

APLICACION DEL CULTIVO 'IN VITRO' AL CLONADO DEL ESPARRAGO

M^a Luisa GÓNZALEZ CASTAÑÓN
Unidad de Horticultura
C.R.I.D.A. 03 - INIA - Zaragoza

1. INTRODUCCION

El espárrago cultivado (*Asparagus Officinalis* L.) es una especie alóga ma, dioica y perenne.

Todo lo anterior origina una gran variabilidad de plantas que da lugar a poblaciones muy heterogéneas, lo que causa grandes variaciones en el rendimiento. Estudios realizados por BANNEROT (1963) muestran que el 10% de los individuos de una parcela son responsables del 20% del rendimiento total de dicha parcela, mientras que otro 25% de la misma sólo producen un 10% del total.

Generalmente las plantas macho son más precoces, productivas y longivas que las plantas hembras (BANNEROT, 1969; LEY et al. 1975).

Un objetivo primordial en la selección de esta especie es la búsqueda de una mayor homogeneidad, así como que el porcentaje de plantas macho sea el más elevado posible.

En la descendencia de una planta hembra cualquiera se encuentra igual proporción de machos que de hembras, y es necesario esperar a la floración para conocer el sexo de una planta, normalmente la floración no tiene lugar hasta un año después de la germinación (THEVENIN, 1967).

Por todo ésto, sería interesante poder multiplicar vegetativamente individuos machos de alto valor agronómico pues tendríamos la posibilidad de crear una plantación homogénea formada totalmente por plantas estaminadas.

La multiplicación vegetativa en condiciones naturales por medio de la división de la garra es muy escasa, a penas se pueden obtener 3-4 individuos por año y garra y para ello ha de comenzarse desde el primer año de vida de la planta (THEVENIN, 1969) y en esta edad, el individuo aún no ha podido manifestar sus cualidades agronómicas. A medida que la planta tiene más edad, la división es más difícil, ya que se perturba el desarrollo de la ^evegetación y se corre el riesgo de perder la planta.

Aunque se ha conseguido enraizar tallos jóvenes procedentes de plántulas mediante el tratamiento con fuertes concentraciones de auxinas y en la oscuridad (GALSTON, 1948), al intentar aplicar estos métodos a plantas adultas, los resultados fueron muy irregulares para poder ser utilizados en la práctica (GORTER, 1965, ANDERSON y ELLISON, 1967). Trabajos realizados por YANG y CLORE, -- (1973) muestran la posibilidad de la formación de garras aéreas en nudos de tallos empleando kinetina y ácido indol acético; también ANYSLEY y MARSTON (1975) han conseguido formación de plantas aéreas sobre los nudos más bajos de los tallos de plantas de 72 semanas empleando métodos mecánicos de ablación de yemas del rizoma. En ambos casos el porcentaje de enraizamiento fué muy escaso, y las plantas sobre las que ocurre muy jóvenes.

En nuestro trabajo de mejora interesa multiplicar individuos adultos -- que son aquellos que ya han podido manifestar sus características de valor agronómico. Esta multiplicación vegetativa de individuos adultos es posible mediante el empleo de técnicas de cultivo 'in vitro' sobre fragmentos de plantas de espárrago. Así, de un individuo se pueden obtener, partiendo de meristemas yemas o esquejes y con un medio adecuado de cultivo, una serie indefinida de individuos idénticos al de partida. Estos clones obtenidos 'in vitro' serán utilizados directamente como planta en el caso de los clones de machos valorados como superproductivos. Si el material clonado son machos y hembras de buena actitud combinatoria para precocidad y productividad, estos clones serán utilizados como parentales para obtención de semillas de híbridos de clones apetecidos.

El cultivo 'in vitro' del espárrago tiene múltiples aplicaciones en --

distintos programas de mejora genética. Muchos autores han trabajado sobre este tema. El material de partida ha sido muy variado según los objetivos que se pretendían de su estudio y podemos dividirlos de la siguiente manera.

- Creación de varibilidad, utilizando cultivo de protoplastos (BUI-DANG-HA, - 1973) o bien cultivo de células (JULLIEN, 1975).
- Obtención de individuos homocigóticos hembras o super-macho (PELLETIER, - 1972; DORE, 1974; FALAVIGNA, 1979).
- Multiplicación vegetativa empleando para ello meristemos, yemas o esquejes. (MURASIGE et al. 1972; YANG y CLORE, 1973; DORE, 1975; MATSUBARA y CLORE, - 1974).
- Obtención de plantas libres de virus mediante cultivo de meristemos (YANG, 1979).

