of and biomass accumulation in asparagus explant shoots increase with the optimal balance of auxins and cytokinins. The objective was to evaluate the effect of auxins and cytokinins on development of micropropagated asparagus rhizomes.

MATERIALS AND METHODS

The asparagus rhizomes used were of the Early California variety, provided by a commercial plantation in the municipality of Caborca, Sonora, Mexico. The rhizomes were established *in vitro*, and from these the vegetative buds that constituted the explants were obtained. Excess soil, stems and roots were eliminated with soapy distilled water and preliminary disinfection was done with a 40 % solution of Ca(ClO)₂ for 30 min. After three rinses with distilled sterile water, the most superficial bracts were eliminated.

The vegetative shoots were disinfected in aseptic conditions with a 30 % solution of NaClO for 25 min. Tissue damaged by the disinfection treatment was eliminated from the vegetative shoots. Each explant was seeded in 25 mL modified Murashige and Skoog (1962) culture medium (MS) supplemented with commercial sucrose and agar-agar (AGARMEX, Mexico). The explants were maintained 30 d in a growing chamber at 25±2 °C, 80 % relative humidity and 12 h cycle of white light-darkness.

The material was multiplied by reseeded *in vitro* every 45 d under aseptic conditions in a horizontal laminar flow chamber (LABCONCO® Purifier™ Clean Bench, USA). One explant per magenta box was seeded in 50 mL modified MS culture medium, supplemented with 30 g L⁻¹ commercial sucrose, 1.6 g L⁻¹ agar-agar (AGARMEX, México), 1.6 g L⁻¹ gelano Gelzan™ CM (Sigma, USA) and without hormones. pH of the media was adjusted to 5.75 and the media were sterilized in an autoclave (20 min at 121 °C and 1.05 cm⁻² pressure). The rhizomes were kept in a growing chamber with a photoperiod of 12 h supplied by fluorescent tubes and temperature of 25±2 °C. The rhizomes were divided with specific cuts in the tissue at the end of each multiplication cycle.

Del material vegetal se separaron aleatoriamente 144 rizomas y sus brotes se cortaron hasta la base (Figura 1A). Estos se cultivaron en medio MS modificado con tres concentraciones de citocininas BAP y KIN (0.0, 0.5 y 1.0 mg L⁻¹) y cuatro de auxinas IBA y ANA (0.0, 0.1, 0.5 y 1.0 mg L⁻¹), y permanecieron 16 semanas *in vitro* y condiciones similares a la fase de multiplicación.

El experimento se estableció con un diseño completamente al azar y arreglo multifactorial 2 × 3 × 2 × 4 (tipo de citocinina, concentración de citocinina, tipo de auxina, concentración de auxina), y 48 tratamientos con tres repeticiones cada uno. A los 21 d de cultivo *in vitro* se evaluó el número de brotes o turiones, longitud de los brotes (cm) y presencia o ausencia de hiperhidratación y engrosamiento del turión. El aumento de peso fresco (total, rizoma y turiones, en g) y el porcentaje de enraizamiento se registraron a las 8 semanas, y los rizomas se mantuvieron en medio sin reguladores de crecimiento por 8 semanas adicionales. Al final, se evaluó la tasa de multiplicación y la presencia o ausencia de hiperhidratación. La estadística descriptiva se usó y con los datos de las variables medidas se realizó un ANDEVA y la comparación de medias de Tukey ($p \leq 0.05$) (SAS, 2009).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La formación de turiones a partir de rizoma se observó desde el tercer día. Esta respuesta rápida y positiva del tejido puede atribuirse a la calidad del explante y al número de yemas vegetativas en cada rizoma. La concentración de los reguladores de crecimiento también puede modificar este comportamiento. El desarrollo de brotes se atribuye principalmente a la presencia de citocininas en el medio de cultivo, ya que estas hormonas incrementan el contenido de clorofila a través de la diferenciación de cloroplastos y por consiguiente la capacidad fotosintética (Ángeles-Espino *et al.*, 2012).

La interacción de las citocininas con las auxinas en el crecimiento y desarrollo de los rizomas micropropagados fue significativa. Los tratamientos más efectivos para la formación de turiones fueron T10 (1 mg L⁻¹ BAP + 0.1 mg L⁻¹ IBA), con producción media de 43.3±1.1 brotes (Cuadro 1, Figura 1B-D) T5, T7, T9, T11 y T12 (de la interacción BAP-IBA); entre estos y T17, T18, T21 y T23 (de la interacción BAP-ANA) no se detectaron diferencias estadísticas. Esto indica que existió efecto mayor de BAP en combinación con las auxinas IBA y ANA en la formación de brotes, en comparación con la citocinina KIN combinada con IBA y ANA. Este comportamiento puede estar asociado al tipo de citocinina, a la

From the plant material, 144 rhizomes were separated at random and their shoots were cut to the base (Figure 1A). These were cultivated in modified MS medium with three concentrations of cytokinins BAP and KIN (0.0, 0.5 and 1.0 mg L⁻¹) and four concentrations of auxins IBA and ANA (0.0, 0.1, 0.5 and 1.0 mg L⁻¹). The cultures remained 16 weeks *in vitro* and in conditions similar to those of the multiplication phase.

The experiment was established with a completely randomized design and a 2 × 3 × 2 × 4 multifactorial array (type of cytokinin, concentration of cytokinin, type of auxin, concentration of auxin) and 48 treatments replicated three times each. After 21 d of *in vitro* culture, the number of shoots or turions, shoot length (cm) and presence or absence of hyperhydration, and turion thickness were evaluated. The increase in fresh weight (total, rhizome and turions, g) and the percentage of rooting were recorded at 8 weeks, and the rhizomes were kept in medium without growth regulators for an additional 8 weeks. Finally, the rate of multiplication and presence or absence of hyperhydration were evaluated. Descriptive statistics were used and, with the data of the measured variables, an ANOVA and Tukey comparison of means ($p \leq 0.05$) were performed (SAS, 2009).

RESULTS AND DISCUSSION

Formation of turions from the rhizome was observed as of the third day. This rapid positive response of the tissue could be attributed to explant quality and number of vegetative buds on each rhizome. The concentration of growth regulators could also have modified this behavior. Shoot development is attributed mainly to the presence of cytokinins in the culture medium since these hormones increase the chlorophyll content by differentiation of chloroplasts and therefore increase photosynthetic capacity (Ángeles-Espino *et al.*, 2012).

