

Espárrago (*Asparagus officinalis* L.): algunos aspectos de su mejora

Gatti, I.; Cravero, V.P.; Asprelli, P.; López Anido, F.S.; García S.M.; Firpo, I.T. y Cointry, E.L.

Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Rosario. Campo Experimental J.F. Villarino. CC 14 - (S2125ZAA) Zavalla. Santa Fe. Argentina

Resumen

Debido al tiempo de evaluación que presenta el espárrago (al menos dos años por ciclo selectivo) los planes de mejoramiento demandan una elevada inversión de recursos, tanto económicos como de mano de obra, para la obtención de materiales con óptimos rendimientos y adaptados a las condiciones agroecológicas locales que satisfagan los requerimientos del mercado. Por este motivo, la elección del tipo de material a obtener es uno de los pasos claves para el éxito del programa.

Tradicionalmente el cultivo se inicia a partir de semillas de híbridos simples, dobles, clonales o "todo macho"; o bien de semillas de poblaciones mejoradas. El éxito de cada uno de ellos depende de las características del material utilizado como punto de partida.

Así entonces, para el mejoramiento de esta especie, es fundamental reunir un pool de germoplasma variable a partir del cual se puedan seleccionar individuos superiores, los cuales serán utilizados para crear una variedad superior.

En los últimos años, el auge de la Biotecnología y la Biología Molecular, trajo aparejado el desarrollo de nuevas técnicas, las cuales resultan una alternativa de suma utilidad a los programas de mejora tradicionales.

Palabras clave adicionales: Espárrago - Mejora - Híbridos - Poblaciones mejoradas - Biotecnología

Asparagus (*Asparagus officinalis* L.): Several aspects of his improvements

Summary

Due to the asparagus evaluation time (at least two years per selective cycle) improvements plans demand a very high investment figures, either in economics and handwork in order to obtain materials with outstanding yields with adaptation to the agroecologic local conditions, able to satisfy market requirements. That's why, a correct election of the material's type to get is one of the clues for the program success.

Traditionally, cultivation begins from hybrids seeds whatever simples, doubles, clones, or "all macho", as well as from seeds of

improved populations. Succesfull of each one of those depends on the characteristics of the material used at the start point.

Therefore, for the improvement of this variety it is fundamental to get a pool of variable germ plasm from which it could be possible to make a selection of superior individual to be used for the creation of a superior variety.

Additional Key Words: Asparagus - improvements - hybrids - improved populations - biotechnology

Introducción

El género *Asparagus*, perteneciente a la familia de las Liliáceas, comprende unas 100 especies originarias del sur de Europa, Asia y África, algunas de ellas con valor ornamental y sólo una con valor hortícola: el espárrago (*Asparagus officinalis* L.).

El cultivo comercial de esta especie, perenne y dioica, se inicia con la siembra de semillas en almácigo, para obtener luego de un año, arañas (órgano de reserva) que serán transplantadas al lugar definitivo durante el reposo invernal.

Tanto los materiales diploides ($2n = 20$) como los tetraploides de coloración violeta ($2n = 4x = 40$) se adaptan a dos sistemas de cultivo: con surcos alomados para la producción de espárrago blanco y con surcos sin alomar para espárrago verde.

En la actualidad, por lo menos 61 países son productores de espárrago, con una superficie total de 218.335 hectáreas, correspondiendo el 55 % de la producción a espárrago de tipo blanco (3). En nuestro país la distribución geográfica del cultivo es muy

amplia, realizándose la producción desde la provincia de Río Negro hasta La Rioja y Catamarca, ocupando tierras de la Región Pampeana, como sustituto de actividades agrícolas tradicionales (63).

A lo largo del mejoramiento de esta especie se han desarrollado metodologías tradicionales, diferentes tipos de materiales con el objetivo de aumentar no sólo el rendimiento sino también la uniformidad del cultivo. Los materiales comercializados desde hace años incluyen poblaciones mejoradas por selección masal, distintos tipos de híbridos tales como los simples, dobles y los híbridos clonales y materiales constituidos por las F_2 de híbridos simples. En los últimos años comenzaron a utilizarse como auxiliares en los planes de mejoramiento convencionales, técnicas biotecnológicas ampliamente difundidas tanto en cultivos de tipo intensivos como extensivos.

Objetivos del mejoramiento.

Los principales objetivos que se persiguen en el mejoramiento genético son:

- Incremento del rendimiento mediante el aumento tanto del número como del diámetro de los turiones, como así también a través de una mayor uniformidad en su producción.
- Mayor calidad a través de la obtención de turiones, con un bajo nivel de fibra, una baja tendencia a la apertura de la punta del turión y, en espárrago blanco, la ausencia de pigmentación.
- Resistencia a enfermedades comunes en el cultivo como las causadas por *Fusarium* sp., *Rhizoctonia violacea*, y *Phytophthora megasperma* (entre los que afectan al sistema radical) y *Puccinia asparagi* y *Stenphyllium* sp. (que afectan al follaje).

A) Métodos convencionales de mejoramiento

Para iniciar un plan de mejoramiento es condición indispensable contar con poblaciones que presenten una amplia diversidad genética para los caracteres vegetativos y productivos sujetos a selección. En esta especie, la identificación de cultivares a través de características morfológicas resulta dificultosa debido a que la mayoría de los ellos sólo difieren para caracteres que son fuertemente influenciados por las condiciones ambientales. Si bien en la actualidad, los polimorfismos isoenzimáticos resultan una herramienta útil (30); sigue siendo la estimación de los parámetros genéticos tradicionales la forma más común de estimación de la variabilidad presente en una población (25).

A partir de una población variable se requiere la elección de los individuos superiores mediante evaluación fenotípica individual y evaluación de progenies con la posterior utilización de estos individuos seleccionados para crear un material superior, sean poblaciones mejoradas o híbridos.

1. Poblaciones mejoradas.

El objetivo de la selección recurrente es mejorar poblaciones para uno o más caracteres (22). Básicamente consiste en la evaluación de individuos dentro de una población base con altos niveles de variancia genética de tipo aditivo para los caracteres de interés y la posterior selección de los individuos superiores que actuarán como progenitores del nuevo ciclo. Cuando es practicada con éxito, resulta en la obtención de una nueva población con características más homogéneas y con valores superiores al comportamiento medio de la población de origen para los caracteres objetos de la mejora.

En estos materiales, la semilla, al ser producida por polinización libre, permite restablecer en cada ciclo la población original, presentando la ventaja de un menor costo de multiplicación y mantenimiento,

lo que redundará en una disminución del costo de producción de semilla. Además, debido a que son genéticamente variables, presentan una mayor homeostasis genética lo que les permite un mayor grado de adaptación local.

Una de las poblaciones más antiguas es Gewone Hollandse, desarrollada en el siglo XVIII, también llamada Purple Dutch en Inglaterra (26). En el siglo XIX, esta población dio origen por selección masal, en Francia a las poblaciones tipo Argenteuil tanto precoz como tardío, que posteriormente fueron introducidas en Estados Unidos, derivándose de ella distintos materiales en este país. En España e Italia se cultivan poblaciones tradicionales que son multiplicadas en áreas locales. Las distintas poblaciones cultivadas en el mundo, presentan actualmente rendimientos medios que oscilan entre los 117 y 243 gramos/planta⁻¹, lo que implica de 1 a 2,5 t·ha⁻¹ en espárrago blanco y de 2,5 a 5 t·ha⁻¹ para espárrago verde, con un promedio de 6 turiones por planta (Tabla 1).

