



**U. M. S. N. H.**

PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN  
CIENCIAS BIOLÓGICAS



ÁREA TEMÁTICA: FISIOLOGÍA Y GENÉTICA VEGETAL  
FACULTAD DE AGROBIOLOGÍA "PRESIDENTE JUÁREZ"

TESIS

**REGENERACIÓN *IN VITRO* Y DESCRIPCIÓN  
MORFOLÓGICA DE GENOTIPOS DE FRAMBUESA (*Rubus  
idaeus L.*)**

Que como requisito para obtener el grado de:  
Maestra en Ciencias Biológicas

PRESENTA:

**ING. MONSERRAT ABIGAIL ROSAS ROJAS**

DIRECTORA DE TESIS

**DRA. MA. DEL CARMEN ROCHA GRANADOS**

URUAPAN, MICHOACÁN, MÉXICO. JUNIO DE 2021

## AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi gratitud a la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo y a la Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez”, por ser mi alma mater y fuente de conocimiento para todos los jóvenes que nos hemos forjado y formado en esta institución.

Reconozco también al CONACyT por la beca que me otorgó a través del Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas (PIMCB) para realizar esta investigación.

Agradezco de manera muy particular a la Dra Ma. Del Carmen Rocha Granados por todo su apoyo y su guía, así como todas las facilidades otorgadas para realizar esta investigación, porque gracias a ella hoy puedo culminar este trabajo, también le agradezco por su confianza y apoyo de manera personal.

Mi agradecimiento es también para mis amigos y compañeros de clase: a la M.C. Banca Rojas Sánchez, al Ing. León Gómez Vargas, a Citlali Balvina Velázquez Meraz, a la Biol. Rubí Contreras Bailon, a la Ing. Claudia Isabel López Cornejo, al Ing. Juan Jesús Churape Mendoza quienes fueron para mí no solo mis compañeros en este proceso que caminamos juntos, sino también buenos amigos.

Deseo reconocer también a la Dra. Sofía Jeannette Bayuelos Jimenez, quien tuvo a bien brindarme sus consejos y aportes en lo académico, así como en esta investigación.

Expreso mi agradecimiento a los profesores que guiaron la presente investigación; a la Dra. Patricia Delgado Valerio, a la Dra. Ana Tztzqui Chávez Bárcenas, al Dr. Neftalí Ochoa Alejo y al Dr. Héctor Guillén Andrade, gracias por sus aportes y correcciones.

Por último, quiero manifestar mi agradecimiento a toda la familia Rosas Rojas quienes, sin excepción, son mi soporte y mi motivación para seguir adelante en todos los ámbitos de mi vida, particularmente en el ámbito profesional, gracias por su apoyo y cariño.

## **DEDICATORIA**

Esta investigación está dedicada con todo mi cariño  
a mis padres...



## ÍNDICE

ÍNDICE DE CUADROS.....	III
ÍNDICE DE FIGURAS.....	V
ÍNDICE DE CUADROS DEL APÉNDICE.....	IX
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	3
I INTRODUCCIÓN.....	4
II REVISIÓN DE LITERATURA.....	6
2.1 Origen y clasificación taxonómica de la frambuesa.....	6
2.2 Importancia del cultivo.....	7
2.3 Morfología.....	7
2.4 Variedades.....	8
2.4.1 Variedades remontantes .....	8
2.4.2 Variedades no remontantes.....	9
2.5 Mejoramiento genético por métodos convencionales.....	9
2.6 Biotecnología vegetal.....	10
2.6.1 Cultivo de tejidos vegetales.....	11
2.6.1.1 Tipos de cultivo <i>in vitro</i> .....	11
2.7 Medios de cultivo.....	12
2.8 Reguladores de crecimiento.....	13
2.8.1 Auxinas.....	13
2.8.2 Citocininas.....	14
2.9 Organogénesis.....	15
2.9.1 Organogénesis indirecta.....	15
2.9.2 Organogénesis directa.....	16
2.9.2.1 Factores que limitan la regeneración.....	16
2.10 Caracterización morfológica de plantas.....	18
III HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	19
3.1 Hipótesis.....	19
3.2 Objetivo general.....	19
3.2.1 Objetivos específicos.....	19
IV MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
4.1 Localización del sitio experimental.....	20
4.2 Material vegetal.....	20
4.3 Medio de cultivo y reguladores de crecimiento.....	20
4.4 Regeneración de segmentos de hojas.....	20
4.5 Descripción morfológica de las selecciones.....	23
4.6 Diseño experimental.....	23
4.7 Variables a evaluar.....	23
V RESULTADOS.....	24
5.1 Efecto de auxinas y citocininas sobre la oxidación de los explantes...	24
5.2 Efecto de auxinas y citocininas sobre regeneración de explantes de hojas.....	30

5.3	Efecto de auxinas y citocininas sobre la multiplicación de brotes ....	36
5.4	Descripción morfológica.....	44
VI	DISCUSIÓN.....	50
VII	CONCLUSIONES.....	58
VIII	LITERATURA CITADA.....	60
IX	APÉNDICE.....	76

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Combinaciones de reguladores de crecimiento vegetal utilizados para inducir la regeneración de segmentos de hojas de cinco genotipos de frambuesa.	22
2	Sensibilidad de los explantes de frambuesa a la oxidación genotipos: 'C-6', 'Joan J.', 'UMC-702', 'A-1' y 'Her', cultivados <i>in vitro</i> y tratados con auxinas y citocininas.	24
3	Comparación de los valores medios y prueba de Duncan de la oxidación de explantes de hoja de frambuesa genotipos 'C-6', 'Joan J.', 'A-1', 'UMC-702' y 'Her' cultivados <i>in vitro</i> y tratados con reguladores de crecimiento (BAP, CIN y TDZ) solas o en interacción con AIB.	25
4	Comparación de los porcentajes y significancia en la prueba de Duncan de la regeneración de brotes a partir de explantes de hojas frambuesa genotipos 'C-6', 'Joan J.', 'UMC-702', 'A-1' y 'Her', cultivados <i>in vitro</i> tratados con reguladores de crecimiento (BAP, CIN y TDZ) solos o en interacción con AIB.	30
5	Comparación de porcentajes y significancia de la prueba de Duncan de la regeneración de brotes a partir de explantes de hoja de frambuesa genotipos 'C-6', 'Joan J.', 'UMC-702', 'A-1' y 'Her', cultivados <i>in vitro</i> tratados con reguladores de crecimiento (BAP, CIN y TDZ) solas o en interacción con AIB.	31
6	Efecto de auxinas y citocininas sobre la multiplicación de brotes de frambuesa genotipos: 'C-6', 'Joan J.', 'UMC-702', 'A-1' y 'Her', cultivados <i>in vitro</i> .	36
7	Comparación del coeficiente de multiplicación y de los resultados de la prueba de Duncan para brotes obtenidos a partir de explantes de hojas de frambuesa genotipos: 'C-6', 'Joan J.', 'UMC-702', 'A-1' y	

'Her', cultivados *in vitro* tratados con reguladores de crecimiento 37  
(BAP, CIN y TDZ) solas o en interacción con AIB.

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Brotos de frambuesa genotipo ‘C-6’ obtenidos <i>in vitro</i> a partir de yemas axilares. A) proliferación en medio de cultivo MS suplementado con 1 mg L <sup>-1</sup> de BAP, B) elongación de los brotes en medio de cultivo MS básico.	21
2	Porcentaje de oxidación de explantes de frambuesa genotipo ‘C-6’ cultivados <i>in vitro</i> tratados con BAP, CIN y TDZ solas o en combinación con AIB evaluadas a los 40 días después de su establecimiento.	26
3	Porcentaje de oxidación de explantes de frambuesa genotipo ‘Joan J.’ cultivados <i>in vitro</i> tratados con BAP, CIN y TDZ solas o en combinación con AIB evaluadas a los 40 días después de su establecimiento.	27
4	Porcentaje de oxidación de explantes de frambuesa genotipo ‘A-1’ cultivados <i>in vitro</i> tratados con BAP, CIN y TDZ solas o en combinación con AIB evaluadas a los 40 días después de su establecimiento.	28
5	Porcentaje de oxidación de explantes de frambuesa genotipo ‘UMC-702’ cultivados <i>in vitro</i> tratados con BAP, CIN y TDZ solas o en combinación con AIB evaluadas a los 40 días después de su establecimiento.	29
6	Porcentaje de oxidación de explantes de frambuesa genotipo ‘Her’ cultivados <i>in vitro</i> tratados con BAP, CIN y TDZ solas o en combinación con AIB evaluadas a los 40 días después de su establecimiento.	29
7	Porcentaje de explantes con brotes de frambuesa genotipo ‘C-6’ cultivados <i>in vitro</i> tratados con BAP, CIN y TDZ solas o en combinación con AIB, evaluadas a los 40 días después de su	

	establecimiento.	32
8	Porcentaje de explantes con brotes de frambuesa genotipo ‘Joan J.’ cultivados <i>in vitro</i> tratados con BAP, CIN y TDZ solas o en combinación con AIB, evaluadas a los 40 días después de su establecimiento.	33
9	Porcentaje de explantes con brotes de frambuesa genotipo ‘A-1’ cultivados <i>in vitro</i> tratados con BAP, CIN y TDZ solas o en combinación con AIB, evaluadas a los 40 días después de su establecimiento.	34
10	Porcentaje de explantes con brotes de frambuesa selección ‘UMC-702’ cultivados <i>in vitro</i> tratados con BAP, CIN y TDZ solas o en combinación con AIB, evaluadas a los 40 días después de su establecimiento.	34
11	Porcentaje de explantes con brotes de frambuesa genotipo ‘Her’ cultivados <i>in vitro</i> tratados con BAP, CIN y TDZ solas o en combinación con AIB, evaluadas a los 40 días después de su establecimiento.	35
12	Coefficiente de multiplicación de brotes a partir de explantes de frambuesa genotipo ‘C-6’, cultivados <i>in vitro</i> tratados con BAP, CIN y TDZ solas o en combinación con AIB, evaluadas a los 40 días de su establecimiento,	38
13	Proceso de regeneración <i>in vitro</i> de frambuesa genotipo ‘C-6’. A) plantas madres para la extracción del material vegetal, B) explantes foliares en medio MS más AIB y BAP, C) brotes nuevos y explantes oxidados, D) plantas regeneradas.	39
14	Coefficiente de multiplicación de brotes a partir de explantes de frambuesa genotipo ‘Joan J.’ cultivados <i>in vitro</i> tratados con BAP, CIN y TDZ solas o en combinación con AIB, evaluadas a los 40 días de su establecimiento.	39
15	Explantes de frambuesa genotipo ‘Joan J.’ con brotes adventicios. A) explantes tratados con 0.2 mg L <sup>-1</sup> de TDZ + 0.1 mg L <sup>-1</sup> de AIB, B)	

	explantes tratados con 0.6 mg L <sup>-1</sup> de TDZ + 0.1 mg L <sup>-1</sup> de AIB, C) formación de brotes en la parte abaxial del explante, D) planta regenerada.	40
16	Coeficiente de multiplicación de brotes a partir de explantes de frambuesa genotipo ‘A-1’ cultivados <i>in vitro</i> tratados con BAP, CIN y TDZ solas o en combinación con AIB, evaluadas a los 40 días de su establecimiento.	41
17	Regeneración de frambuesa genotipo ‘A-1’. A) establecimiento de los explantes, B) brotes adventicios inducidos con TDZ 0.2 mg L <sup>-1</sup> , C) brotes adventicios inducidos con TDZ 0.6 mg L <sup>-1</sup> .	41
18	Coeficiente de multiplicación de brotes a partir de explantes de frambuesa genotipo ‘UMC-702’ cultivados <i>in vitro</i> tratados con BAP, CIN y TDZ solas o en combinación con AIB, evaluadas a los 40 días de su establecimiento.	42
19	Explantes de frambuesa genotipo ‘UMC-702’ tratados con CIN, con formación de raíces adventicias a los 15 días después de su establecimiento.	42
20	Formación y desarrollo de brotes adventicios de frambuesa genotipo ‘UMC-702’ tratados con TDZ (A-E).	42
21	Coeficiente de multiplicación de brotes a partir de explantes de frambuesa genotipo ‘Her’ cultivados <i>in vitro</i> tratados con BAP, CIN y TDZ solas o en combinación con AIB, evaluadas a los 40 días de su establecimiento.	43
22	Formación de brotes adventicios de frambuesa genotipo ‘Her’ cultivados <i>in vitro</i> tratados con TDZ (A-C).	43
23	Características principales de una planta de frambuesa genotipo ‘UMC-702’. A) densidad y color de espinas (marrón violáceo), B) hoja completa, muestra color del haz (5Ey 5/10), C) hoja completa, muestra color del envés (7, 5Ey 7/4), y D) densidad de espinas en el peciolo.	46
24	Características principales de una planta de frambuesa genotipo ‘C-	

6'. A) densidad y color de espinas, muestra color verde y densidad de espinas baja, B) hoja completa, muestra color del haz 5GY 5/6 y forma de la hoja palmeada, C) hoja completa, muestra color del envés 2.5 GY 6/2, y D) densidad de espinas del peciolo.

49

## ÍNDICE DE CUADROS DEL APÉNDICE

Cuadro		Página
1A	Composición del medio de cultivo MS y preparación a partir de soluciones “stock” concentradas.	76
2A	Análisis de varianza para la variable oxidación de explantes de hojas de frambuesa genotipo ‘C-6’ <i>in vitro</i> , en medio de cultivo adicionado con BAP, CIN (0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 y 3 mg L <sup>-1</sup> ) y TDZ (0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 mg L <sup>-1</sup> ) solas o combinadas con AIB (0 y 0.5 mg L <sup>-1</sup> ) evaluados a los 40 días de su establecimiento.	77
3A	Análisis de varianza para la variable oxidación de explantes de hojas de frambuesa genotipo ‘Joan J.’ <i>in vitro</i> , en medio de cultivo adicionado con BAP, CIN (0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 y 3 mg L <sup>-1</sup> ) y TDZ (0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 mg L <sup>-1</sup> ) solas o combinadas con AIB (0 y 0.5 mg L <sup>-1</sup> ) evaluados a los 40 días de su establecimiento.	77
4A	Análisis de varianza para la variable oxidación de explantes de hojas de frambuesa genotipo ‘A-1’ <i>in vitro</i> , en medio de cultivo adicionado con BAP, CIN (0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 y 3 mg L <sup>-1</sup> ) y TDZ (0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 mg L <sup>-1</sup> ) solas o combinadas con AIB (0 y 0.5 mg L <sup>-1</sup> ) evaluados a los 40 días de su establecimiento.	77
5A	Análisis de varianza para la variable oxidación de explantes de hojas de frambuesa genotipo ‘UMC-702’ <i>in vitro</i> , en medio de cultivo adicionado con BAP, CIN (0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 y 3 mg L <sup>-1</sup> ) y TDZ (0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 mg L <sup>-1</sup> ) solas o combinadas con AIB (0 y 0.5 mg L <sup>-1</sup> ) evaluados a los 40 días de su establecimiento.	78
6A	Análisis de varianza para la variable oxidación de explantes de hojas de frambuesa genotipo ‘Her’ <i>in vitro</i> , en medio de cultivo adicionado con BAP, CIN (0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 y 3 mg L <sup>-1</sup> ) y TDZ (0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 mg L <sup>-1</sup> ) solas o combinadas con AIB (0 y 0.5 mg L <sup>-1</sup> ) evaluados a los 40 días de su establecimiento.	78
7A	Análisis de varianza para la variable explantes con brotes de hojas de	

- frambuesa genotipo 'C-6' *in vitro*, en medio de cultivo adicionado con BAP, CIN (0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 y 3 mg L<sup>-1</sup>) y TDZ (0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 mg L<sup>-1</sup>) solas o combinadas con AIB (0 y 0.5 mg L<sup>-1</sup>) evaluados a los 40 días de su establecimiento. 78
- 8A Análisis de varianza para la variable explantes con brotes de hojas de frambuesa genotipo 'Joan J.' *in vitro*, en medio de cultivo adicionado con BAP, CIN (0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 y 3 mg L<sup>-1</sup>) y TDZ (0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 mg L<sup>-1</sup>) solas o combinadas con AIB (0 y 0.5 mg L<sup>-1</sup>) evaluados a los 40 días de su establecimiento. 79
- 9A Análisis de varianza para la variable explantes con brotes de hojas de frambuesa genotipo 'A-1' *in vitro*, en medio de cultivo adicionado con BAP, CIN (0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 y 3 mg L<sup>-1</sup>) y TDZ (0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 mg L<sup>-1</sup>) solas o combinadas con AIB (0 y 0.5 mg L<sup>-1</sup>) evaluados a los 40 días de su establecimiento. 79
- 10A Análisis de varianza para la variable explantes con brotes de hojas de frambuesa genotipo 'UMC-702' *in vitro*, en medio de cultivo adicionado con BAP, CIN (0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 y 3 mg L<sup>-1</sup>) y TDZ (0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 mg L<sup>-1</sup>) solas o combinadas con AIB (0 y 0.5 mg L<sup>-1</sup>) evaluados a los 40 días de su establecimiento. 79
- 11A Análisis de varianza para la variable explantes con brotes de hojas de frambuesa genotipo 'Her' *in vitro*, en medio de cultivo adicionado con BAP, CIN (0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 y 3 mg L<sup>-1</sup>) y TDZ (0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 mg L<sup>-1</sup>) solas o combinadas con AIB (0 y 0.5 mg L<sup>-1</sup>) evaluados a los 40 días de su establecimiento. 80
- 12A Análisis de varianza para la variable coeficiente de multiplicación de explantes de hojas de frambuesa genotipo 'C-6' *in vitro*, en medio de cultivo adicionado con BAP, CIN (0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 y 3 mg L<sup>-1</sup>) y TDZ (0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 mg L<sup>-1</sup>) solas o combinadas con AIB (0 y 0.5 mg L<sup>-1</sup>) evaluados a los 40 días de su establecimiento. 80
- 13A Análisis de varianza para la variable coeficiente de multiplicación de explantes de hojas de frambuesa genotipo 'Joan J.' *in vitro*, en medio

- de cultivo adicionado con BAP, CIN (0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 y 3 mg L<sup>-1</sup>) y TDZ (0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 mg L<sup>-1</sup>) solas o combinadas con AIB (0 y 0.5 mg L<sup>-1</sup>) evaluados a los 40 días de su establecimiento. 80
- 14A Análisis de varianza para la variable coeficiente de multiplicación de explantes de hojas de frambuesa genotipo ‘A-1’ *in vitro*, en medio de cultivo adicionado con BAP, CIN (0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 y 3 mg L<sup>-1</sup>) y TDZ (0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 mg L<sup>-1</sup>) solas o combinadas con AIB (0 y 0.5 mg L<sup>-1</sup>) evaluados a los 40 días de su establecimiento. 81
- 15A Análisis de varianza para la variable coeficiente de multiplicación de explantes de hojas de frambuesa genotipo ‘UMC-702’ *in vitro*, en medio de cultivo adicionado con BAP, CIN (0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 y 3 mg L<sup>-1</sup>) y TDZ (0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 mg L<sup>-1</sup>) solas o combinadas con AIB (0 y 0.5 mg L<sup>-1</sup>) evaluadas a los 40 días de su establecimiento. 81
- 16A Análisis de varianza para la variable coeficiente de multiplicación de explantes de hojas de frambuesa genotipo ‘Her’ *in vitro*, en medio de cultivo adicionado con BAP, CIN (0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 y 3 mg L<sup>-1</sup>) y TDZ (0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 mg L<sup>-1</sup>) solas o combinadas con AIB (0 y 0.5 mg L<sup>-1</sup>) evaluados a los 40 días de su establecimiento. 81



## RESUMEN

La frambuesa se consume en fresco o industrializada, contiene polifenoles y antocianinas con beneficios para la salud. A nivel mundial, México aporta 15 % de la producción, pero en el país no hay variedades propias que satisfagan los requerimientos climáticos de la región productora en el estado de Michoacán, y es necesario generar variedades que se adapten a éstas; por lo cual se puede recurrir a la aplicación de técnicas biotecnológicas como la organogénesis, que son útiles en los procesos de mejoramiento genético. Las auxinas y las citocininas son reguladores de crecimiento de gran importancia en este proceso, pues antes de utilizar cualquier método biotecnológico de mejoramiento es necesario contar con un protocolo eficiente de regeneración. El objetivo de esta investigación fue obtener información sobre la regeneración *in vitro* y las características morfológicas de genotipos de frambuesa (*Rubus idaeus* L.). Para esto se utilizaron diferentes dosis y combinaciones de reguladores de crecimiento para inducir organogénesis directa a partir de explantes foliares en cinco genotipos de frambuesa; 'C-6', 'Joan J.', 'A-1', 'UMC-702' y 'Her'. De acuerdo a los resultados obtenidos, se determinó que el regulador BAP disminuyó la oxidación de los explantes en los genotipos 'C-6', 'Joan J.', 'A-1' y 'Her' en 36, 48, 60 y 68 % respectivamente con referencia en el tratamiento testigo; la CIN disminuyó la oxidación en los genotipos 'C-6' (56 %) y 'Joan J.' (28 %) mientras que TDZ tuvo efecto en la disminución de la oxidación de los cinco genotipos evaluados (72, 64, 72, 84 y 68 % respectivamente con referencia en el tratamiento testigo). Los genotipos evaluados respondieron de manera distinta a la estimulación de la organogénesis con los diferentes reguladores de crecimiento; la inducción de la regeneración fue eficiente con el uso de TDZ en los cinco genotipos evaluados, así como en la multiplicación de los brotes. Por lo tanto, el protocolo de regeneración que se propone debe adicionar los reguladores de crecimiento BAP (0.5, 3 mg L<sup>-1</sup> + 0.1 mg L<sup>-1</sup> de AIB ó 2 mg L<sup>-1</sup> + 0.1 mg L<sup>-1</sup> de AIB) para el genotipo 'C-6' y TDZ 0.2, 0.4, 0.6 y 0.2 mg L<sup>-1</sup> + 0.1 mg L<sup>-1</sup> de AIB. En el genotipo 'Joan J.' el regulador TDZ en dosis de 0.2, 0.4 y 0.4, 0.6 mg L<sup>-1</sup> + 0.1 mg L<sup>-1</sup> de AIB. En el genotipo 'A-1' se sugiere el uso de TDZ en dosis de 0.2. en el genotipo 'UMC-702' se sugiere el uso de TDZ en dosis de 0.2 mg L<sup>-1</sup> + 0.1 mg L<sup>-1</sup> de AIB, mientras que para el genotipo 'Her' se sugiere el uso de TDZ en dosis de 0.2, 0.6, 0.8 y 0.2, 0.4 mg L<sup>-1</sup> + 0.1 mg L<sup>-1</sup> de AIB. Las diferencias morfológicas analizadas en las selecciones 'UMC-702' y

'C-6' dan pauta para proponerlas como candidatas para un programa de mejoramiento genético exitoso mediante el uso de agentes generadores de poliploidia.