The interaction of the cytokinins with auxins in the growth and development of the micropropagated rhizomes was significant. The most effective treatments for turion formation were T10 (1 mg L⁻¹ BAP + 0.1 mg L⁻¹ IBA), with a mean production of 43.3±1.1 shoots (Table 1, Figure 1B-D) T5, T7, T9, T11 and T12 (of the interaction BAP-IBA). Between the latter treatments and T17, T18, T21 and T23 (of the interaction BAP-ANA) no statistical differences were detected. This indicates that there was a greater effect of BAP in combination with the auxins IBA and ANA on shoot formation than of KIN combined with IBA and ANA. This behavior

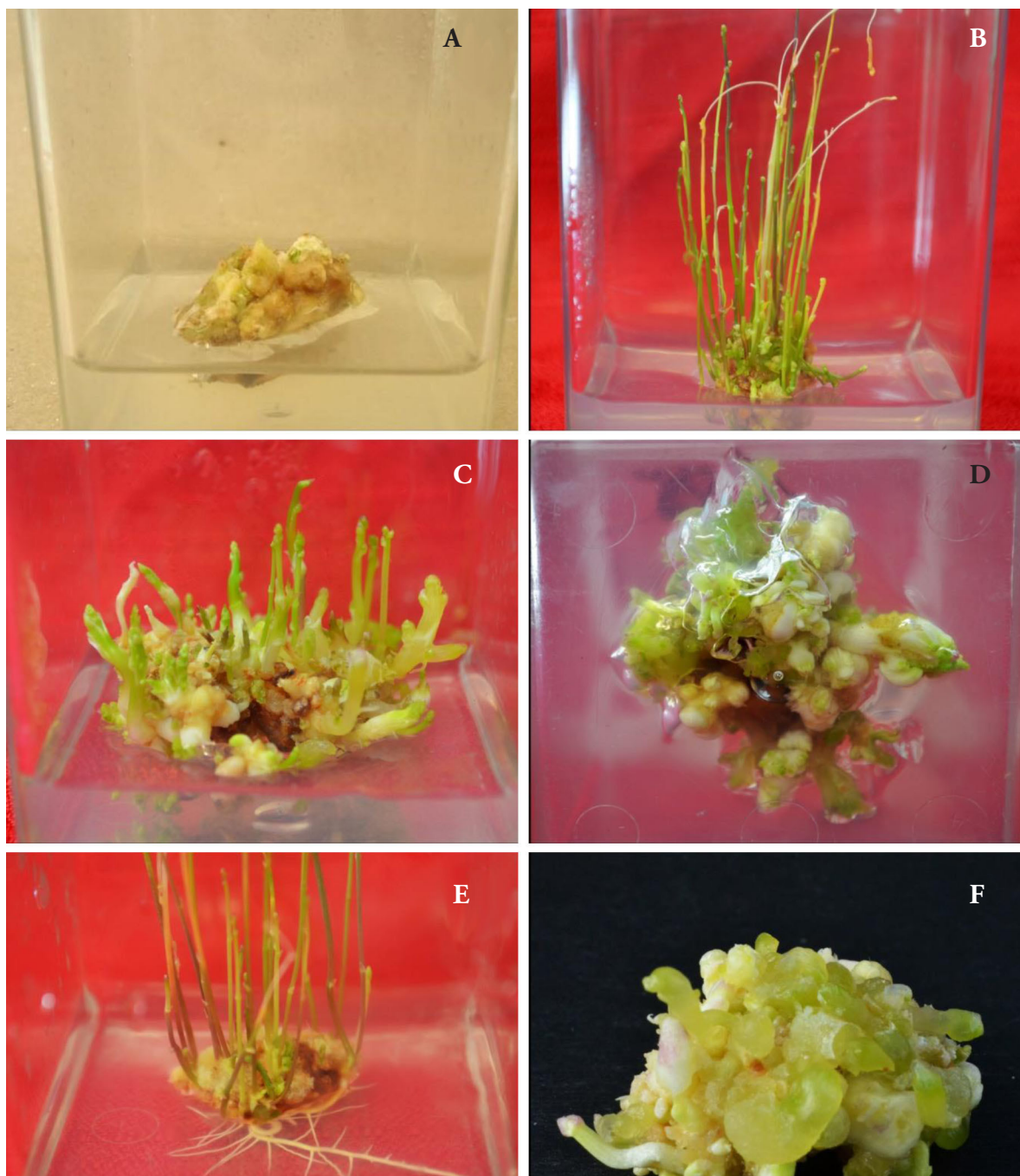


Figura 1. Efecto de auxinas y citocininas en el crecimiento y desarrollo *in vitro* de espárrago (*Asparagus officinalis*). A) Explante-rizoma de espárrago después del corte de los brotes, B) control (sin reguladores de crecimiento), C) producción de brotes, engrosamiento del turión e incremento de peso del rizoma por efecto de BAP (6-bencilaminopurina), D) vista inferior donde se observa la formación de yemas vegetativas por influencia de BAP, E) desarrollo de raíz por la interacción KIN (cinetina)- ANA (ácido naftalenacético) y F) apariencia acuosa y turiones deformes característicos de hiperhidratación.

Figure 1. Effect of auxins and cytokinins on *in vitro* growth and development of asparagus (*Asparagus officinalis*). A) Asparagus rhizome explant after cutting shoots, B) control (no growth regulators), C) shoot production, turion thickening and increase in rhizome weight by effect of BAP (6-benzyl amino purine), D) lower view of site where vegetative buds form by influence of BAP, E) root development by interaction of KIN (kinetin)- ANA (acetic naphthalene acid) and F) aqueous appearance and deformed turions characteristic of hyperhydration.

Cuadro 1. Efecto de auxinas y citocininas en la producción de brotes, vitrificación y engrosamiento del turión de espárrago (*Asparagus officinalis*) a los 21 d de cultivo *in vitro*.

Table 1. Effect of auxins and cytokinins on asparagus (*Asparagus officinalis*) shoot production, vitrification and turion thickness at 21 days of *in vitro* culture.