En nuestro Campo Experimental "J. F. Villarino" ubicado en la localidad de Zavalla, provincia de Santa Fe (33° 01' S, 60° 53' O) se estableció en 1990 una población base (Ciclo 0) constituida por 900 plantas del cultivar Argenteuil originadas a partir de semillas provenientes de dos casas semilleras de Francia y una de Dinamarca. La misma fue manejada como espárrago blanco y evaluada durante las campañas 1992, 1993 y 1994 a nivel de planta individual (47, 8), presentando un rendimiento promedio por planta de 119,75 ± 88,7 g (1,2 t·ha⁻¹) y 7,1 ± 4,4 turiones. En 1994 se seleccionaron sobre la base del rendimiento promedio de las tres campañas, 32 plantas pistiladas y 64 estaminadas (4) que presentaron rendimientos promedio por planta de 248,86 ± 51,6 g y 13,8 ± 1,8 turiones. Esta fracción de plantas selectas se dejó polinizar libremente, cosechándose a comienzos de 1995 la totalidad de semillas producidas sobre cada planta pistilada, y obteniéndose, de esta manera, 32 familias de medios hermanos que constituyeron la población progenie (Ciclo 1). La misma fue implantada en el mismo predio en 1996 y evaluada, también a nivel de planta individual, durante 1997 y 1998. Esta población progenie presentó rendimientos promedios de 185,44 ± 86,1 g y 9,5 ± 2,9 turiones por planta (1,9 t·ha⁻¹) (25).

Siguiendo el mismo criterio que fuera aplicado sobre la población base, se seleccionaron 8 plantas pistiladas y 6 estaminadas cuyos rendimientos promedio oscilaron en los 434,43 ± 52,5 g con un promedio de 16,2 ± 2,5 turiones por planta. Las mismas dieron origen a la población del Ciclo 2 de selección, actualmente implantada en el Campo Experimental, que será evaluada a partir del período

productivo 2001 para originar en 2003 la población del Ciclo 3.

Es necesario sin embargo comparar simultáneamente la población original y los diferentes ciclos a fin de determinar en las mismas condiciones ambientales el logro real del proceso selectivo. Este análisis proveerá la información necesaria para determinar si la población obtenida en el Ciclo 3 de selección reúne las condiciones de rendimiento y uniformidad suficientes como para constituir un material comercial o si es necesario continuar con el proceso selectivo.

2. Híbridos

2.1. Híbridos simples. Originariamente, en espárrago, se denominó híbrido simple al cruzamiento entre una planta pistilada y otra estaminada (altamente heterocigóticas) produciendo descendencia con bajos rendimientos (aproximadamente 0,5 a 1,5 t·ha⁻¹) y de gran variabilidad entre plantas puesto de manifiesto en los elevados valores del coeficientes de variación (Cuadro 1).

Con el objeto de lograr una mayor homogeneidad y explotar los efectos heteróticos, se recurrió a la utilización de híbridos simples F1 provenientes del cruzamiento entre dos líneas endocriadas. Estas líneas, a pesar de ser una especie dioica, pueden obtenerse

por autofecundación de ejemplares hermafroditas o por cruzamientos repetidos entre hermanos. Por este método fue creado el híbrido Limbras en Nueva Zelanda que actualmente constituye un 95 % de las nuevas plantaciones en dicho país (17) con un rinde aproximado de 2 a 4 t·ha⁻¹ dependiendo del tipo de manejo.

Ocasionalmente las semillas desarrollan más de un embrión (54, 30) de los cuales uno puede ser haploide, pudiendo constituir, tras su diploidización, una línea homocigótica. Sin embargo, este método no resulta eficaz debido a que sólo se obtienen en promedio 0,23 haploides cada 1.000 semillas (62), por lo cual se torna indispensable recurrir a nuevas tecnologías para la obtención de este tipo de materiales.

Una variante a los híbridos simples fue la creación de híbridos "Todo Macho".

Al ser el espárrago una planta dioica, numerosos investigadores se han dedicado a establecer si existen diferencias entre sexos para las distintas variables estudiadas. En algunos casos, un mayor rendimiento fue encontrado en las plantas estaminadas (55, 66, 18, 14, 24, 21). Esta superioridad de las plantas estaminadas animó a los mejoradores a pensar qué materiales constituidos íntegramente por estas plantas mostrarían rendimientos superiores a los de las poblaciones dioicas. En 1953, se propuso

Cuadro 1. Valores medios y coeficientes de variación para los diferentes tipos de materiales

Tipo varietal	Variedad	Número de turiones/planta		Rendimiento/planta (g)	
		Media	Coef. Variación	Media	Coef. Variación
Poblaciones	MW500w (Yates)	4,5	82	117	83
	MW500w (Lincoln)	5,0	64	130	84
	MW500w (Baines)	5,4	101	133	90
	Spaganiva	8,9	75	243	61
	Promedio	6,0	81	156	80
Híbridos simples	Limbras 10	8,8	58	271	51
	Limbras 18	7,5	64	205	54
	Limbras 22	8,5	66	241	63
	Limbras 26	5,8	67	205	63
	Schwetzingen	2,1	93	71	94
	Meisterschuss	2,1	93	71	94
Híbridos dobles	Diane	5,7	70	201	75
	Larac	6,9	67	276	68
	Minerve	7,4	70	240	59
	Junon	6,6	62	281	65
	Promedio	6,7	67	250	67
Híbridos clonales	Mira	12,2	58	255	52
	Aneto	9,5	65	357	60
	Bruneto	7,7	58	398	61
	Cito	11,3	42	383	39
	Desto	8,3	56	332	52
	UC157	6,0	72	233	71
Híbridos "Todo macho"	Promedio	8,6	61	288	57
	Sieg	6,9	63	244	63
	Rekord	5,4	65	171	69
	Lucullus	5,3	79	150	81
	Lucullus Early Hybrid	5,8	64	178	62

la posibilidad de crear materiales constituidos totalmente por plantas estaminadas a partir del cruzamiento entre plantas pistiladas normales y plantas estaminadas supermachos (59). Estas últimas pueden obtenerse a partir de la autofecundación de una planta andromonoica (Figura 1), o bien a partir de la duplicación de plantas haploides estaminadas provenientes del cultivo de anteras. De este modo fueron creados, a partir del cultivar Precoz de Argentetüil, y comercializados en Italia (1993), 7 híbridos “Todo Macho” (Marte, Eros, Golia, Gladio, Ringo, Argo y Sirio) de buena calidad y rendimientos que oscilan entre 2,5 y 8,8 t·ha⁻¹. Algunos de ellos aptos para ser cultivados como espárrago verde, otros como blanco y otros adaptados a ambos tipos de manejo (20). Híbridos “Todo Macho” tales como Sieg, Rekord, Lucullus, Lucullus Early Hybrid y Jersey Giant (16), cuyos rendimientos oscilan entre 1,5 a 5 t·ha⁻¹. (Tabla 1) fueron obtenidos en diversas partes del mundo.