Uno de los problemas de la multiplicación 'in vitro' en el caso del es párrago es la formación de garra o rizoma, ya que sin este órgano el trasplante a tierra resulta muy difícil y las plántulas mueren. Por eso nosotros preferimos trabajar con yemas y esquejes en lugar de meristemos debido a que con estos últimos las plántulas obtenidas no poseen garra (BOURGIN, 1971). Solo utilizaremos meristemos cuando las plantas son muy adultas y en aquellos individuos en los que otras partes vegetativas como yemas o esquejes no tiene éxito el cultivo 'in vitro' ó bien en aquellos casos que nos interese tener unos individuos libres de virus.

Tanto con yemas, como esquejes tomados directamente de plantas, como - de segmentos de tallos obtenidos de meristemos, la obtención de plantas clonadas tiene lugar después de varios cortes en tallos y progresivos trasplantes a medios nuevos y sólo reconocemos como material clonado a aquellos individuos completos, esto es, provistos de al menos, un tallo, una garra y una raíz con raíces secundarias y que se obtienen sin pasar en ningún momento de su desarrollo por un callo, teniendo así la seguridad de que el material obtenido es idéntico

al de partida. El paso por un callo, esto es, el material enraizado obtenido de regeneración de un callo, puede implicar la posibilidad de una mutación, y este posible 'nuevo material' aunque si lo tenemos en cuenta para la realización de trabajos posteriores no forma parte del estudio que nos ocupa.

A continuación exponemos las técnicas y métodos de cultivo empleados sobre distintos tipos de tejidos, estudiando algunos de los factores que influyen en la obtención de plantas enraizadas.

2. MATERIAL Y METODOS

2.1. Material vegetal

Los individuos de los que partimos para tomar las muestras utilizadas en el cultivo 'in vitro' son plantas adultas de más de cinco años de edad - seleccionadas de entre otras muchas sobre las que se han valorado sus características de precocidad y productividad a lo largo de varios años.

Estos individuos seleccionados, colocados en macetas para su mejor control y manejo, están ubicados en invernadero frío.

2.2. Medio de cultivo.

El medio empleado está compuesto por los macroelementos y microelementos de MURASIGUE y SKOOG (1962) al que se han añadido las sustancias orgánicas siguientes:

- Myoinositol, 100 g/l
- Acido nicotínico, 0,7 mg/l
- Piridoxina HCL, 0,5 mg/l
- Sacarosa, 30 g/l
- Agar-Agar, 6g/l

Los reguladores de crecimiento han sido ácido naptaleno acético (ANA) y la 6 furfuril amino purina (Kinetina), según las concentraciones empleadas

podemos distinguir los tres tipos de medio empleados siguientes:

Sustancias de crecimiento	M	E	D	I	O
	A	B	C		
	mg/l	mg/l	mg/l		
ANA	0,4	0,1	-		
KINETINA	0,1	0,1	-		

Todos los demás componentes son comunes a los tres tipos de medios. El pH se ajusta 5,6 antes de añadir el agar-agar con NaCH₁N ó bien ClH₁N y el medio se esteriliza en autoclave a 121°C durante 20 minutos.

2.3. Tipo de tejidos o muestras utilizados

2.3.1. Meristemos

A finales de invierno comienzan a salir los turiones de forma progresiva hasta el verano. Cuando éstos alcanzan una longitud aproximada de 7 cm, y antes de que empiecen a abrirse sus yemas, se extraen los meristemos que permanecen agrupados bajo las escamas ó cládidos a lo largo de todo el turión, siendo más abundantes a medida que nos acercamos al extremo superior. Para realizar esta extracción se desinfecta el turión previamente seccionado, en una solución de hipoclorito cálcico al 4%, se lava dos veces con agua esterilizada en autoclave, y en condiciones asépticas, ayudándonos de una lupa binocular, se van retirando las escamas y se cortan a medida que van apareciendo los meristemos. A menudo, en la disección se toma el meristemo acompañado de algún primordio de flor u hoja. El tamaño medio de estos meristemos es de alrededor de 500 . Los meristemos - una vez cortados, se van colocando sobre medio sólido en caja Petri. De un turión pueden obtenerse hasta 200 meristemos (DORE, 1975).