Tratamiento	Concentración (mg L ⁻¹)				Producción media de brotes/turiones	Tukey (p≤0.01)	Intensidad de vitrificación	Engrosamiento del turión
	BAP	KIN	IBA	ANA				
T1	0		0		21.6±1.1	ghijklmn	¶	¶
T2	0		0.1		24.6±3.7	efghijkl	¶	¶
T3	0		0.5		16.6±1.1	jklmnopq	¶	¶
T4	0		1		29.0±3.0	cdefghi	§	†
T5	0.5		0		37.3±0.5	abc	§	†
T6	0.5		0.1		23.3±0.5	fghijklm	§	†
T7	0.5		0.5		37.6±4.1	abc	§	†
T8	0.5		1		30.0±3.6	cdefg	¶	†
T9	1		0		35.6±1.5	abcde	¶	†
T10	1		0.1		43.3±1.1	a	¶	†
T11	1		0.5		36.0±6.0	abcd	¶	†
T12	1		1		32.3±1.5	abcdefg	¶	†
T13	0			0	21.6±1.1	ghijklmn	¶	¶
T14	0			0.1	18.6±2.5	ijklmnop	¶	¶
T15	0			0.5	20.6±2.5	hijklmno	¶	¶
T16	0			1	10.3±0.5	opqrs	¶	¶
T17	0.5			0	42.0±1.0	ab	§	†
T18	0.5			0.1	34.6±2.3	abcde	¶	†
T19	0.5			0.5	27.3±0.5	cdefghij	¶	†
T20	0.5			1	18.0±1.0	ijklmnopq	¶	†
T21	1			0	34.3±2.0	abcdef	§	†
T22	1			0.1	28.6±4.7	cdefghi	¶	†
T23	1			0.5	34.0±1.0	abcdef	¶	†
T24	1			1	13.6±1.1	lmnopqrs	¶	†
T25		0	0		21.6±1.1	ghijklmn	¶	¶
T26		0	0.1		7.6±2.3	pqrs	¶	¶
T27		0	0.5		10.3±2.5	opqrs	¶	¶
T28		0	1		13.6±0.5	lmnopqrs	¶	¶
T29		0.5	0		9.0±4.3	pqrs	¶	¶
T30		0.5	0.1		12.0±5.2	nopqrs	¶	¶
T31		0.5	0.5		5.0±1.0	rs	¶	¶
T32		0.5	1		11.0±1.0	nopqrs	¶	¶
T33		1	0		26.0±3.0	defghijk	¶	¶
T34		1	0.1		10.3±0.5	opqrs	¶	¶
T35		1	0.5		29.0±1.0	cdefghi	§	†
T36		1	1		32.0±1.0	bcdefg	§	†
T37		0		0	21.6±1.1	ghijklmn	¶	¶
T38		0		0.1	14.6±7.3	lmnopqr	¶	¶
T39		0		0.5	3.3±1.5	s	¶	¶
T40		0		1	8.0±0.0	pqrs	¶	¶
T41		0.5		0	18.6±2.0	ijklmnop	¶	¶
T42		0.5		0.1	15.3±0.5	klmnopqr	¶	¶
T43		0.5		0.5	4.3±2.0	rs	¶	¶
T44		0.5		1	7.0±6.0	qrs	¶	¶
T45		1		0	12.3±3.0	mnopqrs	§	†
T46		1		0.1	18.3±2.0	ijklmnop	*	†
T47		1		0.5	21.3±7.0	ghijklmno	¶	†
T48		1		1	22.0±1.0	ghijklmn	¶	†

Los valores representan la media ± desviación estándar. Letras diferentes en una hilera son estadísticamente diferentes (Tukey; p≤0.01) (n=3). BAP: 6-bencilaminopurina, KIN: cinetina, IBA: ácido indolbutírico, ANA: ácido naftalenacético; (†): Presente, (¶): ausente, (*): vitrificación moderada y (°): vitrificación alta ♦ Values represent the mean ± standard deviation. Different letters in a row are statistically different (Tukey; p≤0.01) (n=3). BAP: 6-benzyl amino purine, KIN: kinetin, IBA: indole butyric acid, ANA: naphthalene acetic acid; (†): Present, (¶): Absent, (*): Moderate vitrification and (°): High vitrification.

concentración hormonal, su actividad en el medio de cultivo y al número de receptores en el tejido (Curtis *et al.*, 2008).

La combinación de dos o más reguladores de crecimiento, aplicados simultáneamente o en secuencia, es necesaria para lograr la regeneración (Gaspar *et al.*, 1996). En algunos estudios las citocininas mostraron actividad alta, pero sólo en presencia de auxinas. En este caso, se puede prescindir de las auxinas IBA y ANA, pues los tratamientos T5, T9, T17 y T21 sólo ocuparon la citocinina BAP para la regeneración mayor de turiones. La totipotencia de la célula vegetal (capacidad de realizar la división celular) se estimula por la adición de este regulador que actúa en el ciclo celular. Esto difiere de lo reportado por Caro *et al.* (2010). En nuestro estudio la combinación para obtener el porcentaje mayor de los genotipos de espárrago ensayados, variedad Morado de Huétor, fue KIN 0.7 mg L⁻¹, ANA 0.5 mg L⁻¹ y ancimídol 2 mg L⁻¹, y para la variedad UC-157 fue KIN 0.5 mg L⁻¹, ANA 0.3 mg L⁻¹ y ancimídol 1.3 mg L⁻¹. En ambas variedades la producción media de turiones fue 1 o 2 brotes por explante, y esta capacidad inductora de brotes se atribuyó a la acción de KIN y ANA. En nuestro estudio también se usaron yemas vegetativas del rizoma como explantes pero con dimensiones de entre 0.1 y 0.3 cm, los cuales se cultivaron de forma individualizada.

Carmona-Martín *et al.* (2014) también cultivaron *in vitro* yemas vegetativas provenientes del rizoma de la variedad Morado de Huétor, con una talla de 0.2 a 0.5 cm, cultivados individualmente; ellos concluyeron que la mejor citocinina fue KIN combinada con ANA. La mayor producción de brotes fue 4.4 con el medio de cultivo adicionado con 0.7 mg L⁻¹ KIN, 0.5 mg L⁻¹ ANA y 2 mg L⁻¹ ancimídol, además 85.7 mg L⁻¹ de EDDHA-Fe. En nuestro estudio la producción de turiones fue superior lo cual confirmó que la respuesta de las células, tejidos y órganos depende de las condiciones del cultivo, tipo de explante y genotipo (Gaspar *et al.*, 1996).