**Palabras clave:** Organogénesis, hormonas vegetales, *Rubus idaeus* L.

## ABSTRACT

Raspberry is consumed fresh or industrialized, it contains polyphenols and anthocyanins with health benefits. Worldwide, Mexico contributes 15% of production, but in the country there are no varieties of its own that satisfy the climatic requirements of the producing region in the state of Michoacán, and it is necessary to generate varieties that adapt to them; the application of biotechnological techniques such as organogenesis are useful genetic improvement techniques. Auxins and cytokinins are very important growth regulators in this process, since before using any biotechnological breeding method it is necessary to have an efficient regeneration protocol. In this study, different doses and combinations of growth regulators were used to induce direct organogenesis from foliar explants on five raspberry genotypes; 'C-6', 'Joan J.', 'A-1', 'UMC-702' and 'Her'. According to the results obtained, it was determined that the BAP regulator decreased the oxidation of the explants in the genotypes 'C-6', 'Joan J.', 'A-1' and 'Her' in 36, 48, 60 and 68% respectively with reference to the control treatment; CIN decreased oxidation in genotypes 'C-6' (56%) and 'Joan J.' (28%) while TDZ had an effect on reducing oxidation of the five genotypes evaluated (72, 64, 72, 84 and 68% respectively with reference to the control treatment). The genotypes evaluated responded differently to the stimulation of organogenesis with the different growth regulators; the induction of regeneration was efficient with the use of TDZ in the five genotypes evaluated, as well as in the multiplication of the shoots. Therefore, the proposed regeneration protocol must add BAP growth regulators (0.5, 3 mg L<sup>-1</sup> + 0.1 mg L<sup>-1</sup> of AIB or 2 mg L<sup>-1</sup> + 0.1 mg L<sup>-1</sup> of AIB) to the 'C-6' genotype and TDZ 0.2, 0.4, 0.6 and 0.2 mg L<sup>-1</sup> + 0.1 mg L<sup>-1</sup> of IBA for the 'C-6' genotype. In the 'Joan J.' genotype, the TDZ regulator in doses of 0.2, 0.4 and 0.4, 0.6 mg L<sup>-1</sup> + 0.1 mg L<sup>-1</sup> of AIB. In the 'A-1' genotype, the use of TDZ at a dose of 0.2 is suggested. In the 'UMC-702' genotype the use of TDZ in doses of 0.2 mg L<sup>-1</sup> + 0.1 mg L<sup>-1</sup> of AIB is suggested, while for the 'Her' genotype the use of TDZ in doses of 0.2 is suggested, 0.6, 0.8 and 0.2, 0.4 mg L<sup>-1</sup> + 0.1 mg L<sup>-1</sup> of IBA. The morphological differences analyzed in the selections 'UMC-702' and 'C-6' provide guidelines for proposing them as candidates for a successful genetic improvement program using any compound that induce polyploidia.

**Keywords:** Organogenesis, plants hormones, *Rubus idaeus* L.

## I. INTRODUCCIÓN

La frambuesa se utiliza para consumo humano en fresco y en forma de conservas caseras e industriales, y en la elaboración de aromatizantes y jarabes (SIAP, 2016). Contienen una cantidad significativa de polifenoles y antocianinas (Eyduran *et al.*, 2008) que ejercen efectos terapéuticos y benéficos relacionados a su actividad antioxidante; adicionalmente, tienen efectos anticancerígenos, antitumorales, antiinflamatorios y antidiabéticos, mejoran la agudeza visual y el comportamiento cognitivo (Astrid, 2008). Además de su actividad antioxidante, los compuestos bioactivos muestran un potencial quimiopreventivo en el cáncer de mama (Blassan y Abrahamse, 2019).

México es el quinto productor mundial de frambuesa (*Rubus idaeus* L.); en el año 2019 se produjeron 128, 848 toneladas, con un valor de 5,154 millones de dólares por su venta en el exterior; Michoacán aportó 25,988 toneladas a la producción y se ubicó como el segundo estado productor de esta frutilla (SIAP, 2019). Sin embargo, las variedades que se establecen en México dependen básicamente de las empresas exportadoras con las que trabajan los productores, ya que en muchos casos éstas proveen las plantas (Bascopé, 2013), lo que repercute en el pago de regalías por parte de los productores, o bien son variedades generadas en otros países, por lo cual no cumplen con las características agronómicas adecuadas para crecer óptimamente en las diferentes condiciones ambientales de nuestro país (Granados, 2017). Dentro de las variedades con más éxito están la ‘Heritage’, ‘Maling’, ‘Exploid’, ‘Adelita’, ‘Autum Bliss’, ‘Primavera’ y ‘Blazer’ (Bascopé, 2013).

La organogénesis es un proceso fundamental en las técnicas de mejoramiento genético *in vitro*, dentro del cual se incluye el uso de las auxinas, las citocininas y las giberelinas, ya que son de gran importancia en este proceso. El tipo y la concentración de los fitorreguladores a utilizar van a depender principalmente de la especie, el tejido u órgano, y del objetivo principal del experimento (Adobkar *et al.*, 2012). La regeneración *in vitro*, a partir de explantes de hoja, se ha logrado en frambuesa roja (*Rubus idaeus*) var. ‘Josephine’ con combinaciones de los reguladores del crecimiento benciladenina (BA) o bencilaminopurina (BAP) y ácido indolbutírico (AIB) (Granados, 2017), así como con la adición de thidiazuron (TDZ) (Turk *et al.*, 1994). También se han utilizado yemas axilares, meristemas nodales, segmentos de hoja (Aliona *et al.*, 2009; Allcaco, 2016) y segmentos apicales (Jadán *et al.*, 2015) para inducir la regeneración exitosa en genotipos de frambuesa

en tratamiento con ácido indolbutírico (AIB), y BAP, giberelinas (AGs) y thidiazuron (TDZ), respectivamente. El uso de la técnica de organogénesis directa ha resultado exitosa en otras especies de frutales como fresa (*Fragaria x ananassa*), arándano (Cappelletti *et al.*, 2016), zarzamora (*Rubus* sp.) (Gupta y Mahalaxmi, 2009), manzana (*Malus domestica*) y pera (*Pyrus communis*) (Vujovic *et al.*, 2014), entre otras.

Las herramientas biotecnológicas como la regeneración *in vitro*, vía organogénesis directa, pueden contribuir al desarrollo de variedades mexicanas de frambuesa que muestren resistencia a factores bióticos y abióticos, adaptadas a las distintas condiciones ambientales presentes en el país y con características agronómicas sobresalientes. Actualmente, el Laboratorio de Fisiología Vegetal de la Facultad de Agrobiología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, cuenta con genotipos avanzados de frambuesa generados mediante mejoramiento genético tradicional y varios materiales de libre uso que pueden ser utilizados para inducir variación, nuevos cultivares y disminuir el tiempo de mejoramiento.

De acuerdo a las condiciones indicadas anteriormente se plantea la necesidad de generar variedades con características que sean propias para cada región; para lo cual, se hace necesario desarrollar los protocolos de regeneración *in vitro* de cada uno de los genotipos que se deseen mejorar, ya que para generar variantes genéticas útiles mediante los métodos alternativos (Gutiérrez *et al.*, 2003), como son la aplicación de diferentes técnicas biotecnológicas y el cultivo de tejidos vegetales (Kessel, 2012), se debe contar con dichos protocolos.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 Origen y clasificación taxonómica

El centro de origen de la frambuesa se encuentra en el monte Ida de la isla de Creta (Grecia), por lo cual Linneo denominó a la especie como *idaeus* (García *et al.*, 2009); aunque, el Sureste chino también se ha considerado como uno de los posibles centros de origen para el género *Rubus* debido a la proporción de especies encontradas, número de subgéneros y variación morfológica presente (Alice y Campbell, 1999). El género *Rubus* se concentra en dos secciones principales, el diploide *Idaeobatus* y el poliploide *Malachobatus* (Wang *et al.*, 2019). Por otra parte, Linnaei, (1753) reportó los hábitats de *Rubus folii* y *Rubus idaeus* en Europa y Canadá.

La clasificación taxonómica de la frambuesa es la siguiente:

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Rosales

Familia: Rosaceae

Género: *Rubus*

Especie: *R. idaeus* L.

Nombre común: Frambuesa (SIB, 2019)

Las frambuesas, moras y las bayas pertenecen al género *Rubus* de la familia Rosaceae. El género se compone de cerca de 700 especies con un número de cromosomas  $x=7$  (Meng y Finn, 2002). Hummer y Alice (2016) observaron genomas en el género *Rubus* que iban desde diploides (*R. crataegifolius* y *R. macilentus*) del subgénero *Idaeobatus*, hasta dodecaploides (*R. ursinos*).

## 2.2 Importancia del cultivo

Estados Unidos de Norteamérica es el principal país importador de la frambuesa que se produce en México; sin embargo, países como Canadá, Alemania, Reino Unido y Francia son países que importan un gran volumen de frambuesa en el mundo, con los cuales México podría incrementar el flujo comercial (SIAP, 2017). La importancia de la demanda de esta frutilla radica en los efectos terapéuticos y benéficos (nutracéuticos) que ejercen en la salud humana (Astrid, 2008) debidos a la presencia de polifenoles y antocianinas en los frutos (Eyduran *et al.*, 2008). La superficie plantada en México asciende a 7,028 h, con un volumen de producción de 128,848 ton, y un valor de 5,154 millones de pesos. El estado de Michoacán aportó 25,988 t de la producción total. El periodo de mayor producción en México abarca los meses de octubre-enero en el cual el fruto alcanza los precios más elevados debido a la escasez de oferta (SIAP, 2019; Bascopé, 2013).

## 2.3 Morfología

Las plantas de frambuesa son perennes, bianuales, con ramas más o menos vigorosas que pueden o no estar cubiertas de espinas. Los brotes reciben diferentes nombres según sea su etapa de crecimiento, primero o segundo año, y se diferencian en dos tipos:

- Primocañas: corresponden a los brotes crecidos en el primer año y comúnmente se les llama hijuelos o retoños.
- Floricañas: éstos corresponden a los tallos lignificados en el segundo año y reciben el nombre de cañas, y están activos durante toda la temporada. Los cultivares remontantes y no remontantes producen fruto sobre ellos (García *et al.*, 2014).

Las flores tienen cinco pétalos, cinco sépalos, un hipantio muy corto, muchos estambres y un gineceo de muchos carpelos en un receptáculo con forma de cono. Al madurar los ovarios se convierten en drupelas, y los frutos agregados se conforman de drupelas unidas entre sí por pelos casi invisibles (Pritts, 2008; Graham y Brennan, 2018).

## 2.4 Variedades

Las variedades de frambuesa se clasifican según su origen, color o época de reproducción; sin embargo, para su identificación se consideran su color o época de reproducción (Morales, 2009).

De acuerdo a la época de reproducción, se pueden clasificar en variedades remontantes y no remontantes:

Variedades remontantes: son las que florecen en cañas y en retoños en la misma temporada.

Variedades no remontantes: solo producen primordios florales en cañas y presentan una cosecha en la temporada (Morales *et al.*, 2017).

### 2.4.1 Variedades remontantes

*Heritage* [(Milton x Cuthbert) x Durham] 1969. De New York. Presenta una maduración tardía. El fruto es de tamaño mediano, de buen color, sabor, firmeza y calidad de congelación. Sus bastones son altos y resistentes, tiene espinas prominentes y un rendimiento alto. Resistente a la mayoría de las enfermedades, pero susceptible a la roya tardía de la hoja (Bushway *et al.*, 2008).

*Adelita*. Variedad obtenida por Planasa (Plantas de Navarra S.A.). Las cañas son de porte medio, pero resistentes para soportar el peso de la fruta. Tienen un buen potencial productivo. El fruto es grande, de color atractivo, homogéneo y buen sabor. Posee una gran consistencia, lo que proporciona una buena vida postcosecha (García *et al.*, 2014).

*Joan J*. Variedad desarrollada en Escocia. Presenta maduración temprana de los frutos y periodo largo de fructificación. Tiene brotes sin espinas, pero frágiles, por lo cual necesita soporte. Los frutos son de color rojo, grandes, de sabor agrídulce a dulce y aroma bien pronunciado, es resistente a la sequía y a altas temperaturas (García *et al.*, 2014).

*Caroline*. [(Autum Bliss x Glen Moy) x Heritage] 1999. Posee frutos largos, de color rojo, firmes y de buen sabor. La cosecha es larga en la temporada, es dos semanas más tempranas que Heritage.

Los genotipos C-6 y UMC-702, son genotipos avanzados obtenidos a partir de un proceso de cruce y selección de un programa de mejoramiento genético en la Facultad de Agrobiología a cargo del Dr. José López Medina. Proviene de progenitores desconocidos; sin embargo, presentan características sobresalientes que las hacen destacar entre otros genotipos. El genotipo C-6 se caracteriza por poseer tallos vigorosos y frutos de gran tamaño y sabor.

#### **2.4.2 Variedades no remontantes**

Estas variedades se caracterizan por desarrollar la producción en los primordios florales de las cañas al año siguiente de su aparición y presentan solo una cosecha en la temporada (Morales, 2009). Algunas variedades que corresponden a esta clasificación son:

*Glen Lyon*. Posee un fruto redondeado, de tamaño medio, tiene buena vida post - cosecha; sin embargo, dejó de cultivarse por su sensibilidad a enfermedades fúngicas del fruto (García *et al.*, 2014).

*Meeker*. Planta vigorosa, presenta maduración de media a temprana, con cañas largas y abundantes espinas; poco sensible a enfermedades; el fruto es de tamaño medio, color rojo intenso y de buen sabor (Undurraga y Vargas, 2013).

Otras variedades que pertenecen a las variedades de frambuesa no remontantes son las siguientes: Glen Clova, Gradina, Mallin Exploit, Mallin Promise, Schoenemann, entre otras (García *et al.*, 2014).

#### **2.5 Mejoramiento genético por métodos convencionales**

Los métodos generales de fitomejoramiento son la selección masal y el pedigree o la selección de plantas individuales. La selección masal se logra sembrando una mezcla de semillas tomadas de varias plantas deseables y removiendo a las menos deseables. A las mejores plantas se les permite cruzarse libremente para producir semillas, y las semillas de estas plantas son mezcladas. La desventaja es la dificultad de distinguir entre variaciones hereditarias y ambientales, pero se mantiene la selección a nivel de grupo o variedad y evita la endogamia. Por otro lado, la selección de pedigree se enfoca a las plantas individuales y su progenie; este método es favorecido en los cultivos que se autopolinizan, proporciona una base para comparación entre líneas y distingue entre las propiedades genéticas o ambientales en las plantas, pero la desventaja de este método es la endogamia (Gardner, 2007)

Usando técnicas tradicionales de autopolinización y polinización cruzada fue posible seleccionar especies de alta productividad, mejor crecimiento, valor nutricional, producción de semillas y frutos de mejor calidad que las variedades silvestres con las cuales se revirtió la deficiencia de alimentos que se presentó en los años sesenta del siglo pasado (Vasil, 1998). En las especies frutales, los cultivares se desarrollan generalmente a partir de técnicas de mejoramiento genético convencional que incluyen la recombinación sexual y la selección de la progenie (McNicol y Graham, 1990).

Dentro de las principales características que se requieren mejorar en el cultivo de la frambuesa está la adaptación a condiciones climáticas de la región de interés, así como la resistencia a enfermedades e insectos. En cuanto al fruto, el factor calidad es el más importante: tamaño, color, contenido de azúcar y ácido, así como la firmeza (Weber, 2012). Alrededor del mundo existen cerca de 30 programas de mejoramiento del género *Rubus* en 19 países, de los cuales, casi todos están en Europa y América del Norte.

El mejoramiento de frambuesa se lleva a cabo mediante hibridaciones entre cultivares y/o especies con características deseables; cada ciclo de cruce implica un ciclo en etapa de invernadero, tamizaje y observación en campo, aunque, el mejoramiento genético presenta problemas referentes a la poliploidía, apomixis, incompatibilidad de polen y bajos porcentajes de germinación (Graham *et al.*, 2016).

## **2.6 Biotecnología vegetal**

La biotecnología es un conjunto de métodos y técnicas en las que se involucra el uso de organismos vivos como bacterias, levaduras y células vegetales, entre otros, mientras que la biotecnología vegetal consiste en el uso de plantas, órganos, tejidos y/o células vegetales para la obtención de bienes y servicios mediante la producción de cultivos de mayor calidad (Robert *et al.*, 1993), y explota el potencial para desarrollar cultivos de órganos y células, células en suspensión, y otros (Georgieva *et al.*, 2016); además, aporta herramientas para lograr el mejoramiento genético de manera rápida y dirigida (Gutiérrez *et al.*, 2003), pues a partir del cultivo *in vitro* se pueden multiplicar clonalmente diferentes especies vegetales (Allcaco, 2016).

## 2.6.1 Cultivo de tejidos vegetales

El cultivo de tejidos vegetales se puede definir como un conjunto heterogéneo de técnicas en las que un explante se cultiva asépticamente en un medio artificial de composición química definida y se incuba en condiciones ambientales controladas (Mroginski *et al.*, 2010). Forma parte de la base de varias áreas de la agricultura, horticultura y la biotecnología (Bhatia y Dahiya, 2015), donde provee una herramienta para propagar especies de interés comercial y también es un sistema “modelo” que permite investigar problemas fisiológicos, bioquímicos, genéticos y estructurales en las plantas (Georgieva *et al.*, 2016).

La técnica de cultivo *in vitro* garantiza la calidad y seguridad del material vegetal; esto implica la eliminación de plagas y enfermedades a través de un proceso de asepsia. Las frambuesas son muy susceptibles a enfermedades causadas por virus; esto hace necesario el uso del cultivo *in vitro* para la producción de plantas elite que sean certificadas (Hall y Kempler, 2011). Además, facilita la multiplicación de plantas con rasgos agronómicos deseables (Jadán *et al.*, 2015), como el número y la longitud de las cañas y el número de frutos en plantas de frambuesa (Debnath, 2014); también, el número de plantas que se pueden producir durante el cultivo *in vitro* depende de la variedad, así que, una vez multiplicadas, éstas no deben exceder los 10 ciclos para prevenir acumulación de cambios genéticos (Dolan, 2013).