Las cajas Petri de 10 cm de diámetro contienen aproximadamente 20 ml de medio A y en ellas se siembran alrededor de 30-40 meristemos.

Una vez sembrados, las cajas Petri se cierran con papel de para film y se colocan en una sala de cultivo a temperatura constante de $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$ y con una iluminación durante 16 horas de 1.500 - 2.000 lux medidos a 25 cm, distancia a la que se colocan los cultivos

2.3.2. Yemas laterales

En turiones que ya han alcanzado los 15-20 cm de longitud y en los cuales comienzan a abrirse las yemas laterales, se toma la parte intermedia desechando los 3-4 cm del extremo superior y los 5-7 cm de la base.

La parte del turión utilizable se desinfecta con hipoclorito cálcico del mismo modo que para la extracción de meristemos. Se lava con gua esterilizada y a continuación se extraen las yemas que hay debajo de cada escama, una vez cortadas se colocan en tubos de ensayo de 2,5 mm de diámetro conteniendo 15 ml de medio A y a razón de 3-4 yemas por tubo. Los tubos una vez sembrados se tapan con capuchón de vidrio, se cierran con papel parafilm y se colocan en la sala de cultivo en las condiciones descritas anteriormente.

2.3.3. Segmentos de tallos secundarios con una yema.

En turiones que alcanzan 50-60 cm de longitud en los que se han desarrollado las ramificaciones laterales se toman estas y después de desinfectarlas con hipoclorito cálcico, se van seccionando de forma que cada segmento contenga una yema, en el caso de que la ramificación ya sea muy gruesa el segmento se divide longitudinalmente y se siembra de modo que la sección longitudinal esté en contacto con

el medio de cultivo, quedando la yema en la parte superior.

Estos segmentos de aproximadamente 1 cm de longitud se colocan horizontalmente en tubos de ensayo conteniendo 20 cc de medio A y a razón de 3-4 por tubo, a continuación dichos tubos una vez tapados y cerrados con parafilm se colocan en la sala de cultivo.

2.3.4. Segmentos de tallos de 2º orden.

Llamamos segmentos de 2º orden a aquellos obtenidos de tallos que se desarrollan íntegramente en condiciones de cultivo 'in vitro'.

Tanto meristemas, yemas, como segmentos de tallo con una yema - descritos anteriormente, al cabo de unas semanas dan lugar a uno o más tallos. Estos tallos pueden estar formados por nudos con yemas, nudos con uno o más tallos ó bien nudos con uno o varios fitocladios. Cuando estos tallos alcanzan los 7-10 cm de altura aproximadamente - se trocean en segmentos que comprenden cada uno un nudo y estos pueden ser:

- Segmentos con una yema.
- Segmentos con uno o más tallitos
- Segmentos con fitocladios.

Estos segmentos se siembran en un medio B que se diferencia del anterior en que contiene menos ANA.

2.3.5. Segmentos de 3º orden.

Se llaman segmentos de tercer orden a aquellos que provienen de tallos desarrollados de segmentos de 2º orden, y generalmente son nudos engrosados provistos de tallos y en algunos casos garras y raíces. Estos segmentos se transplantan en medio C desprovisto de sustancias de crecimiento.

3. RESULTADOS Y DISCUSION

3.1. Meristemas

Los meristemas puestos en cultivo al cabo de 1 - 2 semanas comienzan a verdear y van aumentando de tamaño, a las 3-4 semanas se cambian al medio C para que enraicen, observándose que se va alargando el apex y en la base del meristemo comienzan a salir unas raíces gruesas cortas y sin raíces secundarias. Prácticamente el 90% de los meristemas alcanzan este estado, a las 5 - 6 semanas de su transplante. La emisión de tallos se inicia una vez aparecidas las raíces y no ocurre en todos los casos. Estos tallos son débiles. Las plantas así obtenidas carecen de garra y a la hora de su transplante a tierra tuvieron graves problemas de supervivencia. Resultados análogos están descritos por BOURGIN (1971), DORE (1975).

Nosotros sólo esperamos a que se formen los tallos y trabajamos con ellos como segmentos de 2º orden con objeto de obtener las plantas provistas de garras.