En otras investigaciones se obtuvieron resultados similares a los de este estudio, y en ellas se concluyó que las concentraciones bajas de BAP favorecen el desarrollo de los brotes en combinación con otros reguladores de crecimiento. Este fue el caso de 0.5 mg L⁻¹ BAP + 0.015 mg L⁻¹ ANA que produjo 20.5 brotes por explante (Bojnauth *et al.*, 2004). Con 1 mg L⁻¹ BAP + 0.5 mg L⁻¹ ANA se obtuvieron 22 brotes por explante mediante la inducción de callo y regeneración de plántulas (Fazelzadeh *et al.*, 2013).

could be associated to the type of cytokinin, the hormone concentration, its activity in the culture medium and to the number of receptors in the tissue (Curtis *et al.*, 2008).

The combination of two or more growth regulators applied simultaneously or in sequence is necessary to achieve regeneration (Gaspar *et al.*, 1996). In some studies, cytokinins have shown intense activity, but only in the presence of auxins. In this case, the auxins IBA and ANA can be omitted since in treatments T5, T9, T17 and T21, only BAP was used for greater regeneration of turions. The totipotential of the plant cell (the capacity to carry out cell division) is stimulated by the addition of this regulator, which acts in cell cycle. This differs from that reported by Caro *et al.* (2010). In our study, the combination for obtaining the highest percentage of asparagus genotypes assayed, variety Morado de Huétor, was KIN 0.7 mg L⁻¹, ANA 0.5 mg L⁻¹ and ancymidol 2 mg L⁻¹, and for the variety UC-157 it was KIN at 0.5 mg L⁻¹, ANA at 0.3 mg L⁻¹ and ancymidol at 1.3 mg L⁻¹. Both varieties produced a turion mean of 1 or 2 shoots per explant, and this shoot-inducing capacity is attributed to the action of KIN and ANA. In our study, we also used vegetative buds from the rhizome as explants, but their dimensions were between 0.1 and 0.3 cm, and they were cultured individually.

Carmona-Martín *et al.* (2014) also individually cultured vegetative buds from the rhizome of the Morado de Huétor variety with stems 0.2 to 0.5 cm *in vitro*; they concluded that the best cytokinin was KIN combined with ANA. The highest production of shoots was 4.4 in the culture medium to which 0.7 mg L⁻¹ KIN, 0.5 mg L⁻¹ ANA and 2 mg L⁻¹ ancymidol, as well as 85.7 mg L⁻¹ EDDHA-Fe, were added. In our study turion production was higher, confirming that cell, tissue and organ response depends on the culture conditions, type of explant and genotype (Gaspar *et al.*, 1996).

Other studies have obtained results similar to those reported in this study and they have concluded that low concentrations of BAP in combination with other growth regulators favor shoot development. This was the case of 0.5 mg L⁻¹ BAP + 0.015 mg L⁻¹ ANA, which produced 20.5 shoots per explant (Bojnauth *et al.*, 2004). With 1 mg L⁻¹ BAP + 0.5 mg L⁻¹ ANA, 22 shoots per explant were obtained by callus induction and plantlets regeneration (Fazelzadeh *et al.*, 2013).

En *A. racemosus* Willd., con importancia medicinal, la mejor respuesta a la multiplicación de brotes se obtuvo con 1.0 mg L⁻¹ BAP + 1.0 mg L⁻¹ IBA (Patel y Patel, 2015), como en nuestra investigación. En *A. stipularis* Forssk., espárrago con relevancia comercial, la mejor combinación fue BAP 2.0 mg L⁻¹ + ANA 0.5 mg L⁻¹ (Ulukapi *et al.*, 2014), es decir, concentración doble respecto al presente estudio. Esto indica que la respuesta a los reguladores de crecimiento difiere entre especies y variedades de la misma especie. Por tanto, los protocolos parecen específicos para la propagación *in vitro*.

La concentración mayor de BAP en combinación con IBA y ANA redujo la longitud de los brotes, pero la producción media de turiones aumentó. Al contrario, en presencia de KIN la longitud de los brotes aumentó pero la formación de turiones disminuyó, comparado con el efecto de BAP (Cuadro 1, Figura 2). Así, BAP tiene un efecto como activador de yemas vegetativas y KIN se asocia con la elongación del turión. También se observó que el aumento en la brotación se relacionó con un incremento en la concentración de los reguladores de crecimiento.

Los tratamientos T5 y T17 (0.5 mg L⁻¹ BAP) se recomiendan para la producción de brotes, ya que con esta concentración de BAP, dosis menor de citocinina y sin las auxinas IBA y ANA, se obtendrían resultados similares. Así, el proceso de propagación *in vitro* sería más eficiente al reducir los costos de producción. Para definir el tratamiento más exitoso para el crecimiento y morfogénesis de espárrago debe analizarse también la vitrificación y el engrosamiento del turión.

La vitrificación o hiperhidratación es un fenómeno que origina plantas frágiles con apariencia vidriosa, y se interpreta como un aumento en el contenido de agua en las plántulas (Ziv, 1991). La hoja es el órgano más afectado porque cuando se vitrifica desarrolla mesófilo desorganizado y parénquima esponjoso con grandes espacios intercelulares. Las plantas hiperhidratadas usualmente mueren, porque la fotosíntesis y la respiración no se realizan correctamente. Las causas de estas malformaciones están ligadas a factores nutricionales, densidad luminosa y humedad relativa bajas durante la incubación, y dosis altas de reguladores de crecimiento con efecto tóxico en el explante (Ziv, 2000).

El fenómeno de vitrificación también se observó en nuestro estudio. La presencia de auxinas y

The best shoot multiplication response of *A. racemosus* Willd., which is of medicinal importance, was obtained with 1.0 mg L⁻¹ BAP + 1.0 mg L⁻¹ IBA (Patel and Patel, 2015), as in our study. In *A. stipularis* Forssk., asparagus with commercial relevance, the best combination was BAP 2.0 mg L⁻¹ + ANA 0.5 mg L⁻¹ (Ulukapi *et al.*, 2014), that is, the concentration was twice as compared to our experiment. This indicates that the response to growth regulators differs among species and varieties of the same species. Therefore, the protocols seem to be specific for *in vitro* propagation.

The highest concentration of BAP in combination with IBA and ANA reduced shoot length, but the mean production of turions increased. In contrast, in the presence of KIN, shoot length increased, but turion formation decreased, relative to the effect of BAP (Table 1, Figure 2). Thus, BAP has an activating effect on vegetative buds, and KIN is associated with turion lengthening. It was also observed that the increase in sprouting was related to the increment in growth regulator concentration.

