

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA  
LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSGRADO  
MAESTRÍA EN MEJORAMIENTO GENÉTICO  
DE PLANTAS**



**“COMPORTAMIENTO DE TRES CULTIVARES DE  
ESPÁRRAGO (*Asparagus officinalis* L.) AL CULTIVO DE  
ANTERAS *in vitro*”**

**Presentada por:**

**MIGUEL ANGEL VERA VEGA**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE  
MAGISTER SCIENTIAE EN MEJORAMIENTO GENÉTICO  
DE PLANTAS**

**Lima - Perú**

**2021**

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA  
LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSGRADO  
MAESTRÍA EN MEJORAMIENTO GENÉTICO DE  
PLANTAS**

**“COMPORTAMIENTO DE TRES CULTIVARES DE  
ESPÁRRAGO (*Asparagus officinalis* L.) AL CULTIVO DE  
ANTERAS *in vitro*”**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE  
MAGISTER SCIENTIAE**

**Presentada por:**

**MIGUEL ANGEL VERA VEGA**

**Sustentada y aprobada ante el siguiente jurado:**

Dr. Félix Camarena Mayta  
**PRESIDENTE**

Ph.D. Jorge Eduardo Jiménez Dávalos  
**ASESOR**

M.S. Andrés Casas Díaz  
**CO-ASESOR**

Mg.Sc. María de Lourdes Tapia y Figueroa  
**MIEMBRO**

Mg.Sc. Ricardo Sevilla Panizo.  
**MIEMBRO**

## ÍNDICE GENERAL

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1	ESPÁRRAGO	3
2.1.1	Historia del espárrago en el Perú	3
2.1.2	Exigencias agroclimáticas	3
2.1.3	Genética sexual	4
2.1.4	Mejoramiento y selección	4
2.1.6	Clasificación taxonómica del espárrago	7
2.1.7	Botánica del espárrago	7
2.2	INDIVIDUOS DOBLE HAPLOIDES	8
2.2.1	Historia	8
2.2.2	Importancia	8
2.2.3	Ventajas	9
2.3	ESPÁRRAGO DOBLE HAPLOIDE	.. 10
2.3.1	Historia	10
2.3.4	Obtención de líneas dobles haploides	12
2.3.5	Duplicación cromosómica	19
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	21
3.1	MATERIAL VEGETAL	21
3.3	VARIABLES UTILIZADAS EN EL ANÁLISIS	24
3.4	MODELO ESTADÍSTICO	25
IV	RESULTADOS	26
4.1	MÉTODO DE DESINFECCIÓN	26
4.2	PORCENTAJE DEL ESTADO UNINUCLEADO DE LA MICROSPORA	27
4.3	OXIDACIÓN DE LAS ANTERAS	30
4.4	TASA DE INDUCCIÓN	31
4.5	OXIDACIÓN DE LOS CALLOS	33
4.6	TASA DE TRANSFERENCIA	34
4.7	TASA DE REGENERACIÓN, NÚMERO DE EMBRIONES/CALLO, PLANTAS/CALLO Y PLANTAS ACLIMATADAS	37
4.8	DETERMINACIÓN DEL CONTEO CROMOSÓMICO	38
V.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
5.1	DESINFECCIÓN	39

5.2	ESTADO UNINUCLEADO DE LA MICROSPORA	39
5.3	OXIDACIÓN DE LAS ANTERAS, TASA DE INDUCCIÓN Y OXIDACIÓN DE LOS CALLOS	39
5.4	TASA DE TRANSFERENCIA	41
5.5	TASA DE REGENERACIÓN, NÚMERO DE EMBRIONES/CALLO Y NÚMERO DE PLANTAS/CALLO	41
5.6	CONTEO CROMOSÓMICO	42
5.7	TASA DE ACLIMATACIÓN	42
VI.	CONCLUSIONES	44
VII.	RECOMENDACIÓN	45
VIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1</b>	Temperaturas medias, máxima y mínima del distrito de Nepeña, Provincia de Santa, departamento de Ancash en el año 2013. Prueba Tukey ( $p \leq 0.05$ ).....	21
<b>Cuadro 2</b>	Porcentaje de hipoclorito de sodio usado para la desinfección de los botones florales de los tres cultivares de espárrago (ATLAS, IDA LEA y UC 157 F1).....	22
<b>Cuadro 3</b>	ANVA de la tasa de desinfección con lejía en tres cultivares de espárrago (ATLAS, IDA LEA y UC 157 F1).....	26
<b>Cuadro 4</b>	Efecto de lejía en la tasa de desinfección de pimpollos florales de tres cultivares de espárrago (ATLAS, IDA LEA y UC 157 F1).....	27
<b>Cuadro 5</b>	ANVA del estado uninucleado de la microspora de tres cultivares de espárrago (ATLAS, IDA LEA y UC 157 F1).....	28
<b>Cuadro 6</b>	Efecto del tamaño del botón en la proporción del estado de la microspora en los tres cultivares (ATLAS, IDA LEA y UC 157 F1). Prueba Tukey ( $p \leq 0.05$ ).....	30
<b>Cuadro 7</b>	Medios de cultivo usados para la inducción de callos en tres cultivares de espárrago (ATLAS, IDA LEA y UC 157 F1).....	30
<b>Cuadro 8</b>	ANVA del porcentaje de oxidado de las anteras de tres cultivares de espárrago (ATLAS, IDA LEA y UC 157 F1).....	31
<b>Cuadro 9</b>	ANVA de la tasa de inducción en tres cultivares de espárrago (ATLAS, IDA LEA y UC 157 F1) a las 2 MDS.....	32
<b>Cuadro 10</b>	ANVA de la formación de callos oxidados en tres cultivares de espárrago (ATLAS, IDA LEA y UC 157 F1) a los (2 MDS).....	33
<b>Cuadro 11</b>	ANVA de la producción de callos aptos para la transferencia de tres cultivares de espárrago (ATLAS, IDA LEA y UC 157 F1) a los 4 MDS.....	34
<b>Cuadro 12</b>	Efecto de la interacción de los medios de cultivo y los cultivares en la tasa de transferencia (%) a los 4 MDS. Prueba Tukey ( $p \leq 0.05$ ).....	36
<b>Cuadro 13</b>	Medios de cultivo usados para la regeneración de callos para el cultivar espárrago UC 157 F1.....	36
<b>Cuadro 14</b>	ANVA general de la tasa de regeneración (12 MDS), número de embriones/callos (16 MDS), plantas/callos (17 MDS) y plantas aclimatadas (18 MDS) del cultivar UC 157 F1.....	37

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Respuesta de la tasa de desinfección de tres cultivares de espárrago (ATLAS, IDA LEA y UC 157 F1) ante la exposición a la lejía. Prueba Tukey ( $p \leq 0.05$ ).....	26
<b>Figura 2</b>	Efecto de la lejía en la desinfección de pimpollos florales de tres cultivares de espárrago (ATLAS, IDA LEA y UC 157 F1). Prueba Tukey ( $p \leq 0.05$ ).....	27
<b>Figura 3</b>	Porcentaje de microsporas uninucleadas promedio por tamaño de botón en tres cultivares de espárrago (ATLAS, IDA LEA y UC 157 F1). Prueba Tukey ( $p \leq 0.05$ ).....	28
<b>Figura 4</b>	Foto del estado uninucleado de la microspora en espárrago.....	29
<b>Figura 5</b>	Respuesta de los cultivares en la proporción del estado uninucleado de la microspora en tres cultivares de espárrago (ATLAS, IDA LEA y UC 157 F1). Prueba Tukey ( $p \leq 0.05$ ).....	29
<b>Figura 6</b>	Efecto del medio de cultivo en el porcentaje de anteras oxidadas de tres cultivares de espárrago (ATLAS, IDA LEA y UC 157 F1). Prueba Tukey ( $p \leq 0.05$ ).....	31
<b>Figura 7</b>	Efecto de los medios de cultivo en la oxidación de callos y tasa de inducción de tres cultivares de espárrago (ATLAS, IDA LEA y UC 157 F1). A: medio de inducción T1, B: medio T2, C: medio T3, D: medio T4 y E: medio T5.....	21
<b>Figura 8</b>	Efecto de los medios de cultivo en la tasa de inducción en cultivares de espárrago (ATLAS, IDA LEA y UC 157 F1) a las 2 MDS. Prueba Tukey ( $p \leq 0.05$ ).....	33
<b>Figura 9</b>	Efecto de los medios de cultivo en la formación de callos oxidados en tres cultivares de espárrago (ATLAS, IDA LEA y UC 157 F1) a los 2 MDS. Prueba Tukey ( $p \leq 0.05$ ).....	34
<b>Figura 10</b>	Efecto de los cultivares (ATLAS, IDA LEA y UC 157 F1) en la producción de callos aptos para la transferencia a los 4 MDS. Prueba Tukey ( $p \leq 0.05$ ).....	35
<b>Figura 11</b>	Efecto de los medios de cultivo en la producción de callos aptos para la transferencia en las tres cultivares de espárrago (ATLAS, IDA LEA y UC 157 F1) a los 4 MDS. Prueba Tukey ( $p \leq 0.05$ ).....	35
<b>Figura 12.</b>	Callos aptos para la transferencia del cultivar UC 157 F1.....	36
<b>Figura 13</b>	Efecto de los medios de cultivo en la tasa de regeneración (12 MDS), número de embriones/callos (16 MDS), plantas/callos (17 MDS) y plantas aclimatadas (18 MDS) del cultivar UC 157 F1.....	37

<b>Figura 14</b>	Efecto del medio de regeneración R1 en la producción de embriones (B, D, E, F); órganos (A) y plantas (C, G, H e I) en callos del cultivar UC 157 F1.....	38
<b>Figura 15</b>	Célula haploide (A) y diploide (B) en espárrago.....	38

## RESUMEN

El espárrago es una especie de importancia mundial y Perú es uno de los países con mejor producción. Esta alta producción de espárragos ha obligado a los fitomejoradores a investigar nuevas alternativas para tener cultivares de espárragos con alto rendimiento y de forma rápida. Por consiguiente, las investigaciones se orientan a la producción de cultivares masculinos de espárragos utilizando el cultivo de anteras ya que, esta técnica facilita la selección de genotipos y reduce el tiempo de selección de un cultivar. Por ello, el objetivo de este trabajo es evaluar el comportamiento de las anteras de tres cultivares de espárrago (ATLAS, IDA LEA y UC 157 F1) en condiciones *in vitro* hasta la obtención de plantas. Esta investigación se realizó en el laboratorio de biotecnología de los PIP en cereales y granos andinos en 2013. Se desarrolló el protocolo de cultivo de anteras de tres cultivares de espárragos (ATLAS, IDA LEA y UC 157 F1) obteniendo lo siguiente: (1) El estado de la antera más adecuado fue cuando el botón floral tiene entre 1.5 mm y 2 mm para los tres cultivares. (2) En los tres cultivares, el azúcar causó la oxidación de las anteras, pero incentivó la formación de callos (respuesta androgénica), junto con la concentración de la hormona ANA y la relación ANA/BAP. (3) Solo, el cultivar UC 157 F1 produjo callo blanco en el medio de inducción MS suplementado con ANA (2 mg/l), BAP (1 mg/l) y 5% de sacarosa y produjo 15 embriones y dos plantas por callo en promedio con el medio de regeneración MS suplementado con 0.3 gr/l de ANA, 0.2 mg/l de BAP y 3% de sacarosa. Estos resultados revelan que la disminución de la concentración de ANA, BAP y sacarosa promueve la regeneración de las plantas en las anteras de espárragos.

**Palabras claves:** *espárrago, cultivo de anteras, inducción, haploide y embriones.*

## ABSTRACT

Asparagus is a species of world importance and Peru is one of the countries with the best production. This high production of asparagus has forced plant breeders to investigate new alternatives to have asparagus cultivars with high yields and quickly. Therefore, research is oriented to the production of male asparagus cultivars using anther culture, since this technique facilitates the selection of genotypes and reduces the time of selection of a cultivar. Therefore, the objective of this work is to evaluate the behavior of the anthers of three asparagus cultivars (ATLAS, IDA LEA and UC 157 F1) under in vitro conditions until obtaining plants. This research realized in the biotechnology laboratory of the PIPs in Cereal and Grain Andean in 2013. The anther culture protocol of three asparagus cultivars was developed (ATLAS, IDA LEA, and UC 157 F1) obtaining the following: (1) The anther state more adequate was when the floral button has between 1.5mm y 2mm to the three cultivars. (2) In the three cultivars, the sugar caused the anther oxidation but incentivized the callus formation (androgenic response), together with the ANA hormone concentration and the ANA/BAP relationship. (3) Only, The UC 157 F1 cultivar produced white callus in the MS induction medium supplemented with ANA (2mg/l), BAP (1 mg/l), and 5% of saccharose and produced 15 embryos and two plants by callus in average with the MS regeneration medium supplemented with 0.3 mg/l de ANA, 0.2 mg/l de BAP and 3% de saccharose. These results reveal that the decrease of ANA, BAP, and saccharose concentration, promote the regeneration of the plants in the asparagus anthers.

**Keywords:** *asparagus, anther culture, induction, haploid and embryos.*

## I. INTRODUCCIÓN

El espárrago (*Asparagus officinallis* L.) es una hortaliza muy importante a nivel mundial por sus múltiples usos (medicinales, agroindustriales, etc.). Por tal motivo es cultivada en muchos países; sin embargo, el Perú cuenta con las condiciones ideales para su producción todo el año y con los mejores rendimientos en el mundo (ADEX 2011). En la actualidad, el cambio climático ha ocasionado escasez de agua, el incremento de la temperatura, así como la generación de nuevas plagas y enfermedades. Las consecuencias negativas ocasionadas por el cambio climático han incentivado a los fitomejoradores a la generación de nuevos cultivares adaptables al nuevo entorno a través de la selección de genotipos homocigotos masculinos utilizando el cultivo *in vitro* de anteras (Wolyn y Feng 1994, Zhang *et al.* 1994, Muñoz *et al.* 2006).

Esta técnica en el espárrago se aplica al descubrir que el sexo está gobernado por un par de alelos y con segregación genética independiente (Gebler *et al.* 2007). A partir de este descubrimiento se han realizado investigaciones que demostraron que los individuos masculinos presentan características superiores a los femeninos en resistencia a plagas y enfermedades, precocidad y uniformidad en la producción (Jamsari 2004). La ventaja principal de la técnica del cultivo *in vitro* de anteras es la obtención rápida de individuos homocigotas (aprox. 2.5 años) en comparación al mejoramiento convencional. Además, esta técnica se evita la depresión endogámica en el espárrago, ya que esta especie es alógama y su autofecundación sucesiva puede causar la depresión endogámica a través de la expresión de genes deletéreos y letales (Camargo 2003).

El cultivo de anteras tiene como finalidad generar individuos haploides para después duplicar su contenido cromosómico obteniendo los individuos dobles haploides (Gry 1990). Para asegurar la haploidía, los investigadores sugieren tomar anteras con microsporas en el estado uninucleado medio a tardío (Szarejko 2003); sin embargo, esto no es suficiente porque el crecimiento de las microsporas, no están direccionadas a la formación de plantas. Es por ello que someterlas a estrés puede modificar su ruta de crecimiento sería lo más adecuado (Wolyn y Feng 1994). En la fase de inducción (formación de callos) la respuesta

obtenida depende de muchos factores como la ausencia de luz, sometimiento de las anteras a estrés (frio, calor, etc.), las dosis hormonales en medio de cultivo y la temperatura durante la etapa de inducción entre otros (Polci *et al.* 2010). En el espárrago, la dosis por debajo de 6% de azúcar (Wolyn y Feng 1994); por otro lado, la relación auxina/citoquinina alta facilita la producción de callos y su posterior descenso posibilita la formación de embriones y plantas por organogénesis (Tello 2016 y Bilbao 1996). Las plantas obtenidas a través de anteras presentan una carga cromosómica haploide; sin embargo, durante el proceso el contenido cromosómico puede duplicarse de forma espontánea o también puede inducirse por medio de un agente duplicador (Weber *et al.* 2005). El objetivo de la investigación fue determinar el comportamiento de tres cultivares de espárrago (ATLAS, IDA LEA y UC 157 F1) en el establecimiento de la técnica del cultivo *in vitro* de anteras para la producción de líneas dobles haploides.

## **II. REVISIÓN DE LITERATURA**

### **2.1 ESPÁRRAGO**

#### **2.1.1 Historia del espárrago en el Perú**

El cultivo del espárrago en el Perú se inició a principios de la década del 50, en el Departamento de La Libertad con el cultivar Mary Washington, destinándose la totalidad de la Producción a conservas de espárrago blanco. A partir de los años 80, la Asociación de Productores de ICA, inició un Programa de Producción de Espárrago Verde para su exportación en fresco basado en el cultivar UC 157 bajo tecnología californiana. Esta iniciativa contó con apoyo de la AID, que facilitó la realización de un estudio en el país y la visita de dos expertos peruanos a las zonas productoras de espárrago en Estados Unidos (Alzamora 2006).

#### **2.1.2 Exigencias agroclimáticas**

##### **2.1.2.1 Clima**

En el espárrago, la temperatura es el factor ambiental de mayor importancia; ya que la exposición los turiones a temperaturas elevadas ocasionan que estos ramifiquen volviéndose un producto no comercializable (Ellison 1986 y Krug 1996). Por otro lado, muchos autores confirman que el factor luz junto con la temperatura gobiernan la producción y la calidad de las cosechas (Fehér 1992 y Benson 1982). Sin embargo, en el Perú, las condiciones climáticas son las apropiadas para este cultivo ya que permiten la acumulación constante de carbohidratos durante la etapa de maduración del turión (Sánchez y Apaza 2000).

##### **2.1.2.2 Agua**

En el espárrago, el agua es un factor fundamental en la producción y de acuerdo Roth y Gardner (1991), para obtener los mayores rendimientos en este cultivo se le debe brindar una lámina de agua que varíe entre 270 y 310 cm. Mientras que Robinson *et al.* (1984), reportan que con una lámina de 4.2 cm aplicada dos veces por semana es suficiente para las

condiciones de suelo arenoso. Además, Roth y Gardner (1991), señalan que reduciendo el riego durante los primeros 20 días de cosecha no se ve afectada la producción. Así mismo, Navarro-Ainza *et al.* (1997), dicen que el riego es conveniente cuando el suelo tiene una humedad aprovechable del 35%.