3.2. Yemas laterales

De las yemas laterales se obtuvieron al cabo de 4-5 semanas tallos rectos y con pocas ramificaciones que una vez alcanzaron los 7-10 cm de altura se seccionaron en segmentos de 2º orden. La parte de la base se dejó en el medio primitivo continuo produciendo tallos que se fueron seccionando a medida que alcanzaban la altura adecuada, en nuevos segmentos. En muchas de las yemas de origen se formaron callos que se desarrollaron durante algún tiempo y regeneraron tallos en abundancia que posteriormente enraizaron.

Estos tallos regenerados por haberse originado a través de callos no se utilizaron para obtener segmentos de 2º orden, sino que se esperó a su enraizamiento y las plantas así obtenidas se transplantaron a macetas.

3.3. Tallos con una yema.

De la yema de cada segmento se desarrolló al cabo de 1-3 semanas uno ó varios tallos muy rectos con varios nudos, unas veces con yemas y otras con tallos secundarios. Cuando estos tallos alcanzaron los 7-10 cm se seccionaron de modo análogo a los casos anteriores en segmentos de 2º orden.

De las secciones gruesas, que previamente habíamos dividido longitudinalmente, los tallos obtenidos fueron más vigorosos y con menos ramificaciones que los obtenidos de segmentos finos, yemas o meristemas. En los extremos de los segmentos primitivos, sobre todo en el extremo correspondiente a la parte inferior del tallo, se desarrollaron callos que a las 6-8 semanas regeneraron tallos en abundancia. Esta regeneración de tallos continuó durante varios meses y a la vez se fueron formando garras y raíces directamente.

Si el tallo primitivo, después de seccionados sus primeros brotes, se transplanta a un medio nuevo, origina nuevos brotes en el nudo y el desarrollo de los callos en las secciones se estabiliza. Después de algunos cortes de los tallos emitidos por el nudo tiene lugar la emisión de raíces, previa formación de la garra, siempre que después de cada corte de tallos emitidos se cambie de medio.

3.4. Segmentos de 2º orden

Podemos distinguir varios casos a la hora de estudiar los resultados.

Segmentos con una yema. Los segmentos con una yema colocados en medio B, dieron lugar a varios tallos por yema y el número de éstos dependió de dos factores: localización de la yema en el tallo y densidad de muestras por tubo. Cuanto más cerca esté la yema del ápice, más facilidad tiene para producir tallos, así tenemos que dividiendo los tallos que dan origen a los segmentos de 2º orden a la mitad, podemos distinguir tres tipos de yemas: yemas apicales, yemas superiores y yemas inferiores. En el cuadro

1 podemos ver los resultados de cada uno de los tipos a las 4 semanas.

Cuadro 1. N° de tallos obtenidos a las cuatro semanas.

	N° tubos (*)	N° tallos	tallos/yema	N° yemas sin tallo
Yemas apicales	10	247	6,1	9
Yemas superiores	20	427	5,3	8
Yemas inferiores	16	257	4	3

(*) 4 muestras por tubo.

El mayor número de tallos por yema se obtuvo de las apicales, pero también se tuvo el mayor número de yemas que no dieron ningún tallo.

Los tallos más vigorosos pertenecen siempre a las yemas más cercanas a la base del tallo. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por MATSUBARA y CLORE (1973) pero no con los de YANG y CLORE (1973) que obtienen el mayor número de tallos para las yemas situadas en la parte inferior del tallo.

En cuanto a la densidad en muestras por tubo (Cuadro 2) se vió que la mayor densidad favorece la proliferación de un mayor número de tallos por yema, llegándose en nuestro caso a un óptimo de 6 muestras por tubo de 2,5 cm de diámetro conteniendo 20 ml de medio de cultivo.

Cuadro nº 2. Nº de tallos a las 4 semanas de cultivo (densidad)

Nº de yemas (*) por tubo	Nº tubos	Nº tallos/tubo	Nº tallos/yema
1	20	3,1	3,1
2	20	7	3,5
3	20	9,9	3,3
4	20	16,8	4,2
5	18	21	4,2
6	18	28	4,6
7	18	29	4,1
8	16	31	3,8

(*). Todas las yemas pertenecen a la parte inferior del tallo.