Sin embargo, la superioridad de las plantas estaminadas no ha podido ser confirmada en otros materiales (2, 62, 46, 9) posiblemente porque se produce una compensación entre el mayor número de turiones de las plantas estaminadas y los mayores pesos promedios y diámetros de turión de las plantas pistiladas (10).

2.2 Híbridos clonales. Los híbridos clonales o de clones resultan del cruzamiento entre dos genotipos heterocigotas que han sido previamente multiplicados (clonados), normalmente *in-vitro* (Figura 2), para

facilitar la obtención comercial de semilla. Al provenir de dos progenitores heterocigotas manifiestan una variabilidad genética superior a los híbridos simples, lo cual puede resultar en una mayor homeostasis. Por otra parte, una de las principales ventajas de estos materiales es que, una vez detectada una combinación superior en cuanto a rendimiento, se procede directamente a la producción del híbrido evitando así el prolongado proceso de producción de líneas y las erogaciones en tiempo y recursos que este conlleva.

En diferentes programas de mejoramiento llevado a cabo en el INRA (*Institut National de la Recherche Agronomique*) se obtuvieron cinco híbridos clonales Aneto y Desto (en 1977), Bruneto y Cito (en 1978) y Stelline (en 1980) (31); los cuales manifestaron un aumento en el rendimiento de hasta un 100 % sobre los cultivos comerciales (Tabla 1) (13). Otros híbridos clonales obtenidos son UC157, en los Estados Unidos (4) y Diego (19) en Italia.

En nuestro Campo Experimental se implantaron en 1997, 23 híbridos clonales producidos por nuestro Programa de Mejora a partir del cruzamiento de plantas selectas de una población de la cv. Argentetüil y dos testigos comerciales (UC 157 F1 y la cv. Argentetüil). Se evaluó el sistema de producción (blanco o verde) más adecuado utilizándose un diseño en bloques completos aleatorizados con dos repeticiones para manejo como blanco y dos para verde. De la evaluación efectuada durante las cosechas 1999 y 2000 se estableció que 4 de los 23 híbridos experimentales (HEZ-4, HEZ-10, HEZ-17

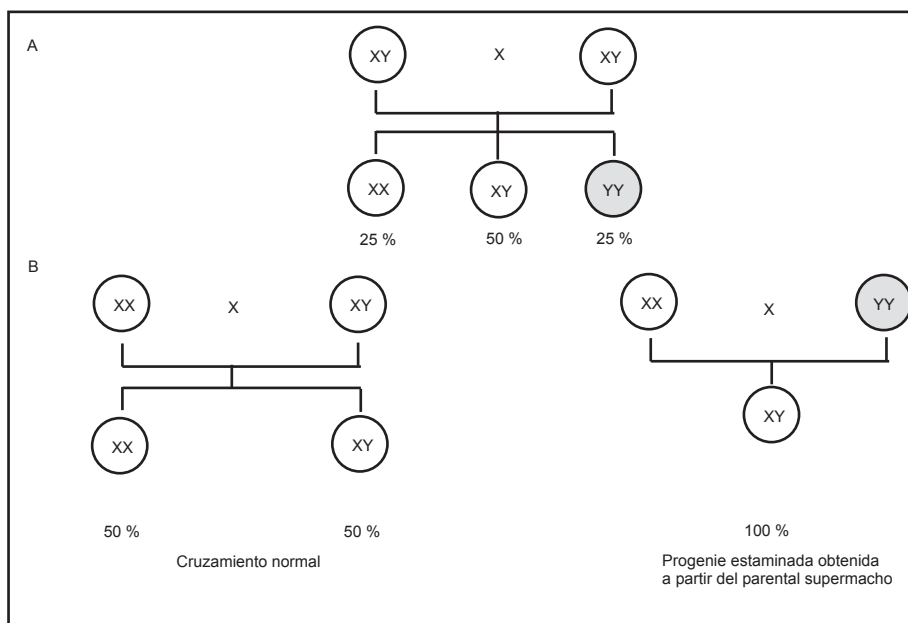


Figura 1. Producción de híbridos todo macho. Adaptado de (54)

A) Cruzamiento de plantas andromonoicas para producir la variedad todo macho. B) El tipo supermacho de plantas estaminadas sólo puede distinguirse mediante cruzamientos de prueba

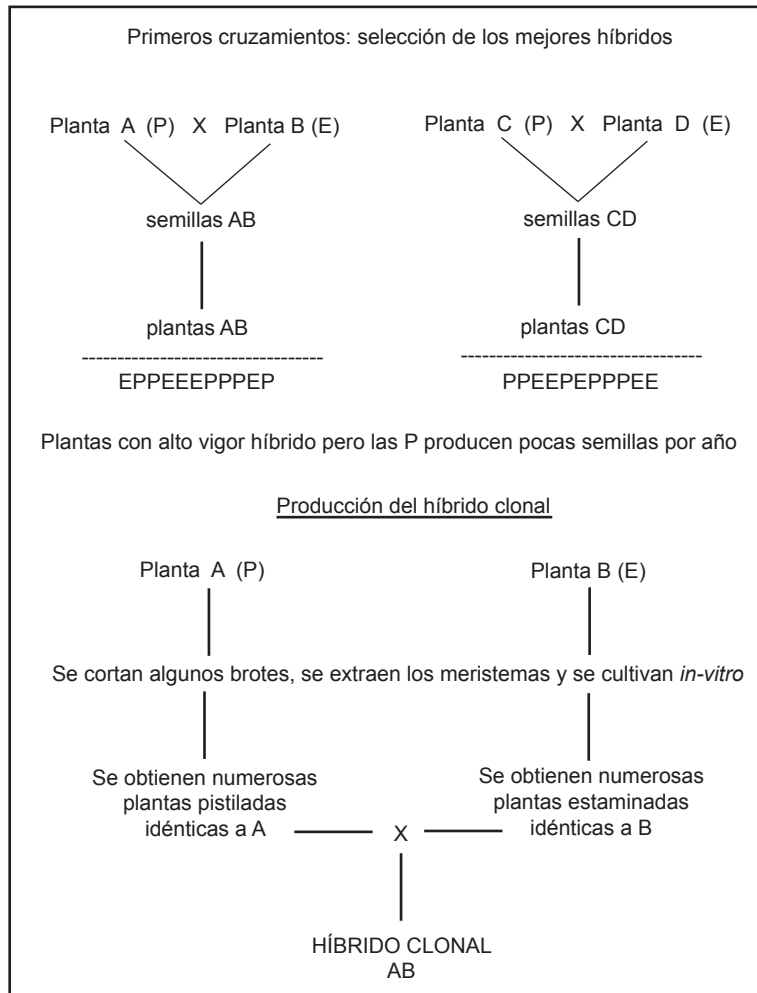


Figura 2. Producción de híbridos clonales. Adaptado de (13)

P = Plantas pistiladas E = Plantas estaminadas

y HEZ-19) superaron ampliamente en rendimiento a los testigos comerciales difundidos en la zona para ambos tipos de manejo (Cuadro 2).