We recommend treatments T5 and T17 (0.5 mg L⁻¹ BAP) for production of shoots. With this BAP concentration, a lower dosage of cytokinin and no IBA or ANA auxins similar results would be obtained. Thus, the process of *in vitro* propagation would be more efficient by reducing production costs. To define the most successful treatment for growth and morphogenesis of asparagus, vitrification and turion thickening should also be analyzed.

Vitrification, or hyperhydration, is a phenomenon that causes plants to be fragile and have a glassy appearance; it is interpreted as an increase in the water content of the plantlets (Ziv, 1991). The leaf is the most affected organ because when it vitrifies, it develops a disorganized mesophyll and spongy parenchyma with large intercellular spaces. Hyperhydrated plants usually die because photosynthesis and respiration cannot be correctly carried out. The causes of these malformations are linked to nutritional factors, low luminous density and relative humidity during incubation, and high doses of growth regulators that have a toxic effect on the explant (Ziv, 2000).

The vitrification phenomenon was also observed in our study. The presence of auxins and cytokinins in the medium caused hyperhydration in 46 % of the treatments that generated rhizomes with aqueous

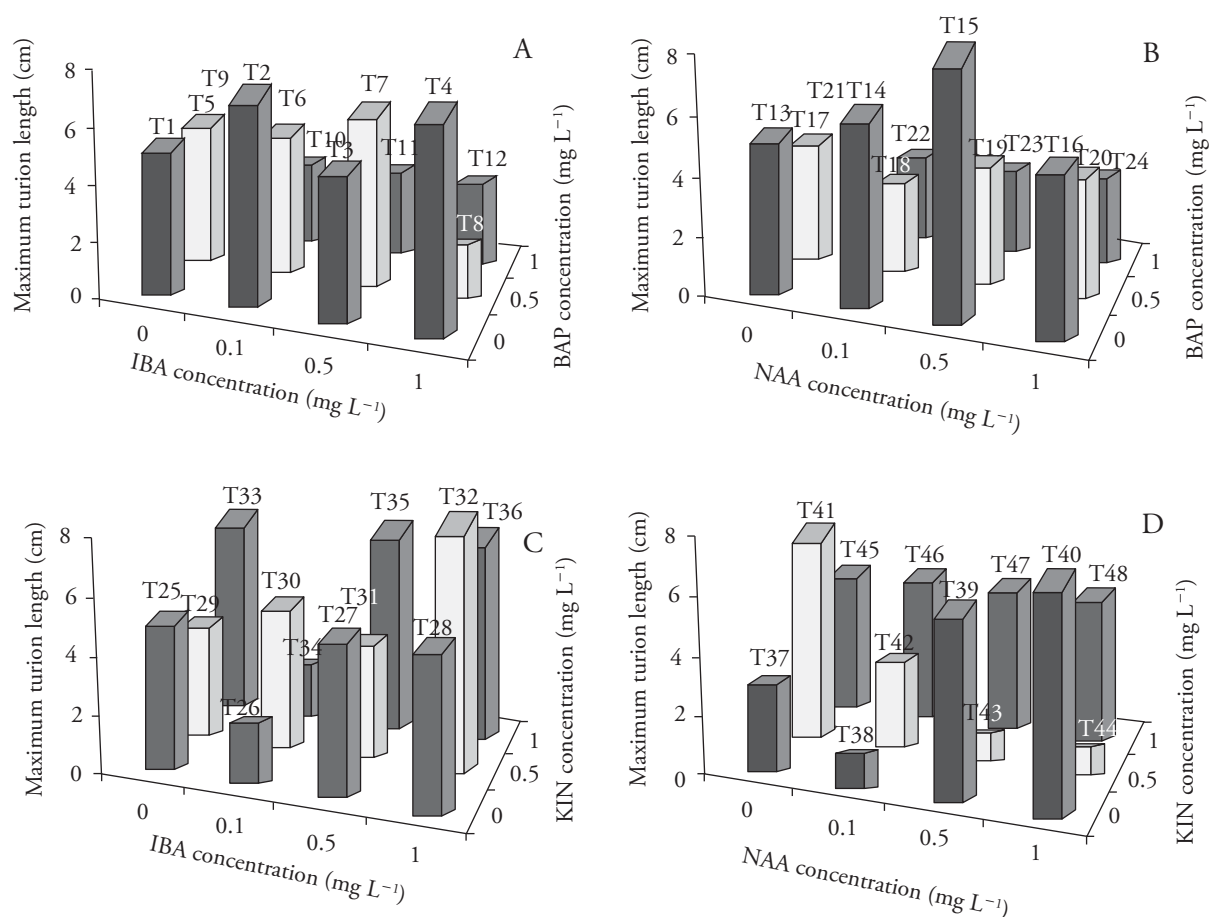


Figura 2. Longitud máxima del turión (cm) de espárrago (*Asparagus officinalis*) por efecto de auxinas y citocininas. A) Interacción BAP-IBA. B) Interacción BAP-ANA. C) Interacción KIN-IBA. D) Interacción KIN-ANA. BAP: 6-bencilaminopurina, KIN: cinetina, IBA: ácido indolbutírico y ANA: ácido naftalenacético.

Figure 2. Maximum turion length (m) of asparagus (*Asparagus officinalis*) by effect of auxins and cytokinins. A) Interaction BAP-IBA. B) Interaction BAP-ANA. C) Interaction KIN-IBA. D) Interaction KIN-ANA. BAP: 6-benzyl amino purine, KIN: kinetin, IBA: indole butyric acid, ANA: naphthalene acetic acid.

citocininas en el medio provocó hiperhidratación en 46 % de los tratamientos que generaron rizomas con apariencia acuosa y turiones deformes. Las concentraciones mayores de fitorreguladores aumentaron la hiperhidratación en el tejido y los desórdenes fisiológicos en el desarrollo de los brotes. La presencia de hiperhidratación estuvo acompañada por engrosamiento del turión, lo que podría asociarse con resistencia en condiciones de aclimatación o campo (Figura 1F).

Al modificar el balance hormonal, con reducción de auxinas y citocininas, la hiperhidratación del tejido disminuye (Kharrazi *et al.*, 2011). La hiperhidratación se redujo a 10.4 % en los tratamientos con

appearance and deformed turions. The highest concentrations of phytohormones increased tissue hyperhydration and physiological disorders in shoot development. The presence of hyperhydration was accompanied by turion thickening, which could be associated with resistance in acclimation or field conditions (Figure F).