### 2.6.1.1 Tipos de cultivo *in vitro*

Existen varios tipos de tejidos que son utilizados en el cultivo *in vitro*, algunos de estos son:

- Callos

Un callo es una masa de células indiferenciadas que se derivan de varios tejidos de explantes; durante el cultivo de tejidos *in vitro* se inducen los callos por una alta concentración de auxinas-citocininas (Cheng *et al.*, 2013). Este tipo de tejido desdiferenciado se utiliza en la micropropagación y suspensiones celulares para la producción de embriones somáticos para el mejoramiento genético vegetal (Larson *et al.*, 2006).

- Suspensión de células

Es un tipo de cultivo en el cual las células se encuentran en suspensión en un medio líquido y se mezclan a cierta velocidad para exponer las células al medio de manera uniforme en todas las direcciones con lo cual se promueve el crecimiento celular (Bhatia y Dahiya, 2015).

- Cultivo de protoplastos

Un protoplasto es una célula desprovista de pared celular que puede ser usado de manera individual el cual, entre otros usos, permite el aislamiento de líneas celulares híbridas mutantes (Barba, 2014).

- Cultivo de anteras

El cultivo de anteras tiene como propósito producir plantas haploides mediante la inducción de embriogénesis a partir de microsporas o granos de polen inmaduros, por lo cual es posible la regeneración de éstos debido a la estabilidad genética que poseen (Luna, 2014). Los pasos básicos para su cultivo son: a) cultivar plantas donantes, b) cosechar órganos florales, c) aislar microsporas, d) cultivar e inducir microsporas, e) regenerar embriones, y f) duplicar cromosomas por un tratamiento con colchicina (Ferrie y Caswell, 2011).

## **2.7 Medios de cultivo**

Según Mroginski *et al.* (2010), el medio de cultivo se puede definir como una formulación de sales inorgánicas y compuestos orgánicos que se requieren para la nutrición y manipulación de los cultivos vegetales; el aporte de estos nutrientes a la planta regula el crecimiento y la morfología de los tejidos, por lo cual le confiere un papel importante en la regeneración de órganos (Bhatia y Dahiya, 2015). Los medios basales más utilizados son las formulaciones B5 (Gamborg *et al.*, 1968) porque muchas especies de plantas se han desarrollado bien en éste (Greenway *et al.*, 2012); así como el medio WPM (Loyd y McCown, 1980) que se utiliza para el cultivo de especies leñosas, pero para la frambuesa se utiliza comúnmente el medio básico Murashige y Skoog (MS) (Murashige y Skoog, 1962), o alguna modificación de este medio para iniciar el crecimiento de esta especie (Weber, 2013b).

## 2.8 Reguladores de crecimiento

Los reguladores vegetales son compuestos sintetizados químicamente u obtenidos de otros organismos, en general son mucho más potentes que los análogos naturales (Alcántara *et al.*, 2019). Existen varias clases reconocidas de sustancias reguladoras de crecimiento vegetal, entre ellas se encuentran los siguientes grupos: auxinas, citocininas, giberelinas, etileno, ácido salicílico, poliaminas, ácido jasmónico y derivados, brasinosteroides, ácido abscísico y estrigolactonas; sin embargo, las auxinas y las citocininas son las más importantes para regular el crecimiento y la morfogénesis en el cultivo de tejidos y órganos de plantas (George y Debergh, 2008). La actividad fisiológica de la planta, en su mayoría, está mediada por los reguladores de crecimiento, ya que éstos actúan como sustancias mensajeras (Hurtado y Merino, 2014); así, por ejemplo, las auxinas desencadenan la fase de dediferenciación durante la regeneración, mientras que, durante la fase final, una vez que el brote se ha formado, las hormonas pudieran estar ausentes o presentes en dosis bajas (De Klerk *et al.*, 1997). Por otra parte, los reguladores aplicados al medio pueden alterar el metabolismo de hormonas endógenas (Michalczuk *et al.*, 1992). Generalmente se requieren probar varios tipos, concentraciones y combinaciones de los reguladores durante el desarrollo de un nuevo protocolo para el cultivo de tejidos de una nueva especie (Shahzad *et al.*, 2017).

### 2.8.1 Auxinas

Las auxinas (del griego: hacer crecer, incrementar) se caracterizan por poseer una estructura con carga negativa en el carboxilo, separada por otra carga residual positiva por una distancia de 0.55 nm. Se sintetizan en los meristemas apicales, tienen movimiento basipétalo por difusión, cuya velocidad de transporte fluctúa entre 6.4 mm h<sup>-1</sup> hasta 25 mm h<sup>-1</sup>. Como auxinas naturales se aceptan el ácido indolacético, ácido fenilacético y el ácido indolbutírico, mientras que a las auxinas sintéticas corresponden los ácidos indólicos, ácidos naftalénicos, clorofenoxiácidos y derivados de los ácidos benzoico y picolínico (Acosta *et al.*, 2008; Barba, 2014). Durante el cultivo *in vitro* las auxinas están involucradas en la formación de meristemas, el establecimiento y mantenimiento de la polaridad, mientras que en plantas enteras su efecto es más marcado en la dominancia apical y la mediación de los tropismos (Machakova *et al.*, 2008).

**Ácido 3-indolbutírico:** Auxina en forma de polvo o cristales blancos, su punto de fusión está entre 122-125 °C. Es insoluble en agua, pero se solubiliza en metanol o etanol (GIS, 2019).

### 2.8.2 Citocininas

Las citocininas deben su nombre a la citocinesis, ya que éstas promueven la división celular. Se sintetizan en los puntos de crecimiento y predominan en la raíz, presentan movimiento acropétalo, es decir, de la base hacia la punta por xilema y se translocan a muy bajas velocidades (Barba, 2014). Según Aina *et al.* (2012), las citocininas se clasifican en dos tipos: las de tipo adenina (6-bencilaminopurina, cinetina y zeatina), y las de tipo fenil urea (difencilurea y thidiazuron). En cuanto a su origen, se pueden distinguir dos tipos: las naturales que son generadas por las plantas, y se derivan de la base púrica adenina (6- amino purina); éstas poseen un sustituyente en el nitrógeno amínico de la posición 6 del anillo de purina que puede ser de naturaleza isoprenoide o aromática (Segura, 2008); por otro lado, existen las citocininas artificiales o sintéticas que son sintetizadas por el hombre (Kakimoto, 2003). Las citocininas promueven la diferenciación celular y, por tanto, reprimen el transporte y la señalización de las auxinas, por lo cual afecta el crecimiento de la raíz (Saini *et al.*, 2013), estimulan la síntesis de proteínas, promueven la maduración de los cloroplastos, retrasan senescencia en hojas desprendidas y rompen la latencia de los brotes laterales (Staden *et al.*, 2008); durante el cultivo *in vitro* pueden iniciar brotes adventicios en porciones de hojas, venas y peciolo intactos (Howell *et al.*, 2008).

**6-bencilaminopurina:** regulador de crecimiento que en su forma pura es una sustancia cristalina, blanca y ligeramente amarillenta, sin olor. Su punto de fusión es de 235 °C, es estable en soluciones ácidas y alcalinas, así como bajo luz y calor, aunque solubiliza mejor en una solución ácida (GIS, 2019).

**6-furfuril-aminopurina (cinetina):** es una citocinina sintética la cual es hasta 30,000 veces más potente que la adenina (Barba, 2014), y su fórmula molecular es  $C_{12}H_{11}N_5$ . Tiene apariencia de polvo de color blanco a amarillo claro, solubiliza en hidróxido de amonio. Su temperatura de almacenamiento es a -20 °C (QC, 2019).

**Phenyl-3-(1,2,3-thidiazol-s-y-l)urea (thidiazurón):** regulador de crecimiento del grupo de las citocininas de apariencia en polvo color blanco y blanco hueso, de olor débil, su punto de

fusión es a 231 °C, es poco soluble en agua, solubiliza en DMSO, su temperatura de almacenamiento es de 15 a 25 °C en polvo y en estado líquido de 2 a 8 °C (Duchefa, 2010).

## **2.9 Organogénesis**

La organogénesis adventicia se asocia con la regeneración de brotes/raíces a partir de explantes que carecen de meristemas preexistentes (hojas, peciolo, hipocotilo, protoplasto, etc.). Es decir, tras la aplicación de un estímulo exógeno apropiado, las células somáticas de las plantas pueden ser capaces de formar brotes o raíces a través de la organogénesis adventicia o embriones a través de la embriogénesis somática (Vujovic *et al.*, 2014). Las células vegetales, órganos y tejidos muestran una marcada habilidad para generar nuevos órganos bajo condiciones *in vitro* (Pulianmackal *et al.*, 2014); este proceso puede ser considerado como el resultado de las interacciones entre los receptores de citocininas, ciclo celular y desarrollo de meristemas (Khamlichi *et al.*, 1999). La regeneración por medio de la organogénesis es un proceso de dos pasos en el cual se desarrollan primero los brotes y luego las raíces con lo cual se forma una plántula completa (Shahzad *et al.*, 2017); se distinguen, además, tres fases análogas: a) *desdiferenciación*: durante esta fase las células adquieren la competencia para reaccionar ante un estímulo organogénico; b) *inducción*: en esta etapa las células se determinan para formar un órgano específico, únicamente durante esta fase la composición hormonal del medio nutritivo es crítica para la regeneración, y, c) *realización*: una vez que las células están determinadas se inicia la diferenciación para producir brotes (De Klerk *et al.*, 1997). La regeneración de plantas es una alternativa para la obtención de plantas, ya que minimiza la variación somaclonal (Grant *et al.*, 1991).

### **2.9.1 Organogénesis indirecta**

La organogénesis indirecta consiste en la formación de brotes o raíces a partir de una fase intermedia de formación de callos (George y Debergh, 2008) y constituye la base para fomentar la variación somaclonal (Krikorian, 1993), puesto que desde el punto de vista morfogénico la característica más importante es la totipotencia de sus células, las cuales tienen la capacidad de desarrollar brotes, raíces y embriones somáticos bajo las condiciones nutricionales, hormonales y ambientales adecuadas (Gómez, 1998); sin embargo, aunque la regeneración de plantas a partir de callos por medio de organogénesis o la embriogénesis

somática se ha utilizado como alternativa en los métodos de propagación, su uso se ve limitado debido a la poca estabilidad genética durante el cultivo de callos (Litz y Jarret, 1991).

El establecimiento del cultivo de callos se ha utilizado como alternativa en protocolos de regeneración para mejoramiento genético (Collado *et al.*, 2008), para la propagación masiva de especies (Anaya *et al.*, 2010), así como para la inducción de cultivo de células en suspensión (Sánchez-Calvo y Alvarenga-Venutolo, 2015).

## **2.9.2 Organogénesis directa**

Mediante la organogénesis directa se obtienen todas las partes aéreas de la planta; la formación de brotes está altamente controlada y durante su formación se pueden observar tres zonas celulares distintas: a) zona central que contiene células madre, b) zona periférica cuyos descendientes de éstas se desplazan para formar órganos específicos, y c) zona de costillas que son las nuevas células que forman los tejidos del tallo (Cheng *et al.*, 2013). La embriogénesis somática se da a partir de una célula que tiene la capacidad de formar un embrión a partir de tejido somático (Gutiérrez *et al.*, 2003). En la regeneración directa, las tres vías regenerativas comienzan a partir de diferentes tejidos celulares (De Klerk *et al.*, 1997) que son llamados explantes y la mejor fuente de éstos es a partir de plantas jóvenes o en desarrollo con tejidos meristemáticos y crecimiento vegetativo vigoroso, ya que se caracteriza por ser activo y por la ausencia de estructuras reproductivas (Calva y Ríos, 1999). Owens y de Nova (1992) descubrieron que el tejido de la hoja es más sensible que el tejido del tallo en términos de inducción rápida de callos y/o regeneración de brotes.

### **2.9.2.1 Factores que limitan la regeneración**

La aplicación de la biotecnología en los cultivos de “berries” depende de la disponibilidad de protocolos de regeneración eficientes, y éstos deben ser específicos para cada genotipo y contener la combinación correcta de hormonas exógenas (auxinas y citocininas) adicionadas al medio (Capelletti *et al.*, 2016); éste se determina en gran medida por factores intrínsecos al material vegetal (ejem., genotipo), y externos como los niveles de reguladores de crecimiento (Shahzad *et al.*, 2017). Entre los factores externos se encuentran la composición hormonal (tipo, concentración y combinación de RCV) y minerales del medio, edad y tipo de explantes (hojas, peciolas, entrenudos, cotiledones o embriones maduros), origen de los explantes *in vivo* o *in vitro*, y la orientación del explante; sin embargo, en *Rubus*

la orientación del explante no tuvo diferencia significativa, excepto en una ocasión donde mostró que al colocar la parte abaxial en contacto con el medio era mejor (McNicol y Graham, 1990), así como las condiciones de incubación (Vujovic *et al.*, 2014).

**Oxidación:** La célula vegetal sometida a un estrés reacciona produciendo mayores niveles de ROS (especies reactivas de oxígeno) y/o RNS (especies reactivas de nitrógeno), los cuales generan una reacción en cascada, cuando el electrón libre se transfiere de una molécula a otra (Pompeu *et al.*, 2008). Durante el cultivo *in vitro* generalmente se asocia a los cortes que sufre el explante, la composición del medio de cultivo, el volumen y la calidad del frasco de cultivo (Abdelwahd *et al.*, 2008). La reducción de la oxidación en frambuesa se ha logrado a partir de la adición de glucanato de calcio y ácido ascórbico al medio de cultivo (Amalia *et al.*, 2014). El carbón activado también se ha utilizado en el cultivo de tejidos de *Rubus* para reducir los niveles de compuestos fenólicos en el medio de cultivo (Millan y Graham, 1999); sin embargo, Constantini *et al.* (1976), y Thomas, (2008) observaron que éste promueve la adsorción de vitaminas, iones metálicos y PGRs.

**Genotipo:** La regeneración de las plantas es altamente dependiente del genotipo; los protocolos de regeneración solo se han desarrollado para algunas selecciones puesto que no es aplicable a un gran rango de genotipos (Graham *et al.*, 1997). En algunos genotipos de frambuesa se observan *in vitro* hojas cloróticas, recalcitrantes a la regeneración (Zawadzka y Orlikowska, 2006). La capacidad embriogénica y organogénica de un cultivo, en general, además de las características genéticas, depende del estado fisiológico y la edad de la planta donadora de los explantes, así como del tipo de explante utilizado (Gaj, 2004).

**Reguladores de crecimiento:** Dentro de la morfogénesis, en la fase de inducción, las células son receptivas al estímulo morfogénico y hay una relación directa con el tipo, concentración y combinación de reguladores de crecimiento agregados al medio de cultivo y el órgano a desarrollar (Radice, 2010). El thidiazuron y las citocininas son compuestos efectivos para la estimulación de brotes adventicios en cultivos de las rosáceas (Korban *et al.*, 1992); sin embargo, los medios de regeneración necesitan ser adaptados para cada genotipo de *Rubus* (Owens y de Novoa, 1992), ya que la respuesta de los diferentes cultivares de frambuesa se puede atribuir al balance hormonal endógeno en el tejido de las plantas (Tanaka *et al.*, 2012).

## 2.10 Caracterización morfológica de plantas

La caracterización del germoplasma se utiliza para describir los caracteres morfológicos, fenológicos y productivos de los recursos fitogenéticos; la morfología se determina mediante el uso de descriptores definidos que permiten diferenciar taxonómicamente a las plantas (Hernández, 2013). En general, la caracterización del germoplasma se utiliza para estudiar la variabilidad genética, para identificar plantas y para conservar los recursos genéticos (Olivera *et al.*, 2009).

La caracterización morfológica y agronómica son actividades complementarias que consisten en describir los atributos de las accesiones para determinar su utilidad y, además, para identificar los tipos promisorios para los procesos de selección, mejoramiento genético u otros fines (Bonilla *et al.*, 2008). Cuando la diversidad genética entre especies es fácilmente observable, los descriptores morfológicos suministran información con la cual se puede evitar la duplicación del mismo material y minimizar las sobreestimaciones de la diversidad existente (Becerra y Paredes, 2000): por esta razón, se deben utilizar las menos características posibles pero que sean únicas del vegetal, y debe otorgársele *a priori* a todos ellos la misma importancia (González-Andrés, 2001). Los órganos más importantes para la descripción morfológica son aquéllos que se ven menos influidos por el ambiente como la flor y fruto; en importancia decreciente, las hojas, tronco, ramas, raíces y los tejidos celulares también son útiles (Enríquez, 1991).

### III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

#### 3. Hipótesis

La regeneración *in vitro* de frambuesa, vía organogénesis directa, está sujeta al grado de oxidación que presenten las secciones de hojas de cada una de las variedades, así como de las concentraciones y combinaciones de los reguladores de crecimiento utilizadas en el medio de cultivo.

Los genotipos de frambuesa ‘UMC-702’ y ‘C-6’ presentan características morfológicas distintivas en comparación con los genotipos ‘Adelita’ y ‘Heritage’.

#### 3.1 Objetivo general

Obtener información sobre la regeneración *in vitro* de frambuesa (*Rubus idaeus* L.) genotipos ‘C-6’, ‘Joan J.’, ‘A-1’, ‘UMC-702’ y ‘Her’, así como obtener información sobre las características morfológicas de frambuesa (*Rubus idaeus* L.) de los genotipos ‘UMC-702’ y ‘C-6’.

#### 3.1.2 Objetivos específicos

- 1.- Evaluar el grado de oxidación de explantes de cinco genotipos de frambuesa tratados con bencilaminopurina (BAP), cinetina (CIN), y thidiazuron (TDZ), solas o combinadas con ácido indolbutírico (AIB) para inducir regeneración.
- 2.- Evaluar el efecto de bencilaminopurina (BAP), cinetina (CIN), y thidiazuron (TDZ), solas o combinadas con ácido indolbutírico (AIB), sobre la organogénesis directa de explantes de hojas.
- 3.- Analizar las características distintivas de los genotipos de frambuesa ‘UMC-702’ y ‘C.6’ en comparación con los genotipos comerciales ‘Adelita’ y ‘Heritage’.

## IV. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Localización del sitio experimental

La presente investigación se desarrolló en el Laboratorio de Fisiología Vegetal de la Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez” de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, ubicada en la ciudad de Uruapan, Michoacán, México. Este sitio se localiza a 19°23'41.15" latitud Norte y 102°03'31.44" longitud Oeste, y a una altitud de 1599 msnm.

### 4.2 Material vegetal

Se utilizaron cinco genotipos de frambuesa roja (*Rubus idaeus* L.) del banco de germoplasma *in vitro* del Laboratorio de Fisiología Vegetal de la Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez”. Los cinco genotipos se mantuvieron en medio de cultivo de proliferación (Figura 1A) Murashige y Skoog (MS) con las sales minerales en concentración al 100%, vitaminas, adicionado con sacarosa 30 g L<sup>-1</sup>. El pH del medio se ajustó a 5.7±1, se adicionaron 8 g L<sup>-1</sup> de agar; posteriormente se fundió y se vertieron 20 mL de medio en frascos de 100 mL de capacidad, y finalmente se esterilizaron en autoclave a 15 Lb de presión durante 15 minutos (Minas y Neocleous, 2007).

### 4.3 Medio de cultivo y reguladores de crecimiento

Para el establecimiento de explantes de hoja de cada genotipo, se utilizó un medio de cultivo igual al descrito en el apartado anterior adicionado con citocininas (CIN, BAP y TDZ) y auxina (AIB) en distintas combinaciones y dosis (Cuadro 1). Además, se adicionaron 50 mg L<sup>-1</sup> de ácido ascórbico al medio de cultivo con la finalidad de reducir la oxidación de los explantes.

### 4.4 Regeneración de segmentos de hojas

A partir de las plántulas propagadas *in vitro* (Figura 1B) se tomaron secciones de hojas de un tamaño promedio de 1 cm de diámetro, se colocaron en el medio MS básico adicionado con los reguladores de crecimiento descritos en el Cuadro 1. Esto se realizó bajo el siguiente procedimiento: dentro de la campana de flujo laminar con la luz apagada, se colocó agua destilada estéril con ácido ascórbico (50 mg L<sup>-1</sup>) sobre cajas Petri para prevenir la oxidación de los explantes; éstas fueron esterilizadas previamente en autoclave; enseguida, las hojas se

separaron de las plántulas, se disectaron en secciones de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> y se colocaron dentro de cada frasco con medio de cultivo, los cuales se mantuvieron en el cuarto de crecimiento bajo condiciones de oscuridad durante ocho días; transcurrido ese periodo de tiempo, los explantes se colocaron en un fotoperiodo de 16/8 horas de luz/oscuridad y 25 °C. Después de tres semanas se subcultivaron en un medio de cultivo fresco con las mismas condiciones que contenía el medio anterior.