Segmentos con un nudo con tallos. En los segmentos de tallo provistos de un nudo con uno o más tallos secundarios, colocados en el medio B y habiéndose, previamente a su colocación, eliminado los ápices de los tallos secundarios, se observó a las pocas semanas un engrosamiento del nudo y a continuación una proliferación de tallos, estos tallos, análogamente a los que provienen de yemas, son más vigorosos si el nudo pertenece a la parte más baja del tallo madre. Después de la salida y corte del 1º tallo se observa en el nudo un engrosamiento que se asemeja a una garra, y a continuación se forman nuevos tallos y en muchos casos a esta emisión de tallos sigue el enraizamiento.

Segmentos con fitocladios. Los segmentos con uno o más fitocladios dieron lugar a un número de tallos y estos siempre fueron muy débiles.

3.5. Segmentos de 3º orden. Obtención de plantas completas.

Segmentos de 3º orden colocados sobre medio de cultivo C que es un medio sin hormonas de crecimiento, han proliferado de la manera siguiente: los segmentos con una yema que provienen de tallos vigorosos sin ramifi-

caciones fueron los que dieron un mayor número de tallos con posterior enraizamiento. De los segmentos con uno o varios tallos por nudo podemos decir que el mayor número de tallos favoreció el enraizamiento y dio lugar a plantas con tallos más vigorosos.

Cuadro 3. Emisión de tallos y enraizamiento en segmentos de 3º orden

Tipos de segmentos	Nº tallos/nudo a las 2 semanas.	% enraizamiento a las 6 semanas
1 yema	3,2	51,0
con 1 tallo	1,5	12,2
Con 2 tallos	1,7	18,9
Con 3 tallos	2,1	32,6
con 4 tallos	3,5	48,5

Todos los tubos contienen 3 muestras.

En los trabajos realizados por YANG y CLORE (1975) los segmentos con nudos con 4 tallos tienen un porcentaje de enraizamiento superior que el de nudos con yemas de tallos sin ramificar. En nuestro caso, este último tipo nos dá un % similar y puede ser una explicación el que solo tomemos las yemas bajas de los tallos sin ramificar que son los que dan los tallos más vigorosos.

En general observamos que el enraizamiento ocurre después de la formación de uno o más tallos cuando el nudo ya está engrosado y ha comenzado a formarse la garra.

En los casos en que el enraizamiento no tuvo lugar después de la emisión de los primeros tallos, se seccionaron éstos y al cabo de 1 ó 2 transplantes se logró enraizar el 80% de los nudos.

Una vez formada la raiz o raices y que estas están provistas de raicillas secundarias se procedió al transplante en macetas con una mezcla de -

tierra, arena y perlita a partes iguales, y se cubrió cada maceta conteniendo una planta con una bolsa de plástico para evitar el desecamiento. Estas plantas, así protegidas, se colocaron durante unas semanas en una cámara con 18 h. de día a 27°C y 6 h. de noche a 18°C.

Las plantas obtenidas son semejantes a las que provienen de germinación de semillas y de un vigor superior que se manifiesta en que tanto tallos como raíces son más recios y abundantes.

Después de 2-4 semanas en cámara cuando las plantas han emitido un tallo nuevo en maceta se les quitó la bolsa y se pasaron a un invernadero - donde siguen produciendo tallos y creciendo normalmente.

CONCLUSIONES.

El clonado de plantas adultas de espárrago es posible utilizando las técnicas de cultivo 'in vitro' .

En nuestras condiciones de cultivo parece deducirse que en la emisión de tallos y posterior enraizamiento influyen:

- Las partes vegetativas utilizadas.
- El número de muestras por tubo (densidad)
- La situación de los nudos en el tallo.
- El número de cortes y trasplantes efectuados.
- El vigor de los tallos empleados.

El mayor número de tallos por nudo se obtuvo de aquellos más cercanos al ápice del tallo de origen y en aquellos tubos en los que la densidad de muestra era mayor. El enraizamiento estuvo favorecido por el mayor número de tallos por nudo y el mayor número de trasplantes a un nuevo medio.

Actualmente contamos con más de 400 individuos clonados utilizando estos métodos y su aspecto es en todo normal y similar a las plantas procedentes de semillas.