### **2.1.3 Genética sexual**

El espárrago comestible (*Asparagus officinalis* L.) es un cultivo diploide ( $2n=2X=20$ ). Además, esta especie es considerada dioica con una proporción sexual de 1:1 (machos Y\_ y hembras XX). Esta proporción sexual sigue uno de los principios básicos de Mendel que es la segregación de caracteres sexuales, siendo el alelo masculino la característica dominante. Así mismo, el cruce entre dos genotipos sexuales heterocigotas producirá una progenie cuya segregación mostrará tres diferentes individuos genotípicamente diferentes, bajo una proporción de 1:2:1 y cuya expresión fenotípica del sexo estará en una relación de 3:1 (Milanesi *et al.* 2008). A nivel molecular, se ha identificado bandas ligadas al sexo a través del análisis BSA (*Bulk Segregant Analysis*) logrando identificar a los individuos machos (YY y XY) y hembras (XX) (Gebler *et al.* 2007). Dentro de esta investigación se encontró una banda de 700 pb (pares de base) en las plantas pistiladas y con menor intensidad en las plantas estaminadas (XY) y ausentes en las supermachos (YY). Por otro lado, Telgmann *et al.* (2007), identificó y clonó una región dentro de los cromosomas sexuales conocida como locus M, alelo que controla el dimorfismo sexual. En lo agronómico se ha descubierto que existen diferencias entre las plantas homocigotas (hembras y machos) en la respuesta adaptativa al ambiente en donde los individuos machos presentan mayor resistencia a las plagas y enfermedades, precocidad en producción de turiones y con mayor número de turiones en relación a las hembras (Jamsari 2004).

### **2.1.4 Mejoramiento y selección**

El mejoramiento del espárrago es un proceso arduo a nivel convencional ya que dura de 10 a 15 años para la obtención de un cultivar. Los tipos varietales de mayor importancia que se han desarrollado por métodos convencionales y son: híbrido simple, dobles y clonales (Ornstrup 1997). Los híbridos simples son obtenidos a través del cruzamiento de líneas puras con el objetivo de uniformizar la producción y aprovechar el efecto de heterosis. Las líneas pueden obtenerse por métodos tradicionales de consanguinidad recurriendo a la autofecundación de ejemplares hermafroditas o por cruzamientos repetidos entre hermanos (Ellison 1986).

Por el método repetido entre hermanos fue creado el híbrido Limbras en Nueva Zelanda que ocupó un 95% de las plantaciones en dicho país (Ellison 1986). Sin embargo, en la actualidad existen metodologías que pueden acelerar el proceso de obtención de un cultivar y entre ellas el cultivo de anteras (Feng y Wolyn 1999, Zhang *et al.* 1994 y Muñoz *et al.* 2006).

#### **2.1.5.1 Herramientas convencionales**

La selección es un factor muy importante dentro de los programas de mejoramiento y además la forma de hacerla denota el tiempo que se necesita cumplir sus objetivos (Camadro 2003). Los cultivares actuales de espárrago son producto de la utilización del mejoramiento convencional que el hombre ha realizado durante siglos a través de ciclos de selección y cruzamiento (Ornstrup 1997). El método puede durar entre cinco a diez años cuando el gen de interés se encuentra en otros individuos de la misma especie y de 10 a 15 años cuando el gen de germoplasma emparentado es silvestre (Camadro 2003). En el espárrago, según Milanesi *et al.* (2008), para obtener individuos supermachos (YY) se deben cruzar dos plantas andromonoicas (XY). El producto de este cruce se tendrá 25% de individuos YY en la progenie. Sin embargo, con la técnica del cultivo de anteras se puede obtener individuos YY a un 100% a partir de un individuo XY (Polci *et al.* 2010)

Con estas técnicas se han obtenido individuos híbridos simples, dobles e híbridos clónales mejorados (Gatti *et al.* 2007). La generación de híbridos simples se obtiene por la cruce de dos parentales homocigotas con gran variabilidad en la generación F1 y F2. Sin embargo, la forma más rápida y eficiente de obtener un cultivar es a través de la cruce de parentales homocigotos proveniente de la fecundación de machos andromonoicas de espárrago o por individuos doble haploides obtenidos por androgénesis *in vitro* (Gry 1990). Por otro lado, los híbridos dobles se obtienen por el cruzamiento de cuatro individuos de genotipo heterocigoto escogidos por su aptitud combinatoria específica (Gatti *et al.* 2007). En cambio, los híbridos clónales se obtiene por el cruzamiento de parentales con genotipos heterocigotos que han sido previamente multiplicado por metodología *in vitro*, facilitando la obtención de semilla comercial (Gatti 2001).

### **2.1.5.2 Técnicas *in vitro***

Gatti *et al.* (2007) señalan que las técnicas *in vitro* se basa en la siembra de diferentes explantes sea células, tejidos u órganos seleccionados para la generación de un individuo dentro de un envase de vidrio. A partir del explante se pueden originar individuos completos por organogénesis directa o se puede formar en el tiempo una masa de células indiferenciadas conocidas como callos. Estos callos pueden pasar por cambio heredables no predecibles conocidos como variación somaclonal o gametoclinal dependiendo de la constitución genética del explante generado mayormente por la constitución hormonal del medio de cultivo. Para evitar esta situación se recomienda formar embriones somáticos a partir del explante y utilizándose como semilla sintética (Polcy *et al.* 2010).

### **2.1.5.3 Herramientas auxiliares**

Las herramientas auxiliares se basan en la aplicación de compuestos químicos en bajas concentraciones con el objetivo de adelantar su etapa reproductiva. La ventaja de esta herramienta es la reducción de tiempo en la obtención de una nuevo cultivar, pero la desventaja es la poca variabilidad y viabilidad que se obtiene en la planta al ser sometida a estos tratamientos (Milanesi *et al.* 2008). Por ejemplo, Abe y Kameya (1986), encontraron que la exposición de las semillas de espárragos a una concentración de 400mM de triazina obtuvieron un 37 por ciento de plantas con floración a los 100 días después de la siembra. Por otro lado Mizonobe *et al.* (1991), utilizando carbamato, lograron obtener floración precoz en el cultivar MS 500W (uno de los siete cultivares utilizadas en el ensayo). En este experimento, el mejor tratamiento para la obtención de plantas masculinas fue el remojo de las semillas de espárrago a una concentración de 50 mg/l de carbamato por un periodo de 12 días bajo luz fluorescente blanca. Los siete cultivares evaluadas mostraron un porcentaje de inducción floral entre 13 a 67 por ciento, alta viabilidad y germinación del polen. Otra técnica es la utilización de hormonas porque se ha demostrado que influyen en la proporción sexual. Por ejemplo, Garrinson y Chin (2005) obtuvieron plantas hermafroditas a partir de plantas estaminadas con aplicaciones de citocininas y hermafroditas a partir de pistiladas con aplicaciones de giberelinas; solas o asociadas con citocininas. Si bien las plantas hermafroditas obtenidas a través de esta herramienta no fueron viables; los autores recomiendan realizar los tratamientos a bajas dosis para la obtención por endocria plantas selectas.

Las técnicas mencionadas anteriormente buscan reducir el tiempo de selección para cumplir de forma más eficiente los siguientes objetivos propuestos dentro de un plan de mejora genética en esta especie (Milanesi *et al.* 2008):

- Precocidad.
- Incremento y agrupación de la producción.
- Buena calidad, uniformidad y apariencia atractiva del turión.
- Disminución de la fibrosidad del turión.
- Mantenimiento de las brácteas cerradas en el turión.
- Resistencia a plagas y enfermedades.
- Cultivares totalmente masculinos.

### **2.1.6 Clasificación taxonómica del espárrago**

El espárrago (*Asparagus officinalis* L.) pertenece a la familia Asparagaceae. Es una planta herbácea perenne cuyo cultivo dura bastante tiempo en campo (8 a 10 años), desde el punto de vista de vida económica rentable (Alzamora 2006). El espárrago se clasifica taxonómicamente en (Grayum 2003):

- Reino: Plantae.
- Subreino: Tracheobionta.
- División: Magnoliophyta.
- Clase: Liliopsida.
- Orden: Asparagales.
- Familia: Asparagaceae.
- Género: *Asparagus*.
- Espécie: *A. officinalis*.

### **2.1.7 Botánica del espárrago**

La planta del espárrago se compone de la parte aérea o “fronde”, de las cuales está constituida por tallos, ramas, hojas, flores, frutos y semillas y la parte subterránea conformada por las raíces anuales, reservantes y el rizoma simpodial (Grayum 2003). La planta de espárrago presenta una constitución morfológica fuera de lo convencional. Para iniciar; el producto comercial es conocido como turión, que es el tallo con hojas reducidas a escamas, que emergen a inicios de primavera y que se cosechan a lo largo de 40-60 días

(Pontaroli 2005). Los turiones tienen una constitución apical compleja, conteniendo en su interior los primordios de hojas, yemas laterales y flores. En los tallos existen estructuras de apariencia acicular conocidos como cladiolos, cuya función es fotosintética (Marziani *et al.* 1999). La estructura perenne del espárrago es la corona, que está constituida por raíces adventicias carnosas, cuya función es de almacenamiento y que crecen a partir de un tallo subterráneo conocido como rizoma simpodial y que a partir de esta se originan los turiones, que crecen año tras año (Blasberg 1932).

## **2.2 INDIVIDUOS DOBLE HAPLOIDES**

Los individuos doble haploides (DH), son aquellos que presentan dos juegos idénticos de cromosomas en su núcleo (Maluszynski *et al.* 2003). Su obtención se puede realizar de la siguiente manera: a través del cultivo *in vitro* de anteras, microsporas, óvulos, cruza amplias, etc. Actualmente se han realizado estudios en una infinidad de cultivos; por ejemplo: *Malus X Domestica* (Zhang *et al.* 2013), trigo (Njau *et al.* 2006), entre otros.

### **2.2.1 Historia**

El primer reporte en la obtención de una planta haploide fue publicado por Blakeslee *et al.* (1922) en *Datura stramonium*. Más adelante Guha y Maheshwari (1964) desarrollaron la técnica de cultivo de anteras para la producción de haploides en el laboratorio. Por otro lado, se reportó la producción haploide a través de cruza amplias en el cultivo de cebada (Kasha y Kao 1970) y tabaco (Burk 1962). A partir de estos antecedentes, esta metodología ha sido utilizada en la construcción de individuos dobles haploides (DH) en más 250 especies de interés comercial (Barnabás *et al.* 1999).

### **2.2.2 Importancia**

La técnica de dobles haploides nace a través de una casualidad, que se basa en investigar el comportamiento de las microsporas en su fase gametofítica (Guha y Maheshwari 1964). Sin embargo los científicos descubrieron que a partir de las anteras sembradas bajo condiciones *in vitro* se pueden obtener plantas completas de configuración cromosómica haploide (Blakeslee *et al.* 1922). Este hecho ha revolucionado la metodología para obtener cultivares mejorados reduciendo el tiempo de selección (Jiang *et al.* 1997 y Chen *et al.* 2006) y más que todo en aquellas especies perennes de ciclos fenológicos largos y con barreras de incompatibilidad que limitan mucho las estrategias de mejoramiento (Herrera y Camayo

2008). Por otro lado, Callohuari (2013), indica que la técnica garantiza la expresión de las características genotípicas en su forma homocigota.

La relevancia de la técnica DH en plantas se ha incrementado notablemente en los últimos años (Maluszynski *et al.* 2003). Las técnicas usadas para la obtención de DHs, ya desempeña un papel importante en la producción de cultivares híbridos vegetales, ya que se ha descubierto que se pueden formar líneas fértiles DH a partir de especies con problemas de incompatibilidad (Immonen y Anttila 1999).

La ventaja de la técnica de DHs es producir líneas homocigóticas después de una recombinación por lo que ahorra mucho tiempo para los mejoradores de plantas (Maluszynski *et al.* 2003). Los estudios concluyen que los DHs son comparables a las líneas seleccionadas por endogamia (Winzeler *et al.* 1987). Los beneficios más específicos incluyen la posibilidad de propagación de semillas como una alternativa a la multiplicación vegetativa en plantas ornamentales y en especies arbóreas en donde los ciclos de vida son largos y la depresión por endogamia se oponen a los métodos tradicionales de mejoramiento (Immonen y Anttila 1999).

### **2.2.3 Ventajas**

En relación a la metodología clásica, esta técnica, de acuerdo a Herrera y Camayo (2008) afirman que contribuyen en el acortamiento de los ciclos de selección para la obtención de un nuevo cultivar, permitiendo la fijación rápida de los caracteres de interés. Por otro lado, Geiger y Gordillo (2009) afirman que con esta técnica se puede llegar a la homocigosis en la F<sub>2</sub>, reduciendo el costo para la obtención de un cultivar (Röber *et al.* 2005, Geiger y Gordillo 2009). Por otro lado, Inagaki y Mujeeb-kazi (1998) señalan que esta técnica nos permite ver la expresión diferencial de los caracteres de naturaleza recesiva. La técnica DH junto a las técnicas asistidas por marcadores moleculares han facilitado la identificación y selección de los caracteres dominantes y o recesivos de importancia agrícola (Thomas *et al.* 2003) y un claro ejemplo, es lo realizado por Chen *et al.* (1994) en donde utilizaron marcadores asistidos de conversión de retrocruzamiento con individuos doble haploides para seleccionar líneas resistentes a la roya lineal en cebada.

## **2.3 ESPÁRRAGO DOBLE HAPLOIDE**

### **2.3.1 Historia**

Los primeros estudios e intentos por tener espárragos doble haploides y de sexo masculino fueron en Italia en 1974 en las instalaciones de empresa MONTANASO LOMBARDO Kirschenbilder *et al.* (2015). Esta empresa obtuvo estos individuos por medio de cultivo *in vitro* de anteras y teniendo hasta la fecha un total de 200 clones de individuos DHs en colección. Estos clones fueron seleccionados por sus características morfológicas y de resistencia a enfermedades. En el 2006 se han optado por la utilización de marcadores moleculares para la detección de genes de resistencia a *Puccinia asparagi*, genes relacionados con el sexo, entre otras características asociadas con el rendimiento. Los marcadores más utilizados fueron: AFLPs, RFLPs, SNPs (Tanksley *et al.* 1992).

### **2.3.2 Características del espárrago supermacho**

Antes de la técnica de doble haploides, se buscaba obtener individuos supermachos (YY) a través de cruzamientos selectivos entre genotipos hembras y machos andromonoicos, a través de la autofecundación de plantas andromonoicas y/o a partir de duplicación cromosómica de plantas estaminados haploides (Muñoz *et al.* 2006). Sneeep (1953) explica que morfológicamente las plantas supermachos de espárrago presentan las mismas características en las primeras etapas de vida en relación a los genotipos machos heterocigóticos mostrando las diferencias a partir de los 2 años de vida. Adicionalmente, las características de los supermachos obtenidas por cruzamiento o por técnica *in vitro* (DH) con los demás son: precocidad, resistencia a plagas y enfermedades, mayor adaptación al medio, mayor producción de turiones y menor porcentaje de fibrosidad.

### **2.3.3 Identificación**

La identificación de los espárragos supermachos, antes de la utilización de los marcadores moleculares, se realizaba observando la apertura de la flor. Esta identificación se hacía teniendo en cuenta la temperatura nocturna (12°C) y bajo estas condiciones la floración se daba a los 5 meses y a partir de ahí se observaban las estructuras sexuales y se elegían a los supermachos (Tsay y Hsu 1986). Por otro lado las técnicas asistidas por marcadores moleculares ayudan a detectar la variabilidad y expresión genética apoyando a la identificación de individuos supermachos de espárrago (Tanksley *et al.* 1992).

Las técnicas asistidas con marcadores moleculares facilitan y aceleran la obtención de los objetivos en los programas de mejora genética respaldando la veracidad de los trabajos de selección a nivel morfológico, fisiológico y bioquímico, así como la identificación de genes que apoyan en la expresión de la resistencia a estreses bióticos y abióticos (Tanksley *et al.* 1992, Gebhardt y Salamini 1992, Rafalski y Tingey 1993, Kurata *et al.* 1994 y Becker *et al.* 1995). En el caso del espárrago, los expertos afirman que los caracteres deseados se encuentran asociados al sexo, siendo el macho homocigoto el que presenta mayor precocidad, rendimiento, tolerancia, uniformidad en el calibre, entre otros. Además, la constitución genética del macho homocigótico obtenido por cultivo de anteras no permite la segregación por polinización cruzada que presenta esta especie (20%) debido a que las estructuras del órgano femenino son vestigiales. Esta característica permite reducir las medidas que se tiene para evitar contaminación genética durante el proceso de mejora genética en esta especie (Caruso *et al.* 2007). La identificación de marcadores ligados al sexo nos facilitaría la selección temprana de los genotipos machos, hembras y machos andromonoicos, y de esta manera evitar mezclas en el futuro (Biffi *et al.* 1995, Ozaki *et al.* 1999, Telgmann *et al.* 2007, Caruso *et al.* 2007 y Gebler *et al.* 2007).

De acuerdo a muchos expertos, el espárrago (*Asparagus officinalis* L.) es una especie cuyo sexo se rige por las leyes de Mendel, siendo el alelo dominante la que expresa la característica de macho (Y) y el recesivo (X) la hembra (Milanesi *et al.* 2008). Para corroborar esta teoría con el paso del tiempo se han realizado pruebas que permiten la identificación de los genes que gobiernan la característica sexual. el enunciado anterior es afirmado por Spada *et al.* (1998), el cual recomiendan realizar un mapa genético en el espárrago para la identificación del gen o genes que gobiernan la característica sexual y para lograrlo es necesario el apoyo de técnicas asistidas por marcadores moleculares como los AFLPs, RFLPs, etc. La construcción del mapa como también lo sugirió Loptien (1979), ayudó a la localización del gen en el cromosoma 5; pero sin existo en poder aislarlo y clonarlo; sin embargo, Restivo *et al.* (1995) reportaron tres marcadores RFLPs ligados al sexo, enriqueciendo el mapa genético, localizados en el cromosoma 5. En relación a los individuos obtenidos a través de la técnica de dobles haploides Spada *et al.* (1998) Comentan en su trabajo que al utilizar cuatro técnicas asistidas (RFLP, RAPD, AFLP e Isoenzimas) en los diversos cruces entre dobles haploides, han tenido como resultado 33 marcadores ligados al sexo (13 RFLPs, 18 AFLPs, 2 RAPDs y 1 isoenzima); además afirman que no todos los

genes se encuentran en el cromosoma 5 sino que también se localizan en el cromosoma 1. Asimismo, Milanesi *et al.* (2008) reportaron que a través del análisis BSA (Bulk Segregant Analysis) se identificaron bandas ligadas al sexo presentando una de ellas 700 pb; el cual identificaba al genotipo femenino, porque las muestras machos (YY) no presentaban esa banda.