**Figura 1.** Brotes de frambuesa genotipo ‘C-6’ obtenidos *in vitro* a partir de yemas axilares. A) proliferación en medio de cultivo MS suplementado con 1 mg L<sup>-1</sup> de BAP, B) elongación de los brotes en medio de cultivo MS básico.

**Cuadro 1.** Combinaciones de reguladores de crecimiento vegetal utilizados para inducir la regeneración de segmentos de hojas de cinco genotipos de frambuesa.

Tratamiento	Auxina (AIB)	Citocinina		
		BAP	KIN	TDZ
mg L <sup>-1</sup>				
1	0	0.5	-	-
2	0	1	-	-
3	0	1.5	-	-
4	0	2	-	-
5	0	2.5	-	-
6	0	3	-	-
7	0.1	0.5	-	-
8	0.1	1	-	-
9	0.1	1.5	-	-
10	0.1	2	-	-
11	0.1	2.5	-	-
12	0.1	3	-	-
13	0	-	0.5	-
14	0	-	1	-
15	0	-	1.5	-
16	0	-	2	-
17	0	-	2.5	-
18	0	-	3	-
19	0.1	-	0.5	-
20	0.1	-	1	-
21	0.1	-	1.5	-
22	0.1	-	2	-
23	0.1	-	2.5	-
24	0.1	-	3	-
25	0	-	-	0.2
26	0	-	-	0.4
27	0	-	-	0.6
28	0	-	-	0.8
29	0	-	-	1
30	0.1	-	-	0.2
31	0.1	-	-	0.4
32	0.1	-	-	0.6
33	0.1	-	-	0.8
34	0.1	-	-	1

TDZ = thidiazurón; AIB = ácido indolbutírico; BAP = bencilaminopurina; KIN = cinetina

#### **4.5 Descripción morfológica de las selecciones**

Para los genotipos 'C-6' y 'UMC-702' se determinaron las características morfológicas más sobresalientes y se realizó una comparación de éstas con los genotipos 'Adelita' y 'Heritage', respectivamente, considerando las características más sobresalientes descritas en la patente 'Adelita' no. US 2012/0311748 P1 (Pierron-Darbone, 2012) y 'Heritage' (no patentada).

#### **4.6 Diseño experimental**

Para analizar los datos obtenidos, se utilizó el diseño experimental completamente al azar con 34 tratamientos y un control con 5 repeticiones, donde cada unidad experimental constó de 5 explantes por frasco. Con los datos obtenidos se hizo un análisis de varianza univariado y, las variables que mostraron diferencias significativas se sometieron a la prueba de Duncan ( $p \leq 0.5$ ) (Duncan, 1995) para comparación de medias entre tratamientos. Para los análisis se utilizó el programa SAS versión 9.0 (SAS, 2002).

#### **4.7. Variables a evaluar**

##### **Regeneración:**

a) Oxidación de explantes: se determinó el porcentaje de explantes oxidados mediante la siguiente fórmula: porcentaje de oxidación = número de explantes oxidados x 100/ número total de explantes establecidos.

b) Explantes regenerados: se determinó el porcentaje de regeneración mediante la siguiente fórmula: porcentaje de regeneración = número de explantes con brotes x 100/ número total de explantes establecidos.

c) Coeficiente de multiplicación: se determinó mediante la siguiente fórmula: Coeficiente de multiplicación= número de plántulas finales/ número de explantes establecidos.

## V. RESULTADOS

A partir de los datos obtenidos después de la aplicación de reguladores de crecimiento (BAP, CIN, TDZ y AIB) para la emergencia de brotes adventicios *in vitro* de frambuesa se obtuvieron los siguientes resultados:

### 5.1 Efecto de auxinas y citocininas sobre la oxidación de los explantes

En el ANDEVA se puede observar que los reguladores de crecimiento adicionados al medio de cultivo ejercieron efectos significativos sobre la variable porcentaje de oxidación para todos los genotipos (Cuadro 2), así como en el número de explantes que produjeron brotes a los 40 días después de su establecimiento (Cuadro 4); de igual manera, se observó en la variable multiplicación de brotes (Cuadro 6).

**Cuadro 2.** Sensibilidad de los explantes de frambuesa a la oxidación: genotipos ‘C-6’, ‘Joan J.’, ‘UMC-702’, ‘A-1’, y ‘Her’, cultivados *in vitro* y tratados con auxinas y citocininas.

Variable	Media	Cuadrado de la media		CV	R <sup>2</sup>
		Tratamientos	Error		
Oxidación (%) cv. ‘C-6’	59.8	2578.5546**	630.8654	63.15	0.50
Oxidación (%) cv. ‘Joan J.’	40.34	3182.9244**	618.2857	61.64	0.56
Oxidación (%) cv. ‘UMC-702’	71.20	5180.2353**	385.1429	27.56	0.76
Oxidación (%) cv. ‘A-1’	63.09	5125.1092**	563.4286	37.63	0.69
Oxidación (%) cv. ‘Her’	58.29	7643.6975**	280.0000	28.71	0.87

\*p≤0.05; \*\*p≤0.01; ns= no significativo

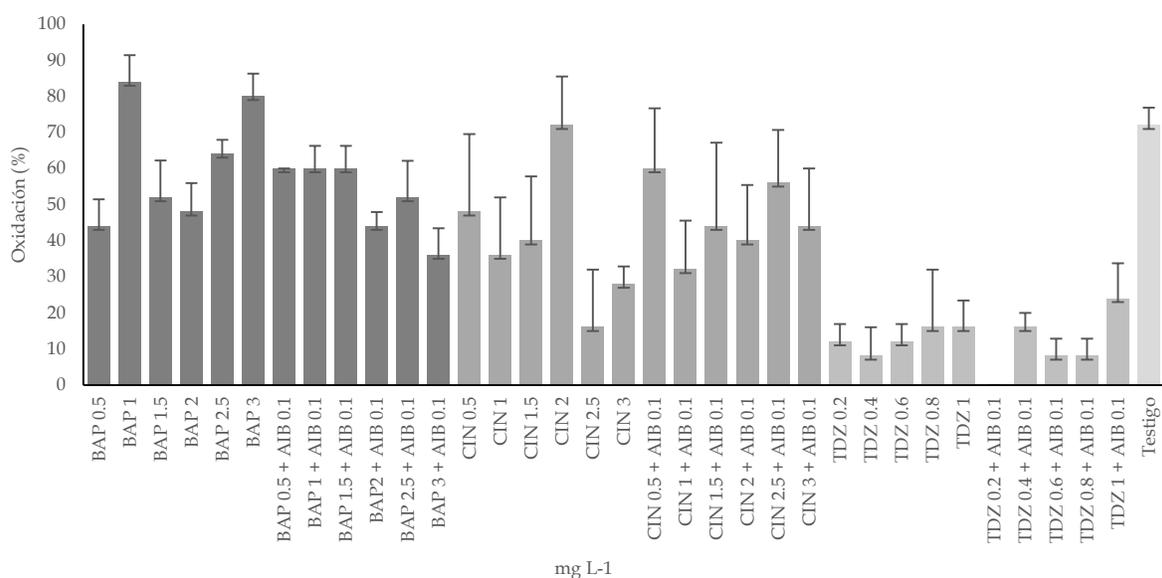
Los reguladores de crecimiento adicionados al medio de cultivo tuvieron un marcado efecto sobre la oxidación de los explantes. Los explantes del genotipo ‘C-6’ mostraron diferencia significativa en la sensibilidad a la oxidación a los 40 días de su establecimiento *in vitro* (Apéndice 2A).

**Cuadro 3.** Comparación de los valores medios y prueba de Duncan de la oxidación de explantes de hoja de frambuesa genotipos ‘C-6’, ‘Joan J.’, ‘A-1’, ‘UMC-702’ y ‘Her’ cultivados *in vitro* y tratados con reguladores de crecimiento (BAP, CIN y TDZ) solos o en interacción con AIB.

Regulador de crecimiento	Dosis (mg L <sup>-1</sup> )	‘C-6’ (%)	‘JOAN J’ (%)	‘A-1’ (%)	‘UMC-702’ (%)	‘HER’ (%)
BAP	0.5	44 bcdefgh	40 bcdefghi	48 defg	72 ab	36 ef
	1	84 a	44 bcdefgh	92 abc	84 ab	88 ab
	1.5	52 abcdef	56 abcde	16 ghi	64 bc	76 abc
	2	48 abcdefg	56 abcde	96 ab	72 ab	20 fgh
	2.5	64 abcd	68 abc	88 abc	64 bc	88 ab
	3	80 ab	72 abc	100 a	84 ab	100 a
BAP + AIB	0.5 + 0.1	60 abcde	16 fghij	100 a	40 c	44 de
	1 + 0.1	60 abcde	44 bcdefgh	84 abc	64 bc	0 h
	1.5 + 0.1	60 abcde	20 efghij	60 bcdef	88 ab	76 abc
	2 + 0.1	44 bcdefgh	28 defghij	68abcde	68 bc	44 de
	2.5 + 0.1	52 abcdef	40 bcdefghi	56 cdef	92 ab	64 cd
	3 + 0.1	36 cdefghi	44 bcdefg	76 abcd	88 ab	28 efg
CIN	0.5	48 abcdefg	68 abc	88 abc	100 a	96 a
	1	36 cdefghi	72 abc	80 abcd	100 a	100 a
	1.5	40 cdefgh	64 abcd	100 a	100 a	96 a
	2	72 abc	40 bcdefghi	92 abc	100 a	100 a
	2.5	16 fghi	76 ab	84 abc	100 a	96 a
	3	28 defghi	84 a	76 abcd	100 a	100 a
CIN + AIB	0.5 + 0.1	60 abcde	48 abcdefg	40 efgh	100 a	96 a
	1 + 0.1	32 defghi	52 abcdef	68 abcde	100 a	100 a
	1.5 + 0.1	44 bcdefgh	36 cdefghij	100 a	80 ab	100 a
	2 + 0.1	40 cdefgh	64 abcd	76 abcd	88 ab	100 a
	2.5 + 0.1	56 abcde	48 abcdefg	100 a	100 a	100 a
	3 + 0.1	44 bcdefgh	72 abc	100 a	88 ab	100 a
TDZ	0.2	12 ghi	4 ij	4 i	84 ab	16 fgh
	0.4	8 hi	24 efghij	16 ghi	72 ab	16 fgh
	0.6	12 ghi	0 j	32 fghi	76 ab	12 fgh
	0.8	16 fghi	28 defghij	20 ghi	64 bc	8 gh
	1	16 fghi	12 ghij	60 bcdef	68 bc	24 efg
	TDZ + AIB	0.2 + 0.1	0 i	4 ij	8 hi	4 d
0.4 + 0.1		16 fghi	12 ghij	36 efghi	0 d	8 gh
0.6 + 0.1		8 hi	0 j	28 fghi	0 d	12 fgh
0.8 + 0.1		8 hi	8 hij	36 efghi	0 d	16 fgh
1 + 0.1		24 efghi	4 ij	4 i	0 d	0 h
TESTIGO		0	72 abc	64 abcd	76 abcd	84 ab

Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas al 0.05

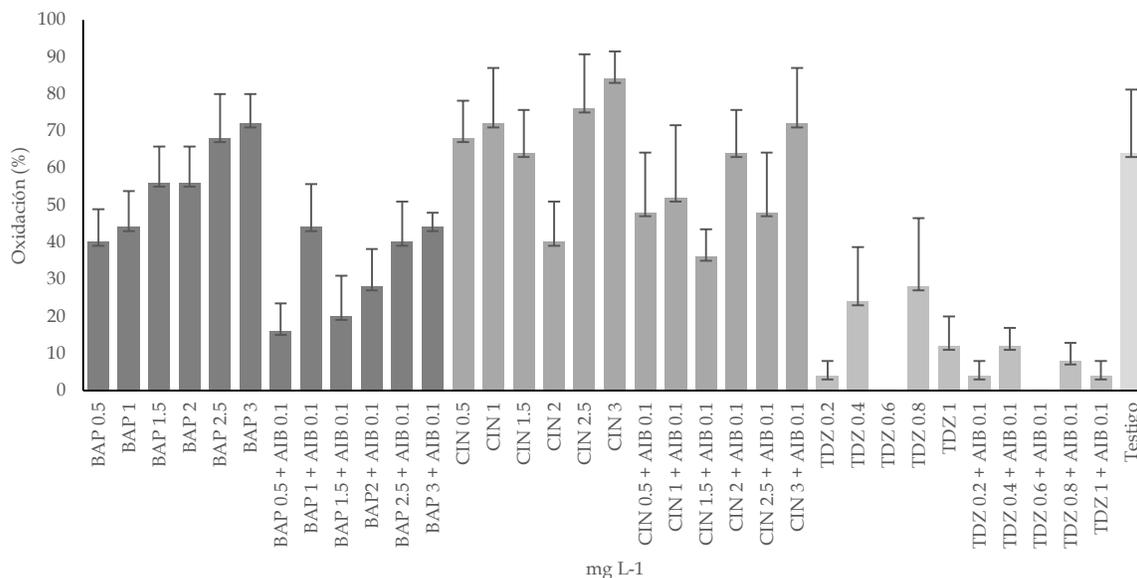
Los explantes tratados con CIN y CIN + AIB (2.5, 3 y 1 + 0.1 mg L<sup>-1</sup>) mostraron porcentajes de oxidación de 16, 28 y 32 %; esto significó 56, 44 y 40%, respectivamente, menos oxidación en comparación con el tratamiento testigo, mientras que con el uso de TDZ los porcentajes de oxidación se redujeron hasta un 56% respecto al tratamiento testigo, independientemente de la dosis empleada; sin embargo, al utilizar TDZ 0.2 mg L<sup>-1</sup> + 0.1 mg L<sup>-1</sup> de AIB se logró la disminución total de la oxidación para los explantes de este genotipo (Cuadro 3 y Figura 2).



**Figura 2.** Porcentaje de oxidación de explantes de frambuesa genotipo ‘C-6’ cultivados *in vitro* tratados con BAP, CIN y TDZ solos o en combinación con AIB, evaluados a los 40 días después de su establecimiento.

En el genotipo ‘Joan J.’ se observó diferencia significativa para la variable oxidación (Apéndice 3A). En los explantes que se establecieron en medio adicionado con BAP + AIB (0.5 + 0.1 y 1.5 + 0.1 mg L<sup>-1</sup>) se redujeron los porcentajes de oxidación en un 48 y 44 %, respectivamente, comparados con el tratamiento testigo (64%) (Cuadro 3). Al aplicar CIN al medio de cultivo se observaron porcentajes de oxidación por arriba del 36%, mientras que con el uso de TDZ y TDZ + AIB se redujo la oxidación en cualesquiera de las dosis utilizadas, e

incluso se inhibió por completo al utilizar TDZ 0.6 mg L<sup>-1</sup> y TDZ 0.6 + 0.1 mg L<sup>-1</sup> de AIB (Cuadro 3 y Figura 3).

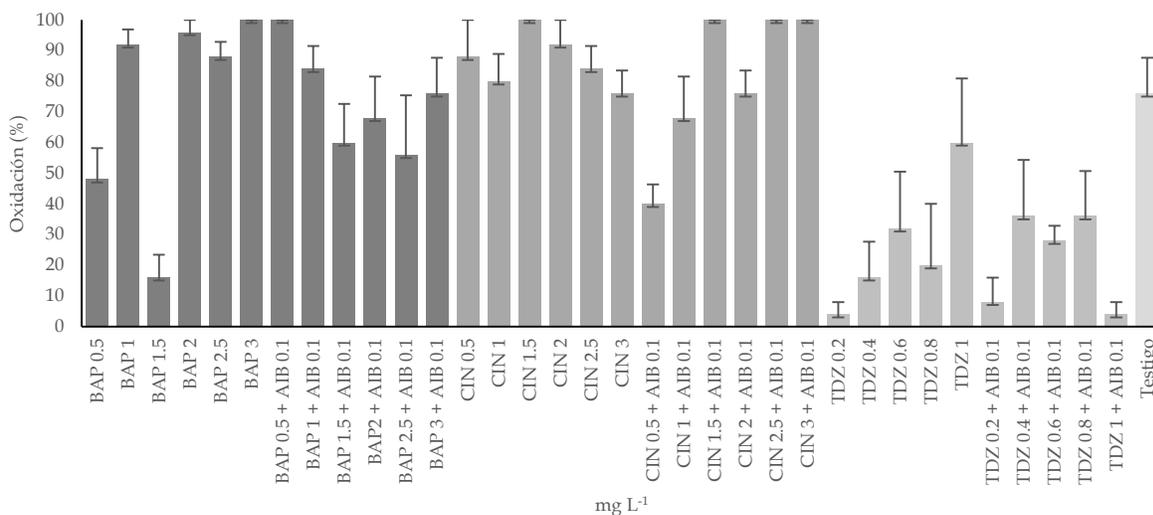


**Figura 3.** Porcentaje de oxidación de explantes de frambuesa genotipo ‘Joan J.’ cultivados *in vitro* tratados con BAP, CIN y TDZ solos o en combinación con AIB, evaluados a los 40 días después de su establecimiento.

De manera similar, en el genotipo ‘A-1’ se observó diferencia significativa (Apéndice A5). Los explantes tratados con BAP (1.5 mg L<sup>-1</sup>) mostraron porcentajes de oxidación de 16%; esto significó 60% menos oxidación que en el tratamiento testigo. El regulador CIN no mostró efectos sobre la disminución de la oxidación en los explantes del genotipo ‘A-1’; por otra parte, con el uso del TDZ (0.2, 0.4 y 0.6 mg L<sup>-1</sup>) se redujo la oxidación en 72, 60 y 44 % con respecto al tratamiento testigo mientras que al adicionar TDZ + AIB la oxidación se redujo en 68, 40, 48, 40 y 72 % en los explantes tratados con TDZ 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 + 0.1 mg L<sup>-1</sup> de AIB (Cuadro 3 y Figura 4).

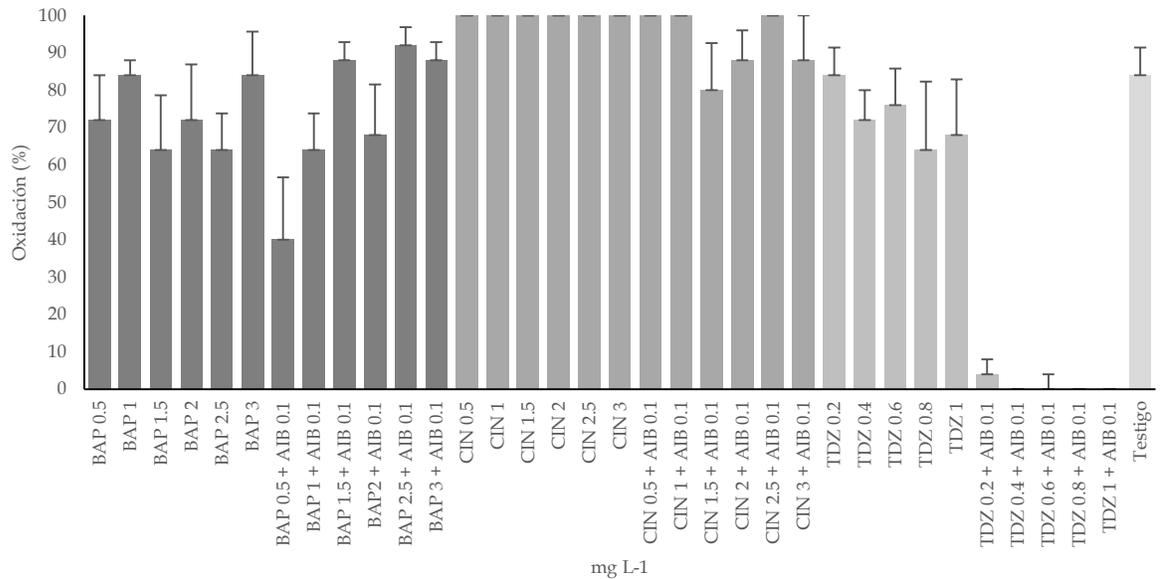
El genotipo ‘UMC-702’ estadísticamente mostró diferencia altamente significativa en la variable oxidación (Apéndice A6). Los reguladores de crecimiento aplicados al medio de cultivo en las dosis y combinaciones de BAP, BAP + AIB, CIN, CIN + AIB y TDZ no

mostraron efecto en la disminución de la oxidación de los explantes; los valores de oxidación fueron por arriba del 40% en estos casos (Cuadro 3). Caso contrario sucedió con el uso de TDZ en combinación con AIB donde, independientemente de la dosis utilizada, se observaron porcentajes de oxidación por debajo del 4%; esto significó un 80% menos oxidación con respecto al tratamiento testigo (Figura 5).