2.3 Híbridos dobles. Los denominados híbridos dobles en espárrago, provienen del cruzamiento de 4 plantas heterocigotas elegidas por su aptitud combinatoria específica (Figura 3) y presentan mayor variabilidad genotípica que los híbridos simples, aunque inferior a la de las poblaciones. Mediante esta técnica, se crearon en un programa de mejoramiento del INRA en Francia, 4 híbridos dobles (Diane, Larac, Minerve y Junon) que mostraron rendimientos promedios de 250 g·planta⁻¹ (2,5 a 5 t·ha⁻¹), resultando un 60 % superiores respecto a media de las poblaciones comerciales de la zona (Cuadro 1).

B) Técnicas auxiliares de mejoramiento

El mejoramiento del espárrago a través de técnicas

convencionales resulta un proceso arduo que requiere entre 15 y 20 años desde el comienzo del programa hasta la obtención de semilla comercial (50). Por tal motivo, en las últimas décadas se han comenzado a desarrollar nuevas técnicas biotecnológicas para ser utilizadas como auxiliares en los planes de mejora.

1. Uso de la inducción floral

Su utilidad radica en la posibilidad de establecer la proporción sexual en etapas tempranas de crecimiento. En aquellos programas de mejoramiento que producen materiales "Todo Macho", esta técnica permite reducir los tiempos de evaluación de las progenies de diferentes cruzamientos para identificar parentales supermachos.

Esta técnica puede obtenerse por tratamiento químico con herbicidas como Atrazina y Diurón (1), anticitoquininas s-triazinas (48) y derivados de anilidas y benzamidas (32).

Por otra parte, con el uso de citocininas es posible inducir un alto porcentaje de flores hermafroditas en

Cuadro 2. Valores promedio para las diferentes variables productivas de los híbridos experimentales y los testigos comerciales en los dos años y tratamientos evaluados.

Material	Año	DAC		RM		RT		NM		NT		PM		PT	
		BL	VE	BL	VE	BL	VE	BL	VE	BL	VE	BL	VE	BL	VE
HEZ 1	1	156,0	152,5	1.009,0	590,0	1.173,5	742,5	37,0	41,0	59,0	69,0	26,8	14,4	19,6	10,7
	2	162,0	156,0	3.974,0	2.392,9	4.202,4	2.768,4	137,0	131,8	158,7	178,9	29,0	18,1	26,5	15,5
HEZ 2	1	154,0	157,5	879,0	367,5	999,5	613,5	39,0	26,0	54,4	71,5	22,4	14,2	18,3	8,7
	2	164,0	162,0	3.435,0	1.336,1	3.903,8	1.939,3	123,5	91,8	167,0	182,9	27,9	14,7	23,6	10,6
HEZ 3	1	144,5	145,5	822,5	478,5	1.163,5	603,0	41,5	33,5	82,0	55,0	19,9	13,7	14,2	10,9
	2	156,5	159,5	2.735,7	1.748,9	3.306,2	2.045,8	117,2	97,8	176,3	142,2	23,7	17,1	18,8	14,0
HEZ 4	1	153,0	152,0	1.886,5	933,5	2.029,0	1.018,0	60,0	52,0	78,0	63,5	31,3	17,9	25,9	15,8
	2	163,0	158,5	29.636,8	3.548,0	30.109,0	3.735,3	201,5	158,2	250,0	188,1	146,8	22,3	118,7	19,8
HEZ 5	1	153,0	156,0	1.261,0	785,0	1.486,0	1.031,5	54,0	47,5	80,0	87,5	23,3	16,7	18,6	11,9
	2	163,0	161,5	4.015,2	2.177,4	4.649,8	2.982,6	159,3	146,8	224,7	256,3	25,2	14,8	20,7	11,6
HEZ 6	1	153,5	151,0	1.316,0	737,5	1.544,0	882,0	58,0	41,5	87,5	69,0	23,1	17,5	17,6	13,1
	2	165,5	164,0	4.385,0	3.095,7	4.834,8	3.450,7	163,2	161,2	206,6	210,2	27,0	19,2	23,8	16,5
HEZ 7	1	159,5	151,0	1.387,5	854,5	1.714,0	1.017,5	58,5	56,0	96,0	84,0	23,7	15,2	17,9	12,1
	2	164,0	165,0	4.675,3	2.710,3	5.411,3	3.310,5	177,5	163,2	245,5	245,8	26,2	16,6	22,3	13,5
HEZ 8	1	158,5	158,0	1.253,0	820,0	1.408,5	1.049,5	49,0	56,0	69,5	84,5	25,7	14,6	20,9	12,4
	2	168,0	161,5	5.488,0	3.095,7	5.831,2	3.514,8	177,0	159,5	207,6	204,7	31,0	19,5	28,1	17,3
HEZ 9	1	156,0	158,0	1.172,5	519,8	1.426,5	867,8	50,0	44,0	82,0	98,0	23,5	12,9	17,4	8,7
	2	160,5	161,5	4.680,8	2.556,6	5.321,9	3.010,4	159,7	134,9	220,0	194,7	29,2	18,9	24,2	15,4
HEZ 10	1	160,0	155,5	1.336,0	747,0	1.505,5	983,0	49,0	42,5	72,5	77,0	27,3	17,6	20,8	12,8
	2	168,0	164,0	4.810,7	2.835,6	5.169,0	3.318,6	139,8	140,4	177,8	198,2	34,4	20,2	29,2	16,8
HEZ 11	1	146,5	148,0	963,0	609,8	1.201,0	884,5	41,5	40,0	70,0	88,0	23,4	15,1	17,5	9,9
	2	157,0	159,5	4.027,1	2.354,5	4.393,5	2.854,8	137,9	152,5	174,6	226,6	29,0	15,4	25,0	12,6
HEZ 12	1	165,5	159,5	829,5	409,3	1.156,0	713,3	38,5	29,0	80,0	84,5	21,2	13,7	14,3	8,4
	2	165,5	163,0	2.800,1	1.693,2	3.514,6	2.186,3	116,0	103,7	188,3	177,6	24,1	16,2	18,7	12,2
HEZ 13	1	156,5	157,0	1.299,5	583,5	1.552,0	892,0	61,0	41,0	92,0	92,0	21,4	14,2	17,0	9,7
	2	163,0	164,0	4.035,5	1.946,2	4.799,5	2.530,2	157,2	122,7	232,7	194,5	25,6	15,9	20,6	13,0

Los valores corresponden al promedio por parcela de 20 plantas. Abreviaturas:

DAC: días a cosecha, RM: rendimiento de mercado, RT: rendimiento total, NM: número de turiones de mercado, NT: número de turiones totales, PM: peso medio del turión de mercado, PT: peso medio del turión, BL: espárrago blanco, VE: espárrago verde.