### **2.3.4 Obtención de líneas dobles haploides**

Para obtener líneas doble haploides debemos partir de un individuo haploide y luego duplicar su juego cromosómico que puede darse de forma espontánea o con ayuda de un agente duplicador (Polci *et al.* 2010).

#### **2.3.4.1 Haploidia**

El individuo haploide contiene célula en donde el núcleo presenta un solo juego de cromosomas. Además, estos individuos se pueden generar tanto de forma espontánea en el ambiente o pueden ser generados en forma artificial (Callohuari 2013). La obtención de la haploidia es pieza clave para la formación de los DHs bajo condiciones *in vitro* (Muñoz *et al.* 2006). En otras palabras, primero se debe tener al individuo haploide cuyo contenido cromosómico es igual al de los gametos normales de la especie (Polci *et al.* 2010).

##### **2.3.4.1.1 Identificación**

De acuerdo a Polci *et al.* (2010), existen varios procedimientos para poder identificar a los individuos haploides y en el espárrago tenemos:

###### **a. Morfología**

Las plantas haploides suelen diferenciarse de las plantas diploides por el tamaño de sus partes vegetativas y florales. El tamaño se debe a la disminución de las dimensiones a nivel celular.

###### **b. Genes marcadores**

Son genes con una ubicación física identificable en un cromosoma cuya herencia se puede rastrear. Con este fin puede utilizarse cualquier par de alelos cuyos genotipos dominantes o recesivos sean fácilmente distinguibles. En la práctica, lo recomendable es usar marcadores

genéticos que posean manifestaciones fenotípicas claras en semillas y a nivel de plántula, para facilitar una respuesta rápida y económica. Los marcadores que fueron utilizados en espárrago, para la identificación de estos individuos son: AFLP, RAPD-PCR y RFLPs (Tanksley *et al.* 1992, Gebhardt y Salamini 1992, Rafalski y Tingey. 1993, Kurata *et al.* 1994 y Becker *et al.* 1995).

#### **2.3.4.1.2 Origen**

La haploidia se origina de forma espontánea en la naturaleza o en un laboratorio con la ayuda de diversos métodos que a continuación se mencionaran (Polci *et al.* 2010):

1. Ginogénesis
2. Androgénesis
3. A partir de alguna célula haploide del saco embrionario del gameto femenino.
4. Cruzamiento interespecífico o intergenérico con eliminación cromosómica.
5. Interacción núcleo-citoplasma.
6. Semigamia.

Dentro de estos seis métodos el más usado por los investigadores es la Androgénesis que puede subdividirse en el cultivo de anteras y microsporas, siendo la más usada el cultivo de anteras.

#### **2.3.4.2 Técnicas *in-vitro***

##### **2.3.4.2.1 Cultivo de anteras**

El cultivo de anteras es una técnica que consiste en la siembra de las mismas bajo un medio nutritivo basado en macronutrientes, micronutrientes, vitaminas y hormonas para la obtención de una planta completa; siendo estas de constitución genética haploide (Dodds y Roberts 1985). Además, Ortuño-Olea *et al.* (1998) y Thomas *et al.* (2003) ameritan que el cultivo de anteras es una técnica sencilla para la obtención de callos, embriones y plantas completas haploides y con su posterior doblaje cromosómico se puede obtener plantas fértiles, conocidas como dobles haploides. Desde que Guha y Maheshwari en 1964 consiguieron de casualidad obtener plantas a partir de anteras, se empezó a trabajar sobre este tema, abarcando hasta la actualidad con en más 200 especies principalmente en

Solanáceas, Gramíneas y Crucíferas (Bajaj 1990). Esta técnica se basa en el cultivo *in-vitro* de anteras inmaduras en un medio de inducción, donde las microsporas competentes formarán callos, que luego serán transferidos a un medio de cultivos adecuado para la embriogénesis somática (Polci *et al.* 2010). El cultivo de anteras es una técnica para la obtención de plantas haploides con gran potencial para el mejoramiento genético de plantas a través de la inducción de individuos haploides en los híbridos, seguido de un doblamiento cromosómico permitiendo la obtención de líneas puras homocigóticas, evitando una larga serie de autofecundaciones (Bouharmont 1989).

Según Eimert *et al.* (2003), muestran que el cultivo de anteras es la herramienta más adecuada, eficiente y barata para la obtención de individuos DHs supermachos de espárrago en comparación a la metodología de cruzamiento convencional. Esta conclusión la obtuvo al utilizar la metodología de marcadores genéticos: RAPD-PCR, con primers con alto contenido C/G en secuencia de dinucleótidos en 87 supuestos doble haploides androgénicos de 7 plantas donante de diferentes cultivares y líneas de mejora, con diferentes antecedentes genéticos. Además, de acuerdo a Polci *et al.* (2010) la capacidad de respuesta al cultivo de anteras, denominada capacidad androgénica, puede ser evaluada a través de la producción de callos y su eficiencia es altamente dependiente de:

a. Genotipo.

El genotipo es un sistema integrado vivo que está conformado por un conjunto de genes que expresan características que diferencian un individuo de otro. Este factor es muy importante en cultivo de tejidos, ya que define los protocolos de micropropagación a nivel de especie, cultivar, accesión y hasta tipo de explante. Además, estas diferencias nacen a través de los ajenos requerimientos que necesita el material y de los genes que la componen para su conversión a planta completa (Polci *et al.* 2010). En maíz, Prasanna *et al.* (2013) afirmaron que la androgénesis es dependiente del genotipo y además junto a otros investigadores señalan que la mayoría de los genotipos de maíz son recalcitrantes y no manifiestan respuesta alguna cuando son sembradas bajo condiciones *in vitro* (Brettell *et al.* 1981, Genovesi y Collins 1982 y Spitzkó *et al.* 2006); sin embargo, Zarate (2013) trabajando en esta misma especie, el cultivar INIAP 101, tuvo éxito en el cultivo de anteras. En el caso de espárrago, Muñoz *et al.* (2006) confirma que existen diferencias en el comportamiento androgénico de

los 14 genotipos en el porcentaje de callos totales, callos embrionarios y plantas con raíces funcionales.

b. El porcentaje de albinismo

Bernard (1980) respalda que la presencia de plantas albinas es un serio problema para el cultivo de anteras y su incidencia depende de la capacidad de respuesta del genotipo a la temperatura durante el proceso de diferenciación. Este investigador señala que la alta temperatura incrementa las diferencias entre la velocidad de replicación del material nuclear y el de los organelos resultando en un desarrollo retardado e incompleto de los plásmidos dando como resultado individuos albinos. Por tal razón, el funcionamiento del sistema fotosintético es promovido por la exposición del material a las bajas temperaturas, aunque no es seguro a un 100 por ciento.

c. Condiciones de crecimiento de las plantas donantes

La planta donadora es una pieza determinante, ya que influye en las condiciones de crecimiento de las microsporas bajo condiciones *in vitro* (Orshinsky *et al.* 1990). Por otro lado, en el caso de trigo, Malagón *et al.* (2007) señalan que la aplicación de ácidos húmicos como fertilizantes a las plantas donadoras tres días antes de cortar las espigas, se obtenían anteras aptas para el cultivo *in vitro* y además en estas promovían la formación de callos embriogénicos hasta 5 veces más que en plantas no tratadas. Por otra parte, Callohuari (2013) afirma que las condiciones de crecimiento de la planta donante pueden marcar una diferencia en el éxito de la producción de plantas *in vitro*.

d. Estado de desarrollo de las microsporas

Las microsporas son el producto final de la microesporogénesis. De acuerdo a Szarejko (2003), el estado de la microspora adecuado para la obtención de la haploidia es el estado uninucleado medio a tardío, ya que en este rango solo uno de los dos núcleos se encuentra estable para poder soportar el estrés generado en las siguientes etapas: el pre-enfriados y la siembra en un medio de inducción. Por otra parte, es fundamental saber o encontrar una correlación entre el estado de la microspora con algún atributo dentro del estado fenológico de la flor o la inflorescencia, y de esta manera facilitar y agilizar la investigación. Bajo esta situación Muñoz *et al.* (2006) detectó que el estado uninucleado de la microspora en espárrago se encontraba en mayor proporción cuando los botones presentaban un tamaño de

1.5 a 2 mm.; sin embargo, Wolyn y Nichols (2003), determinaron que el estado uninucleado de la microspora en el cultivar Guelph Millennium se encuentra en botones de 2.1 a 2.4 mm de longitud. Por otro lado, Peng *et al.* (1997) señalaron que el estado uninucleado de la microspora en el genotipo C459 se presenta cuando los botones florales tienen de 1.7 a 1.9 mm de grosor y 2 a 2.2 mm. de longitud. Una vez encontrada la correlación entre el estado uninucleado de la microspora con algún carácter relacionado con la flor se procede a la extracción de las mismas. Pero esta extracción debe realizarse con sumo cuidado para evitar irregularidades en la respuesta androgénica (Pacheco-Sanchez *et al.* 2003).

#### e. Los pre-tratamientos

El pre-tratamiento consiste en someter a las anteras a estrés ocasionado calor, frío o choques eléctricos por un tiempo determinado. Touraev *et al.* (1997) y Polci *et al.* (2010) señalaron que el pre-tratamiento contribuye a la disminución de la expresión de genes que impiden el cambio de la ruta de crecimiento (de gametofítica a esporofita). Callohuari (2013) cree que incrementando o disminuyendo la temperatura del medio, se puede contribuir a incrementar la respuesta androgénica y más adelante tener estructuras parecidas a embriones. Además, Dunwell (2010), Roca y Mroginsky (1991) revelaron que la temperatura óptima y el tiempo del pre-enfriado dependen del genotipo, tipo de explante y el contenedor donde crecerá el material. En esta etapa el material colectado es sometido al frío y bajo condiciones de oscuridad por un cierto periodo de tiempo con el objetivo de contribuir al cambio de comportamiento de la microspora (Chen *et al.* 1991). De acuerdo a Polci *et al.* (2010) el pre-enfriado reduce la expresión del gen hap, cuya expresión se manifiesta a través de la reducción de la respuesta androgénica o disminución de la formación de callos a partir de la antera. Por otro lado, Ouyang (1986) ha relacionado el tratamiento en frío con la disminución del albinismo en cereales y con la estimulación de la división mitótica ecuacional de las microsporas. Asimismo, Sunderland (1978), señala que el pre-enfriado bajo condiciones oscuras ayuda a la reducción de la actividad respiratoria y con ello prolonga la actividad biológica del arqueosporio que alberga a las microsporas, contribuyendo a la mantención de la viabilidad de las mismas. En relación al espárrago Wolyn y Nichols (2003) recomiendan exponer los botones o pimpollos florales a una temperatura de 4°C por una semana. Por otro lado, Muñoz *et al.* (2006) expusieron los botones de los genotipos evaluados de espárrago a 4°C por un periodo de 24 horas; sin embargo, Peng *et al.* (1997) estudiando el efecto del frío (4°C), se dieron cuenta que la temperatura no detiene el crecimiento de la microspora; pero

este porcentaje de crecimiento no afecta el porcentaje de anteras uninucleadas que se requieren para pasar a la siguiente fase del cultivo de anteras. En cambio, Feng y Wolyn (1999) incrementaron la tasa de producción de callos cuando expusieron los pimpollos florales a 4°C por siete o nueve días.

f. La composición de los medios de cultivo

El medio de cultivo es el segundo factor de mayor importancia que hay que tener en cuenta para el desarrollo de plantas haploides a partir de anteras (Polci *et al.* 2010). Los medios que se utilizan para formación de plantas son el de inducción y el de regeneración.

La parte nutritiva puede influir mucho en el cultivo de anteras afirman muchos autores. En tabaco la ausencia de sacarosa en medio de cultivo puede bloquear la ruta gametofítica de las anteras y movilizarlas hacia la ruta esporofítica promoviendo la producción de embriones haploides (Touraev *et al.* 1996). Por otra parte, en el caso de maíz, Zarate (2013) señala que la utilización de medios de cultivos derivados de protocolos de genotipos chinos de maíz se obtuvo un protocolo de cultivo de anteras en el cultivar maicero INIAP 101.

La etapa de inducción consiste en la formación de callos a partir de las anteras. Este paso es apoyado gracias a pre-enfriado y la ausencia de luz en la mayoría de los casos (Polci *et al.* 2010). El problema durante esta etapa es el grado de oxidación que el medio de cultivo puede ocasionar a las anteras y/o a los callos. La oxidación se define como el cambio de color (de blanco a rojo oscuro) provocado por el daño a las células. La oxidación se produce cuando los fenoles se convierten en quinonas debido a la reacción de fenol oxidasa; siendo la actividad de esta enzima la que provoca la senescencia (Bidwell 1979). Por otro lado, Lux-Endrich *et al.* (2000) aseguraron que el efecto de los azúcares contribuye al incremento de polifenoles en el material provocando la disminución del porcentaje de producción de callos. Además, Feng y Wolyn (1999), trabajando en espárrago, pudieron observar que a partir de una concentración de 6% de sacarosa en el medio, el número de callos desciende abruptamente. Por otro lado, muchos autores afirman que la presencia de los reguladores de crecimiento como el 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y el 6-bencilaminopurina (BAP) puede ocasionar oxidación en las anteras; sin embargo, para el espárrago la presencia del 2,4 D reduce significativamente el número de callos por anteras (Feng y Wolyn 1999). Por otro el contenido nutricional es factor importante para la formación de callos a partir de anteras

y un claro ejemplo es el citado por Muñoz *et al.* (2006). Estos autores manifestaron que el medio de cultivo Murashige & Skoog (MS) suplementado con 2 mg/L de BAP y 0.5 mg/L ANA y 5% de agar, causó en el 64% de los híbridos estaminados, el 33% de callos androgénicos.

La regeneración es la etapa en donde el callo inducido es pasado a un medio de cultivo especializado para incentivar la diferenciación celular y con ellos la formación de embriones y órganos. Esta etapa es muy crítica, Feher *et al.* (2003) consideraron que la adición exógena hormonal no es fundamental, sino la que lleva consigo el material (nivel hormonal endógeno). En otras palabras, que la composición hormonal presente en el material es el que determinará la respuesta del explante en condiciones *in vitro*. Además, el estrés ocasionado por las condiciones extracelulares debido a la composición nutricional y/o hormonal puede conllevar a la formación de embriones (Polci *et al.* 2010). Asimismo, la mayoría de investigadores realzan la importancia de las hormonas como las auxinas y citoquininas exógenas en la embriogénesis somática (Dudits *et al.* 1991, Yeung 1995 y Sagare *et al.* 2000).

#### g. Condiciones de incubación

La temperatura es un factor importante en el crecimiento y desarrollo de la planta madre; ya que se ha demostrado su influencia en la obtención de plantas completas a partir de anteras (Malagón *et al.* 2007). Por otro lado, las condiciones ambientales en la que crecen el material *in-vitro* influyen en la respuesta androgénica. Los factores medio ambientales más críticos son el fotoperiodo, la intensidad de luz, la temperatura, la nutrición y la concentración de CO<sub>2</sub>. Además, se ha demostrado que estos factores activan la capacidad de producción de divisiones celulares morfogénicas para la regeneración de embriones (Polci *et al.* 2010). Igualmente, la temperatura y la intensidad de luz pueden presentar efectos positivos en el espárrago. Según Wolyn y Feng (1993) el factor determinante en espárrago es la temperatura, indicando que para los genotipos evaluados se obtuvo respuesta androgénica de cero a 50% y cuatro de los cinco genotipos evaluados alcanzaron de 70% a un 100% de plantas haploides. Asimismo, la mayor frecuencia inducción de callos embriogénicos se obtuvo a una temperatura de 32°C (la temperatura más alta en el ensayo). Por otro lado, Muñoz *et al.* (2006) sometieron las anteras de 15 genotipos de espárrago estaminados a 28.2°C bajo condiciones de oscuridad obteniendo callos a las 6 y 8 semanas. Asimismo,

Feng y Wolyn (1991) afirman que las temperaturas altas contribuyen a la inducción de callos y además reduce el porcentaje de callos oscuros.

### **2.3.5 Duplicación cromosómica**

La duplicación cromosómica es un fenómeno que consiste en la repetición de un cromosoma a continuación de su original. Este acontecimiento surge por errores en la duplicación en el ADN, como producto de la reorganización del cromosoma del tipo estructural o relacionado con un proceso de sobrecruzamiento defectuoso. Además, estas duplicaciones no suelen presentar un fenotipo distinguible a simple vista; por lo tanto, para su discriminación se debe realizar el análisis citogenético y/o molecular (Polci *et al.* 2010). La duplicación cromosómica se establece de manera natural o se puede inducir a través de la exposición del material biológico a sustancias químicas que alteren los procesos de división celular. Entre ellos tenemos la más conocida y usada: la colchicina (Chaikam y Mahuku 2014).

En el reino *Plantae* existen especies que se deben exponer a reactivos como la colchicina para doblar su contenido cromosómico; mientras que otras no es necesario realizar este proceso, ya que ellas mismas pueden endorreplicarse (Lentini *et al.* 1997). Según Arcos (2014) y Chaikam y Mahuku (2014), afirman que la colchicina es un alcaloide soluble en agua y su presencia evita la formación de los microtúbulos del uso acromático durante la metafase. Este proceso impide el desplazamiento equitativo de los cromosomas hacia los polos de la célula; quedando en un solo polo durante la anafase, para finalmente tener una célula con doble contenido cromosómico. Por otra parte, Kasha *et al.* (2001) mencionan que las microsporas al ser expuestas al manitol, pueden fusionar sus núcleos en la primera división nuclear obteniendo una célula con doble contenido cromosómico.