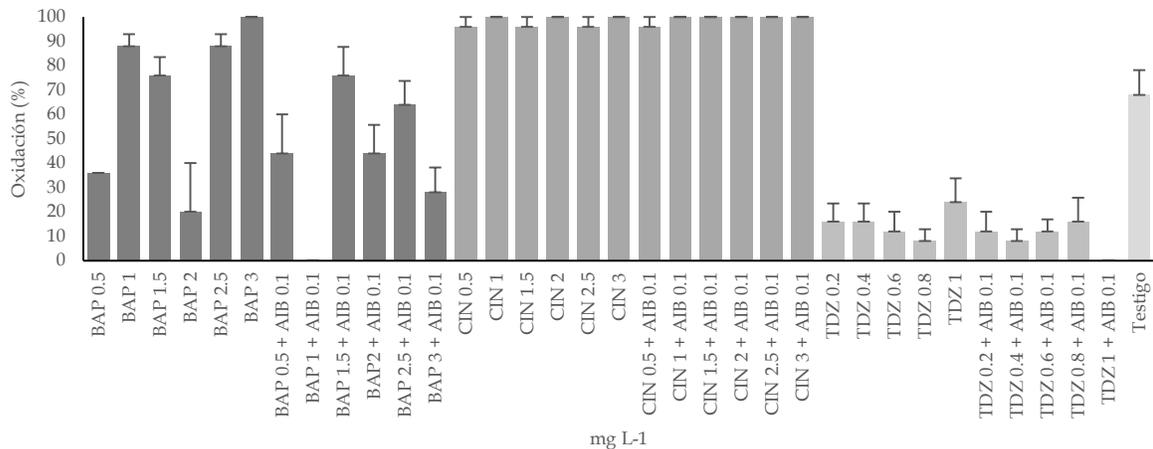


**Figura 4.** Porcentaje de oxidación de explantes de frambuesa genotipo ‘A-1’ cultivados *in vitro* tratados con BAP, CIN y TDZ solos o en combinación con AIB, evaluados a los 40 días después de su establecimiento.

Los reguladores de crecimiento adicionados en el medio de cultivo para la siembra de los explantes del genotipo ‘Her’ mostraron diferencias estadísticamente significativas (Cuadro 6A). El uso de BAP y BAP + AIB (2 y 1 + 0.1 mg L<sup>-1</sup>) disminuyó los porcentajes de oxidación en un 48 y 68% con respecto al tratamiento testigo; al utilizar CIN en el medio de cultivo se observaron porcentajes de oxidación por arriba del 96% (Cuadro 3 y Figura 6). Por otro lado, con el uso de TDZ se mantuvo la tendencia de los genotipos anteriores donde su uso en el medio de cultivo influyó sobre la disminución de la oxidación de los explantes; para el genotipo ‘Her’ en TDZ y TDZ + AIB mostró hasta un 52% menos oxidación con respecto al tratamiento testigo (Figura 6).



**Figura 5.** Porcentaje de oxidación de explantes de frambuesa genotipo ‘UMC-702’ cultivados *in vitro* tratados con BAP, CIN y TDZ solos o en combinación con AIB, evaluados a los 40 días de su establecimiento.



**Figura 6.** Porcentaje de oxidación de explantes de frambuesa genotipo ‘Her’ cultivados *in vitro* tratados con BAP, CIN y TDZ solos o en combinación con AIB, evaluados a los 40 días después de su establecimiento.

## 5.2 Efecto de auxinas y citocininas sobre regeneración de explantes de hojas

En la variable porcentaje de explantes con brotes evaluada a los 40 días de su establecimiento, se observaron diferencias estadísticamente significativas para los cinco genotipos evaluados (Cuadro 3). El número de explantes que formaron brotes se vio afectado por los reguladores de crecimiento adicionados al medio de cultivo.

**Cuadro 4.** Comparación de los porcentajes y significancia en la prueba de Duncan de la regeneración de brotes a partir de explantes de hojas de frambuesa genotipos: ‘C-6’, ‘Joan J.’, ‘UMC-702’, ‘A-1’ y ‘Her’ cultivados *in vitro* tratados con reguladores de crecimiento (BAP, CIN y TDZ) solos o en interacción con AIB.

Variable	Media	Cuadrado de la media		CV	R <sup>2</sup>
		Tratamientos	Error		
Regeneración (%) cv. ‘C-6’	5.60	212.70588**	94.86	173.92	0.35
Regeneración (%) cv. ‘Joan J.’	10.17	1496.20168**	130.37143	112.26	0.74
Regeneración (%) cv. ‘UMC-702’	8.57	541.8487**	128.0000	131.99	0.51
Regeneración (%) cv. ‘A-1’	4.90	436.61613**	64.11714	163.32	0.62
Regeneración (%) cv. ‘Her’	9.42	812.1008	121.1428	120.38	0.62

\*p≤0.05; \*\*p≤0.01; ns= no significativo

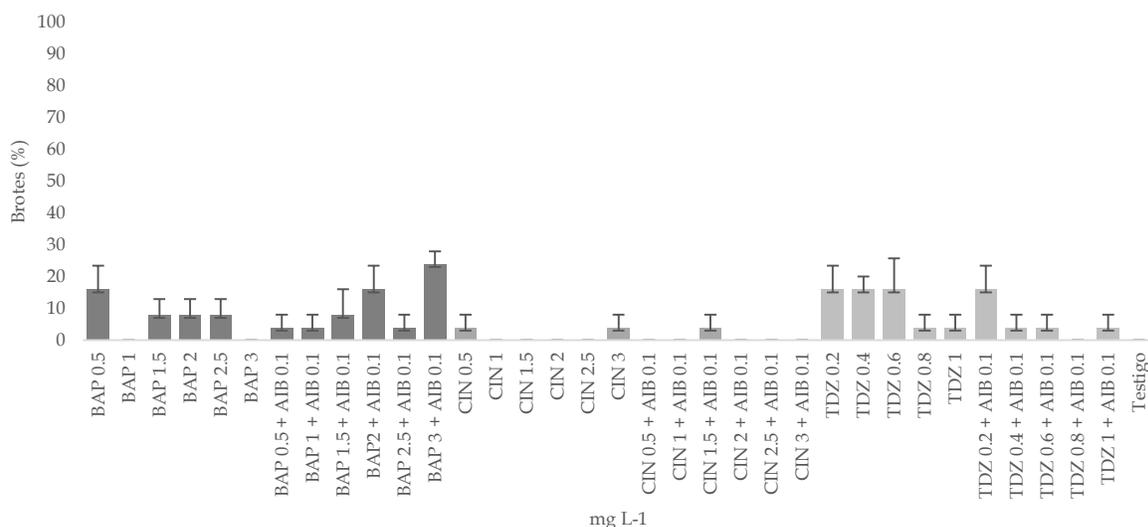
En el genotipo ‘C-6’ se observaron diferencias estadísticamente significativas para la variable porcentaje de explantes con brotes (Cuadro 8A). El regulador de crecimiento BAP solo o en combinación con AIB (0.5, 2 y 3 + 0.1 mg L<sup>-1</sup>) ejerció un efecto sobre la inducción de regeneración de brotes (16, 16 y 24%), mientras que el tratamiento testigo no tuvo efecto sobre esta variable (Cuadro 5). El uso del regulador CIN en el medio de cultivo no parece haber ejercido un efecto significativo sobre la regeneración de brotes en el genotipo ‘C-6’; por otra parte, las dosis bajas de TDZ solo o en combinación con AIB (0.2, 0.4 y 0.6 así como 0.2 + 0.1 mg L<sup>-1</sup>) tuvo un efecto marcado en la regeneración de brotes a partir de explantes de hojas del genotipo ‘C-6’; estos tratamientos promovieron porcentajes de regeneración de 16%, lo que significó un aumento en la regeneración del 16% con

respecto al tratamiento testigo (Figura 7).

**Cuadro 5.** Comparación de porcentajes y significancia en la prueba de Duncan de la regeneración de brotes a partir de explantes de hoja de frambuesa genotipos ‘C-6’, ‘Joan J.’, ‘A-1’, ‘UMC-702’ y ‘Her’ cultivados *in vitro* tratados con reguladores de crecimiento (BAP, CIN y TDZ) solos o en interacción con AIB.

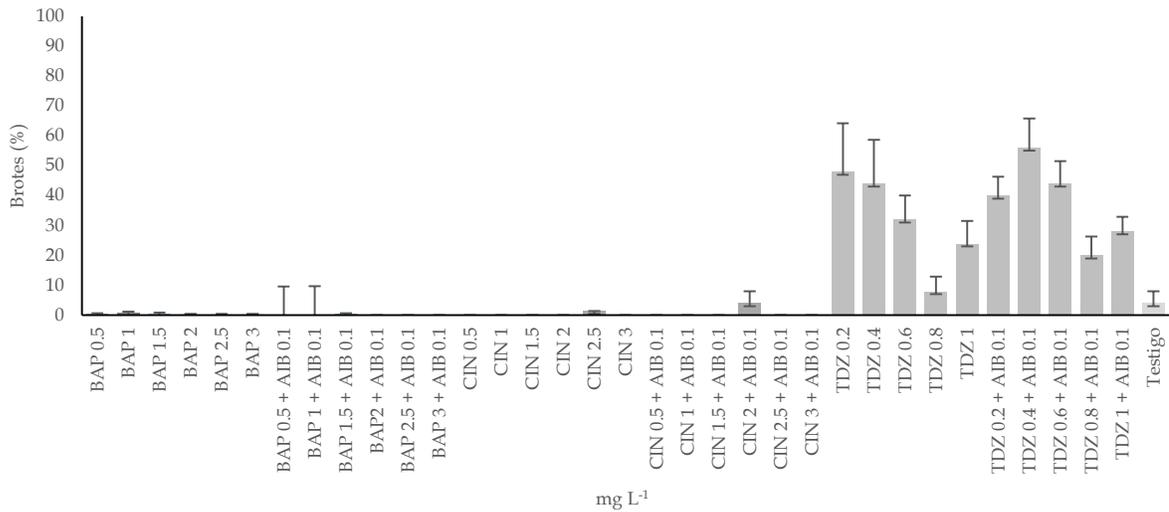
Regulador de crecimiento	Dosis (mg L <sup>-1</sup> )	‘C-6’ (%)	‘Joan J.’ (%)	‘A-1’ (%)	‘UMC-702’ (%)	‘Her’ (%)
BAP	0.5	16 ab	0.4 g	0 d	4 cd	4 de
	1	0 c	0.8 g	0 d	8 cde	0 e
	1.5	8 bc	0.4 g	0.8 d	4 ed	8 cde
	2	8 bc	0.2 g	0.2 d	12 bcde	8 cde
	2.5	8 bc	0.2 g	0.4 d	24 bc	4 de
	3	0 c	0.2 g	0 d	8 cde	0 e
BAP + AIB	0.5 + 0.1	4 bc	0 g	0 d	20 bcd	0 e
	1 + 0.1	4 bc	0 g	0 d	20 bcd	16 bcde
	1.5 + 0.1	8 bc	0.4 g	0.4 d	4 de	8 cde
	2 + 0.1	16 ab	0 g	0.4 d	4 de	0 e
	2.5 + 0.1	4 bc	0 g	0 d	0 e	8 cde
	3 + 0.1	24 a	0 g	1 d	4 de	16 bcde
CIN	0.5	4 bc	0 g	0 d	0 e	0 e
	1	0 c	0 g	0 d	0 e	0 e
	1.5	0 c	0 g	0 d	0 e	0 e
	2	0c	0 g	0 d	0 e	0 e
	2.5	0c	4 g	0 d	0 e	0 e
	3	4bc	0 g	0.4 d	0 e	0 e
CIN + AIB	0.5 + 0.1	0c	0 g	0 d	0 e	0 e
	1 + 0.1	0c	0 g	0 d	0 e	0 e
	1.5 + 0.1	4bc	0 g	0 d	4 de	0 e
	2 + 0.1	0c	4 g	0 d	0 e	0 e
	2.5 + 0.1	0c	0 g	0 d	0 e	0 e
	3 + 0.1	0c	0 g	0 d	4 de	0 e
TDZ	0.2	16ab	48 ab	40 a	12 bcde	32 ab
	0.4	16ab	44 abc	20 bc	4 de	20 bcd
	0.6	16ab	32 cde	24 b	20 bcd	40 a
	0.8	4bc	8 fg	0 d	4 de	32 ab
	1	4bc	24 e	12 cd	16 bcde	8 cde
	0.2 + 0.1	16ab	40 bcd	20 bc	44 a	40 a
TDZ + AIB	0.4 + 0.1	4bc	56 a	12 cd	20 bcd	28 ab
	0.6 + 0.1	4bc	44 abc	8 d	12 bcde	24 bc
	0.8 + 0.1	0c	20 ef	20 bc	20 bcd	0 e
	1 + 0.1	4bc	28 de	8 d	28 b	24 bc
TESTIGO	0	0c	4 g	4 d	0 e	0e

Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas al 0.05



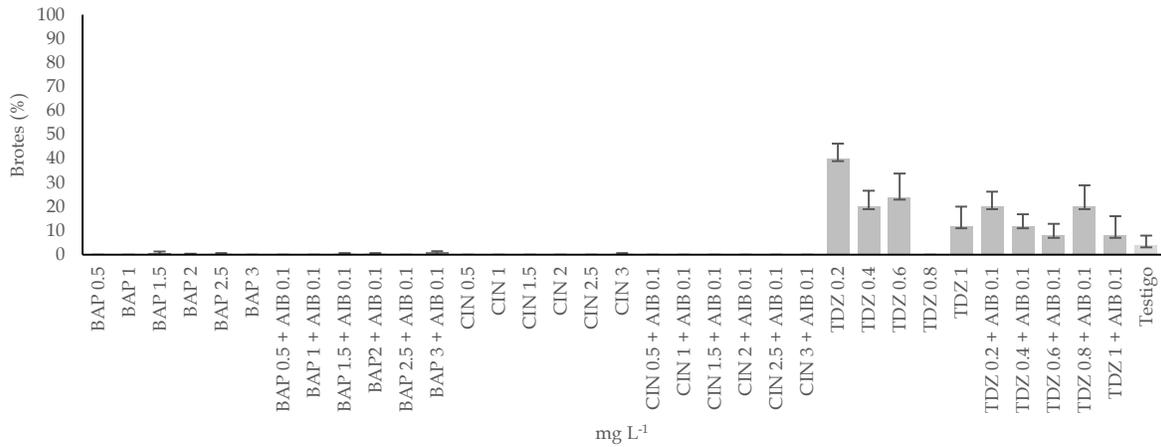
**Figura 7.** Porcentaje de explantes con brotes de frambuesa genotipo ‘C-6’ cultivados *in vitro* tratados con BAP, CIN y TDZ solos o en combinación con AIB, evaluados a los 40 días después de su establecimiento.

El porcentaje de explantes con brotes se vio influido por los reguladores de crecimiento en el genotipo ‘Joan J.’ donde se observaron diferencias estadísticas altamente significativas (Cuadro 9A). En este caso, los reguladores BAP, BAP + AIB, CIN, y CIN + AIB no tuvieron influencia significativa sobre la regeneración de brotes; caso contrario se presentó con el uso de TDZ en el medio de cultivo donde las dosis bajas (0.2 y 0.4 mg L<sup>-1</sup>) indujeron la regeneración en un 48 y 44%, respectivamente; al adicionar AIB en el medio de cultivo (0.4 y 0.6 + 0.1 mg L<sup>-1</sup>) la regeneración aumentó hasta 52 y 40% con respecto al tratamiento testigo (Cuadro 5, Figura 8).

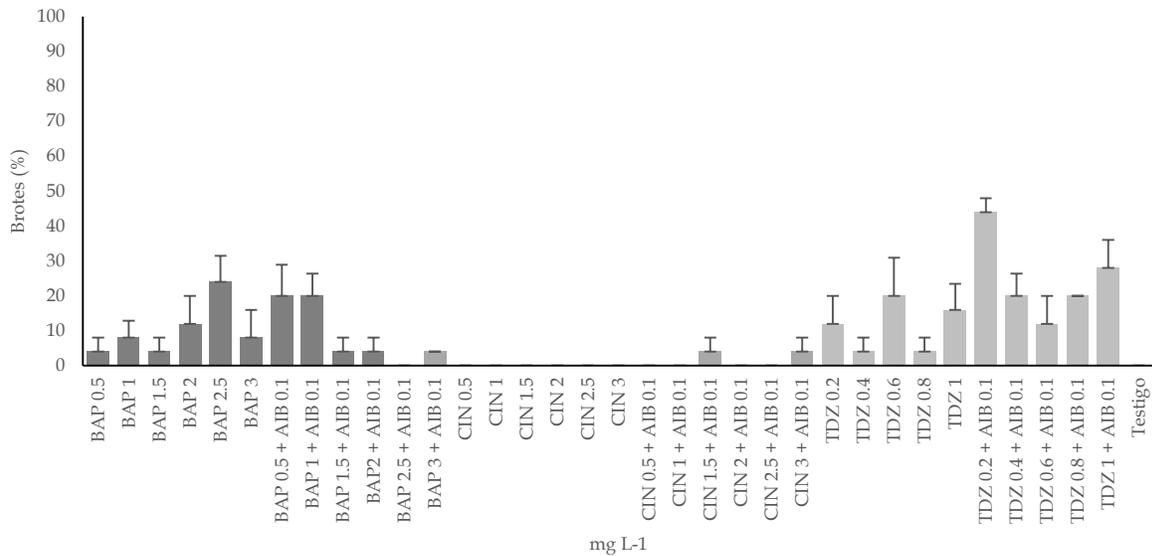


**Figura 8.** Porcentaje de explantes con brotes de frambuesa genotipo ‘Joan J.’ cultivados *in vitro* tratados con BAP, CIN y TDZ solos o en combinación con AIB, evaluados a los 40 días después de su establecimiento.

En el genotipo ‘A-1’ se observaron diferencias estadísticas altamente significativas (Cuadro 10A). Los reguladores de crecimiento BAP, BAP + AIB, CIN, CIN + AIB y TDZ + AIB no ejercieron efecto sobre la inducción de la regeneración a partir de explantes de hoja del genotipo ‘A-1’; sin embargo, el TDZ a una dosis de 0.2 mg L<sup>-1</sup> indujo la regeneración en 40%, con un porcentaje de 36% más que en el tratamiento control (Cuadro 5, Figura 9).



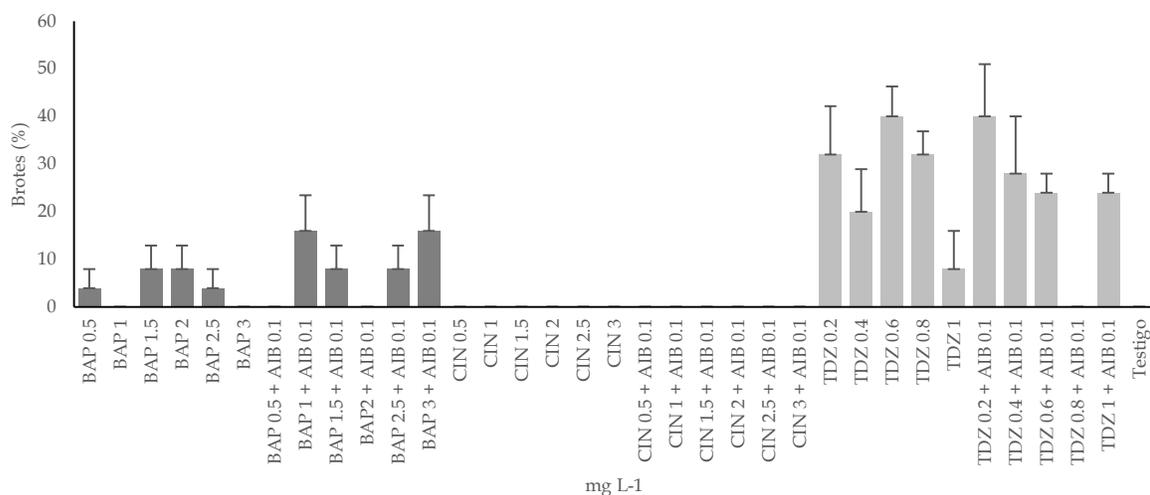
**Figura 9.** Porcentaje de explantes con brotes de frambuesa genotipo ‘A-1’ cultivados *in vitro* tratados con BAP, CIN y TDZ solos o en combinación con AIB, evaluados a los 40 días después de su establecimiento.