Cuadro 2. Valores promedio para las diferentes variables productivas de los híbridos experimentales y los testigos comerciales en los dos años y tratamientos evaluados. (Continuación)

Material	Año	DAC		RM		RT		NM		NT		PM		PT	
		BL	VE	BL	VE	BL	VE	BL	VE	BL	VE	BL	VE	BL	VE
HEZ 14	1	160,0	157,5	1.128,5	614,32	1.387,0	832,5	54,0	42,5	84,5	78,0	20,8	14,4	16,4	10,6
	2	165,5	163,0	4.031,0	2669,5	4.718,3	3.017,8	165,5	151,9	230,5	197,9	24,3	17,6	20,4	15,3
HEZ 15	1	159,5	157,5	1.228,5	763,3	1.365,5	973,8	50,0	44,5	67,0	72,5	24,6	17,0	20,4	13,3
	2	165,5	161,0	4.274,8	2.697,7	4.461,3	3.095,6	134,3	146,6	153,1	198,9	31,3	18,2	28,8	15,5
HEZ 16	1	158,0	152,0	1.443,5	608,0	1.769,5	892,5	67,5	43,5	111,0	97,5	21,6	14,1	16,0	9,2
	2	165,0	159,5	5.948,3	2.926,8	6.672,8	3.512,7	220,3	169,8	288,2	254,4	26,9	17,2	23,0	13,8
HEZ 17	1	164,0	161,5	1.328,0	1.141,5	1.459,0	1.279,3	45,5	56,5	58,5	72,0	29,2	20,2	25,0	17,7
	2	170,0	169,0	5.588,0	3.371,3	5.668,4	3.520,0	147,9	144,2	154,9	156,5	37,8	23,3	36,7	22,4
HEZ 18	1	158,5	153,0	1.151,5	408,5	1.438,5	798,3	48,5	35,5	85,5	89,5	23,8	13,5	16,9	9,1
	2	164,0	159,5	4.320,2	1.767,0	5.125,5	2.632,7	159,9	117,6	236,2	239,1	27,0	15,1	21,7	11,2
HEZ 19	1	158,5	157,5	1.360,5	906,8	1.537,5	1.179,3	49,0	56,0	67,5	99,5	27,7	16,1	22,8	11,8
	2	160,5	161,0	4.916,0	2.995,3	5.353,2	3.633,1	164,1	179,4	196,5	256,7	29,9	16,8	27,3	14,2
HEZ 20	1	162,0	154,5	851,5	548,3	1.130,5	845,0	42,0	41,5	74,5	85,0	20,1	13,3	15,1	9,9
	2	166,5	159,5	3.641,7	2.134,1	4.558,9	2.964,6	157,3	145,2	241,3	256,7	23,2	14,7	18,9	11,6
HEZ 21	1	158,5	155,5	1.137,0	647,0	1.415,5	849,5	50,0	47,5	81,5	86,5	22,8	13,6	17,4	9,8
	2	164,0	163,0	4.161,8	2.301,2	4.910,0	3.107,1	156,5	148,2	223,0	255,9	26,5	15,4	22,1	12,0
HEZ 22	1	161,0	157,0	685,0	473,8	1.000,0	740,3	35,0	34,0	74,0	79,0	19,2	13,9	13,4	9,4
	2	166,5	165,0	2.908,5	2.086,9	3.724,3	2.782,9	74,0	124,9	151,0	212,2	58,8	16,3	25,4	12,9
HEZ 23	1	162,0	155,0	1.682,0	684,5	1.863,0	965,5	67,5	44,0	90,5	85,5	24,9	15,6	20,8	11,5
	2	164,0	158,0	5.294,0	3.535,4	5.725,5	3.954,9	178,5	206,6	217,0	256,7	29,6	17,1	26,4	15,4
HEZ 24	1	163,0	163,5	921,0	365,0	1.143,0	493,5	42,5	27,5	71,5	49,0	21,7	13,2	16,0	10,0
	2	164,5	165,5	3.338,9	1.580,6	3.854,5	2.000,0	135,8	106,7	191,6	152,8	24,6	14,8	20,4	13,1
cv. Argentéuil	1	158,5	159,5	1.229,0	660,8	1.434,5	928,0	47,0	36,0	77,0	68,5	26,1	18,2	18,8	13,6
	2	165,5	166,5	4.471,1	2.678,6	4.970,5	3.117,1	138,9	125,8	186,7	173,7	32,2	21,3	26,9	18,0

Los valores corresponden al promedio por parcela de 20 plantas. Abreviaturas:

DAC: días a cosecha, RM: rendimiento de mercado, RT: rendimiento total, NM: número de turiones de mercado, NT: número de turiones totales, PM: peso medio del turión de mercado, PT: peso medio del turión, BL: espárrago blanco, VE: espárrago verde.

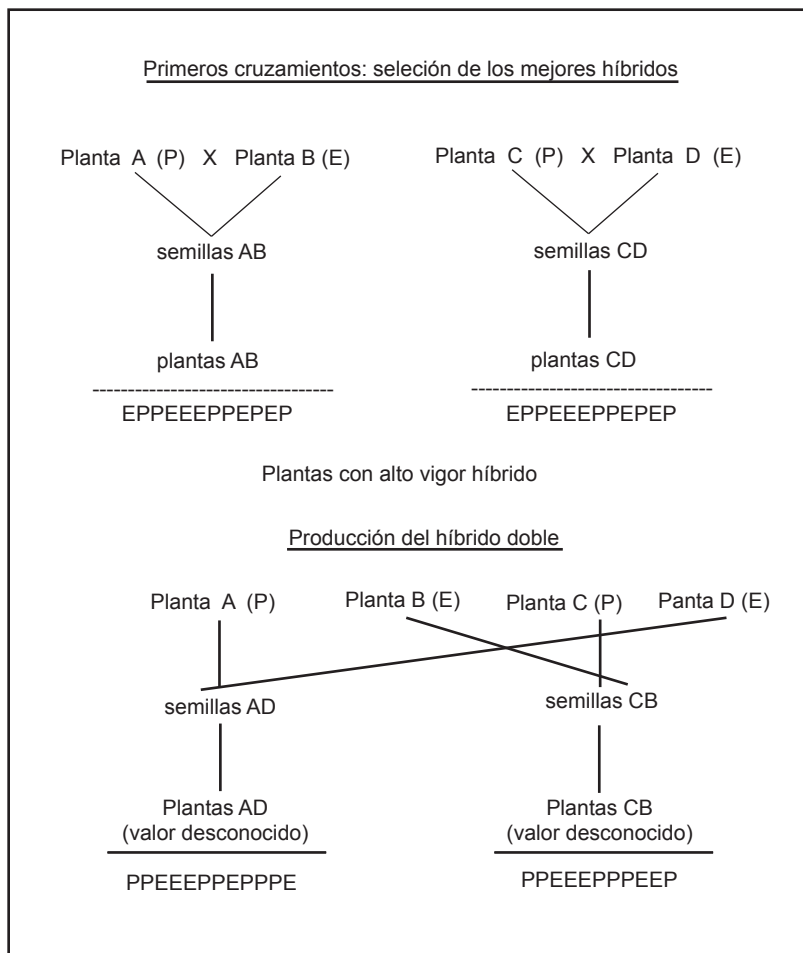


Figura 3. Producción de híbridos dobles. Adaptado de (13)

plantas estaminadas, y con giberelinas aplicadas solas o en conjunto con citocininas en plantas pistiladas (45). Si bien las flores hermafroditas obtenidas con esta metodología no dieron semillas viables, en un futuro será posible ponerla a punto para proceder a la endocria de plantas selectas.