#### **2.3.5.1 Colchicina**

La colchicina es un alcaloide que se encuentra en los bulbos y raíces de colquito (*Colchicum autumnale*) y se ha demostrado que evita el crecimiento del uso mitótico durante la mitosis celular favoreciendo la duplicación cromosómica (Braak y Zeilinga 1957). Uno de los objetivos para su utilización fue para la restauración de la fertilidad de híbridos interespecíficos e intergenéricos y para acelerar el proceso de endocría en la obtención de plantas DHs (Betül y Ülkü 2008). Además, Betül y Ülkü (2008) indican que la efectividad de la colchicina para la obtención de la duplicación cromosómica ha sido reportada por

muchos autores en diferentes plantas como: trigo (Navarro-Alvarez *et al.* 1994), Maíz (Wan *et al.* 1989), *Brassica napus* (Weber *et al.* 2005), mostaza de la india (Prem *et al.* 2005), etc

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 MATERIAL VEGETAL

El material vegetal utilizado fueron las anteras extraídas de los pimpollos obtenidos en la etapa reproductiva de los cultivares ATLAS, IDA LEA y UC 157 F1.

#### Procedencia de las plantas donadoras de anteras

El material vegetal fue obtenido de tres cultivares de espárrago sembrados en el Fundo San Jacinto, ubicado en el distrito de Nepeña, provincia de Santa departamento de Ancash, durante el mes de enero del 2013.

#### Recolección del material vegetal

Las plantas madres de espárrago estuvieron creciendo bajo condiciones fitosanitarias óptimas. La recolección se realizó partir del primer año, cuando la planta inicio el periodo de floración.

#### Condiciones climáticas de la zona donde se extrajo el material vegetal

El distrito de Nepeña presenta una variación entre T° mínima y T° máxima de 5°C al año. A continuación, se muestran las temperaturas promedio del distrito de Nepeña (cuadro 1).

**Cuadro 1. Temperaturas medias, máxima y mínima del distrito de Nepeña, Provincia de Santa, departamento de Ancash en el año 2013.**

T (°C)	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Tem. Med.	21.1	22.3	22.4	20.7	19.1	17.9	17.3	16.9	17	17.7	18.4	19.8
Temp. Min.	16.4	17.5	17.7	16.3	14.8	13.6	13	12.8	12.9	13.4	13.8	15.1
Temp. Max.	25.9	27.1	27.1	25.1	23.5	22.3	21.7	21	21.2	22	23.1	24.6

FUENTE: Climate-data.org (2013)

### **3.2 FASES DE TRABAJO**

#### **Colección de los botones florales**

La recolección de los botones florales se dio antes de la floración y se realizaron las observaciones bajo el microscopio para determinar el momento óptimo de colección.

#### **Determinación del estado de la microspora**

Los botones fueron seleccionados por su tamaño, evaluando las siguientes longitudes: 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 y 4.0 mm y extrayendo tres anteras por tamaño. Estas anteras se colocaron en porta objetos y se bañaron con una gota de aceto-orceína al 2%, realizando el squash y luego con ayuda del microscopio se observaron y contabilizaron las microsporas en el estado uninucleado (100 microsporas por antera).

#### **Pretratamiento para la inducción de callos**

Se mantuvieron los pimpollos florales a 4°C por 24 horas, para acelerar la inducción de callo (Muñoz *et al.* 2006).

#### **Desinfección de botones florales**

Los botones florales fueron llevados al laboratorio y posteriormente lavados con agua de caño para eliminar el polvo o suciedad que podrían traer del campo. Después fueron sumergidos en los siguientes tratamientos de lejía por un lapso de 10 minutos (Cuadro 2).

**Cuadro 2. Porcentaje de hipoclorito de sodio usado para la desinfección de los botones florales de los tres cultivares de espárrago (ATLA, IDA LEA y UC 157 F1).**

	L1	L2	L3	L4	L5
Hipoclorito de sodio	0.55%	1.1%	1.65%	2.2%	Control (0%)

#### **Siembra de anteras**

Con ayuda de un estereoscopio se procedió a extraer las anteras utilizando pinzas y un estilete previamente esterilizados. Por placa Petri con medio de cultivo de inducción se sembraron 20 anteras. Después de procedió al sellado de las placas Petri con parafilm y luego fueron envueltas con papel aluminio.

## **Inducción de callos**

Las anteras sembradas en placa Petri fueron incubadas bajo condiciones de oscuras y a una temperatura de 27° C (Muñoz *et al.* 2006) con el fin de inducir la formación de callos. Se observaron los cambios que se produjeron en las anteras durante el período de inducción a partir de los 14 días después de la siembra. Se probaron cinco medios de cultivo y estos son:

T1: Murashige & Skoog más 2% de glucosa, 0.1 mg/l NAA y 10 mg/l BAP (Inagaki. 1983).

T2: Murashige & Skoog más 3% de sucrosa, 0.1 mg/l NAA, 0.5 mg/l BAP y 0.5 mg/L 2,4D (Shalaby *et al.* 2005).

T3: Murashige & Skoog más 5% de sucrosa, 2 mg/l NAA y 1 mg/l BAP (Feng y Wolyn 1991).

T4: Murashige & Skoog más 6% de sucrosa, 2 mg/l NAA y 1 mg/l BAP (Peng y Wolyn 1999).

T5: Murashige & Skoog más 2 mg/l NAA y 1 mg/l BAP (Muñoz *et al.* 2006).

A cada medio de inducción se le añadió 0.65 mg/l de ancymidol, para acelerar el proceso de respuesta androgénica (Muñoz *et al.* 2006).

## **Regeneración**

Los callos con un diámetro de 2mm procedentes del medio de inducción fueron sembrados en un medio de regeneración. En esta etapa se probaron lo siguientes cinco medios de cultivo.

R1: Murashige & Skoog más 3% de sucrosa, 0.3 mg/l NAA y 0.2mg/l BAP (Shalaby *et al.* 2005)

R2: Murashige & Skoog más 1 mg/l NAA y 1 mg/l BAP (Inagaki *et al.* 1983).

R3: Murashige & Skoog más 3% sucrosa, 800 mg/l glutamina, 500 mg/l caseina hidrolizada, 2 mg/l NAA, 1 mg/l BAP (Peng y Wolyn 1999).

R4: Murashige & Skoog más 6 % sucrosa, 0.1 mg/l NAA, 0.1 mg/l kinetina (Feng y Wolyn 1991).

R5: Murashike & Skoog más 0.1 mg/l NAA, 0.1 mg/l cinetina (Muñoz *et al.* 2006).

A cada medio de regeneración se le añadió 0.65 mg/l de ancymidol, para acelerar el proceso de regeneración (Muñoz *et al.* 2006).

### **Determinaciones del índice mitótico**

Para determinar este proceso, primero se procedió a extraer las raíces de las plantas obtenidas en el medio de regeneración. Estas raíces fueron sometidas al siguiente protocolo:

- a. Se colectaron de 6 a 9 raíces en una solución pre-fijadora de 0.02M de 8-hydroxiquinoline y se mantuvo a 4°C por 6 horas en refrigeración.
- b. Las raíces fueron transferidas a la solución carnoy (3 partes de etanol absoluto: 1 parte de ácido acético glacial) a 24 horas a 4°C.
- c. La maceración con ácido clorhídrico 1N en una estufa constante a 60°C por 8 - 10 minutos.
- d. Tinción con lacto propionico orceina por 24 horas.
- e. Luego se realizó el aplastado o squash y observarlo en el microscopio.

### **Aclimatación**

Las plantas regeneradas fueron aclimatadas por un mes, para asegurar su completa adaptación al medio ambiente.

## **3.3 VARIABLES UTILIZADAS EN EL ANÁLISIS**

### **Etapa de desinfección**

- Porcentaje de desinfección.

### **Etapa de inducción**

- La tasa de inducción (número de callos / antera). Se contó el número de anteras que produzcan callos sobre el total de anteras multiplicado por 100.
- Porcentaje de oxidación de las anteras. Se contó el número de anteras que se oxidaron sobre el total de estos multiplicado por 100.
- Porcentaje de oxidación de los callos. Se contó el número de callos que se oxidaron sobre el total de estos multiplicado por 100.
- La tasa de transferencia. Se contó el número de callos aptos que pasaron al medio de regeneración.

### **Etapa de regeneración**

- Tasa de regeneración. Se realizó el conteo del número de brotes, raíces y embriones que regeneraron por callo.
- Producción de embriones/callo. Se contó y registro el número de embriones que se formaron por callo durante el proceso de regeneración.
- Número de plantas/callo. Se evaluó el número de plantas producidas por callo.
- Plantas aclimatadas. Se contabilizó el número de plantas que sobrevivieron durante la etapa de aclimatación.

### **3.4 MODELO ESTADÍSTICO**

El modelo es un DCA con arreglo factorial 3A x 5B, siendo A: cultivar y B es dependiendo de la etapa que se registre los datos:

#### **Etapa de desinfección**

B: Concentración de hipoclorito de sodio.

#### **Estado de la microspora**

B: Tamaño del botón.

#### **Etapa de inducción, transferencia y regeneración**

B: Medios de cultivo

Teniendo 15 tratamientos con 10 repeticiones por tratamiento; sin embargo, después de la tasa de transferencia se utilizó un diseño completamente al azar, debido a que solo el cultivar UC 157 siguió las etapas posteriores teniendo 5 medios de cultivo como tratamientos y 10 repeticiones por tratamiento

## IV RESULTADOS

### 4.1 MÉTODO DE DESINFECCIÓN

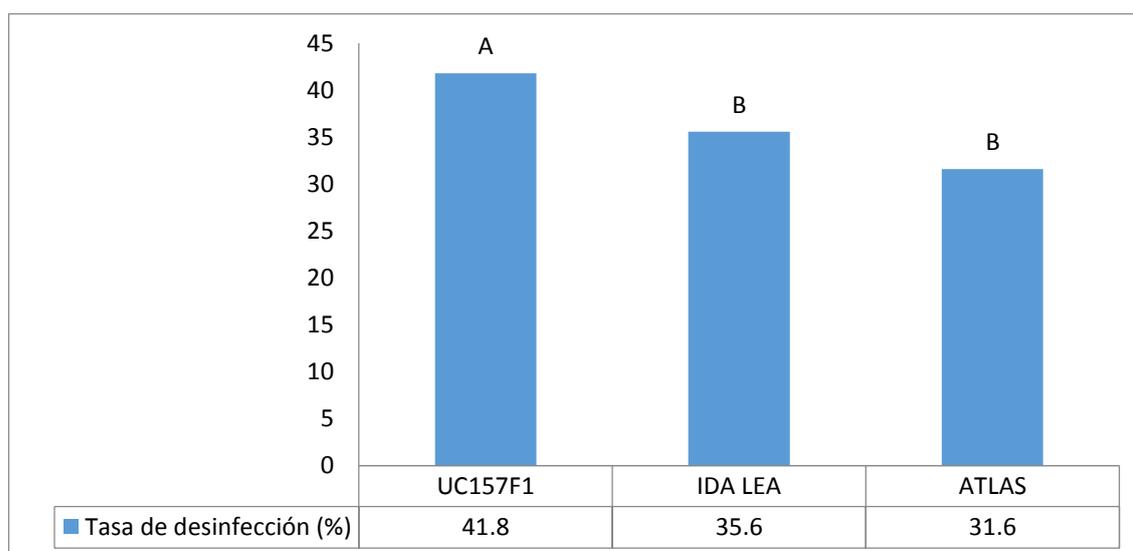
En el ANVA general se puede apreciar que la lejía influye en el porcentaje de desinfección en los tres cultivares de espárrago (Cuadro 3).

**Cuadro 3. ANVA de la tasa de desinfección con lejía en tres cultivares de espárrago (ATLAS, IDA LEA y UC 157 F1)**

FV	GL	SC	CM	F-CAL	P-VALOR
CULTIVAR (C)	2	2641.3	1320.650	13.375	0.0001
LEJIA (L)	4	102913.3	25728.325	260.564	0.0001
C X L	8	1598.7	199.838	2.024	0.048
ERROR	135	13330.0	98.741		
TOTAL	149	1204830.3			

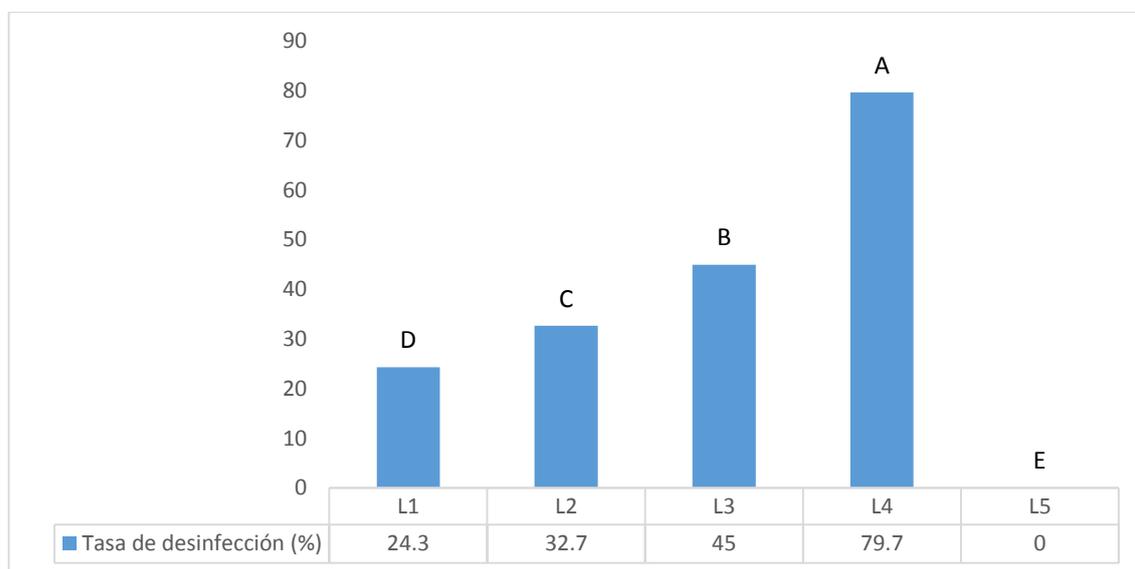
Alpha=0.05 CV: 20.548

Se observó que dentro de los tres cultivares (Figura 1), solo la UC 157 tuvo una tasa de desinfección mayor a las demás (41.8%); sin embargo, este porcentaje de desinfección es muy bajo, debido a estos resultados lo conveniente sería sembrar más anteras, para tener material suficiente y así poder cumplir con los objetivos.



**Figura 1. Respuesta de la tasa de desinfección de tres cultivares de espárrago (ATLAS, IDA LEA y UC 157 F1) ante la exposición a la lejía. Prueba Tukey ( $p \leq 0.05$ ).**

Las dosis de lejía utilizadas (Figura 2); solo la dosis de 2.2% (L4) produjo una tasa de desinfección adecuada para los tres cultivares de espárrago con un valor de 79.7%. En resumen la dosis de hipoclorito de sodio al 2.2% (L4) fue la mejor y permitió la esterilización de la superficie del pimpollo floral en forma eficiente.



**Figura 2. Efecto de la lejía en la desinfección de pimpollos florales de tres cultivares de espárrago (ATLAS, IDA LEA y UC 157 F1). Prueba Tukey ( $p \leq 0.05$ ).**

En los tratamiento (Cuadro 4), como también se refleja en la figura 2, con la dosis de hipoclorito de sodio al 2.2%, se consiguió la desinfección mayor a las demás concentraciones de lejía; sin embargo, el cultivar UC 157 (86%) e IDA LEA (84%) tuvieron porcentajes más altos que el cultivar Atlas (69%).

**Cuadro 4. Efecto de lejía en la tasa de desinfección de pimpollos florales de tres cultivares de espárrago (ATLAS, IDA LEA y UC 157 F1). Prueba Tukey ( $p \leq 0.05$ ).**

LEJIA	ATLAS	IDA LEA	UC 157
L1 (0.55%)	21 G	23 G	29 G
L2 (1.1%)	30 G	28 G	40 E
L2 (1.65%)	38 F	43 E	54 D
L4 (2.2%)	69 C	84 B	86 A
L5 (0%)	0 H	0 H	0 H

#### 4.2 PORCENTAJE DEL ESTADO UNINUCLEADO DE LA MICROSPORA

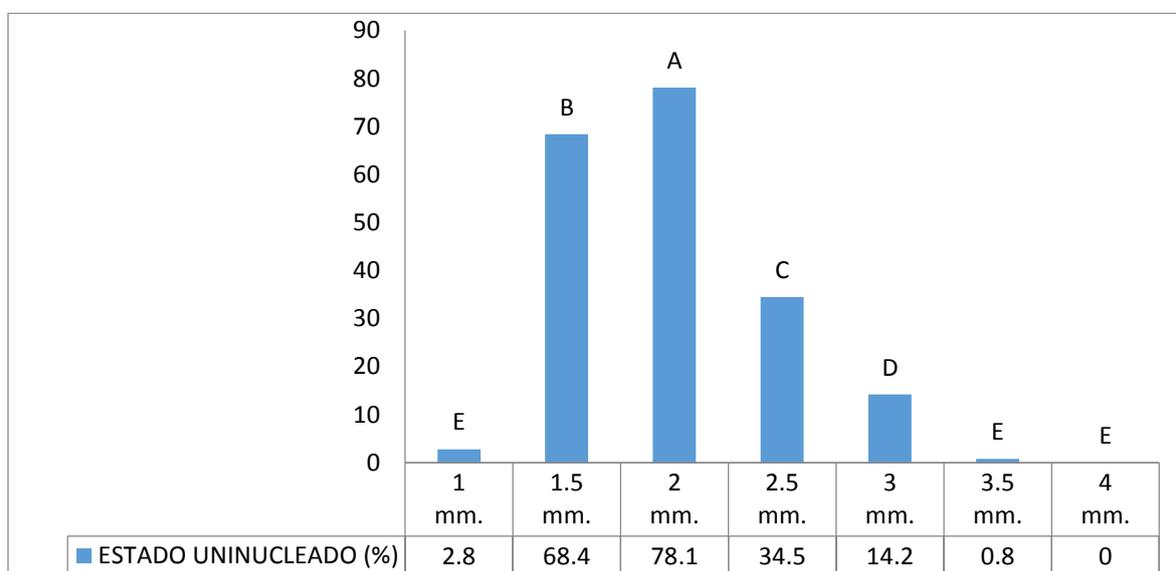
El análisis ANVA reveló que el porcentaje del estado uninucleado de la microspora varía en los tres cultivares, así como el tamaño del botón floral y su interacción (Cuadro 5).