**Figura 10.** Porcentaje de explantes con brotes de frambuesa genotipo ‘UMC-702’ cultivados *in vitro* tratados con BAP, CIN y TDZ solos o en combinación con AIB, evaluados a los 40 días después de su establecimiento.

De manera similar ocurrió en el genotipo ‘UMC-702’ donde se obtuvo una diferencia altamente significativa (Apéndice A11). El porcentaje más alto de regeneración (44%) se obtuvo con 0.2 mg L<sup>-1</sup> de TDZ + 0.1 mg L<sup>-1</sup> de AIB. Los reguladores BAP, BAP + AIB, CIN, CIN + AIB y TDZ no presentaron influencia sobre la regeneración de brotes en los explantes de hoja de este genotipo (Cuadro 5, Figura 10).

De manera similar a los otros genotipos evaluados, en el genotipo ‘Her’ se observó diferencia altamente significativa para la variable porcentaje de explantes con brotes (Apéndice 16A); asimismo, se mantuvo la tendencia en cuanto al efecto de los reguladores de crecimiento sobre la regeneración, ya que las dosis y combinaciones de BAP, BAP + AIB, CIN, y CIN + AIB no presentaron influencia sobre la regeneración, mientras que el TDZ solo o en combinación con AIB promovió los porcentajes más altos de regeneración de hasta un 40%, mientras que en el tratamiento control no se logró obtener regeneración (Cuadro 5, Figura 11).



**Figura 11.** Porcentaje de explantes con brotes de frambuesa genotipo ‘Her’ cultivados *in vitro* tratados con BAP, CIN y TDZ solos o en combinación con AIB, evaluados a los 40 días después de su establecimiento.

### 5.3. Efecto de auxinas y citocininas sobre la multiplicación de brotes

Respecto a la variable multiplicación de brotes, se obtuvieron diferencias estadísticas significativas (Cuadro 6) en los 5 genotipos evaluados.

**Cuadro 6.** Efecto de auxinas y citocininas sobre la multiplicación de brotes de frambuesa genotipos: ‘C-6’, ‘Joan J.’, ‘UMC-702’, ‘A-1’ y ‘Her’ cultivados *in vitro*.

Variable	Media	Cuadrado de la media		CV	R <sup>2</sup>
		Tratamientos	Error		
Brotes (CM) cv. ‘C-6’	0.19	0.549552**	0.210743	239.10	0.39
Brotes (CM) cv. ‘Joan J.’	0.26	0.857586**	0.093714	117.48	0.69
Brotes (CM) cv. ‘UMC-702’	0.15	0.282399**	0.046634	139.10	0.60
Brotes (CM) cv. ‘A-1’	0.10	0.158763**	0.030514	175.69	0.56
Brotes (CM) cv. ‘Her’	0.18	0.398292**	0.101942	176.81	0.49

\*p≤0.05; \*\*p≤0.01; ns= no significativo

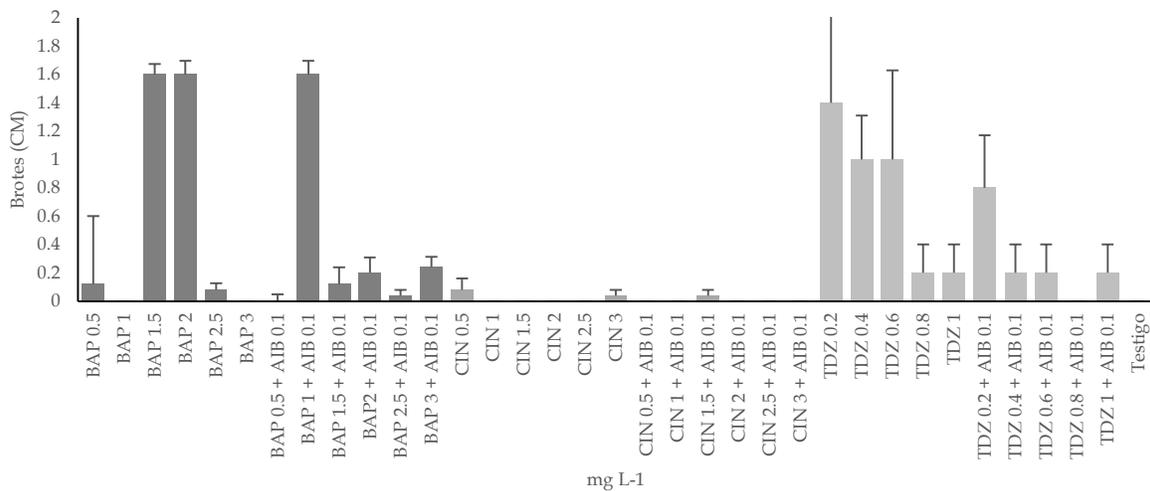
El efecto de los reguladores de crecimiento sobre la multiplicación de los brotes del genotipo ‘C-6’ se vio marcado con el uso de TDZ solo (en dosis de 0.2, 0.4 y 0.6 mg L<sup>-1</sup>) y en combinación con el AIB en dosis de 0.2 + 0.1 mg L<sup>-1</sup>, donde se obtuvieron coeficientes de multiplicación de 1.4, 1, 1 y 0.8 brotes por explantes, respectivamente; esto representó un aumento de hasta 1.4 brotes por explante con respecto al tratamiento testigo. Por otra parte, los reguladores BAP, BAP + AIB, CIN y CIN + AIB no tuvieron efecto en la inducción de la multiplicación de los brotes obtenidos a partir de explantes de hoja del genotipo ‘C-6’ (Cuadro 7, Figura 12).

**Cuadro 7.** Comparación del coeficiente de multiplicación y de los resultados de la prueba de Duncan para brotes obtenidos a partir de explantes de hoja de frambuesa genotipos ‘C-6’, ‘Joan J.’, ‘A-1’, ‘UMC-702’ y ‘Her’ cultivados *in vitro* y tratados con reguladores de crecimiento (BAP, CIN y TDZ) solos o en interacción con AIB.

Regulador de crecimiento	Dosis (mg L <sup>-1</sup> )	‘C-6’	‘JOAN J’	‘A-1’	‘UMC-702’	‘HER’
BAP	0.5	0.12 bc	0.12 d	0 d	0.04 fg	0.04 e
	1	0 c	0.24 cd	0 d	0.18 defg	0 e
	1.5	0.16 bc	0.08 d	0.16 bcd	0.04 fg	0.44 bcde
	2	0.16 bc	0.08 d	0.04 d	0.20 defg	0.08 e
	2.5	0.08 c	0.04 d	0.08 cd	0.6 b	0.04 e
	3	0 c	0.04 d	0 d	0.04 fg	0 e
BAP + AIB	0.5 + 0.1	0.08 c	0.36 cd	0 d	0.24 cdefg	0 e
	1 + 0.1	0.16 bc	0 d	0 d	0.20 defg	0.16 e
	1.5 + 0.1	0.12 bc	0.08 d	0.08 cd	0.04 fg	0.08 e
	2 + 0.1	0.2 bc	0 d	0.08 cd	0.04 fg	0 e
	2.5 + 0.1	0.04 c	0 d	0 d	0 g	0.12 e
	3 + 0.1	0.24 bc	0 d	0.36 b	0.04 fg	0.2 e
CIN	0.5	0.08 c	0 d	0 d	0 g	0 e
	1	0 c	0 d	0 d	0 g	0 e
	1.5	0 c	0 d	0 d	0 g	0 e
	2	0 c	0 d	0 d	0 g	0 e
	2.5	0 c	0 d	0 d	0 g	0 e
	3	0.04 c	0 d	0.08 cd	0 g	0 e
CIN + AIB	0.5 + 0.1	0 c	0 d	0 d	0 g	0 e
	1 + 0.1	0 c	0 d	0 d	0 g	0 e
	1.5 + 0.1	0.04 c	0 d	0 d	0.04 fg	0 e
	2 + 0.1	0 c	0.04 d	0 d	0 g	0 e
	2.5 + 0.1	0 c	0 d	0 d	0 g	0 e
	3 + 0.1	0 c	0 d	0 d	0.04 fg	0 e
TDZ	0.2	1.4 a	1.12 a	0.92 a	0.37 bcde	0.84 ab
	0.4	1 a	1 ab	0.24 bcd	0.04 fg	0.32 de
	0.6	1 a	0.88 ab	0.36 b	0.36 cdef	0.8 abc
	0.8	0.2 bc	0.08 d	0 d	0.08 efg	0.68 abcd
	1	0.2 bc	0.4 cd	0.16 bcd	0.2 defg	0.28 de
	TDZ + AIB	0.2 + 0.1	0.8 ab	1.24 a	0.32 bc	1.12 a
0.4 + 0.1		0.2 bc	1.2 a	0.12 bcd	0.4 bcd	0.68 abcd
0.6 + 0.1		0.2 bc	1.6 a	0.12 bcd	0.16 defg	0.36 cde
0.8 + 0.1		0 c	0.32 cd	0.2 bcd	0.44 bcd	0 e
1 + 0.1		0.2 bc	0.6 bc	0.08 cd	0.52 bc	0.24 de
TESTIGO	0	0 c	0.04 d	0.08 cd	0 g	0 e

Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas al 0.05

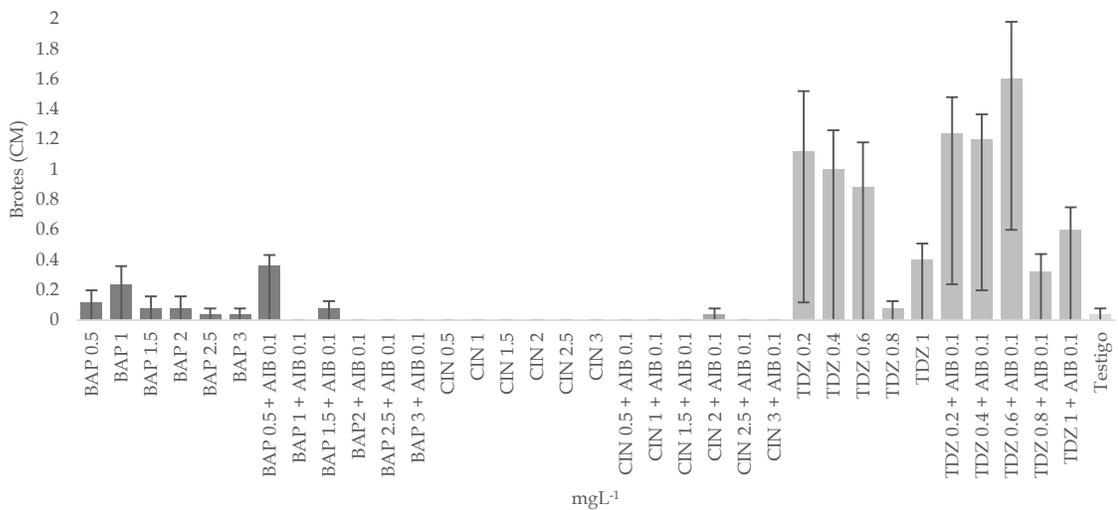
En el genotipo ‘Joan J.’ se observó diferencia estadísticamente significativa para la variable coeficiente de multiplicación; sin embargo, los reguladores de crecimiento BAP, BAP + AIB, CIN, CIN + AIB adicionados al medio de cultivo para los explantes no mostraron efecto sobre la inducción de la multiplicación de brotes, mientras que el TDZ solo o en combinación con AIB aplicados en dosis bajas (0.2, 0.4, 0.6; 0.2, 0.4 y 0.6 + 0.1 m gL<sup>-1</sup>) indujo la multiplicación de los brotes en los explantes de este genotipo y se obtuvieron hasta 1.6 brotes por explante, 1.56 brotes más que en los explantes del tratamiento testigo (Cuadro 7, Figura 14).



**Figura 12.** Coeficiente de multiplicación de brotes a partir de explantes de frambuesa genotipo ‘C-6’ cultivados *in vitro* tratados con BAP, CIN y TDZ solos o en combinación con AIB, evaluados a los 40 días después de su establecimiento.



**Figura 13.** Proceso de regeneración *in vitro* de frambuesa genotipo ‘C-6’. A) plantas madres para la extracción del material vegetal, B) explantes foliares en medio MS más AIB y BAP, C) brotes nuevos y explantes oxidados, y D) plantas regeneradas.



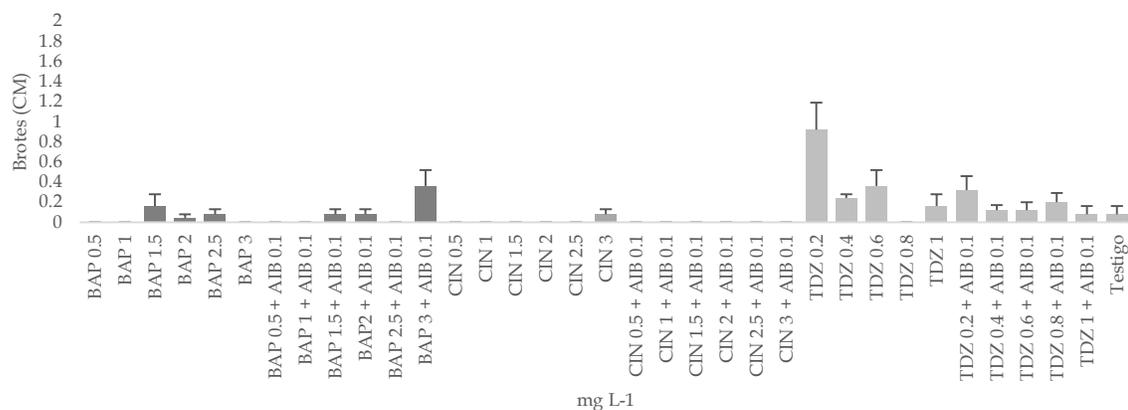
**Figura 14.** Coeficiente de multiplicación de brotes a partir de explantes de frambuesa genotipo ‘Joan J.’ cultivados *in vitro* tratados con BAP, CIN y TDZ solos o en combinación con AIB, evaluados a los 40 días después de su establecimiento.



**Figura 15.** Explantes de frambuesa genotipo ‘Joan J.’ con brotes adventicios. A) explantes tratados con  $0.2 \text{ mg L}^{-1}$  de TDZ, B) explantes tratados con  $0.6 \text{ mg L}^{-1}$  de TDZ +  $0.1 \text{ mg L}^{-1}$  de AIB, C) formación de brotes en la parte abaxial del explante, y D) planta regenerada.

Para la variable coeficiente de multiplicación en el genotipo ‘A-1’ se observó diferencia estadísticamente significativa (Cuadro 14A). En este caso, los reguladores de crecimiento BAP, BAP + AIB, CIN, CIN + AIB y TDZ + AIB adicionados al medio de cultivo no mostraron efecto sobre la inducción de la multiplicación de los brotes. Los explantes cultivados en presencia de TDZ en dosis de  $0.2 \text{ mg L}^{-1}$  presentaron el coeficiente de multiplicación más alto con 0.92 brotes por explante, los cuales fueron 0.84 más brotes con respecto al tratamiento testigo (Cuadro 7, Figura 16).

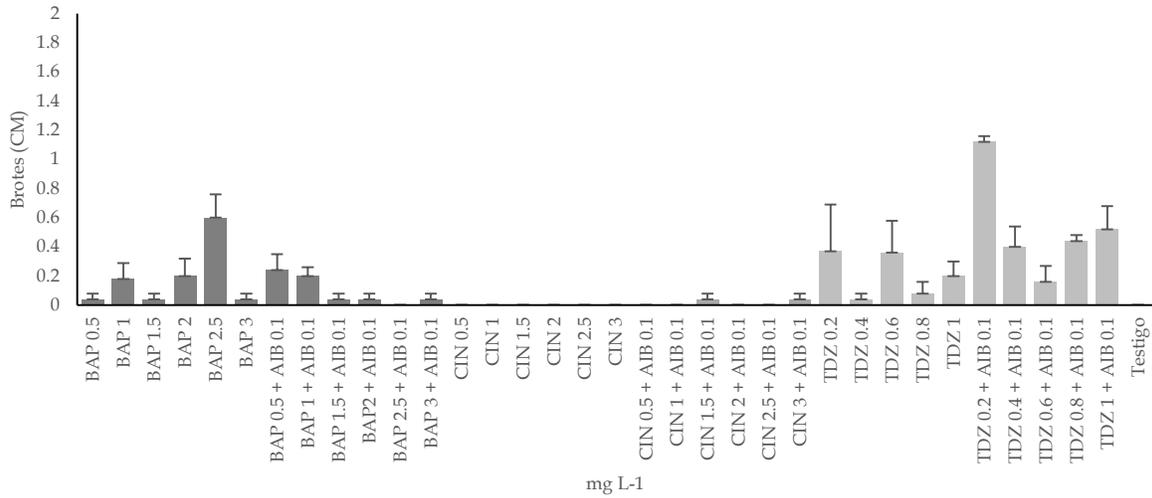
El genotipo ‘UMC-702’ mostró diferencia significativa para la variable coeficiente de multiplicación (CM) (Cuadro 16A). El coeficiente de multiplicación fue de 1.12 brotes por explante con la dosis  $0.2 \text{ mg L}^{-1}$  de TDZ +  $0.1 \text{ mg L}^{-1}$  de AIB. Con respecto a los reguladores BAP, BAP + AIB, CIN, CIN + AIB, y TDZ solo, no presentaron efecto sobre la multiplicación de los brotes a partir de explantes de hojas en este genotipo; asimismo, sucedió con el tratamiento testigo donde el coeficiente de multiplicación fue igual a 0 (Cuadro 7, Figura 18). Por otro lado, el uso de CIN en el medio de cultivo promovió la formación de raíces a los 15 días del establecimiento de los explantes (Figura 17), contrario a lo observado con los otros genotipos y reguladores evaluados en esta investigación; sin embargo, 22 días después de su establecimiento los explantes presentaron oxidación y murieron.



**Figura 16.** Coeficiente de multiplicación de brotes a partir de explantes de frambuesa genotipo ‘A-1’ cultivados *in vitro* tratados con BAP, CIN y TDZ solos o en combinación con AIB, evaluados a los 40 días después de su establecimiento.



**Figura 17.** Regeneración de frambuesa genotipo ‘A-1’. A) establecimiento de los explantes, B) brotes adventicios inducidos con TDZ 0.2 mg L<sup>-1</sup>, y C) brotes adventicios inducidos con TDZ 0.6 mg L<sup>-1</sup>.



**Figura 18.** Coeficiente de multiplicación de brotes a partir de explantes de frambuesa genotipo ‘UMC-702’ cultivados *in vitro* tratados con BAP, CIN y TDZ solos o en combinación con AIB, evaluados a los 40 días después de su establecimiento.

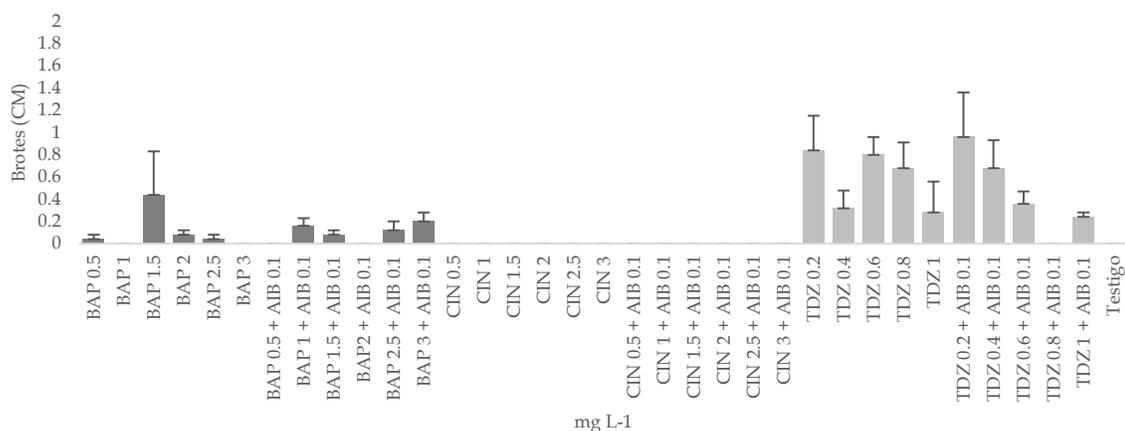


**Figura 19.** Explantes de frambuesa genotipo ‘UMC-702’ tratados con CIN con formación de raíces adventicias a los 15 días después de su establecimiento.