By modifying the hormone balance, reducing auxins and cytokinins, tissue hyperhydration can be decreased (Kharrazi *et al.*, 2011). Hyperhydration was reduced to 10.4% in treatments in which rhizomes were re-seeded to culture medium without growth regulators. This method could be applied to recover hyperhydrated plant material.

la resiembra de rizomas en medio de cultivo sin reguladores de crecimiento. Esto podría aplicarse para recuperar material vegetal hiperhidratado.

La formación del sistema radicular se observó a las ocho semanas de cultivo *in vitro*, en 22.9 % de los tratamientos correspondientes a la interacción KIN-IBA y KIN-ANA. El mayor porcentaje de explantes enraizados fue 66.6 % con los tratamientos T35 (1.0 mg L⁻¹ KIN + 0.5 mg L⁻¹ IBA) y T42 (0.5 mg L⁻¹ KIN + 0.1 mg L⁻¹ ANA) (Cuadro 2, Figura 1E). Estos resultados concuerdan con los reportados por Caro *et al.* (2010) y Carmona-Martín *et al.* (2014), que observaron una generación de raíces de 65 y 70 % respectivamente, con la variedad Morado de Huétor y la misma combinación de fitohormonas. En otros protocolos se ha logrado el desarrollo de raíz mediante la aplicación de ancimídol y 2,4-diclorofenoxiacético. Esta respuesta puede asociarse al periodo de cultivo, al cultivar y su variabilidad genética, al tipo de explante en la fase de inducción y a la concentración y tipo de regulador de crecimiento (Ren *et al.*, 2012).

Otra característica determinante en la producción de vitroplantas es la ganancia de peso, ya que está relacionada con el aumento de biomasa que permite aumentar las tasas de multiplicación y generar plantas más vigorosas. En espárrago el tamaño de las yemas vegetativas está positivamente correlacionado con el tamaño de los turiones. En un mismo cultivo, los turiones más gruesos están formados a partir de yemas más grandes. Pero el tamaño de las yemas estará determinado por las reservas de carbohidratos almacenados en el rizoma (del Pozo, 1999). Por tanto, el objetivo de producir rizomas *in vitro* de mayor tamaño y con una alta capacidad para la formación de turiones se logró en esta investigación y representa una ventaja frente a otros protocolos enfocados en la generación de turiones individuales en los que el costo y el espacio requerido para la obtención de vitroplantas aumenta.

La mayor ganancia de peso fresco total se observó con la combinación BAP-IBA y BAP-ANA (Cuadro 2). El tratamiento más efectivo fue el T19 ($p \leq 0.01$) (0.5 mg L⁻¹ BAP y 0.5 mg L⁻¹ ANA) que generó un incremento de peso de 7.1 ± 0.8 g respecto al peso inicial de 1.3 ± 0.1 g, un aumento de 600 % en el tamaño de la vitroplanta. Además del peso total, también se determinó el peso fresco correspondiente a la formación de rizoma y la producción de brotes

Formación del sistema radicular se observó después de ocho semanas de cultivo *in vitro* en 22.9 % de los tratamientos correspondientes a la interacción KIN-IBA y KIN-ANA. El mayor porcentaje de explantes enraizados fue 66.6 % con los tratamientos T35 (1.0 mg L⁻¹ KIN + 0.5 mg L⁻¹ IBA) y T42 (0.5 mg L⁻¹ KIN + 0.1 mg L⁻¹ ANA) (Tabla 2, Figura 1E). Estos resultados concuerdan con Caro *et al.* (2010) y Carmona-Martín *et al.* (2014), quienes observaron 65 y 70 % de generación de raíces, respectivamente, con la variedad Morado de Huétor y la misma combinación de fitohormonas. En otros protocolos el desarrollo de raíz se logró mediante la aplicación de ancimídol y 2,4-diclorofenoxiacético. Esta respuesta puede asociarse al periodo de cultivo, al cultivar y su variabilidad genética, al tipo de explante en la fase de inducción y a la concentración y tipo de regulador de crecimiento (Ren *et al.*, 2012).

Otra característica determinante en la producción de plantas *in vitro* es la ganancia de peso, ya que está relacionada con el aumento de biomasa que permite aumentar las tasas de multiplicación y generar plantas más vigorosas. En espárrago, el tamaño de las yemas vegetativas está positivamente correlacionado con el tamaño de los turiones. En un mismo cultivo, los turiones más gruesos están formados a partir de yemas más grandes. Pero el tamaño de las yemas estará determinado por las reservas de carbohidratos almacenados en el rizoma (del Pozo, 1999). Por tanto, el objetivo de producir rizomas *in vitro* de mayor tamaño y con una alta capacidad para la formación de turiones se logró en esta investigación y representa una ventaja frente a otros protocolos enfocados en la generación de turiones individuales en los que el costo y el espacio requerido para la obtención de vitroplantas aumenta.

La mayor ganancia de peso fresco total se observó con la combinación BAP-IBA y BAP-ANA (Tabla 2). El tratamiento más efectivo fue el T19 ($p \leq 0.01$) (0.5 mg L⁻¹ BAP y 0.5 mg L⁻¹ ANA), que generó un incremento de peso de 7.1 ± 0.8 g, relativo al peso inicial de 1.3 ± 0.1 g, un aumento de 600 % en el tamaño de la vitroplanta. Además del peso total, también se determinó el peso fresco correspondiente a la formación de rizoma y la producción de brotes

Cuadro 2. Efecto de auxinas y citocininas en el incremento de peso fresco (total, rizoma y turiones) y porcentaje de enraizamiento de espárrago (*Asparagus officinalis*) a las ocho semanas de cultivo *in vitro*.

Table 2. Effect of auxins and cytokinins on increase of fresh weight (total, rhizome and turions) and percentage of rooting in asparagus (*Asparagus officinalis*) at eight weeks of *in vitro* culture.