**Cuadro 5. ANVA del estado uninucleado de la microspora de tres cultivares de espárrago (ATLAS, IDA LEA y UC 157 F1).**

FV	GL	SC	CM	F-CAL	P-VALOR
TAMAÑO DEL BOTÓN (B)	6	58849.300	9808.217	481.413	0.0001
CULTIVAR (C)	2	448.300	224.150	11.002	0.0001
B X C	12	1042.400	86.867	4.264	0.0001
ERROR	42	855.700	20.374		
TOTAL	62	61195.700			

Alpha=0.05 CV: 18.758

El análisis Tukey del tamaño del botón reveló que el porcentaje del estado uninucleado de la microspora es diferente. Además, estos resultados han revelado que el tamaño ideal del botón floral en donde se tiene un mayor porcentaje de microsporas uninucleadas (Figura 4) es el cuándo el pimpollo floral tiene una longitud de 2 mm (Figura 3).

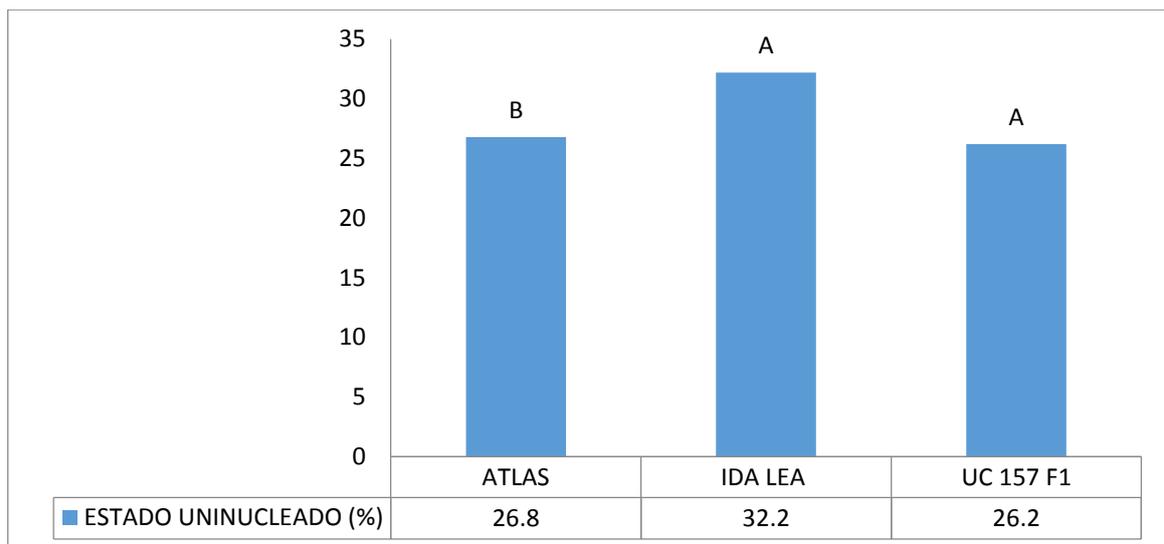


**Figura 3. Porcentaje de microsporas uninucleadas promedio por tamaño de botón en tres cultivares de espárrago (ATLAS, IDA LEA y UC 157 F1). Prueba Tukey ( $p \leq 0.05$ ).**

En los cultivares (Figura 5), se pudo observar que el estado uninucleado de la microspora en el cultivar IDA LEA (32.2%) y UC 157 (26.2%) presentaron porcentajes similares. Mientras que el cultivar ATLAS presentó una proporción menor a estas dos. Esta proporción se origina por la alta variación que existe entre los valores de microsporas uninucleadas de cada cultivar dentro de cada tamaño de botón utilizado en el experimento.



**Figura 4. Estado uninucleado de la microspora en espárrago.**



**Figura 5. Respuesta de los cultivares en la proporción del estado uninucleado de la microspora en tres cultivares de espárrago (ATLAS, IDA LEA y UC 157 F1). Prueba Tukey ( $p \leq 0.05$ ).**

En los tratamientos se puede apreciar que cada cultivar responde de forma diferente (Cuadro 6); sin embargo, el mayor porcentaje de microsporas uninucleadas para los cultivares ATLAS (79.4%) e IDA LEA (79.7%) fue cuando el botón tiene 1.5 mm de longitud. Para el cultivar UC 157 F1 (84.4%) se obtuvo cuando el pimpollo tiene 2 mm de longitud. En general se pudo observar que para los tres cultivares el tamaño apropiado del botón es de 1.5 a 2 mm de altura (Figura 3).

**Cuadro 6. Efecto del tamaño del botón en la proporción del estado de la microspora en los tres cultivares (ATLAS, IDA LEA y UC 157 F1). Prueba Tukey ( $p \leq 0.05$ ).**

Tamaño del botón	ATLAS	IDA LEA	UC 157
1 mm	0 E	4 E	4.3 E
1.5 mm	60.4 B	84.4 A	60.4 B
2 mm	79.4 A	79.7 A	75 A
2.5 mm	34.5 C	34.7 C	34.3 C
3 mm	11.5 E	21.7 D	9.4 E
3.5 mm	1.3 E	0.7 E	0.3 E
4 mm	0 E	0 E	0 E

Los resultados anteriores nos determinaron que el estado uninucleado de la microspora de los cultivares de espárrago (ATLAS, IDA LEA y UC 157 F1) se encuentra cuando el pimpollo floral de estos cultivares está en el rango de 1.5 mm a 2 mm. En base a estos resultados se procedió a la recolección de los botones florales para después someterlos a fase de pre enfriado (4°C por un día). Terminado la fase de pre enfriado, las anteras contenidas en los pimpollos florales de los tres cultivares de espárrago fueron sembrados en cinco medios de cultivos bajo condiciones estériles para evaluar la etapa de inducción (Cuadro 7).

**Cuadro 7. Medios de cultivo usados para la inducción de callos en tres cultivares de espárrago (ATLAS, IDA LEA y UC 157 F1).**

Código	Composición de los medios de inducción	Autor
T1	MS más 2% de glucosa, 0.1 mg/l NAA y 10 mg/l BAP	Inagaki <i>et al.</i> 1983
T2	MS más 3% de sucrosa, 0.1 mg/l NAA, 0.5 mg/l BAP y 0.5 mg/l 2,4D	Shalabi <i>et al.</i> 2005
T3	MS más 5% de sucrosa, 2 mg/l NAA y 1 mg/l BAP	Feng y Wolyn 1991
T4	MS más 6% de sucrosa, 2 mg/l NAA y 1 mg/l BAP	Peng y Wolyn 1999
T5	MS más 2 mg/l NAA y 1 mg/l BAP	Muñoz <i>et al.</i> 2006

En la etapa de inducción se evaluó lo siguiente:

#### 4.3 OXIDACIÓN DE LAS ANTERAS

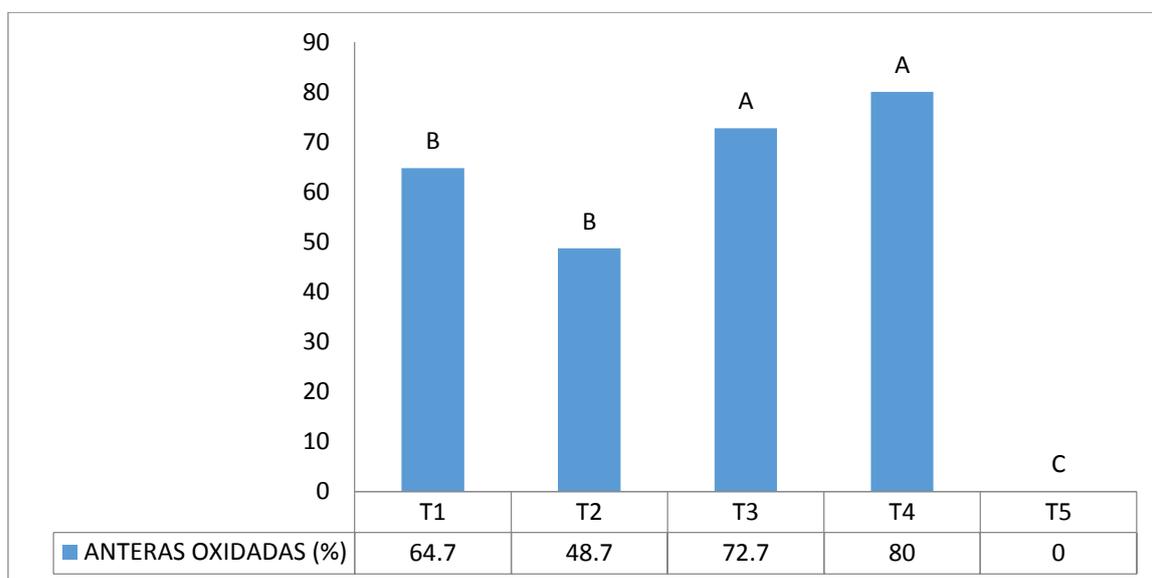
El análisis ANVA reveló que el medio de cultivo repercute en la oxidación de las anteras (Cuadro 8).

**Cuadro 8. ANVA del porcentaje de oxidación de las anteras de tres cultivares de espárrago (ATLAS, IDA LEA y UC 157 F1).**

FV	GL	SC	CM	F-CAL	P-VALOR	SIGN.
CULTIVAR (C)	2	782.300	391.150	0.744	0.477	NS
MEDIO DE CULT. (MC)	4	122652.700	30663.175	58.297	0.0001	****
C X MC	8	2714.300	339.288	0.645	0.739	NS
ERROR	135	71007.500	525.981			
TOTAL	149	197156.800				

**Alpha=0.05 CV: 19.756**

En los medios de cultivo se pudo observar que los tratamientos T3 y T4 provocaron la oxidación del material en un 72.7% y 80% respectivamente. Además, las diferencias entre los tratamientos T1 al T4 con el T5 se dio por la presencia de azúcar. Por otro lado, se pudo apreciar que la concentración de ANA y la relación ANA/BAP es mayor en los medios T3 y T4 que en T1 y T2, lo que permite intuir que la oxidación de las anteras está influenciado por la concentración de ANA y la relación ANA/BAP presentes en el medio. Bajo las premisas anteriores podemos decir que los medios T3 y T4 contribuyeron al incremento en el porcentaje de oxidación en las anteras en los tres cultivares (Figura 6).



**Figura 6. Efecto del medio de cultivo en el porcentaje de anteras oxidadas de tres cultivares de espárrago (ATLAS, IDA LEA y UC 157 F1). Prueba Tukey ( $p \leq 0.05$ ).**

#### 4.4 TASA DE INDUCCIÓN

En el cuadro ANVA se puede apreciar que los medios de cultivo provocaron respuestas diferentes en la tasa de inducción (Cuadro 9).

**Cuadro 9. ANVA de la tasa de inducción en tres cultivares de espárrago (ATLAS, IDA LEA y UC 157) a las 2 MDS.**

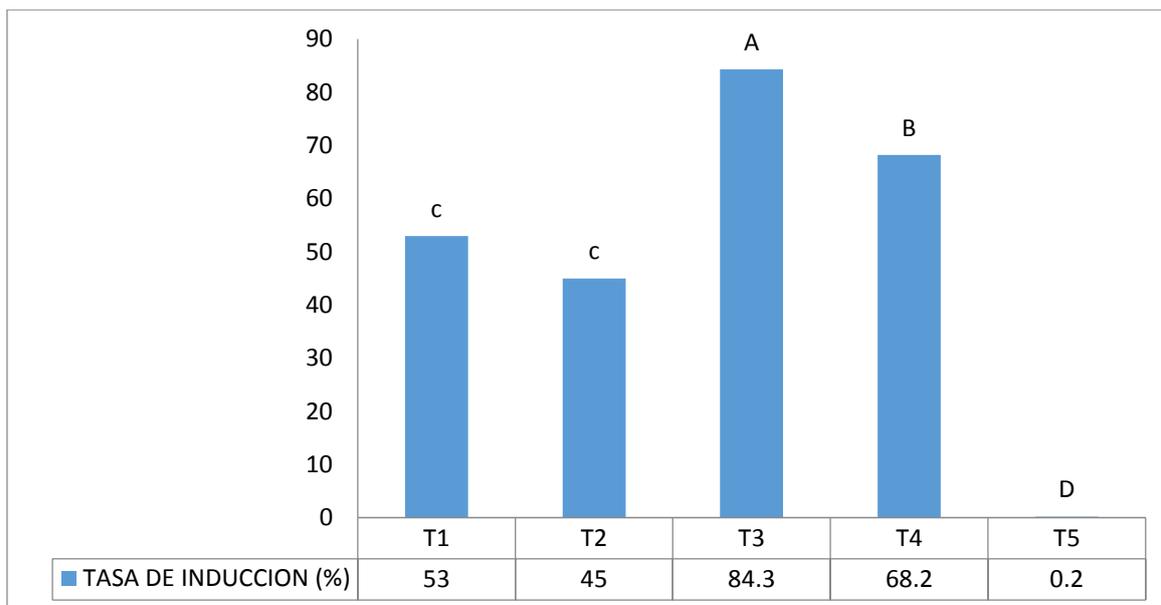
FV	GL	SC	CM	F-CAL	P-VALOR	SIGN
CULTIVAR (C)	2	22.300	11.150	0.017	0.98	NS
MEDIO DE CULT. (MC)	4	120782.300	30195.575	46.998	0.0001	****
C X MC	8	157.700	19.713	0.031	1	NS
ERROR	135	86735.000	642.481			
TOTAL	149	207697.300				

Alpha=0.05 CV: 21.598

El análisis Tukey reveló que los medios de cultivo influyen en la tasa de inducción de callos (Figura 8). Estos resultados han revelado que el medio inductivo T3 se obtuvo una tasa de inducción de callos de 84.3%. Por otro lado, se pudo observar que las diferencias entre el T5 y los demás medios se basan en la presencia de azúcar; sin embargo, dentro de estos medios se vio que la inducción de callos en los medios T3 y T4 es mayor a la T1 y T2, debido a que la concentración de ANA, así como su relación ANA/BAP es mayor. Esta respuesta se obtuvo a los dos meses después de la siembra (2 MDS), manifestando que el azúcar es un factor importante en la producción de callos en espárrago y que además sumado con una concentración de ANA (2mg/l) y relación ANA/BAP (2) contribuyeron al incremento de la respuesta androgénica. Además, cabe decir que existen otros factores que sumados a los mencionados anteriormente contribuyeron al cambio de ruta de crecimiento de las microsporas a la formación de callos, y estos son: el pre enfriado (4°C por un día) y las condiciones de incubación de las anteras (bajo condiciones oscuras y a 27°C). En la figura 7 se puede observar cómo han reaccionado las anteras a la producción de callos.



**Figura 7. Efecto de los medios de cultivo en la oxidación de callos y tasa de inducción de tres cultivares de espárrago (ATLAS, IDA LEA y UC 157 F1). A: medio de inducción T1, B: medio T2, C: medio T3, D: medio T4 y E: medio T5.**



**Figura 8. Efecto de los medios de cultivo en la tasa de inducción en cultivares de espárrago (ATLAS, IDA LEA y UC 157 F1) a las 2 MDS. Prueba Tukey ( $p \leq 0.05$ ).**

#### 4.5 OXIDACIÓN DE LOS CALLOS

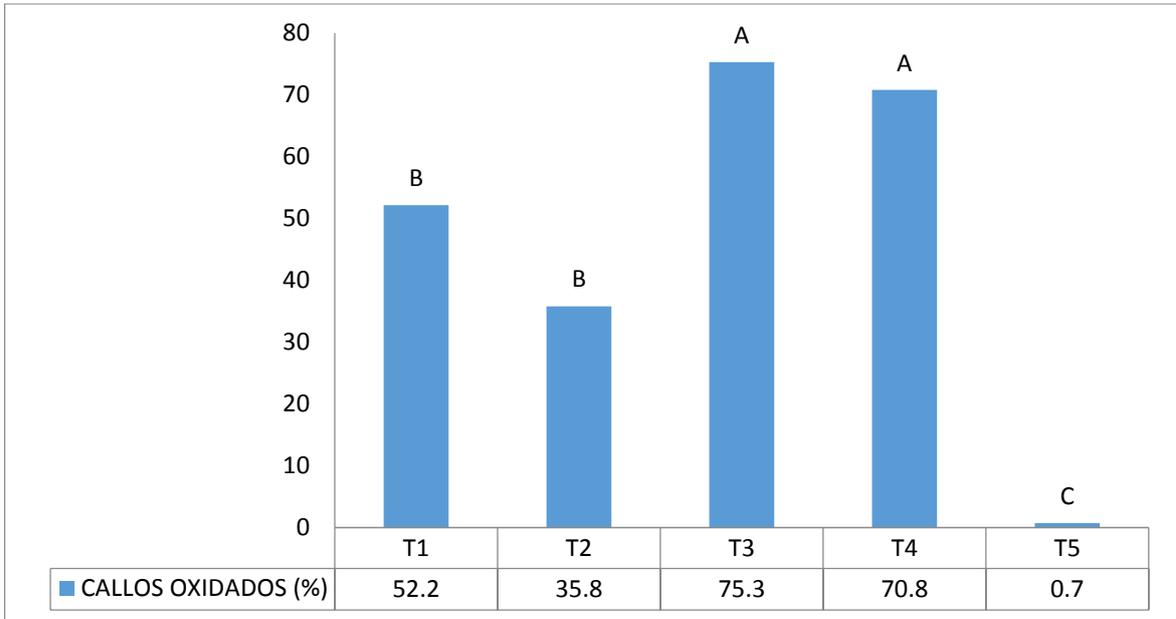
En el análisis ANVA reveló que los medios de cultivo provocaron respuestas diferentes en la producción de callos oxidados (Cuadro 10).