2. Cultivo de tejidos:

Los objetivos principales de esta metodología consisten en multiplicar a través de diferentes procedimientos, progenitores de híbridos y genotipos sobresalientes en escala comercial. El cultivo de meristemas es la técnica más ampliamente difundida y utilizada por diferentes investigadores (34, 65, 15, 8, 58). Actualmente en el Laboratorio perteneciente a la Cátedra de Genética de la Facultad de Ciencias

Agrarias (Universidad Nacional de Rosario) y en la Estación Experimental Agropecuaria Balcarce INTA se lleva a cabo la multiplicación *in-vitro* de los progenitores de los cuatro híbridos experimentales selectos mencionados anteriormente (HEZ-4, HEZ-10, HEZ-17 y HEZ-19) para conformar lotes de cruzamiento y así producir semilla híbrida en cantidad suficiente para su comercialización.

La embriogénesis somática es otra alternativa que consiste en la producción de embriones a partir de cultivo *in-vitro* de tejidos somáticos tales como hipocótilos, tallos y cladodios (64, 53, 33, 40), los cuales pueden cultivarse en medios líquidos libres de hormonas en los que presentan un alto potencial de multiplicación con escasa o nula variación somaclonal.

La gran potencialidad de estas técnicas se basa

en que el explanto posee la capacidad de regenerar íntegramente el genotipo original haciendo posible la obtención de un número elevado de plantas en tiempo y espacio reducido, pudiendo a su vez ser automatizada. El espárrago es una de las primeras monocotiledóneas que pudo ser regenerada por embriogénesis somática (64, 61, 53).

Por otra parte, las técnicas de cultivo *in-vitro* también son aplicadas al cultivo de anteras a fin de obtener plantas haploides (52) que, tras duplicación permiten producir embriones androgenéticos. Sin embargo, esta metodología trae aparejada una serie de inconvenientes (20) tales como:

- baja producción de embriones ya que se obtienen en promedio 2,4 embriones cada 100 anteras;
- bajo porcentaje de regeneración de embriones *in-vitro* debido a que aproximadamente el 50 % de los embriones degenera o prolifera como callos indiferenciados;
- baja proporción de embriones haploides, de un total de 2.709 embriones obtenidos solamente un 3 % cumplió la condición de haploide, el 59 % fue diploide, el 11 % triploide y el 27 % tetraploide;
- posible regeneración de embriones heterocigotas de origen somático;
- imposibilidad de distinguir, en función de caracteres morfológicos, genotipos diploides de poliploides.

Para poder superar estos inconvenientes, se desarrolló un método más promisorio basado en la inducción del crecimiento de las células madres del polen bajo condiciones *in-vitro* para generar plántulas haploides en forma directa o a través de callos (23, 67).

3. Uso del Cultivo de células y protoplastos

Los protoplastos (células cuya pared celular ha sido removida por métodos mecánicos o enzimáticos) crecen y pueden dividirse llegando a regenerar una nueva planta. Cuando la célula está en estado de protoplasto se puede manipular pudiendo absorber varios tipos de materiales genéticos. Un método para generar variabilidad genética consiste en fusionar protoplastos de dos especies diferentes para formar híbridos somáticos. Sin embargo, el proceso de fusión es enteramente físico y difícil de repetir, originándose una amplia variación de resultados en cada experimento, por lo cual los resultados a obtener son siempre impredecibles. En tal sentido, la introducción de genes aislados mediante electroporación, proceso mediante el cual las células se someten a pulsos eléctricos de alto voltaje, (44, 49) permite sortear este obstáculo, siendo la baja velocidad de regeneración de plantas, la principal desventaja de esta técnica.

Las células aisladas son más fáciles de obtener y

manejar que los protoplastos y pueden regenerar nuevas plantas con una alta frecuencia (39, 41), siendo además un excelente material para el estudio de diferentes procesos fisiológicos.

4. Uso de Marcadores moleculares

Los análisis moleculares pueden efectuarse mediante marcadores isoenzimáticos o de ADN. Las isoenzimas fueron utilizadas con éxito tanto para la identificación de clones y detección de individuos homocigotas (56, 57), como para la identificación de plantas doble-haploides derivadas del cultivo de anteras y microsporas (11, 29) y, en los últimos años, para establecer la relación existente entre híbridos y cultivares de diferentes orígenes (26, 28), lográndose clasificar los 50 cultivares estudiados, en sólo 7 grupos con características distintivas (27), lo que pone en evidencia la existencia de una estrecha base genética en el espárrago cultivado mundialmente (37, 43).

Si bien los marcadores isoenzimáticos permiten detectar cambios genéticos, están sujetos a variaciones ontogénicas, son limitados en número, y sólo permiten analizar regiones del genoma que codifican para estas enzimas. Por ello, la tendencia actual es utilizar marcadores de ADN, como RFLPs (Polimorfismo para la longitud de los fragmentos de restricción) o RAPDs (Polimorfismo para fragmentos de ADN amplificados al azar). Este tipo de marcadores presentan las ventajas de ser independientes de las prácticas de manejo y del ambiente y pueden ser extraídos de cualquier tejido vegetal, incluso al estado de plántula en que el carácter en estudio aún no se expresó (42); con ellos se obtienen patrones de bandas independientes de la expresión ontogénica, y se puede analizar gran parte del genoma con un número de marcadores potencialmente ilimitados.

Los RFLPs y RAPDs se han empleado en espárrago para la detección temprana del sexo (5, 51); para la determinación de la variación somaclonal ocurrida durante cultivo *in-vitro* (36) y para la construcción de mapas de ligamiento (38, 60, 7).

5. Uso de Transformación genética

Los métodos de transformación con *Agrobacterium* se han incorporado rápidamente en plantas dicotiledóneas. Sin embargo, en especies monocotiledóneas, su difusión es menor, siendo el espárrago una de las plantas monocotiledóneas que han podido ser transformadas, a nivel experimental, a través de diversos procedimientos, incluyendo *A. tumefaciens* (35, 6, 12). Métodos alternativos de transformación tales como bombardeo de partículas y electroporación han sido

probados, sin embargo sólo mediante transformación con *Agrobacterium* fue posible la regeneración de plantas completas (50).

Consideraciones finales

El espárrago es una de las hortalizas que ha experimentado mayores avances en los mercados mundiales, principalmente en el Hemisferio Norte como consecuencia de cambios de hábitos de consumo que en la actualidad muestran una tendencia pronunciada hacia el consumo de vegetales frescos.

En los últimos años ha habido en nuestro país una retracción de la actividad hortícola provocada principalmente por un incremento en el área agrícola y agravada por un mayor riesgo económico de la horticultura. Esto se debe a que la explotación agrícola, al evolucionar hacia una agricultura con sentido empresarial, destina mayores superficies y una mayor inversión de capitales. Este tipo de inversiones exige entonces mayor seguridad en los retornos. Por otra parte la producción en la agricultura mundial moderna alcanzó un grado de complejidad tal, que exige no ya la reproducción rutinaria de materiales introducidos, sino mantener un progreso continuado basado en el mejoramiento genético a través de técnicas convencionales y no convencionales.