**Figura 20.** Formación y desarrollo de brotes adventicios en explantes de frambuesa genotipo ‘UMC-702’ tratados con TDZ (A-E).

En el genotipo ‘Her’ se observaron diferencias estadísticamente significativas en el coeficiente de multiplicación (Cuadro 17A). En este cultivar se obtuvo un coeficiente máximo de 0.84, 0.8 y 0.68 brotes por explante con la adición de TDZ 0.2, 0.6, 0.8 mg L<sup>-1</sup> y 0.96 y 0.68 brotes por explante con 0.2 o 0.4 + 0.1 mg L<sup>-1</sup> de TDZ y AIB, respectivamente, al medio de cultivo, mientras que con los reguladores BAP, BAP + AIB, CIN, CIN + AIB no se indujo la multiplicación de los brotes obtenidos a partir de explantes de hoja de este genotipo (Cuadro 7, Figura 21).



**Figura 21.** Coeficiente de multiplicación de brotes a partir de explantes de frambuesa genotipo ‘Her’ cultivados *in vitro* tratados con BAP, CIN y TDZ solos o en combinación con AIB, evaluados a los 40 días después de su establecimiento.



**Figura 22.** Formación de brotes adventicios de frambuesa genotipo ‘Her’ cultivados *in vitro* tratados con TDZ (A-C).

## 5.4 Descripción morfológica

### Planta de frambuesa llamada ‘UMC-702’

Nombre latino: *Rubus idaeus* L.

#### Resumen

Genotipo avanzado de frambuesa que se distingue por ser primocaña, tiene un color de fruta favorable y polidrupa aromática, grande y firme.

#### Antecedentes de la selección

La presente es genotipo avanzado de frambuesa roja botánicamente conocida como *Rubus idaeus* L., y en lo sucesivo denominado por el nombre de ‘UMC-702’.

‘UMC-702’ se obtuvo a partir de una polinización abierta del progenitor femenino ‘UMC-8’ y del progenitor masculino ‘C-5’ (No registrados).

Esta selección se obtuvo en Uruapan, Michoacán, México y ha sido reproducida asexualmente repetidamente mediante cultivo *in vitro* y por estacas de raíz.

Se ha observado que la mencionada selección conserva sus características distintivas a través de sucesivas propagaciones asexuales.

#### Sumario de la selección ‘UMC-702’

Las siguientes son las más destacadas y diferenciadas características de la selección cuando se cultivan en condiciones de invernadero en Uruapan, Michoacán.

Planta de frambuesa de primocaña.

Sabor y color de fruta favorables.

#### Descripción de fotografías

Esta planta de frambuesa está ilustrada por fotografías; los colores mostrados son tan fieles como fue posible. Las fotografías son de plantas que tienen 2 años.

Figura 22A. Densidad y color de espinas (marrón violáceo).

Figura 22B. Hoja completa, muestra color del haz (5Ey 5/10)

Figura 22C. Hoja completa, muestra color del envés (7, 5Ey 7/4)

Figura 22D. Densidad de espinas en el peciolo.

#### Descripción de la selección

La siguiente descripción establece el distintivo característico de 'UMC-702'. Los datos que definen estos caracteres se recolectaron de plantas establecidas en Uruapan, Michoacán.

Las plantas fueron cultivadas durante 2 años en condiciones de invernadero. Las referencias de color son principalmente de la Carta de colores de la Royal Horticultural Society of London (R.H.S.) (edición de 2001) y la tabla de Munsell.

#### Descripción botánica detallada

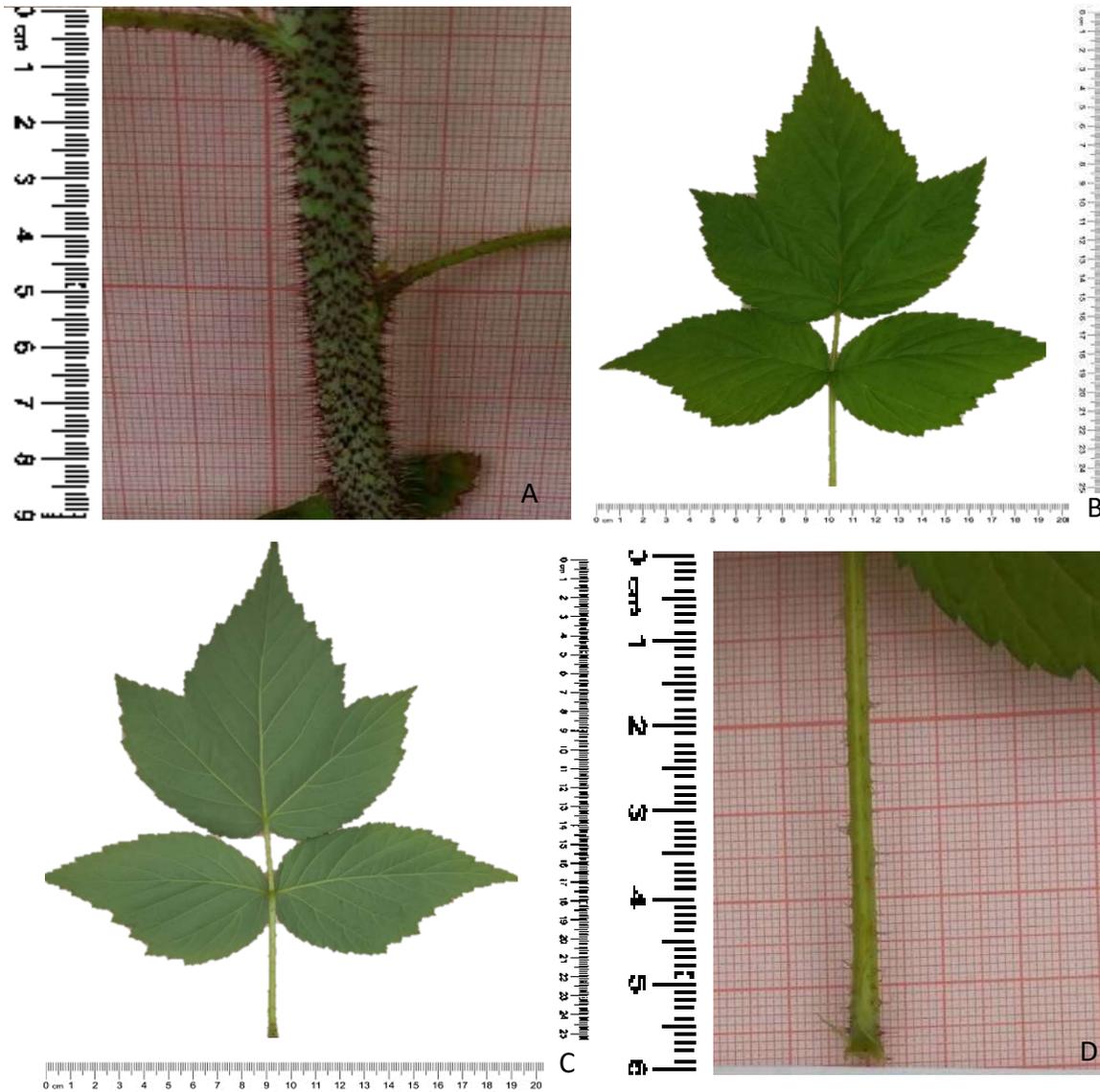
Clasificación:	Longitud: 20 mm
Familia Rosaceae	Ancho en la base: pequeña 1.6 mm
Nombre botánico: <i>Rubus idaeus</i> L.	Largo: medio
Nombre común: Frambuesa	Color: marrón violáceo
Genealogía: Cruce de parental femenino 'UMC-8' (no registrado) y la selección 'C-5' (no registrada).	Hojas: Compuestas de 3 a 5 folíolos libres y solapados
Planta: Propagación <i>in vitro</i>	Longitud de hoja: 20 cm
Autofértil	Ancho de hoja: 19 cm
Primocaña	Forma del folíolo principal: palmeada
Color de cañas: verde-amarillo 5Gy 7/8	Color de hojas y superficie superior: 5Ey 5/10
Presencia de espinas: Delgada y densa	Superficie inferior: 7,5 Ey 7/4
Longitud: 0.65 m	Longitud del peciolo: 6 cm
Diámetro: 6.6 cm	Diámetro: 2.4 mm
Textura: suberosa	Color: 2.5 Ey 8/4
Longitud del internodo: 3-7 cm	Estípulas:
Espinas:	Cantidad por hoja: 2
Número de espinas en el brote principal: 40 por cm	Longitud de la base: 0.2 mm
Forma: cónica	Color: 2.5 Gy 6/10

#### Comparación con padres y cultivares comerciales

La selección 'UMC-702' se distingue de la variedad 'Heritage' en las siguientes características:

- 'Heritage': Color de las cañas gris violáceo
- 'UMC-702': Color de cañas verde-amarillo

- ‘Heritage’: color del peciolo rojo-grisáceo 181B a 181A
- ‘UMC-702’: Color del peciolo verde 2.5 Ey 8/4



**Figura 23.** Características principales de una planta de frambuesa selección ‘UMC-702’. A) densidad y color de espinas (marrón violáceo), B) hoja completa, muestra color del haz (5Ey 5/10), C) hoja completa, muestra color del envés (7, 5Ey 7/4), y D) densidad de espinas en el peciolo.

## Planta de frambuesa llamada 'C-6'

Nombre latino: *Rubus idaeus* L.

### Resumen

Genotipo avanzado de frambuesa que se distingue por ser primocaña, tiene un color de fruta favorable y polidrupa aromática, grande y firme.

### Antecedentes de la selección

La presente es una selección avanzada de frambuesa roja botánicamente conocida como *Rubus idaeus* L., y en lo sucesivo denominado por el nombre de 'C-6'.

'C-6' es proveniente de los progenitores 'UMC-10' y 'UMC-15' (selecciones no registradas).

Esta selección se obtuvo en Uruapan, Michoacán, México y ha sido reproducida asexualmente repetidamente mediante cultivo *in vitro* y por estacas de raíz.

Se ha observado que la mencionada selección conserva sus características distintivas a través de sucesivas propagaciones asexuales.

### Sumario de la selección 'C-6'

Las siguientes son las más destacadas y diferenciadas características de la selección cuando se cultivan en condiciones de invernadero en Uruapan, Michoacán.

Planta de frambuesa de primocaña.

Sabor y color de fruta favorables

### Descripción de fotografías

Esta planta de frambuesa está ilustrada por fotografías; los colores mostrados son tan fieles como fue posible. Las fotografías son de plantas que tienen 2 años.

Figura 23 A. Muestra color verde y densidad de espinas baja.

Figura 23B. Hoja completa, muestra color del haz 5GY 5/6 y forma de la hoja palmeada.

Figura 23C. Hoja completa, muestra color del envés 2.5 GY 6/2.

Figura 23. Densidad de espinas del peciolo.

### Descripción de la selección

La siguiente descripción establece el distintivo característico de 'C-6'. Los datos que definen estos caracteres se recolectaron de plantas establecidas en Uruapan, Michoacán.

Las plantas fueron cultivadas durante 2 años en condiciones de invernadero. Las referencias de color son principalmente de la Carta de colores de la Royal Horticultural Society of London (R.H.S.) (edición de 2001) y la tabla de Munsell.

#### Descripción botánica detallada

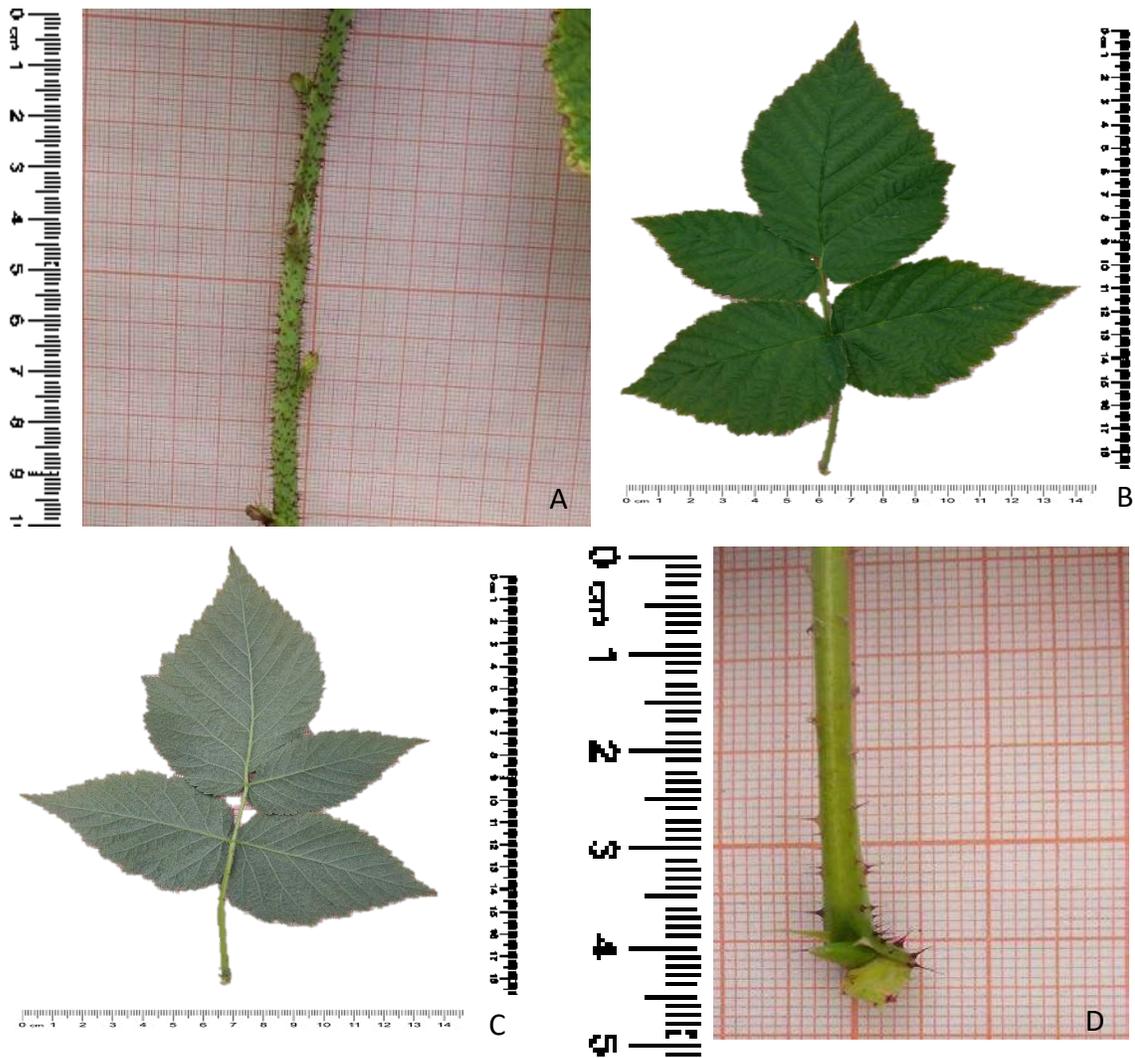
Clasificación:	Color de la rama lateral fructífera: verde amarillo 5GY 7/6
Familia Rosaceae	Espinas:
Nombre botánico: <i>Rubus idaeus</i> L.	Numero de espinas en el brote principal: 112 por cm
Nombre común: Frambuesa	Color: marrón violáceo
Genealogía: Cruce del parental femenino ‘UMC-10’ (no registrado) y la selección ‘UMC-15’ (no registrada).	Hojas:
Planta: Propagación <i>in vitro</i>	Compuestas con 3 y 5 foliolos libres
Autofértil	Longitud de hoja: 32.35 cm
Primocaña	Ancho de hoja: 18.4 cm
Color de cañas: verde-amarillo 5GY 7/6	Forma del foliolo principal: palmeada
Presencia de espinas: delgadas y densas	Color de hojas y superficie superior: 5GY 5/6
Longitud: 84.5 cm	Superficie inferior: 2.5 GY 6/2
Diámetro: 6.0 mm	Longitud del peciolo: 6.5 cm
Textura: Firme	Diámetro: 0.4cm
Longitud del internodo: 3.0 cm	Color peciolo: 5GY 7/8
Ramas laterales:	Estípulas:
Numero de ramas laterales fructíferas por planta: 5	Cantidad por hoja: 2
Longitud de la rama fructífera: 48 cm	Longitud: 6.0 mm
Diámetro de la rama lateral fructífera: 4.0 mm	Color: 2.5 GY 7/
Textura de las ramas laterales fructíferas: firme	

#### COMPARACIÓN CON PADRES Y CULTIVARES COMERCIALES

La selección ‘C-6’ se distingue con la variedad ‘Adelita’ en las siguientes características:

- ‘Adelita’ Color de espinas rojo-medio

- ‘C-6’: Color de espinas marrón violáceo
- ‘Adelita’: Longitud de hoja 28 cm
- C-6: Longitud de hoja 32.35 cm
- ‘Adelita’: ancho de la hoja 20.5 cm
- ‘C-6’: Ancho de la hoja 18.4 cm



**Figura 24.** Características principales de una planta de frambuesa selección ‘C-6’. A) densidad y color de espinas, muestra color verde y densidad de espinas baja, B) hoja completa, muestra color del haz 5GY 5/6 y forma de la hoja palmeada, C) hoja completa, muestra color del envés 2.5 GY 6/2, y D) densidad de espinas del peciolo.

## VI. DISCUSIÓN

### Oxidación

Los resultados obtenidos en nuestra investigación demuestran un marcado efecto de la oxidación sobre la sobrevivencia de los explantes de hojas de todos los genotipos de frambuesa estudiados; asimismo, se observa que los reguladores de crecimiento pueden aumentar o disminuir la oxidación, y, por ende, la sobrevivencia de los mismos. Durante el cultivo *in vitro* de plantas, especialmente leñosas, existe una limitación debida a la ocurrencia de oscurecimientos letales en los explantes y en el medio de cultivo (George, 1996); éstos se encuentran estrechamente relacionados con el estrés oxidativo (Turrens, 2003) que puede originarse a partir de los cortes que sufre el explante, la composición del medio de cultivo, el volumen y la capacidad del frasco de cultivo (Abdelwahd *et al.*, 2008). El control de la oxidación causada por fenolización es crucial para el éxito en la regeneración, ya que una vez que se desencadenan las reacciones de oxidación de fenoles en los tejidos dañados, este proceso se hace irreversible, lo cual lleva a una pérdida significativa de la calidad y viabilidad de los explantes (Perl *et al.*, 1996); no obstante, las especies reactivas de oxígeno o ROS cumplen una doble función dentro de los tejidos aunque bien pudieran ser tóxicas para éstos también pueden acelerar el proceso de regeneración.

La oxidación de los explantes se debe a la acción de las enzimas oxidasas y tirosinasas que se liberan al herirse los tejidos (Jacinto, 2018); éstas actúan sobre los polifenoles oxidándolos a quinonas que son fitotóxicas y las cuales, al polimerizarse, afectan a las proteínas y, en consecuencia, inhiben el crecimiento y la viabilidad de los explantes (Read y Economou, 1987). La síntesis de los precursores de fenoles es más activa y compleja en los tejidos maduros que en los jóvenes y se vé directamente influida por el contenido de sales y reguladores del crecimiento en el medio de cultivo (Muhitch y Fleycher, 1985).

Para contrarrestar la oxidación, se recomienda, según Jacinto (2018), adicionar antioxidantes al medio de cultivo como son el ácido ascórbico, ácido cítrico y/o adsorbentes como el carbón activado, realizar cambios de medio de cultivo cada vez que se observe fenolización o con una frecuencia regular; otra alternativa es mantener el tejido en oscuridad en la cámara de crecimiento por 15 días (Restrepo *et al.*, 2018), así como el tratamiento con bajas temperaturas o choque térmico (Méndez Álvarez y Abdelnour-Esquivel, 2014).