**Cuadro 10. ANVA de la formación de callos oxidados en tres cultivares de espárrago (ATLAS, IDA LEA y UC 157 F1) a los (2 MDS).**

FV	GL	SC	CM	F-CAL	P-VALOR	SIGN
CULTIVAR (C)	2	114.300	57.150	0.102	0.1	NS
MEDIO DE CULT. (MC)	4	110069	27517.250	49.201	49.2	****
C X MC	8	1909	238.625	0.427	0.43	NS
ERROR	135	75502.5	559.278			
TOTAL	149	187594.8				

**Alpha=0.05 CV: 25.564**

El análisis Tukey reveló a los dos meses después de la siembra (2MDS), el medio de cultivo T3 (75.3%) y T4 (70.8%) ocasionaron porcentajes de callos oxidados por encima del resto. Por otro lado, la presencia del azúcar provocó que los medios T1 a T4 presentaran callos oxidados mientras que en el T5 por su ausencia no (Figura 8). Sin embargo, las diferencias entre los tratamientos T1 al T4 puede deberse a la concentración de ANA así como a la relación ANA/BAP, ya que los medios T3 y T4 se prepararon con una concentración mayor de ANA (2mg/l) y además presentaron una relación ANA/BAP (2) mayor a los medios T1 y T2 (Figura 9 y Cuadro 7).



**Figura 9. Efecto de los medios de cultivo en la formación de callos oxidados en tres cultivares de espárrago (ATLAS, IDA LEA y UC 157) a los 2 MDS. Prueba Tukey ( $p \leq 0.05$ ).**

#### 4.6 TASA DE TRANSFERENCIA

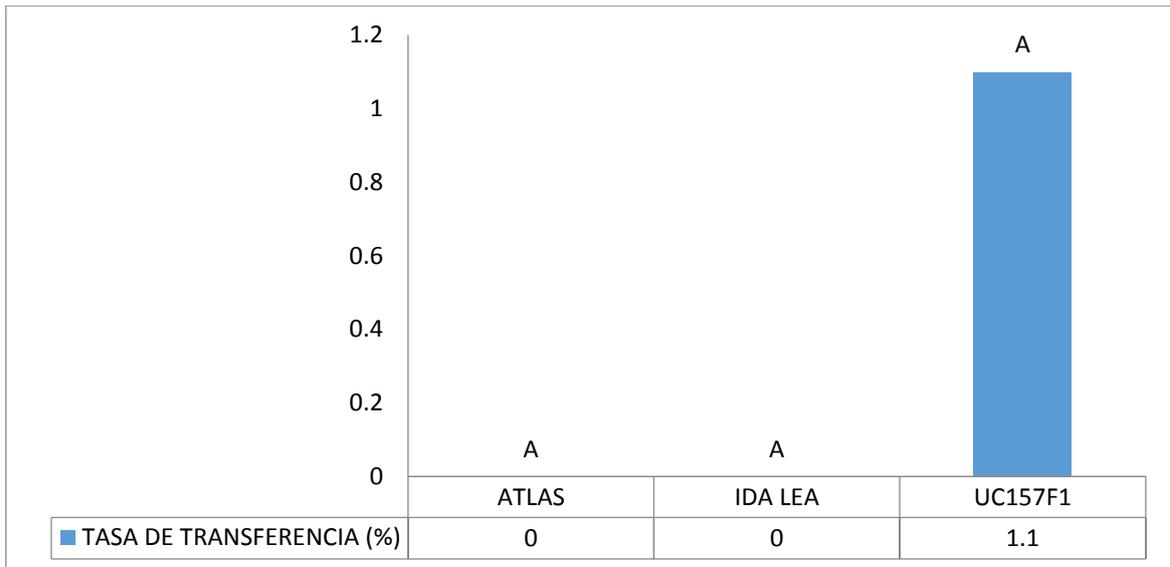
El análisis ANVA reveló que existen respuestas diferentes a nivel de cultivar, medio de cultivo y de su interacción (Cuadro 11).

**Cuadro 11. ANVA de la producción de callos aptos para la transferencia de tres cultivares de espárrago (ATLAS, IDA LEA y UC 157 F1) a los 4 MDS.**

FV	GL	SC	CM	F-CAL	P-VALOR	SIGN
CULTIVAR (C)	2	40.33	20.17	12.23	0.0001	****
MEDIO DE CULT. (MC)	4	80.667	20.17	12.24	0.0001	****
C X MC	8	161.333	20.17	12.24	0.0001	****
ERROR	135	222.5	1.65			
TOTAL	149	504.833				

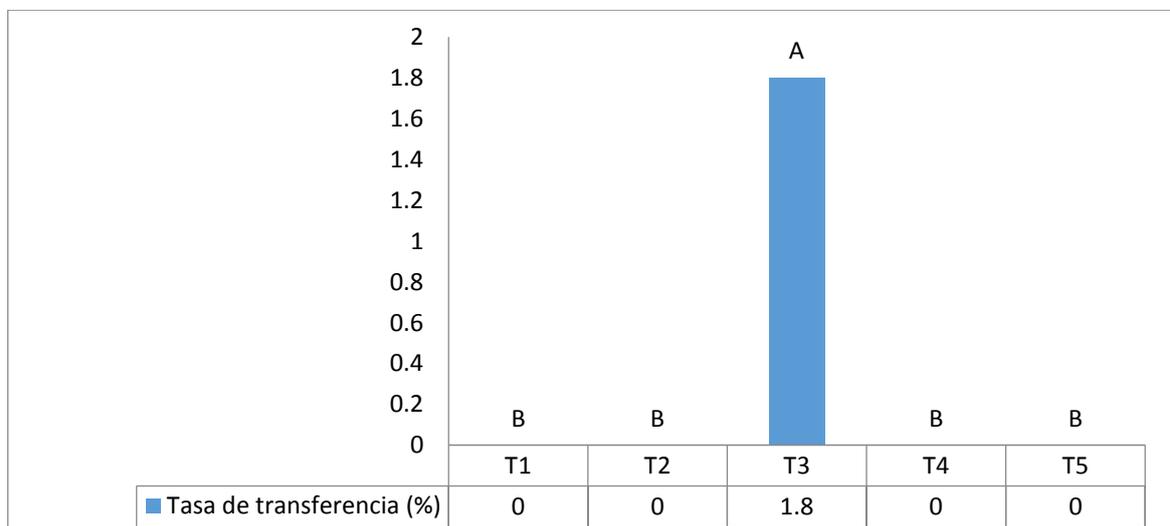
**Alpha=0.05 CV: 24.568**

En los cultivares, el análisis Tukey reveló a los cuatro meses después de la siembra (4 MDS) que solo las anteras del cultivar UC 157 F1 produjeron callos blancos para la transferencia (1.1 %), mientras que los demás cultivares no. Este comportamiento puede deberse a que el cultivar UC 157 F1 es más tolerante al medio de cultivo que los otros dos cultivares (Figura 10).



**Figura 10. Efecto de los cultivares (ATLAS, IDA LEA y UC 157 F1) en la producción de callos aptos para la transferencia a los 4 MDS. Prueba Tukey ( $p \leq 0.05$ ).**

A nivel de medios de cultivo se puede apreciar que el medio inductivo T3 produjo 1.8% de callos blancos, mientras que en los otros medios no hubo respuesta. Esta situación puede deberse a las concentraciones ANA y BAP en el medio, así como la relación ANA/BAP (Figura 11).

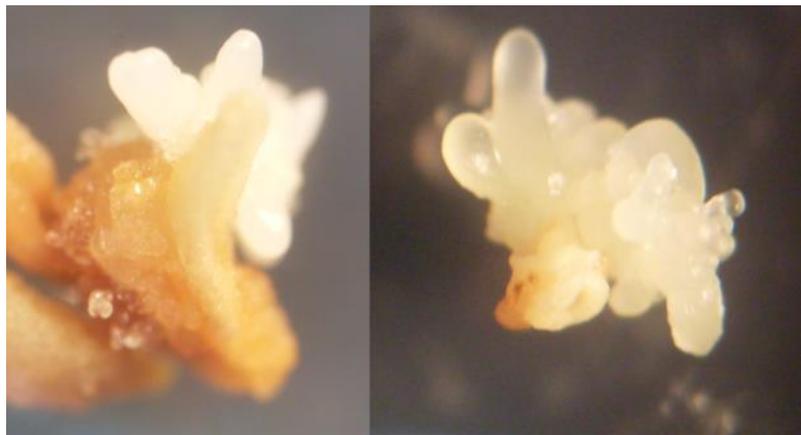


**Figura 11. Efecto de los medios de cultivo en la producción de callos aptos para la transferencia en las tres cultivares de espárrago (ATLAS, IDA LEA y UC 157) a los 4 MDS. Prueba Tukey ( $p \leq 0.05$ ).**

A nivel de los tratamientos (Cuadro 12) se puede apreciar que solo el medio de cultivo T3 provocó en el cultivar UC 157 una tasa de producción de callos de 5.5%, mientras que en los demás tratamientos no hubo respuesta (Figura 12).

**Cuadro 12. Efecto de la interacción de los medios de cultivo y los cultivares en la tasa de transferencia (%) a los 4 MDS. Prueba Tukey ( $p \leq 0.05$ ).**

	ATLAS	IDA LEA	UC157F1
T1	0.00 B	0.00 B	0.00 B
T2	0.00 B	0.00 B	0.00 B
T3	0.00 B	0.00 B	5.50 A
T4	0.00 B	0.00 B	0.00 B
T5	0.00 B	0.00 B	0.00 B



**Figura 12. Callos aptos para la transferencia del cultivar UC 157 F1.**

Los resultados obtenidos en la fase de inducción de callos revelo que solo el cultivar UC 157 F1 formó callos aptos para ser transferidos a un medio de regeneración. Por tal motivo el análisis estadístico tuvo que ser cambiado a DCA para describir el comportamiento de este cultivar bajo los medios de regeneración descritos en esta tesis (Cuadro 13).

**Cuadro 13. Medios de cultivo usados para la regeneración de callos para el cultivar espárrago UC 157 F1.**

Código	Medios de cultivo	Autor
R1	MS más 3% de sucrosa, 0.3 mg/l NAA y 0.2 mg/l BAP	Shalabi <i>et al.</i> 2005
R2	MS más 1 mg/l NAA y 1 mg/l BAP	Inagaki <i>et al.</i> 1983
R3	MS más 3% sucrosa, 800 mg/l glutamina, 500 mg/l caseína hidrolizada, 2 mg/l NAA, 1 mg/l BAP	Peng y Wolyn 1999
R4	MS más 6% sucrosa, 0.1 mg/l NAA, 0.1 mg/l kinetina	Feng y Wolyn 1991
R5	MS más 0.1 mg/l NAA, 0.1 mg/l cinetina	Muñoz <i>et al.</i> 2006

#### 4.7 TASA DE REGENERACIÓN, NÚMERO DE EMBRIONES/CALLO, PLANTAS/CALLO Y PLANTAS ACLIMATADAS

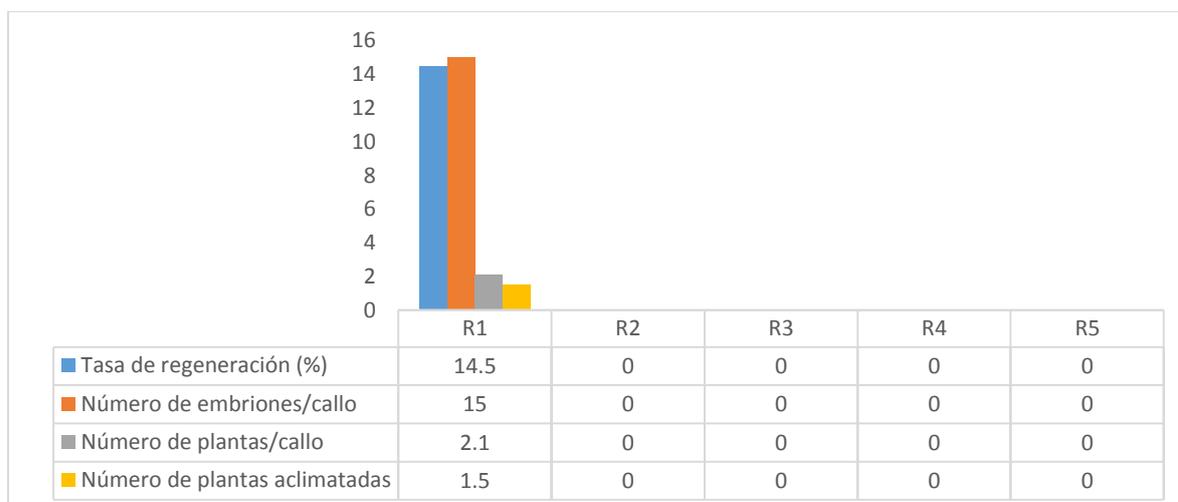
El análisis ANVA de la tasa de regeneración, número de embriones/callos, plantas/callos y plantas aclimatadas (Cuadro 14) reveló que el cultivar UC 157 responde de forma diferente a los medios de cultivo (MC).

**Cuadro 14. ANVA general de la tasa de regeneración (12 MDS), número de embriones/callos (16 MDS), plantas/callos (17 MDS) y plantas aclimatadas (18 MDS) del cultivar UC 157 F1.**

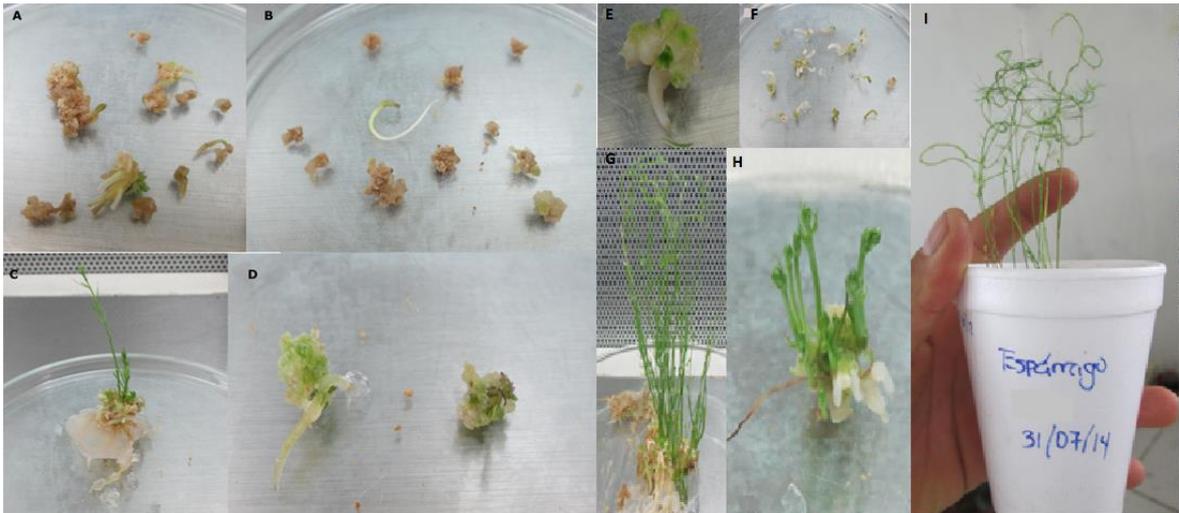
FV	GL	SC	CM* de la Tasa de Regeneración	CM* del Número de embriones/callos	CM* del Número de plantas/callos	CM* de las plantas aclimatadas
MC	4	1682	420.5****	2178****	8.82***	4.5****
ERROR	45	472	10.49	40.22	0.11	0.1
TOTAL	49	2154				

\*cuadro medio del análisis de variancia.

El análisis Tukey reveló que el medio de cultivo de regeneración 1 (R1) se tuvo 14.5% de regenerantes, 15 embriones/callos, 2.1 plantas/callos y 1.5 plantas aclimatadas. Estos resultados se deben a concentración de sacarosa, a la concentración de la hormona ANA y la relación ANA/BAP; ya que el descenso de las concentraciones de ANA y sacarosa, así como la relación ANA/BAP que pasaron las anteras, propicio la formación de embriones y plantas a partir de callos. Para finalizar el cultivar UC 157 F1 fue el único que respondió de forma satisfactoria a la regeneración de plantas completas (Figura 13).



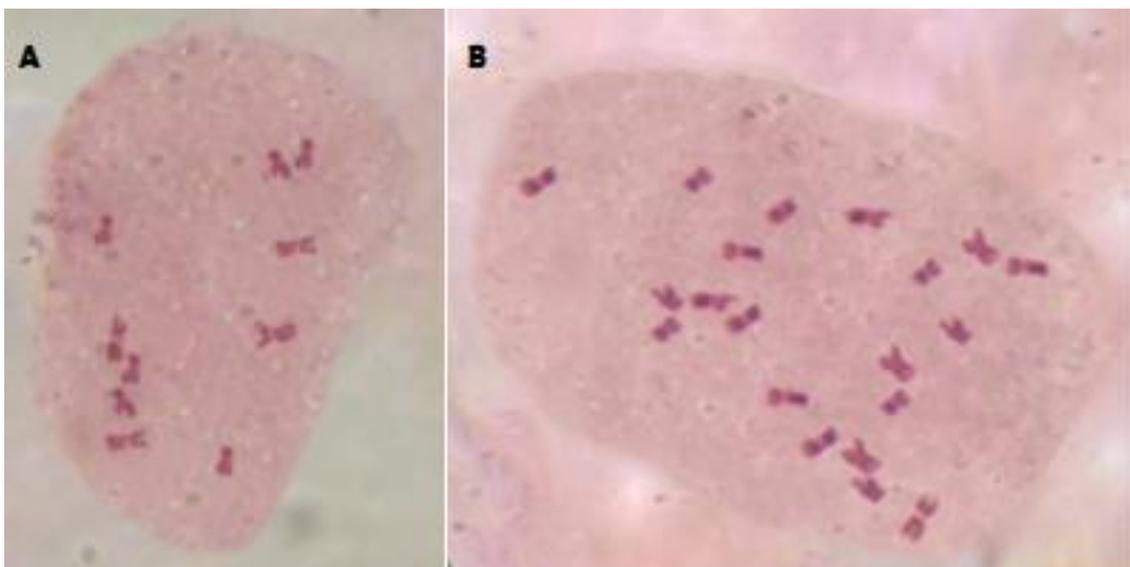
**Figura 13. Efecto de los medios de cultivo en la tasa de regeneración (12 MDS), número de embriones/callos (16 MDS), plantas/callos (17 MDS) y plantas aclimatadas (18 MDS) del cultivar UC 157 F1. Prueba Tukey ( $p \leq 0.05$ ).**



**Figura 14. Efecto del medio de regeneración R1 en la producción de embriones (B, D, E, F); órganos (A) y plantas (C, G, H e I) en callos del cultivar UC 157 F1.**

#### **4.8 DETERMINACIÓN DEL CONTEO CROMOSÓMICO**

El conteo de cromosomas (Figura 15) se realizó al mes de crecido los embriones (raíz diferenciada) y cuando se obtuviera planta completa por organogénesis antes de pasarla a aclimatar. En los resultados obtenidos por embriogénesis somática se obtuvo un 80% de individuos haploides y el resto con doble contenido cromosómico. En cambio, por organogénesis el 100% de los individuos presentaron doble juego cromosómico.