En el caso del espárrago, por sus características de cultivo (plurianual, de producción en una época reducida del año) los mayores requerimientos económicos se presentan en la época de cosecha debido a las necesidades de mano de obra especializada, lo que provoca un incremento de los costos marginales disminuyendo así la rentabilidad para el productor.

El desarrollo de materiales de mayor potencial de rendimiento tales como híbridos dobles, clonales y simples, o poblaciones mejoradas de buena adaptación local y calidad exportable, aseguran que los planes de mejoramiento locales jugarán un papel cada vez más importante en el futuro de la especie ya que la elevada producción, sumada a un menor costo, favorecerá su expansión.

Bibliografía

1. Abe, T. & Kameya, T. 1986. Promotion of flower formation by atrazine and diuron. *Planta* 169: 289-291.
2. Bannerot, H.; Derieux, M.; Thevenin, L. & Arnoux, J. 1969. Résultats de'un essai comparatif de populations de'asperge. *Ann. Amélior. Plantes* 19(3):289-324.
3. Benson, B. L. 1997. World asparagus production areas and periods of production. Proc. IX International Asparagus Symposium. ACTA

- Horticulturae 479:43-50.
4. Benson, B. L. & Takatori, F. 1980. Foundation asparagus seed program and the release of UC157 parental clones to the seed industry. *Asparagus Res.* 1979-1980. Univ. Cal. Davis. pp. 25-26.
5. Biffi, R.; Restivo, F. M.; Tassi, F.; Caporali, E.; Carboni, A.; Marziani, G.; Spada, A. & Falavigna, A. 1995. A restriction fragment length polymorphism probe for early diagnosis of gender in *Asparagus officinalis* L. *HortScience*. 30:1463-1464.
6. Bytebier, B.; Debroeck, F.; Greve, H.; Montagu, M. & Hernalsteens, J. P. 1987. T-DNA organisation in tumor culture and transgenic plants of the monocotyledon *Asparagus officinalis* L. *Proc. Natl. Acad. Science. USA.* 84: 5345-5349.
7. Caporali, E.; Carboni, A.; Spada, A.; Marziani, G.; Biffi, R.; Restivo, F.; Tassi, F.; Nichols, M. & Swain, D. 1996. Construction of a linkage map in *Asparagus officinalis* L. through RFLP and RAPD analysis. *Acta Hort.* 415:435-440.
8. Cointry, E.; García, S.; Firpo, I. y Benavidez, R. 1993. Utilización de metodologías no convencionales para un programa de mejoramiento de espárrago (*Asparagus officinalis* L.). *Hort. Arg.* 8-12(18-32):13-18.
9. Cointry, E. L.; López Anido, F. S.; Gatti, I.; Firpo, I. T. y García, S. M. 1996. Criterios para la selección de plantas élites en espárrago. II Jornada Argentino-Chilena de Genética; XXXIV Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Chile; XXVI Congreso Argentino de Genética. Viña del Mar. Chile.
10. Cointry, E.; López Anido, F.; Gatti, I.; García, S. & Firpo, I. 1996. Comparative study of morphological and productive characters in blanched asparagus populations. *Asparagus Res.* Univ. Cal. Davis. 13: 30-34.
11. Colby, L. & Peirce, L. 1988. Using an isozyme markers to identify doubles haploids from anther culture of asparagus. *Hort Science.* 23:761-763.
12. Conner, A. J.; Williams, M. K.; Lancaster, J. E.; Shaw, M. L.; Falloon, P. G.; Deroles, S. C. & Gardener, R. C. 1990. Genetic engineering of *Asparagus officinalis* L. using *Agrobacterium*. *Acta Hort* 271:509.
13. Corriols, L. & Thevenin, L. 1979. L'INRA et l'asperge. Qu'en est-il en 1979. P.H.M. *Révue Horticole.* Oct. 1979. de clones et de lignées d'asperge.
14. Currence, T. M. & Richardson, A. L. 1937. Asparagus breeding studies. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 35:554-557.
15. Doré, C.; Rameau, C. & Bizais, F. 1991. Mise au point sur la sélection et les types variétaux

- d'asperge à l'INRA. P.H.M.- Revue Horticole. N° 320. pp:25-32.
16. Ellison, J. H. 1984. Release of Jersey Giant and Greenwich. *Asparagus Research Newsletter*. 2:23.
 17. Ellison, J. H. 1986. *Asparagus breeding*. In: *Breeding Vegetable Crops*. Bassett, M. J. (Ed.). Avi Publisher Co. Westport CT, AVI, 521-569.
 18. Ellison, J. H.; Scheer, D. F. & Wagner, J. J. 1960. *Asparagus yield as related to plant vigor, earliness and sex*. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 75:411-415.
 19. Falavigna, A.; Casali, P. & Soresi, G. 1982. Diego: first italian hybrid of asparagus from heterozygous clones. *Genet. Agrar.* 162-163.
 20. Falavigna, A.; Casali, P. & Bataglia, A. 1997. Achievement of asparagus breeding in Italy. *Proc. IX International Asparagus Symposium. ACTA Horticulturae* 479:67-74.
 21. Fallon P. G. & Nikoloff, A. F. 1986. *Asparagus: value of individual plant yiel and fern characteristics as selection criteria*. *N.Z.J. of Exp. Agric.* 14:417-420.
 22. Fehr, W. R. 1987. *Principles of cultivar development*. Iowa State University. McGraw-Hill, Inc. vol 1. p 536.
 23. Feng, X. R. & Wolyn, D. J. 1994. Recovery of haploid plants from asparagus microspore culture. *Can. J. Bot.* 72:296-300.
 24. Franken, A. A. 1970. Sex characteristics and inheritance of sex in asparagus (*Asparagus officinalis* L.). *Euphytica* 19:277-287.
 25. 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.
 26. Geoffriau, E.; Denoue, D. & Rameau, C. 1992. Assessment of genetic variation among asparagus (*Asparagus officinalis* L.) populations and cultivars: agromorphological and isozymic data. *Euphytica*. 61:169-179.
 27. González-Castañón, M. L. 1997. Isozyme gene markers in asparagus used to classify fifty asparagus cultivars. *Proc. IX International Asparagus Symposium. ACTA Horticulturae* 479:77-84.
 28. González-Castañón, M. L. 1999. Isozyme gene markers in asparagus use to classify fifty asparagus cultivars. *Acta Hort.* 479:77-84.
 29. González-Castañón, M. L. & Carbajal-Carcedo, S. 1996. Isoenzyme gene marker in asparagus used for identification of doubled-haploids and híbrids. *Acta Horticulturae* 415:143-150.
 30. Gottlieb, L. D. 1982. Conservation and duplication of isoenzymes in plants. *Science* 216:373-380.
 31. Gry, L. 1990. L'asperge profite d'une sélection de pointe. *Semences et Progrès N.* 65:3-16.
 32. Hara, T.; Wada, N. & Iwamura, H. 1992. Flower induction in asparagus seedling by analide and benzamide derivates. *J. Agric. Food Chem.* 40:1692-1694.
 33. Harada, H. 1973. Differentiation of shoot and somatic embryos in asparagus tissue culture. *Eucarpia 4 èmé réunion sur la sélection d l'asperge*. 1:163-172.
 34. Hasagawa, P. M.; Murashige, T. and Takatori, F. H. 1973. Propagation of asparagus through shoot apex culture. II. Light and temperature requirements, transplantability of plants, and cyto-histological characteristics. *J. Amer. Soc. Hortic. Sci.* 98:143-148.
 35. Hernalsteens, J. P.; Thia-Toong, L.; Schell, J. & Montagu, M. 1984. An Agrobacterium transformed cell culture from the monocot *Asparagus officinalis* L. *EMBO J.* 3(13):3039-3041.
 36. Hollingsworth, W.; Christie, C. Nichols, M. & Behboudian, M. 1999. Detection of variation within asparagus embryogenic calli using RAPD markers. *Acta Hort.* 479:121-127.
 37. Jermyn, W. A. & Cross, R.J. 1997. Action needed on asparagus germplasm conservation: a workshop. . *Proc. IX International Asparagus Symposium. ACTA Horticulturae* 479:65-66.
 38. Jiang, C.; Lewis, M. & Sink, K. 1997. Combined RAPD and RFLP molecular linkage map of asparagus. *Genome.* 40:69-76.
 39. Jullien, M. 1973. Division et croissance *in-vitro* de cellules séparées du parenchme foliaire d' *Asparagus officinalis* L. *L. Z. Pflazenphysiol.* 69:129-141.
 40. Jullien, M. 1974. La culture *in-vitro* de cellules de tissu foliaire d' *Asparagus officinalis* L. Optentions de souches à embryogenèse permanente et régénération de plantes entières. *C. R. Acad. Sci. Série D* 279: 747-750.
 41. Jullien, M.; Rossini, L. & Guern, J. 1980. Quelques aspects de l'induction de la division cellulaire et de la croissance dans les populations de cellules de parenchyme foliaire chez *Asparagus officinalis* L. In: *Application de la culture in-vitro à l'amélioration des plantes potagères*. Réunion Eucarpia, section légumes, Versailles. Edition INRA, Paris. pp.156-165.
 42. Kanno, A. & Kameya, P. 1999. Cloning and variation of ribosomal DNA from *Asparagus officinalis* L. *Acta Hort.* 479:365-372.
 43. Knaflewski, M. 1996. Genealogy of asparagus cultivars. *Proc. VIII International Asparagus Symposium. ACTA Horticulturae* 415:87-91.
 44. Kunitake, H.; Nakashima, T.; Mori, K.; Tanaka,