Tratamiento	Concentración (mg L ⁻¹)				Incremento de peso fresco (g)			Tukey (p≤0.01)	Porcentaje de enraizamiento
	BAP	KIN	IBA	ANA	Total	Rizoma	Turiones		
T1	0		0		0.9±0.1	0.3	0.6	fg	0.0
T2	0		0.1		1.4±0.2	0.7	0.7	defg	0.0
T3	0		0.5		0.7±0.1	0.3	0.4	g	0.0
T4	0		1		2.6±0.8	1.1	1.5	bcdefg	0.0
T5	0.5		0		3.6±1.6	1.4	2.2	abcdefg	0.0
T6	0.5		0.1		3.0±0.6	1.1	1.9	bcdefg	0.0
T7	0.5		0.5		5.4±1.1	2.1	3.3	abc	0.0
T8	0.5		1		5.3±0.8	3.0	2.3	abcd	0.0
T9	1		0		4.2±0.6	2.8	1.4	abcdefg	0.0
T10	1		0.1		6.2±0.2	3.1	3.1	ab	0.0
T11	1		0.5		5.5±0.8	3.1	2.4	abc	0.0
T12	1		1		6.2±2.1	3.9	2.3	ab	0.0
T13	0			0	0.9±0.1	0.3	0.6	fg	0.0
T14	0			0.1	0.9±0.2	0.4	0.5	fg	0.0
T15	0			0.5	1.2±0.2	0.5	0.7	fg	0.0
T16	0			1	1.2±0.3	0.8	0.4	fg	0.0
T17	0.5			0	3.6±0.2	1.6	2.0	abcdefg	0.0
T18	0.5			0.1	4.6±0.9	1.5	3.1	abcdef	0.0
T19	0.5			0.5	7.1±0.8	4.8	2.3	a	0.0
T20	0.5			1	2.7±0.2	1.4	1.3	bcdefg	0.0
T21	1			0	5.2±1.3	3.8	1.4	abcde	0.0
T22	1			0.1	5.1±1.6	3.5	1.6	abcde	0.0
T23	1			0.5	6.3±0.9	4.8	1.5	ab	0.0
T24	1			1	2.1±0.2	0.9	1.2	cdefg	0.0
T25		0	0		0.9±0.1	0.3	0.6	fg	0.0
T26		0	0.1		1.1±0.4	0.4	0.7	fg	0.0
T27		0	0.5		1.0±0.4	0.6	0.4	fg	33.3
T28		0	1		1.4±0.1	0.7	0.7	efg	0.0
T29		0.5	0		0.9±0.2	0.3	0.6	fg	0.0
T30		0.5	0.1		1.2±0.2	0.4	0.8	fg	0.0
T31		0.5	0.5		0.6±0.2	0.2	0.4	g	0.0
T32		0.5	1		1.7±0.5	0.9	0.8	cdefg	33.3
T33		1	0		1.6±0.2	0.7	0.9	cdefg	33.3
T34		1	0.1		1.2±0.2	0.6	0.6	fg	33.3
T35		1	0.5		3.0±0.5	1.4	1.6	bcdefg	66.6
T36		1	1		3.2±0.7	1.7	1.5	abcdefg	0.0
T37		0		0	0.9±0.1	0.3	0.6	fg	0.0
T38		0		0.1	1.0±0.4	0.50	0.5	fg	33.3
T39		0		0.5	0.5±0.2	0.3	0.2	g	33.3
T40		0		1	0.9±0.3	0.6	0.3	fg	0.0
T41		0.5		0	1.2±0.1	0.3	0.9	fg	33.3
T42		0.5		0.1	1.1±0.6	0.5	0.6	fg	66.6
T43		0.5		0.5	0.8±0.1	0.3	0.5	fg	33.3
T44		0.5		1	0.5±0.1	0.4	0.1	g	0.0
T45		1		0	0.9±0.2	0.3	0.6	fg	0.0
T46		1		0.1	1.6±0.3	0.5	1.1	cdefg	33.3
T47		1		0.5	3.1±1.0	2.1	1.0	bcdefg	0.0
T48		1		1	3.0±0.3	2.0	1.0	bcdefg	0.0

Los valores representan la media ± desviación estándar. Letras diferentes en cada hilera son estadísticamente diferentes (Tukey; p≤0.01) (n=3). BAP: 6-bencilaminopurina, KIN: cinetina, IBA: ácido indolbutírico y ANA: ácido naftalenacético ♦ Values represent the mean ± standard deviation. Different letters in a row are statistically different (Tukey; p≤0.01) (n=3). BAP: 6-benzyl amino purine, KIN: kinetin, IBA: indole butyric acid, ANA: naphthalene acetic acid.

(Cuadro 2, Figura 1C-D). Este resultado es de interés porque permite aumentar las tasas de multiplicación y establecer estrategias de micropropagación masiva. Un medio con un suplemento de 0.5 mg L⁻¹ BAP + 0.5 mg L⁻¹ ANA estimula el aumento de tamaño del rizoma, mientras que 0.5 mg L⁻¹ BAP activa la formación de yemas vegetativas y así optimiza una mayor producción de turiones. Finalmente, al cultivar las vitroplantas con 0.5 mg L⁻¹ KIN y 0.1 mg L⁻¹ ANA se generó la formación de raíces para la posterior aclimatación en condiciones de invernadero.

En esta investigación la tasa de multiplicación para la variedad Early California fue de 3.3 rizomas por explante a las 16 semanas de incubación. Este resultado es similar a lo reportado por Carmona-Martín *et al.* (2014), quienes obtuvieron una tasa de multiplicación de 3.5 plantas por explante a las ocho semanas de cultivo *in vitro*. Sin embargo, por el tipo de material vegetal desarrollado y el tiempo de incubación para cada protocolo, nuestros resultados se consideran más eficientes porque las vitroplantas producidas están conformadas por un rizoma con capacidad para producir hasta 43 turiones y cada uno de estos brotes podría diferenciarse y originar una planta en condiciones de campo. Otros protocolos generaron vitroplantas que desarrollan el rizoma solamente hasta ser establecidas en campo.

CONCLUSIONES

El protocolo de organogénesis desarrollado es eficiente para inducir producción de brotes y aumentar la biomasa en vitroplantas de espárrago, a partir de yemas vegetativas preexistentes en el rizoma. En este protocolo, BAP fue activadora de yemas vegetativas y KIN indujo elongación del turión. La presencia de IBA y ANA fue esencial para la formación del sistema radicular. Existe una concentración óptima de los reguladores del crecimiento para la producción *in vitro* de rizomas de espárrago con capacidad alta para formar turiones y raíces.