**Figura 15. Célula haploide (A) y con doble contenido cromosómico (B) realizado al cultivar UC 157 F1**

## **V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **5.1 DESINFECCIÓN**

Los resultados obtenidos muestran que la dosis de 2.2% de hipoclorito de sodio resulto ser la más adecuada para los tres cultivares de espárrago analizados. Estos resultados son contradictorios a los obtenidos por Tsay y Hsu (1996), señalando que la inmersión de los pimpollos en la solución de hipoclorito de sodio al 0.5%, fue la mejor; pero esto es porque sus estudios se realizaron bajo condiciones controladas. Por tanto, la desinfección de sus pimpollos no requirió de altas concentraciones. En cambio, bajo las condiciones de este experimento la concentración tuvo que ser mayor, porque la procedencia de las muestras colectadas fue de campo.

### **5.2 ESTADO UNINUCLEADO DE LA MICROSPORA**

El estado uninucleado de las microsporas en los tres cultivares se asoció con la longitud del botón floral. Estos resultados evidenciaron que el mayor porcentaje de microsporas uninucleadas se encontró cuando el botón tiene una longitud de 1.5 a 2mm. Este comportamiento coincide con lo citado por Muñoz *et al.* (2006) en espárrago.

El estado uninucleado es importante, porque garantiza que se obtenga individuos haploides (Polci *et al.* 2010) y además afirma Szarejko (2003), que en este estado solo uno de los núcleos está bien formado y por la cual podrá cambiar su ruta de crecimiento sin ser afectado de forma abrupta por el cambio de ambiente; mientras que el otro al no estar completamente formado se desnaturalizaría teniendo al final células de contenido genético haploide.

### **5.3 OXIDACIÓN DE LAS ANTERAS, TASA DE INDUCCIÓN Y OXIDACIÓN DE LOS CALLOS**

Las respuestas de estos parámetros giran en torno al contenido hormonal y de azúcares en el medio de cultivo. Los medios de cultivo T3 y T4 promovieron altos porcentajes de anteras oxidadas, inducción a callos y oxidación de callos. El incremento de la oxidación de las

anteras se relaciona con la concentración de azúcares y esto probablemente porque durante la fase de autoclavado, los azúcares como la sacarosa suelen degradarse y formar compuestos dañinos para las anteras provocando su oxidación (Ortuño-Olea *et al.* 1998). Así mismo Lux-Endrich *et al.* (2000), afirman que la presencia de azúcares en el medio incrementa la concentración de polifenoles en el explante provocando su oxidación. Por otro lado, las concentraciones hormonales presentes en los medios de inducción pudieron causar la oxidación de las anteras (Zinn *et al.* 2010).

La tasa de inducción de callos es una etapa muy importante, ya que refleja el cambio en la ruta de crecimiento y desarrollo que toman las microsporas (de un estado gametofítico a esporofítico). En el experimento se observó que la respuesta a la inducción de callos de los cultivares fue similar. Este comportamiento puede deberse al sometimiento de las anteras de los tres cultivares a temperaturas bajas (4°C por un día), su posterior incubación a temperaturas altas (27°C) y el estado de la microspora (uninucleado), ya que Feng y Wolyn (1991) y Zhang *et al.* (1994) afirman que estos tres puntos son fundamentales para el incremento en la respuesta androgénica en espárrago.

La tasa de inducción, así como el porcentaje oxidación de los callos se incrementa a medida que aumenta la concentración de azúcares en el medio, demostrando que estos dos parámetros son dependientes a concentración de azúcar. Esta premisa es afirmada por Lux-Endrich *et al.* (2000) indicando que la concentración de azúcares incrementa la oxidación de los callos, pero a su vez incrementa la tasa de inducción; sin embargo, para esta última existe un punto máximo para el cultivo de espárrago como lo afirman Feng y Wolyn (1999) indicando que partir de 6% de azúcar, el porcentaje de formación de callos se ve reducido. Por otro lado, los reguladores de crecimiento juegan un rol importante, Scowcroft y Admson (1976) indican que la relación auxina/citoquinina alta, facilita la obtención de callos y esto explica la razón de la mayor inducción de callos en los medios de cultivo T3 y T4. Se tiene referencia que tanto la presencia de las hormonas, azúcares entre otros compuestos pueden favorecer la oxidación de las anteras (Arana 2012); sin embargo, el estrés que ocasiona estos compuestos puede ayudar a cambio de ruta gametofítica a esporofítica en las anteras para posteriormente incentivar la embriogénesis somática (Shahinul y Tuteja 2012).

## **5.4 TASA DE TRANSFERENCIA**

En relación a los cultivares evaluados solo se pudo obtener callos aptos para la transferencia con la UC 157 F1 con 5.5% con el medio de inducción T3. Este comportamiento demuestra que en el espárrago está influenciado por la interacción del genotipo con el medio (Germana, 2011). Estos resultados son similares a los obtenidos por Wolyn y Feng (1993) quienes obtuvieron una frecuencia de callos transferidos que fluctuó de 0 a 31% en los genotipos de espárragos evaluados. Por otro lado, Feng y Wolyn (1991) y Zhang *et al.* (1994) obtuvieron en esta especie porcentajes de transferencia del 46.6% y 50% respectivamente. Probablemente en esta investigación el estrés oxidativo haya influenciado en la baja incidencia de callos blancos (Nagata *et al.* 1994). Así mismo la heterogeneidad genética de las microsporas presentes inter e intra-anteras, pudo haber ocasionado esta respuesta (Shahinul y Tuteja 2012).

## **5.5 TASA DE REGENERACIÓN, NÚMERO DE EMBRIONES/CALLO Y**

### **NÚMERO DE PLANTAS/CALLO**

La embriogénesis consiste en la formación embriones somáticos a partir de cualquier tipo de explante (Tello 2016), además esta respuesta es dependiente de muchos factores como el genotipo, la concentración hormonal exógena, entre otros. Todos estos factores han contribuido en alargar el tiempo en la elaboración del protocolo *in vitro* (Criollo 2013). En esta investigación el genotipo como el medio de cultivo influyen en la formación de embriones. El cultivar UC 157 F1 respondió a la regeneración (14.5%), producción de embriones (33 por callo) y a la formación de plantas por callo (2.1). Este comportamiento fue similar a los obtenidos por Wolyn y Feng (1993) logrando tener de 0% a 14% de material regenerado en los cuatro genotipos de espárragos estudiados. Así mismo Muñoz *et al.* (2006) trabajando con catorce genotipos de espárrago, encontraron que la tasa de regeneración fluctuó de 0% a 19.7%. Por otro lado, Shabaly *et al.* (2003) tuvieron una producción de 1.9 a 3.5 embriones por callo y una producción de plantas que vario de 1.1 a 2.1 por callo.

La utilización de las anteras inmaduras (Celestino *et al.* 2005) así como el estrés por frio que se les sometió (4°C por un día) contribuyó a la reprogramación celular posiblemente por metilación del ADN causado por el estrés oxidativo (Tello 2016) orientando a la formación de callos seguido de la formación de embriones somático y regeneración por morfogénesis

indirecta. Así mismo la composición del medio de cultivo que se utilizó para la formación de callos pudo estimular el inicio de la embriogénesis (Bilbao 1996).

Dentro del medio de cultivo las auxinas juegan un papel importante en la expresión de genes que intervienen en la reprogramación celular dirigida a la formación de embriones (Tello 2016). En el experimento, la concentración de ANA, así como la relación ANA/BAP provocó que el cultivar UC 157 F1 presente una respuesta en la tasa de regeneración, formación de embriones y plantas por callos. Además, la disminución de la concentración de ANA (medio de inducción a regeneración) provocó que se genere a partir de los callos, embriones y plantas por morfogénesis. Así mismo la presencia del azúcar también contribuyó a la formación de embriones potenciando el proceso unicelular a embrionario por medio de estrés no plasmolítico (Bilbao 1996).

## **5.6 CONTEO CROMOSÓMICO**

El conteo cromosómico se realizó a partir de las raíces de plántulas obtenidas por embriogénesis somática y morfogénesis indirecta, obteniendo lo siguiente: por embriogénesis somática el 80% fueron haploides y el resto con doble contenido cromosómico, mientras que por organogénesis indirecta el 100% fueron de doble juego cromosómico. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Wolyn y Feng (1993) teniendo 77% de individuos haploides y el resto diploides por embriogénesis somática; sin embargo, Muñoz *et al.* (2006) solo obtuvieron un 40% de haploides y 60 diploides; además Falavigna *et al.* (1985) y Tsay y Hsu (1986) reportaron que la haploidia oscila entre el 10 al 60%. Este comportamiento en el cultivar UC 157 F1 puede ser debido a la heterogeneidad genética presente en la población provocando variación en el contenido cromosómico (Shahinul y Tuteja 2012). Otras explicaciones se basan en la fusión de los núcleos de las microsporas binucleadas durante la etapa de inducción originando callos con doble juego cromosómico y por endorreplicación de células haploides que no se han separado los cromosomas duplicados (Lentini *et al.* 1997).

## **5.7 TASA DE ACLIMATACIÓN**

De las 2.1 plantas que se extrajeron por callos del cultivar UC 157 F1 solo se aclimataron 1.5 plantas revelando que no todas presentan raíces viables. Estos resultados son similares a lo obtenido por Muñoz *et al.* (2006) señalando que el número de plantas aclimatadas se redujo

debido a poca estabilidad y adaptación que presentaron las raíces de espárrago durante esta etapa.

## VI. CONCLUSIONES

- La UC 157 F1 fue el único cultivar con vitro-plantas de doble contenido cromosómico (80% por embriogénesis y 100% por organogénesis) obtenidos a partir del cultivo de anteras bajo condiciones *in vitro*; por lo tanto, este cultivar puede ser incluido en un programa de mejoramiento genético utilizando esta técnica.
- El estado uninucleado correspondió al estado de botón floral aproximadamente en el rango de 1.5 mm a 2 mm de longitud en los tres cultivares de espárragos.

La concentración de azúcar; así como, de la hormona ANA y la relación ANA/BAP permitieron la inducción de callos, embriones y la regeneración de plantas

## **VII. RECOMENDACIÓN**

Realizar un análisis asistido por marcadores moleculares a los individuos con doble contenido cromosómico obtenidos por embriogénesis somática para validar si son dobles haploides.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abe, T. y Kameya, T. 1986. Promotion of flower formation by atrazine and diuron in seedlings of *Asparagus*. *Planta* 169, 289–291

ADEX. 2011. Exportación Perú. (citado en el 2013).

Alzamora, H. Espárragos. [En línea]. Instituto Peruano del Espárrago y Hortalizas. [Citado el 2013-04-24] Disponible en World Wide web: [http://www.ipeh.org/prod\\_espa\\_sabiaque.asp](http://www.ipeh.org/prod_espa_sabiaque.asp).

Arana, L. 2012. Cultivo *in vitro* de anteras de arroz (*Oryza sativa* L.) para inducir plantas doble haploides homocigóticas. INIAP, Centro Experimental del Litoral del Sur, Dr. Enrique Ampuero Pareja. Virgin de Fatima. Ecuador, Pág. 34-45.

Arcos, L. 2014. Comparación del Comportamiento Agronómico de Híbridos de Maíz Obtenidos con Líneas Doble Haploides y con Líneas Autofecundadas. Tesis para optar el Grado de Doctor en Mejoramiento Vegetal. Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira, Pág. 25-45.

Bajaj, Y. 1990. In vitro production of haploids and their use in cell genetics and plant breeding. Pág. 1–44.

Barnabás, B.; Obert, B. y Kovács, G. 1999. Colchicine, an efficient genome-doubling agent for maize (*Zea mays* L.) microspores cultured in anther. *Plant Cell Reports* (18), 858–862.

Becker, J.; Vos, P.; Kuiper, M.; Salamini, F. y Heun, M. 1995. Combined mapping of AFLP and RFLP markers in barley. *Mol Gen Genet* 249, 65-73.

Benson, B. 1982. Sex influence on foliar trait morphology in *Asparagus*. *HortScience* 17, 625-627.

Bernard, S. 1980. In vitro androgenesis in hexaploid *Triticale*: determination of physical conditions increasing embryoid and green plant production. *Z. Pflanzenzucht* 85, 308-321.

- Betül, B. y Ülkü, E. 2008. Comparative Study on Colchicine Application Methods in Obtaining Doubled Haploids of Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). Turk J Biol. 32, 105-111.
- Bidwell, R. 1979. Plant Physiology. McMillan Pub. Co., Inc. New York. USA, Pág. 128-129.
- Biffi, R.; Restivo, F.M.; Tassi, F.; Caporali, E.; Carboni, A.; Marziani, G.; Spada, A. y Falavigna, A. 1995. A restriction fragment length polymorphism probe for early diagnosis of gender in *Asparagus officinalis* L. HortScience. 30, 1463-1464.
- Bilbao, M. 1996. Estudio de la expresión genética durante la embriogénesis somática en *Saccharum officinarum* y su relación con el ácido abscísico y la sequía. Tesis para optar el grado de Doctor. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Ciencias Biológicas. Departamento de Genética. Pág. 14-17.
- Blakeslee, A.; Belling, M.; Farmham, A. y Bergner, A. 1922. A Haploid Mutant In The Jimson Weed, *Datura stramonium*. Science. 55 (1433), 646-647.
- Blasberg, C. 1932. Phases of the anatomy of *Asparagus officinalis*. Botanical Gazette. 94. 206-214.
- Braak, A. y Zeilinga, E. 1957. Production of a colchicine-induced tetraploide asparagus. Euphytica Netherland Journal of Plants Breeding. 6(3), Pág. 201.
- Brettell, R.; Thomas, E. y Wernicke, W. 1981. Production of haploid maize plant by anther culture. Maydica, 26, 101-111.
- Bouharmont, A. 1989. Differential sensitivity of callus derived from immature panicles of rice cultivars to the non-specific toxin of *Pyricularia grisea*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 50(1), 13-18.
- Burk, L. 1962. Haploids in genetically marked progenies of tobacco. J Hered 53, 222-225.
- Callohuari, Y. 2013. Cultivo de anteras *in vitro* para la producción de individuos haploides en maíz (*Zea mays* L.), Tesis para optar el título de Ingeniero Agrónomo. Universidad Agraria La Molina. Lima. Perú. Pág. 15-22.
- Camadro, E. 2003. Mejoramiento Genético de Hortalizas. <http://www.biblioteca.org.ar/libros/210661.pdf>, Pág. 14-18.

- Celestino, C.; Hernández, I.; Carneros, E.; López-Vela, D. y Toribio, M. 2005. La embriogénesis somática como elemento central de la biotecnología forestal. *Invest agrar*, 14(3), 345-357.
- Caruso, M.; Claire, E.; Federici, T.; Mikeal, E. y Roose, L. 2007. EST-SSR markers for asparagus genetic diversity evaluation and cultivar identification. *Molecular Breeding*. Pág. 124-131.
- Chaikam, V. y Mahuku, G. 2014. Duplicación de cromosomas de haploides maternos. *Tecnología de Doble Haploide en el mejoramiento del maíz: Teoría y Práctica*. Editores B. M. Prasanna, Vijay Chaikam y George Mahuku.
- Chen, C.; Tsay, H. y Huang C. 1991. Factors affectinng androgenesis in rice (*Oryza sativa* L.). In: Bajaj, Y. (Ed.). *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, (14), 193-215.
- Chen, Z.; Snyder,S.; Fan,Z. y Loh,W. 1994. Efficient production of doubled haploid plants through chromosome doubling of isolated microspores in *Brassica napus*. *Plant Breed*. 113, 217–221.
- Chen, C., Xiao, H., Zhang, W., Wang, A., Xia, Z., Li, X., Zhai, W., Cheng, Z. y Zhu, L. 2006. Adapting rice anther culture to gene transformation and RNA interference. *Sci. China, C, Life Sci*. 49, 414–428.
- Criollo, H. 2013. Estudios orientados a la regeneración de plantas de lulo (*Solanum quitoense* Lam.) a través de la embriogénesis somática. Bogotá, Colombia: s.n. Pág. 125-128.
- Delgado de la Flor, B.; Francizco, L.; Montauban, R. y Hurtado, F. 1987. Manual del cultivo de espárrago. Noma SRL. Lima. I.C.E. Pág. 134.
- Dodds, J. y Roberts, J. 1985. *Experiments in plant tissue culture*. Second edition. Cambridge University Press, New York. Pag: 232.
- Dudits, D.; Bögre, L. y Györgyey, J. 1991. Molecular and cellular approaches to the analysis of plant embryo development from somatic cells *in vitro*. *J. Cell Sci*. 99:473-482.
- Dunwell, J. (2010). Haploids in flowering plants: origins and exploitation. *Plants Biotechnology journal*. 8, 377-424.
- Eimert, K.; Reutter, G. y Strolka, B. 2003. Fast and reliable detection of doubled-haploids in asparagus *officinalis* by stringent RAPD-PCR. *Acta Horticulturae* 660, 40-43.

Ellison, J. 1986. Asparagus breeding. En: Breeding vegetable crops (M.J. Bassett, ed.); AVI Pub. Co.; Westport, CN, USA. Pág. 521-540.

Falavigna, A.; Tacconi, M. y Casali, P. 1985. In: Lougheed EC, Tiessen H (eds) Proc 6th Intl Asparagus Symp, University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada. Pág. 31-39.

Fehér, E. 1992. *Asparagus*. Pág. 161.

Fehér, A.; Pasternak, T. y Dudits, D. 2003. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 74, 201-228.

Forster, B. y Thomas, W. 2005. Doubled haploid in genetics and plant breeding. *Plants Breed Rev.* 25, 57-88.

Garrinson, S. y Chin, C. 2005. Perspectives in Asparagus breeding. Department of Plant biology and Pathology. State University of New Jersey, U.S.A.

Gatti, I. 2001. Selección de progenitores y cálculo de parámetros genéticos en espárrago (*Asparagus officinalis* L.) Tesis para la obtención del Grado Académico Magíster Scientiae. UNR. Pág. 34-39.