- M.; Saito, A. & Mii, M. 1996. Production of interspecific somatic hybrid plants between *Asparagus officinalis* and *Asparagus mocawanii* through electrofusion. *Plant Science* 116: 213-222.
45. Lazarte, J. E. & Garrison, S. A. 1980. Sex modification in *Asparagus officinalis* L. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 105:691-694.
46. Ley, J.P.; Monget, M. & Thevenin, L. 1976 L'amélioration de l'asperge (*Asparagus officinalis* L.): application conjointe de méthodes statistiques descriptives et inférentielles a l'utilisation raisonnée des différences de production entre plantes mâles et femelles. *Ann. Amélior. Plantes* 26(4):675-716.
47. López Anido, F. S. y Cointry, E. L. 1993. Estimación de parámetros genéticos para caracteres vegetativos en *Asparagus officinalis* L. *Actas XXIV Congreso Argentino y II Jornadas Argentino-Uruguayas de Genética. Misiones.*
48. Mizonobe, G.; Maeda, T.; Yamaguchi, K.; Harada, T.; Yakura, T. & Iwamura, H. 1991. Studies on flower induction by s-triazine and carbamate in seedlings of *Asparagus officinalis* L. *J. Fac. Agr. Hokkaido Univ.* 64:256-263.
49. Mukhopadhyay, S. and Desjardins, Y. 1994. Direct gene transfer to protoplasts of two genotypes of *Asparagus officinalis* L. by electroporation. *Plant Cell Report.* 13:421-424.
50. Ornstrup, H. 1997. Biotechnological methods in asparagus breeding. *Asparagus Res. Univ. Cal. Davis.* 14: 1-25.
51. Ozaki, Y.; Tashiro, T. & Okubo, H. 1999. Molecular markers linked to the sex determination locus of asparagus. *Acta Hort.* 479:129-134.
52. Peng, M & Wolyn, D. 1999. Development of a microspore culture method to produce haploid and double- haploid asparagus (*Asparagus officinalis* L.) plants. *Acta Hort.* 479: 357-361.
53. Reuther, G. 1977. Adventitious organ formation and somatic embryogenesis in callus of *Asparagus* and *Iris* and it's possible application. *Acta Hort.* 78:217-224.
54. Reuther, G. 1992. *Handbook of Plant Cell Culture. Section IV: Vegetables. Ch. 8: Asparagus.*
55. Robbins, W. W. & Jones, H.A. 1926. Sex as a factor in growing asparagus. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 21:19-23.
56. Roux, L. & Roux, Y. 1981. Identification biochimique de clones et de lignées d'asperge (*Asparagus officinalis* L., Liliacées). *Agronomie* 1:541-548.
57. Roux, L. & Roux, Y. 1983. Identification biochimique de clones et de lignées d'asperge. II Caractères particuliers liés à l'état homozygote ou hétérozygote. *Agronomie* 3(1):57-66.
58. Shigeta, J.; Sato, K.; Tanaka, S.; Nakayama, M. & Mii, M. 1996. Efficient plant regeneration of asparagus by inducing normal root from *in-vitro* multiplied shoot explants using gellan gum and glucose. *Plant Science.* 113:99-104.
59. Sneep, J. 1953. the significance of andromonoecy for the breeding of *Asparagus officinalis* L. *Euphytica.* 2:89-95.
60. Spada, A.; Caporali, E.; Marziani, G.; Portaluppi, P.; Restivo, F. M.; Tassi, F. & Falavigna, A. 1998. A genetic map of *Asparagus officinalis* L. based on integrated RFLP, RAPD and AFLP molecular markers. *Theor. Appl. Genet.* 97:1083-1089.
61. Steward, F. & Mapes, M. 1971. Morphogenesis and plant propagation in aseptic cultures of asparagus. *Bot. Gaz.* 133:70-79.
62. Thevenin, L. 1967. Les problèmes d'amélioration chez *Asparagus officinalis* L. I Biologie et amélioration. *Ann Amélior. Plantes* 17(1):33-66.
63. Torchelli, J. C. 1993. Manual de producción de espárrago. *Diversificación productiva. Serie A N° 1. INTA.*
64. Willmar, C. & Hellendoorn, M. 1968. Growth and morphogenesis of asparagus cells culture *in-vitro*. *Nature.* 217: 369-371.
65. Yang, H. J. & Clore, W. J. 1973. Rapid propagation of asparagus through bud culture. *HortScience.* 8:141-143.
66. Young, R. E. 1937. Yield-growth relationships in asparagus. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 35:576-577.
67. Zhang, C. J., Wang, H.L.; M.A. & Kang, Y. Q. 1994. Regeneration of haploid plants from isolated microspores of asparagus (*Asparagus officinalis* L.). *Plant Cell Rep.* 13:637-640.