BIBLIOGRAFIA

- ANDREASEEN, D.C.; ELLISON, J.H.; 1967. Root initiation of stem cuttings from mature Asparagus plants. Proe. Amer. Soc. Hort. Sci. 90, 159-162
- AYNSLEY, J.J.; Margaret E., MARSTON; 1975. Aerial Plantlet formation in Asparagus officinalis L. Scientia Horticultura, 3. 149-155.
- BANNEROT, H.; 1963. Resultats actuels d'un essai varietal d'Asperge. C.R. Journ. Intern. de l'Asperge, Blois 23-25 mai.
- BANNEROT, H.; DERIEUX, M.; THEVENIN, L.; ARNOUX, J.; 1969. Resultats d'un essai - comparatif de populations d'asperge. Ann. Amelior. Plants. 19 (3), 289-324.
- BUI-DANGHA, D., 1973. Formation de tiges racines, embryoides et plante entières à partir des calcs d'Asperge provemant de protoplastes. Eucarpia, 4^e reunión sur la selección de l'Asperge. Versailles, 155-162.
- BOURGIN, J.O.; MULLER, J.F.; MOREL, G.; 1972. La multiplication vegetative de l'Asperge. 96^e Congr. natio. Soc. savantes. 1971 Toulouse. 4, 107-112.
- DORE, Claire, 1974. Production de plantes homozygotes mâles et femelles à partir d'authères d'Asperge C.R. Anal. Sci. Paris. serie D, 278 2135-2138
- DORE, Claire, 1975. La multiplication clonale de l'Asperge (Asparagus officinalis L.) par culture in vitro: son utilization en selection. Ann. Amelior. - Plantes. 25 (2), 201-204
- FALAVIGNA (1979). Pure lines of Asparagus officinalis L. Obtained by in vitro anther culture in Italy Eucarpia Proceeding of the 5 th International Asparagus - Symposium Geinsenheim R.F. of Germany. 91-99.
- GALSTON, A.W., 1948. On the physiologu of root initiation in excised Asparagus stem tips Amer. J. Bot. 35: 281-287

- JULLIEN, M., 1973. Division et croissance in vitro des celluloses réparées du parenchyme foliaire d'Asparagus officinalis L. Z.Pflanzenphysiol., 69, 129-141
- JULLIEN, M., ROSSINI, L., 1977. L'obtention de cellules séparés à partir du tissu foliaire chez les plantes supérieures; intérêt et potentialités d'une méthode mécanique. Ann. Amélior. Plant., 27, 81-103.
- LEY, J.O.; MONGET, M.; THEVENIN, Lucette, 1976. L'amélioration de l'Asperge (Asparagus officinalis L.). Application conjointe de méthodes statistiques descriptives et inférentielles à l'utilisation raisonnée des différences de production entre plantes mâles et femelles. Ann. Amélior. Plantes. 26 (4) 675-716.
- MATSUBARA, S.; CORE, W.J., 1974. Vegetative propagation of Asparagus from Lateral Buds. Sci. Rep. Fac. Agr. OKOYAMA Univ. (43), 19-26.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F.; 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with Tobacco tissue cultures. Physiol Plant. 15, 473-497.
- MURASHIGE, T.; SHABDE, M.M.; HASEGAWA, P.M.; TAKATORI, F.H.; JONES, J.B.; 1972. Propagation of asparagus through shoot apex culture. I Nutrient medium for formation of plantlets. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 97 (2): 158-161.
- PELLETIER, G., et al. 1972. La culture in vitro d'anthères d'Asperge (Asparagus officinalis L.) C.R. Acad. Sci. Paris, serie D. 274 (6) 848-874.
- THEVENIN, L., 1967 b. Les problèmes d'amélioration chez Asparagus officinalis L. I Biologie et Amélioration. Ann. Amélioration Plantes, 17 (I), 33-36.
- YANG, H.J., CLORE, W.J., 1973. Rapid Vegetative Propagation of Asparagus Through Lateral Bud Culture HortScience, 8 (2); 141-143.
- YANG, H.J., CLORE, W.J., 1973. Induction of Aerial crowns in Asparagus officinalis L. by Kinetin - IAA treatment HortScience 8 (6) 490-491.

YANG, H.J.; CLORE, W.J.; 1975. In vitro Reproductiveness of Asparagus Stem Segments with Branch-Shoot at Node. HortScience 10 (4) 411-412

YANG, H.J., 1979. Mass production of virus free Asparagus officinalis L. Plants by tissue culture Eucarpia Proceedings of the 5th International Asparagus symposium. Geisenheim R.F. of Germany 156-162.