Gatti, I.; Cravero, V.; Asprelli, P.; Lopez, F.; Garcia, S.; Firpo, I. y Country, E. 2007. Espárrago (*Asparagus officinalis* L.): en algunos aspectos de su mejora. *Avances en horticultura* 5. Edición online. Pág. 1-12.

Gebler, P.; Wolko, L. y Miko, K. 2007. Identification of molecular markers for selection of supermale (YY) asparagus plants. *Journal of Applied Genetic* 48(2), 129-131.

Geiger, H. y Gordillo, G. 2009. Doubled haploid in hybrid maize breeding. *Maydica* 54, 485-499.

Genovesi, A. y Collins, G. 1982. In vitro production of haploid plants of corn vial anther culture. *Crop Sci.* 22, 1137-1144.

Gebhardt, C. y Salamini, F. 1992. Restriction fragment length polymorphism analysis of plant genomes and its application to plant breeding. *Int Rev Cytol* 135, 201-237.

Germana, M. 2011. Anther culture for haploid and doubled haploid production. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, Vienna. 104, 283-300.

- Grayum, M. 2003. Asparagaceae. In: Manual de Plantas de Costa Rica, B.E. Hammel, M.H. Grayum, C. Herrera & N. Zamora (eds.). Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard. 92, 294–295.
- Gry, L. 1990. L'asperge profite d'une sélection de pointe. Semences et Progrès N. 65,3-16.
- Guha, S. y Maheshwari, S. 1966. Cell division and differentiation of embryos in the pollen grains of *Datura* in vitro. Nature 212, 97-98.
- Herrera, J. y Camayo, G. 2008. Caracterización morfológica y citológica de árboles de *Coffea arabica* L. regenerado por cultivo in vitro de polen aislado. Cenicafe, 59(2), 143-154.
- Immonen, S. y Anttila, H. 1999. Cold pretreatment to enhance green plant regeneration from rye anther culture. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 57, 121–127.
- Inagaki, N.; Harada, T. y Yakuwa, T. 1983. Studies on the anther culture of horticultural crops VII: Investigation of optimal conditions for obtaining pollen-originating callus and its characteristics- in *Asparagus officinalis* L. J. Faculty Agr. Hokkaido Univ. 61, 279-285.
- Inagaki, M. y Mujeeb-Kazi, A. 1998. Production of polyhaploids of hexaploid wheat using stored pearl millet pollen. Euphytica 100: 253–259.
- Jamsari, A. 2004. BAC-derived diagnostic markers for sex determination in asparagus. Theoretical and Applied Genetic 108(6), 1140-1146.
- Jiang, C.; Lewis, M. y Sink, K. 1997. Combined RAPD and RFLP molecular linkage map of asparagus. Genome. 40, 69-76.
- Kasha, K. y Kao, K. 1970. High frequency haploid production in barley (*Hordeum vulgare* L.) Nature 225, 874-876.
- Kasha, K.; Hu, T.; Oro, R.; Simion, E. y Shim, Y. 2001. Nuclear fusion leads to chromosome doubling during mannitol pretreatment of barley (*Hordeum vulgare* L.) microspores. Journal of Experimental Botany, 52(359), 1227- 1238.
- Krug, H. 1996. Seasonal growth and development of asparagus (*Asparagus officinalis* L.). I. Temperature experiments in controlled environments. Gartenbauwissenschaft. 61, 18–25.
- Kurata, N.; Nagamura, Y.; Yamamoto, K.; Harushima, Y.; Sue, N.; Wu, J.; Antonio, B.; Shomura, A.; Shimizu, T.; Lin, S-Y.; Inoue, T.; Fukuda, A.; Shimano, T.; Kuboki, Y.; Toyama, T.; Miyamoto, Y.; Kirihara, T.; Hayasaka, K.; Miyao, A.; Monna, L.; Zhong, H.; Tamura, Y.;

Wang, Z-X.; Momma, T.; Umehara, Y.; Yano, M.; Sasaki, T. y Minobe, Y. 1994. A 300-kilobase interval genetic map of rice including 883 expressed sequences. *Nature Genet.* 8, 365-372.

Lentini, Z., Martínez, C., y Roca, W. 1997. Cultivo de anteras de arroz en el desarrollo de germoplasma. Cali, CO. Centro Internacional de Agricultura Tropical (Publicación CIAT; Nº 293) ISBN 958-9439-92-6. Pág. 15.

Loptien, H. 1979. Identification of the sex chromosome pair in asparagus (*Asparagus officinalis* L.) *Z Pflanzenzucht.* 82, 162-173.

Lux-Endrich, A.; Treutter, D. y Feucht, W. 2000. Influence of nutrients and carbohydrate supply on the phenol composition of apple shoot cultures. *Plant Cell, tissue and Organ Culture* 60, 15-21.

Malagón, R.; Borodanenko, A.; Ochoa N.; Pérez L.; Barrera J. y Gordon H. 2007. Effect of genotype, environment and humic acid on the in vitro culture of wheat anthers. *Rev. Fitotec. Mex.* 30(2), 159-165.

Maluszynski, M.; Kasha, K. y Szarelko, I. 2003. Published doubled haploid protocols in plant species. *Doubled Haploid Production in Crop Plants.* Pág. 309-335.

Marziani, G.; Caporali, E. y Scala, A. 1999. Search for genes involved in asparagus sex determination. En: *Sex determination in plants* (C.C. Ainsworth, ed.); Bios Scientific Publishers Ltd. Oxford. Pág. 149-162.

Milanesi, L.; Espòsito M.; Lopez, F.; Garcia, S. y Cointry, E. 2008. Espárrago (*Asparagus officinalis* L.) Aspecto biotecnológico de su mejora. *Horticultura Argentina* 27(64), 12-24.

Mizonobe, G.; Maeda, T.; Yamaguchi, K.; Harada, T.; Yakuwa, T. y Iwamura, H. 1991. Studies on flower induction by s-triazine and carbamate in seedlings of *Asparagus officinalis* L. 1. Effects of day length, compound concentration, temperature, and seedling age and cultivar on flower induction of seedlings. *J Fac Agr, Hokkaido Univ.* 64, 256–263.

Muñoz, S.; Espòsito, M.; Cravero, V.; García, S.; López, F. y Cointry, E. 2006. Obtención de plantas a partir de anteras de espárrago (*Asparagus officinalis*). *Revista de Investigaciones de la Facultad de Ciencias Agrarias – UNR.* 5(9), 39-46.

Nagata, T.; Ishida, S.; Hasezawa, S. y Takahashi, T. 1994. Gene involved in the dedifferentiation of plant cells, *Int. J. Dev. Biol.* 38, 321–327.

Navarro-Alvarez, W.; Baenziger, P. y Eskridge, K. 1994. Addition of colchicine to wheat anther culture media to increase doubled haploid plant production. *Plant Breeding*. 112, 192-198.

Navarro-Ainza, J.; Robles, F.; Fimbres, A. y Grijalva, R. 1997. Necesidades de agua y fertilización en espárrago. *Horticultura Mexicana*. 5, 93.

Njau, P.; Kimurto, P.; Kinyua, M.; Okwaro, H. y Ogolla, J. 2006. Wheat productivity improvement in the drought prone areas of Kenia. *African Crop Science Journal*. 14(1), 49-57.

Orshinsky, B.; McGregor, L.; Johnson, G.; Hucl, P. y Kartha, K. 1990. Improved embryoid induction and green shoot regeneration from wheat anthers cultured in medium with maltose. *Plant Cell Rep*, 9(7), 365-369.

Ornstrup, O. 1997. Biotechnological methods in *Asparagus* breeding. *Asparagus Research Newsletter*. Department of Plant Science. Massey University 14 (112), 1-25.

Ortuño-Olea, L.; Manzo-González, A. y Peña-Lomelí, A. 1998. Cultivo de anteras en tomate de cascara. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 4(1), 39-43.

Ouyang, J. 1986. Induction of pollen plants in *Triticum aestivum* L. In: Hu, H.; Yang, Y., eds. *Haploids of higher plants in vitro*; 26Md. Beijing, China: Academy Press. Pág. 324-329.

Ozaki, Y.; Tashiro, T. y Okubo, H. 1999. Molecular markers linked to the sex determination locus of asparagus. *Acta Horticulturae*. 479, 129-134.

Pacheco-Sánchez, M.; Lozoya-Saldaña, H. y Colinas León, T. 2003. Reguladores de crecimiento y pre tratamiento con frío en la androgénesis in vitro de *Solanum iopetalum* L. *Agrociencia*. 37,257-265.

Peng, X. y Wolyn, D. 1991. High frequency production of haploid embryos in asparagus anther culture. *Plant Cell Rep*. 10,574-578.

Peng, X. y Wolyn, D. 1999. Recovery of haploid plants from asparagus microspore culture. *Can J Bot*. 72, 296-300.

Peng, M. y Wolyn, D. 1999. Improved callus formation and plant regeneration for shed microspore culture asparagus (*Asparagus officinalis* L.). *Plant Cell Rep*. 18, 954-958.

Peng, M.; Ziauddin A. y Wolyn D. 1997. Development of asparagus microspore in vivo and in vitro is influenced by gametogenic stage and cold treatment. In *Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 33, 263-268.

Polci, P.; Conti, V.; Miranda, R. y Gear, N. 2010. *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II. Parte III. Capítulo 1.* Pág. 295-305.

Prem, D.; Gupta, K. y Agnihotri, A. 2005. Effect of various exogenous and endogenous factors on microspore embryogenesis in Indian mustard (*Brassica juncea* L.) Czern and Coss). In *Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 41(3), 266-273.

Pontaroli, C. 2005. Búsqueda de la Resistencia a *Fusarium proliferatum* en el espárrago comestible (*Asparagus officinalis* L.) mediante aplicaciones biotecnológicas. Tesis para optar el título de Doctora en Ciencias Agrarias. Universidad Mar Del Plata. Balarce. Argentina. Pág. 25-27.

Prasanna, M.; Vijay, C. y George, M. 2013. *Tecnología de dobles haploides en el mejoramiento de maíz: Teoría y práctica.* México, D.F. CIMMYT. Pág. 45-56.

Rafalski, J. y Tingey, S. 1993. Genetic diagnostics in plant breeding: RAPDs, microsatellites and machines. *Trends Genet.* 9, 344-348.

Restivo, F.; Tassi, F.; Biffi, R.; Falavigna, A.; Caporali, E.; Carboni, A.; Doldi, M.; Spada, A. y Marziani, G. 1995. Linkage arrangement of RFLP loci in progenies from crosses between doubled haploid *Asparagus officinalis* L. clones. *Theor. Appl. Genet.* 90, 124–128.

Röber, F. y Gordillo, G.; Geiger, H. 2005. In vivo haploid induction in maize – performance of new inducers and significance of double haploid lines in hybrid breeding. *Maydica.* 50, 275-283.

Robinson, F.; Berry, L.; Scherer, J. y Thomas, R. 1984. Yield potential of asparagus irrigated with geothermal and ground water on Imperial East Mesa Desert, California. *Hort. Sci.* 19(3), 407-408.

Roca, W. y Mroginski, L. 1991. *Cultivo de tejidos en la agricultura.* Reimpresión del 1993 ed. Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical.

Roth, R. y Gardner, B. 1991. Asparagus spear size distribution and earliness as affected by water and nitrogen applications. *Trans. Amer. Soc. Agr. Eng.* 33, 480-486.

Sagare, A.; Lee, Y.; Lin, T.; Chen, C. y Tsay, S. 2000. Cytokinin-induced somatic embryogenesis and plant regeneration in *Corydalis yanhusuo* (Fumariaceae) a medicinal plant. *Plant Sci.* 160, 139-147.

Scowcroft, W. y Adamson, J. 1976. *Plant Sci. Lett.* 7,39:42.

Shalaby T. Haneklaus S. y Schnug E. 2005. Genotypical differences in callus induction and regeneration of plantlets produced from asparagus (*Asparagus officinalis* L) horticulture department, Faculty of Agriculture, Tanta University, Kafer El- Sheikh, 33516 Egypt. *Landbauforschung Völkenrode, Special Issue.* 286, 107-111.

Shahinul, S. y Tuteja, N. 2012. Enhancement of androgenesis by abiotic stress and other pretreatments in major crop species. *Plant Science.* 182 (2012), 134–144.

Sánchez, V. y Apaza, T. 2000. Plagas y Enfermedades del Esparrago en el Perú. IPEH – PROMPEX. Lima, Perú. Pág.140.

Sneep J. 1953. The significance of andromonocy for the breeding of *Asparagus officinalis* L. *Euphytica.* 2, 89–95.

Spada, A.; Caporali, E.; Marziani, G.; Portaluppi, P.; Restivo, F.M.; Tassi, F. y Falavigna, A. 1998. A genetic map of *Asparagus officinalis* L. based on integrated RFLP, RAPD and AFLP molecular markers. *Theoretical and Applied Genetic.* 97, 1083-1089.

Spitkó, T.; Sági. L.; Pintér, J.; Marton. L. y Barnabás, B. 2006. Field performance of hybrids developed from doubled haploid maize inbred lines. *Cereal Research Communications.* 34(1), 665-668.

Sunderland, N. 1978. Strategies in the improvement of yields anther culture. In: *Proc Symp Plant Tissue Culture.* Science Press: Beijing. Pág. 65-86.

Szarejko, I. 2003. Anther culture for doubled haploid production in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Doubled Haploid Production in Crop Plants.* Pág.35-42.

Tanksley, S.; Ganai, M.; Prince, J.; De Vicente, M.; Bonierbale, M.; Broun, P.; Fulton, T.; Giovannoni, J.; Grandillo, S.; Martin, G.; Messeguer, R.; Miller, J.; Miller, L.; Paterson, A.; Pineda, O.; Roder, M.; Wing, R.; Wu, W. y Young, N. (1992). High-density molecular-linkage maps of the tomato and potato genomes. *Genetics* 132, 1141-1160.

Telgmann, A.; Jamsari, A.; Kinney, S.; Pires, J. y Jung C. (2007). Genetic and physical maps around the sex-determining M-locus of the dioecious plant asparagus. *Molecular Genetics and Genomics*. 278, 221–234.

Tello, V. (2016).despliegue diferencial de genes candidato del proceso de embriogénesis somática en tomate de árbol (*Solanum betaceum* L.). Tesis para optar el título de Ingeniero Agrónomo. Facultad de Ciencias Agrícolas. Universidad Nacional de Ecuador. 19-22.

Thomas, W.; Forster, B.; Gertsson, B. (2003). Doubled haploids in plant breeding. In: *Haploid Production in Crop Plants: a Manual* (Maluszynski, M., Kasha, K.J., Forster, B.P. and Szarejko, I., eds). Pág.. 337–349.

Touraev, A.; Indrianto, A.; Wratschko, I.; Vicente, O. y Heberle-Bors, E. (1996). Efficient microspore embryogenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.) induced by starvation at high temperatures. *Sexual Plant Reproduction*, 9(4), 209–215.

Touraev, A.; Stoger, E.; Voronin, V. y Heberle-Bors, E. (1997). Plant male germ line transformation. *Plant Journal*, Vol. 12, No. 4, (February 1997), pp. 949-956, ISSN 0960-7412.

Tsay H. y Hsu, J. (1986) Taiwan Asparagus Research 1983-1985. Pág. 13-22.

Tsay, H. (1996). Haploid in asparagus anther culture: *in vitro* Haploid Production in Higher Plants. Jain, S.; Sopory, S.; and Veilleux, R. (Eds) Kluwer Academic Publishers Dordrecht. Pág. 109-144.

Wan, Y.; Petolino, J. y Widholm, J. (1989). Efficient production of doubled haploid plants through colchicine treatment of anther-derived maize callus. *Theor. Appl. Genet.* 77, 889–892.

Weber, S.; Ünker, F. y Friedt, W. (2005).Improved doubled haploid production protocol for *Brassica napus* using microspore colchicine treatment in vitro and ploidy determination by flow cytometry. *Plant Breeding* 124, 511-513.

Winzeler, H., Schmid, J. y Fried, P. (1987). Field performance of androgenetic, doubled haploid spring wheat lines in comparison with lines selected by the pedigree system. *Plant Breeding* 99, 41–48.

Wolyn, D. y Feng, X. (1993). Genotype, Temperature, and Sampling Date Affect Embryogenesis in Asparagus Anther Culture. *Hortscience* 28(3), 216-217.

Wolyn, D. y Nichols, B. (2003). Published doubled haploid protocols in plant species. *Doubled Haploid Production in Crop Plants*. Pág. 265-270.

Yeung, E. (1995). Structural and developmental patterns in somatic embryogenesis in plants. In: *in vitro embryogenesis in plants*. Thorpe, T. A. (ed). Kluwer Academic Publishers, Netherlands. Pág. 205- 248.

Zhang, J.; Wang, H.; Ma, Y. y Kang, Y. (1994). Regeneration of haploid from isolated microspore of asparagus (*Asparagus officinalis* L.). *Plant Cell Reports*. 13, 637-640.

Zhang, C.; Tsukumi, T.; Ikeda, M.; Sato, M.; Okada, H.; Ohashi, Y.; Matsuno, H.; Yamamoto, T.; Wada, M.; Yoshikawa, N.; Matsumoto, S.; Li, J.; Mimida, N.; Watanabe, M.; Suzuki, A. y Komori, S. (2013). Effects of the microspore development stage and cold pre-treatment of flower buds on embryo induction in Apple (*Malus × domestica* Borkh.) anther culture. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 82(2), 114-124

Zarate, A. (2013). Evaluación de la regeneración de dobles haploides de maíz suave variedad INIAP-101 mediante el cultivo de anteras. Título para obtener el grado de Ingeniera Biotecnológica. Escuela Politécnica del Ejército. Sangolquí. Ecuador. Pág: 10-21.

Zinn, K.; Tunc-Ozdemir, M. y Harper, J. (2010). Temperature stress and plant sexual reproduction: uncovering the weakest links. *J Exp Bot*. Apr; 61(7), 1959–1968.

<http://www.dsalud.com/index.php?pagina=articulo&c=150EDIAGRARIA>. (citado el 25 de octubre del 2013).

[http://www.infoagro.com/hortalizas/esparrago\\_verde.htm](http://www.infoagro.com/hortalizas/esparrago_verde.htm) (citado el 25 de octubre del 2013).