LITERATURA CITADA

- Ángeles-Espino, A., A. J. Valencia-Botín, G. Virgen-Calleros, C. Ramírez-Serrano, L. Paredes-Gutiérrez, y S. Hurtado-De la Peña. 2012. Micropropagación de agave (*Agave tequilana* Weber. Var. Azul) a través de yemas axilares. *Trop. Subtrop. Agroecosyst.* 15:693-698.
- Asprelli, P., D., V. P. Cravero, I. Gatti, y E. L. Cointy. 2002. Micropropagación de plantas elite de espárrago. *Rev. Cient. Agropec.* 6: 17-23.

vegetative buds and thus optimizes higher production of turions. Finally, by culturing explants with 0.5 mg L⁻¹ KIN and 0.1 mg L⁻¹ ANA, root formation was promoted for later acclimation under greenhouse conditions.

In this study, the multiplication rate for the variety Early California was 3.3 rhizomes per explant after 16 weeks of incubation. This result is similar to that reported by Carmona-Martín *et al.* (2014), who obtained a multiplication rate of 3.5 plants per explant after eight weeks of *in vitro* culture. However, because of the type of plant material developed and the incubation time for each protocol, we consider our results more efficient since the vitroplants produced are formed by a rhizome with the capacity to produce up to 43 turions and each of these shoots could differentiate and produce a plant in the field. Other protocols generate vitroplants that develop rhizome only after establishment in the field.

CONCLUSION

The organogenesis protocol developed is efficient in inducing shoot production and increasing biomass of asparagus plants *in vitro* from vegetative buds that pre-exist on the rhizome. In this protocol, BAP activated vegetative buds and KIN induced turion lengthening. The presence of IBA and ANA was essential for the formation of the root system. There is an optimal concentration of growth regulators for *in vitro* production of asparagus rhizomes with a high capacity to form turions and roots.

—End of the English version—

---*---

- Bojnauth, G., S. Puchooa, and T. Bahorun. 2004. *In vitro* regeneration of *Asparagus officinalis*: Preliminary results. In: Proceedings Sixth Meeting of Agricultural Scientists. 8-9 May 2003. Réduit, Mauritius. <http://farc.govmu.org/English/Documents/Policy%20and%20promotion/Publications/final1jal.pdf> pp: 7-15.
- Carmona-Martín, E., J. J. Regalado, I. M. G. Padilla, N. Westendorp, and C. L. Encina. 2014. A new and efficient micropropagation method and its breeding applications in *Asparagus* genera. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 119: 479-488.
- Caro, E., N. Westendorp, I. Vidoj, C. López, E. Carmona-Martín, A. Barceló, y I. M. González. 2010. Procedimiento para la propagación *in vitro* de espárrago. Consejo Superior de

- Investigaciones Científicas (CSIC). Patente No. 11728006. Madrid, España. 26 p.
- Curtis, H., N. S. Barnes, A. Schenek, y A. Massarini. 2008. Biología. 7a ed. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires. 1160 p.
- del Pozo, A. 1999. Morfología y funcionamiento de la planta. In: González, M., I., y A. del Pozo (eds.). El Cultivo del Espárrago Boletín INIA N° 6. Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA)-Ministerio de Agricultura, Chillán, Chile. pp: 9-28.
- Desjardins, Y. 1992. Micropropagation of asparagus (*Asparagus officinalis* L.). In: Bajaj, Y., P., S. (ed.). Biotechnology in Agriculture and Forestry. Vol 19: High-Tech and Micropropagation III. Springer-Verlag, Berlin. pp: 26-41.
- FAO. FAOSTAT (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2018. Agricultural production of asparagus. <http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/download/Q/QC/S/> (Consulta: abril de 2018).
- Fazelzadeh, S., A., B. Habibi, and Z. Karimaneh. 2013. Optimization of callus induction and seedling regeneration in asparagus (*Asparagus officinalis*). Bull. Environ. Pharmacol. Life Sci. 2: 5-8.
- Gaspar, T., C. Kevers, C. Penel, H. Greppin, D. M. Reid, and T. A. Thorpe. 1996. Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant. 32: 272-28.
- Kharrazi, M., H. Nemati, A. Tehranifar, A. Bagheri, and A. Sharifi. 2011. *In vitro* culture of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) focusing on the problem of vitrification. J. Biol. Environ. Sci. 5: 1-6.
- López, F., and E. Cointry. 2008. Asparagus. In: Prohens-Tomás, J., and F. Nuez (eds). Vegetables II: Fabaceae, Liliaceae, Solanaceae, and Umbeliferæ Handbook of Plant Breeding 2. Springer-Verlag, Berlin. pp: 87-119.
- Máthé, Á., F. Hassan, and A. Abdul K. 2015. Micropropagation of medicinal and aromatic plants *in vitro*. In: Máthé, Á. (ed.). Medicinal and Aromatic Plants of the World, Volume 1. Springer, Dordrecht. pp: 305-336.
- Murashige, T., and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15: 473-497.
- Patel, L., S., and R. S. Patel. 2015. Rapid *in vitro* micropropagation of *Asparagus racemosus* Willd. from nodal explants. Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci. 4: 607-617.
- Pontaroli, A., C., and E. L. Camadro. 2005. Somaclonal variation in *Asparagus officinalis* plants regenerated by organogenesis from long-term callus cultures. Genet. Mol. Biol. 28: 423-430.
- Ren, J., W. Chen, and M. Knaflewski. 2012. Factors affecting asparagus (*Asparagus officinalis* L.) root development *in vitro*. Acta Sci. Pol. Hortorum Cultus 11: 107-118.
- SAS. 2009. SAS software Versión 9 para Windows. SAS Institute Inc. SAS. Cary, NC, USA.
- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). 2018. <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-cultivo/> (Consulta: abril de 2018).
- Taiz, L., and E. Zeiger. 2010. Plant Physiology. 5a ed. Sinauer Associates Inc., Massachusetts. 778 p.
- Ulukapi, K., A. G. Nasircilar, A. N. Onus, and I. Baktir. 2014. *In vitro* propagation and determination of the nutrient content of naturally grown *Asparagus stipularis* Forssk. Arch. Biol. Sci. 66: 1333-1338.
- Ziv, M. 1991. Vitrification: morphological and physiological disorders of *in vitro* plants. In: Debergh, P., C., and R. H. Zimmerman (eds). Micropropagation: Technology and Application. Kluwer, Dordrecht. pp: 45-64.
- Ziv, M. 2000. Bioreactor technology for plant micropropagation. In: Janick, J. (ed.). Horticultural Reviews Vol. 24. John Wiley & Sons Inc., New York. pp: 1-24.