En esta investigación el uso del ácido ascórbico adicionado al medio de cultivo fue una de las alternativas empleadas para reducir la oxidación en los explantes, así como la incubación de los tejidos en el cuarto de crecimiento bajo condiciones de oscuridad durante 8 días; sin embargo, se observó que el uso de reguladores de crecimiento adicionados al medio de cultivo tuvo influencia sobre este fenómeno, ya que para los cinco genotipos evaluados se pudo notar de manera general una disminución de la oxidación con el uso de TDZ solo o en combinación con el AIB, mientras que el uso de BAP y CIN presentó efecto sobre esta variable únicamente para ciertos genotipos. En este sentido, Wang *et al.* (2019b), obtuvieron un porcentaje alto de explantes sobrevivientes a la oxidación, así como regenerantes con el uso de thidiazuron en el medio de cultivo y 14 días de cultivo bajo condiciones de oscuridad en explantes foliares de *Fragaria vesca*.

Los resultados obtenidos en la presente investigación concuerdan con lo establecido por Graham *et al.* (1997), quienes indicaron que la regeneración de las plantas es altamente dependiente del genotipo, ya que los protocolos de regeneración solo se han obtenido para pocas selecciones y/o genotipos donde la recalcitrancia de los tejidos de *Rubus* es uno de los factores que ha impedido la regeneración *in vitro* (Millan y Graham, 1999; Palomo-Ríos *et al.*, 2018). Asimismo, Zawadzka y Orlikowska (2006) observaron que los genotipos de frambuesa mostraron *in vitro* hojas cloróticas y recalcitrantes a la regeneración. El estrés oxidativo y el oscurecimiento de los explantes puede ser atribuido al uso de reguladores del crecimiento, la citocinina BAP adicionada al medio de cultivo es uno de los reguladores con más reportes de este efecto (George, 1996; Azofeia *et al.*, 2009). En esta investigación, la reducción de la oxidación de los explantes de frambuesa puede ser atribuida al uso de los reguladores de crecimiento; según Joyce *et al.*, (2003), las combinaciones y niveles de fitohormonas suministradas exógenamente pueden conducir al estrés a diversas respuestas. Las ROS asociadas con estas tensiones, influyen en el metabolismo de las hormonas vegetales, ya que como las fitohormonas están involucradas en las vías de señalización con la mediación de las respuestas al estrés, entonces los desequilibrios de las hormonas provocarían una interrupción de los procesos reguladores. En este sentido, el uso de la vitamina C en el medio de cultivo también influye, pues, según Paciolla *et al.* (2019), ésta es un excelente eliminador de radicales libres, ya que posee la capacidad para donar reductores equivalentes. Además, la incubación en condiciones de oscuridad reduce la oxidación de compuestos fenólicos que

pueden ser altamente tóxicos para los tejidos de la planta (George, 1993), aunque, por otro lado, Vijendra *et al.* (2017) mencionan que el estrés oxidativo tiene participación en el proceso de regeneración de las plantas. De cualquier manera, la inconsistencia en el oscurecimiento de los explantes con el uso de un mismo regulador en distintas especies o genotipos de una misma especie se deben, según Van Staden *et al.*, (2006), a las diferencias genéticas de los materiales.

### **Regeneración y multiplicación de brotes**

Los protocolos de regeneración en “berries” deben ser específicos para cada genotipo; esto se logra con la aplicación de las dosis y combinaciones de los reguladores de crecimiento exógenos correctos (auxinas y citocininas) adicionados al medio de cultivo (Cappelletti *et al.*, 2016). La morfogénesis *in vitro* es afectada por diversos factores tales como el tipo de explante, genotipo, edad, posición y orientación del explante en el medio de cultivo (Kumar y Reddy, 2011). Debido a que la regeneración de las plantas es altamente genotipo-dependiente, los protocolos de regeneración solo se han desarrollado para algunos genotipos de frambuesa puesto que no es aplicable a un gran rango de los mismos (Graham *et al.*, 1997).

En esta investigación se observó que el uso de los reguladores de crecimiento influyó sobre la regeneración, pero, los resultados obtenidos indican que cada genotipo tuvo una capacidad de respuesta distinta; así, el uso de BAP y BAP + AIB fue favorable para la inducción de la regeneración en el genotipo ‘C-6’, mientras que en el resto de los genotipos evaluados estos reguladores no mostraron efecto en la inducción de la regeneración. Estos resultados concuerdan con lo obtenido por Meng *et al.*, (2004) donde el uso de BAP (5  $\mu\text{M}$ ) + AIB 0.5 ( $\mu\text{M}$ ) en frambuesa del cv. ‘Marion’ indujeron la regeneración en un 70%, mientras que en el cultivar ‘Sunberry’ se observó un 46% con BAP 2 ( $\text{mg L}^{-1}$ ) + AIB 0.1 ( $\text{mg L}^{-1}$ ) (McNicol y Graham, 1990) y en el cultivar ‘Autumn Bliss’ se obtuvo 25% de regeneración a partir de explantes de hojas al utilizar BAP 10  $\mu\text{M}$  + AIB 2.5  $\mu\text{M}$  en el medio de cultivo, pero cuando se incrementó la dosis a 20  $\mu\text{M}$  de BAP se inhibió la regeneración (Mezzetti *et al.*, 1997). Asimismo, Gupta y Mahalaxmi, (2009) obtuvieron resultados no significativos en la regeneración al adicionar BAP (0.5, 1.0, 1.5, 2.0  $\text{mg L}^{-1}$ ) solo o en combinación con AIB (0.01  $\text{mg L}^{-1}$ ) en el medio de cultivo en el cv. Satin. A propósito del uso de BAP en la regeneración, Kim y Dai (2020) obtuvieron en el genotipo ‘Joan J.’ un porcentaje de regeneración del 70%

con 2.5  $\mu\text{M}$  de BAP + 1.0  $\mu\text{M}$  de TDZ en el medio de cultivo. Hasta el momento, el reporte del efecto de la combinación de dos citocininas sobre la regeneración de frambuesa solo se había realizado por Kalai *et al.* (2009) donde en especies del género *Rubus* se tuvo éxito en la regeneración al utilizar BAP 3 ( $\text{mg L}^{-1}$ ) + TDZ 0.2 ( $\text{mg L}^{-1}$ ) + IBA 0.2 ( $\text{mg L}^{-1}$ ), ya que regularmente los procesos morfogénicos se regulan en primera instancia por las citocininas, las cuales actúan sobre la zona central de los explantes y posteriormente intervienen las auxinas en el proceso sobre las células periféricas del explante (Schaller *et al.*, 2015). Sin embargo, Bairú *et al.*, 2007 mencionan que de manera general la combinación de BAP con TDZ fomenta la proliferación a medida que se acelera la multiplicación de brotes nuevos. Bustillo-Avendaño *et al.*, (2018) mencionan que el efecto de las citocininas sobre la regeneración se puede atribuir a que éstas actúan como un activador positivo de la división celular; BAP pertenece a este grupo, que son las hormonas clave para la inducción de brotes en diversos tejidos y órganos (Howell *et al.*, 2008). La combinación de BAP con AIB contribuye a mejorar la proliferación posiblemente debido a un equilibrio entre citocininas/auxinas porque cuando se combinan las auxinas y las citocininas actúan en sinergismo y están involucradas en la regulación de la expresión de genes del ciclo celular y su progresión (Kulaeva, 1980; Del Pozo *et al.*, 2005). Con esto se da inicio a los tejidos a partir de divisiones celulares después de 48 h de cultivo en un medio nutritivo donde cada mitosis es seguida rápidamente por una división mayor dando así paso a la promoción de crecimiento de callos, suspensión de células y órganos, así como la regulación de la morfogénesis con la formación de primordios adventicios (Broertjes *et al.*, 1976; Armstrong, 1994). Al respecto del uso del AIB en el medio de cultivo, éste suele utilizarse más debido a su estabilidad en solución en comparación con el AIA, esto es, 75% menos alteraciones después de 30 días en oscuridad y 40% menos después de 30 días en la luz (Dun lap *et al.*, 1986). Por otro lado, la citocinina que generalmente se utiliza durante el cultivo *in vitro* para especies leñosas en la inducción de la multiplicación es el BAP, puesto que las plantas leñosas poseen una mayor carga hormonal endógena en comparación con las plantas herbáceas (Schmülling, 2004); asimismo, tiene gran eficacia y es asequible (Bairú *et al.*, 2007), y cuando se utiliza en tejidos jóvenes el potencial morfogénico para la diferenciación se incrementa (Mazumdar *et al.*, 2020).

En cuanto al efecto de las CIN, en esta investigación se observó un efecto inhibitorio sobre los procesos de regeneración en todos los genotipos evaluados, caso contrario a lo reportado por Meng *et al.*, (2004) quienes obtuvieron 40% de regeneración al adicionar CIN (5  $\mu$ M) + AIB 0.5 ( $\mu$ M) sobre el cv. 'Marion'. De la misma manera, Alliona *et al.*, (2009) reportaron el efecto de las concentraciones altas de auxinas con CIN sobre la inducción de la caulogénesis en los cultivares Opa y Cayuga de frambuesa, ya que las citocininas como 6-BAP y CIN estimulan la división celular y la propagación vegetativa (Taiz y Zeiger, 2010). Sin embargo, los resultados obtenidos por Millán-Soto *et al.*, (2019) muestran que la CIN se asocia más con la elongación celular, ya que su uso en espárrago tuvo efecto solo después del uso de BAP el cual indujo la multiplicación de brotes, mientras que en chíá la CIN indujo la formación de brotes, aunque también tuvo un efecto significativo sobre la longitud de los mismos (Crespo-Rosas *et al.*, 2019). Por otra parte, en la planta medicinal *Scopari dulcis* se observó que la inducción de los brotes fue favorecida por la combinación citocinina-citocinina (BAP + CIN) (Premkumar *et al.*, 2011). Los reguladores empleados actúan sobre el proceso morfogénico, provocan variaciones en las respuestas de desarrollo y los cambios en respuesta pueden atribuirse a cambios en la sensibilidad del tejido (Gaspar *et al.*, 2003), ya que las células son receptivas ante un estímulo morfogénico y existe una relación directa con el tipo, concentración y combinación de reguladores de crecimiento agregados al medio de cultivo y el órgano a desarrollar (Radice, 2010). La señalización a través de los receptores de las plantas es fundamental para que las células puedan comunicarse entre sí e interactuar con el medio ambiente (Geldner y Robatzek, 2008).

En todo proceso morfogénico, el número de brotes producido está determinado genéticamente y se considera el principal indicador del potencial de multiplicación de una especie; la cantidad de brotes refleja el número de plantas potenciales adultas (Téllez-Román *et al.*, 2017). Sin embargo, según Bhojwani y Razdan, (1996) éste se puede optimizar sustancialmente con la adición en el medio de cultivo de concentraciones apropiadas de citocininas con o sin auxina. En este sentido, en la presente investigación, la adición de TDZ al medio de cultivo provocó un efecto estimulante sobre la regeneración de brotes en los genotipos 'Joan J.' y 'A-1', lo cual concuerda con los resultados obtenidos por Fiola *et al.*, (1990) quienes obtuvieron significativamente más eficacia con thidiazuron que con BAP para inducir organogénesis en cotiledones y hojas de *Rubus*, la dosis óptima en explantes de hoja

fue de 5-20  $\mu\text{M}$ ; esto ocurrió de manera similar en la formación de brotes a partir de yemas axilares y brotes apicales en blackberry donde concentraciones de 0.25, 0.5, 0.75 y 1  $\text{mg L}^{-1}$  lograron porcentajes de regeneración de 60, 70, 100, 80 y 75%, respectivamente (Jadán *et al.*, 2015). En los cv. ‘Autumn Bliss’, ‘Canby’, ‘Summit’ y ‘Sentry’ de frambuesa se observó que el TDZ fue significativamente más efectivo que BAP, el medio adicionado con 1  $\mu\text{M}$  de TDZ indujo los porcentajes más altos de regeneración en hojas (Turk, 1994); en “blackberry” se logró el 41.66% de regeneración al adicionar TDZ al medio de cultivo (Lazic y Ruzic, 2007). Cousineau y Donnelly (1991) obtuvieron 70% de regeneración en el cv. ‘Comet’ (*Rubus idaeus* L.) y un coeficiente de multiplicación de 3.7 brotes por explante al utilizar 1-2  $\text{mg L}^{-1}$  de TDZ con 0.5-1  $\text{mg L}^{-1}$  de AIB, mientras que con BAP y AIB se logró solo el 50% de regeneración y un coeficiente de multiplicación de 1.8 brotes por explante. Debnath *et al.*, (2014) reportaron un 70% de regeneración al adicionar al medio de cultivo 4.5  $\mu\text{M}$  de TDZ con 4.2 brotes por explante y un coeficiente de multiplicación de 1.7 en un sistema de biorreactores, y al aumentar la dosis a 5  $\mu\text{M}$  se obtuvo un porcentaje de regeneración de 96% en el cv. ‘MD-ETC E-1’ (Hassan *et al.*, 1993), mientras que en el cv. ‘Satin’ (blackberry) se logró un 97% de regeneración y 17.3 brotes por hoja al adicionar 0.02  $\text{mg L}^{-1}$  de TDZ al medio de cultivo (Gupta y Mahalaxmi, 2009).

Las citocininas poseen la capacidad de inducir la proliferación y división celular, permiten estimular el desarrollo morfogénico y la producción de brotes (Alcantara *et al.*, 2019). El TDZ es una fenilurea que induce altamente la actividad morfogénica en los tejidos de hojas (Passey *et al.*, 2003), ya que estimula compuestos endógenos que regulan el crecimiento de las plantas en tejidos segmentados e intactos, modula los PGR endógenos (Dewir *et al.*, 2018); esto involucra la síntesis de auxina para incrementar los niveles de AIA, también aumenta los niveles de etileno y ABA, y es precursor del triptofano, el cual, a su vez, es precursor de las auxinas (Hutchinson *et al.*, 1996; Murthy *et al.*, 1998; Alcántara, 2019). De esta manera, el uso de thidiazuron ha demostrado ser eficaz en la regeneración de muchas especies recalcitrantes (Liu *et al.*, 2003). A diferencia de otras citocininas, el TDZ es resistente a la citocinina oxidasa, por lo cual es bastante estable en los tejidos de las plantas (Dewir *et al.*, 2018). La necesidad de citocininas es extremadamente variable y depende del contenido endógeno de la especie (Pierik, 1990) y del genotipo, ya que éste tiene un efecto marcado sobre la capacidad de regeneración en condiciones *in vitro* (Hunková *et al.*, 2016), pero

también depende del estado fisiológico, la edad de la planta donadora de los explantes y del tipo de explante utilizado (Gaj, 2004). Las dosis utilizadas tienen influencia sobre los procesos a los que da origen; por ejemplo, cuando se usan dosis bajas de thidiazuron, éste induce el proceso de organogénesis, mientras que al utilizar dosis altas se conduce al proceso de embriogénesis, sin embargo, concentraciones elevadas pueden ser tóxicas para el desarrollo de los cultivos *in vitro* (Ling *et al.*, 2013).

Asimismo, las auxinas también se consideran como un tipo morfógeno capaz de inducir la diferenciación celular de órganos como raíces, tallos y hojas, y dar origen a ellos (Alcantara *et al.*, 2019). La activación de la división celular en los haces vasculares es la primera etapa que se requiere para la formación de órganos durante la regeneración en explantes de hojas; Bustillo-Avenidaño *et al.*, (2018) mencionan que los reguladores actúan primero sobre los haces vasculares y después como regulador negativo de la formación de las raíces laterales, lo cual se puede atribuir a la actividad dual del TDZ tipo auxina-citocinina (Singh *et al.*, 2003).

La amplia variabilidad en la respuesta morfogenética demuestra que aún se conoce muy poco acerca de la interacción de diferentes factores de cultivo en la formación de órganos a partir de los explantes, en particular en lo que respecta a la naturaleza de los reguladores de crecimiento (García *et al.*, 2014).

### **Descripción morfológica**

La necesidad de obtener nuevos genotipos para la producción de frambuesa, ha llevado a los fitomejoradores a generar nuevos cultivares para lo cual se debe tener en cuenta la adaptación a entornos y sistemas agrícolas específicos (Dawson *et al.*, 2007), así como las características que requiere la industria y el consumidor. Ninguna variedad funcionará bien en todos los lugares, tipos de suelo y sistemas de producción; sin embargo, muchas de ellas han demostrado ser útiles para situaciones diferentes (Weber, 2012). Algunas variedades de uso comercial muestran fortalezas; por ejemplo, la variedad ‘Summit’ es de producción temprana y rendimiento alto, pero produce frutos pequeños y de calidad inconsistente; la variedad ‘Josephine’ tiene frutos con un excelente sabor, de calidad para consumo en fresco pero presenta producción tardía; la variedad ‘Joan J.’ es muy productiva, sus cañas están libres de espinas pero éstas son frágiles; la variedad ‘Heritage’ es una de las variedades principales en

México, ésta presenta bastones firmes pero su fruto es pequeño y de sabor medio (Weber, 2013a). La industria requiere cultivares de excelente calidad, mayor rendimiento, mayor resistencia a patógenos y adaptación; así, a medida que surgen nuevos problemas y nuevos sistemas de producción, los programas de mejoramiento se enfrentan a satisfacer estas demandas con nuevos cultivares (Graham y Jennings, 2009).

De acuerdo a las observaciones realizadas en este estudio se encontraron características sobresalientes para las selecciones ‘UMC-702’ y ‘C-6’; éstas son plantas productoras en primocaña. Las frambuesas productoras en primocañas se han hecho más populares porque amplían la temporada de producción (Graham y Jennings, 2009); ambas selecciones tienen frutos de color rojo de sabor y color favorables los cuales son unos de los objetivos principales del mejoramiento genético en frambuesa (Molina-Bravo *et al.*, 2019). Las frambuesas rojas son más cultivadas porque generalmente son más resistentes a enfermedades y son más productivas que las frambuesas negras (Kim, 2016). Las diferencias entre los genotipos según Cancino-Escalante *et al.*, (2011) son propias del género y de sus especies; aunque en este estudio no se realizaron pruebas cromosómicas, las diferencias en rasgos que presenta el género *Rubus* pueden ser debidas a su gran variabilidad morfológica y genética, y a su nivel de ploidía. Kader *et al.*, (1985) mencionan que las características morfológicas varían entre cultivares y dependen de muchos factores, entre ellos, los factores ambientales.

## VII. CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos a partir de la respuesta de los explantes de frambuesa (*Rubus idaeus* L.) var. 'Joan J.', 'A-1', 'Her' y selecciones 'C-6' y 'UMC-702' a la aplicación de reguladores de crecimiento y la descripción morfológica de las selecciones 'C-6' y 'UMC-702' se puede concluir lo siguiente:

### 1) Oxidación

- La oxidación de los explantes disminuyó con la adición del regulador BAP solo o en combinación con AIB en los genotipos 'C-6' 'Joan J.' y 'Her'.
- El uso de la citocinina CIN sola o en combinación con el regulador AIB tuvo efecto sobre la oxidación únicamente en los genotipos 'C-6' y 'Joan J.'.
- La adición del TDZ solo o en combinación con AIB en el medio de cultivo disminuyó la oxidación de los explantes para los cinco genotipos evaluados: 'C-6' en todas las dosis aplicadas, así como en los genotipos 'Joan J.', 'A-1' y 'Her'. En el genotipo 'UMC-702' únicamente disminuyó la oxidación con la combinación de TDZ + AIB.

### 2) Organogénesis

- El uso de BAP solo o en combinación con AIB en el medio de cultivo estimuló la regeneración de explantes de hojas en el genotipo 'C-6'.
- El regulador CIN solo o en combinación con AIB no tuvo efecto sobre la regeneración de explantes de hojas en ninguno de los genotipos evaluados.
- El uso de TDZ solo o en combinación con AIB estimuló la regeneración de explantes de hojas en los cinco genotipos evaluados: 'C-6', 'Joan J.', 'A-1' 'UMC-702' y 'Her'.
- Los reguladores del crecimiento BAP y CIN solos o combinados con AIB no estimularon la multiplicación de los brotes en ninguno de los genotipos evaluados.

- El regulador TDZ solo o en combinación con AIB estimuló la multiplicación de los brotes en los cinco genotipos evaluados.

### **3) Descripción morfológica**

- Las selecciones 'C-6' y 'UMC-702' presentan características distintivas que son favorables para iniciar un programa de mejoramiento genético.

## VIII. LITERATURA CITADA

- Abdelwahd, R., Hakam, N., Labhilili, M. & Udupa, S. M. (2008). Use of an adsorbent and antioxidants to reduce the effects of leached phenolics in *in vitro* plantlet regeneration of faba bean. African Journal of Biotechnology, 7(8): 997-1002. ISSN 1684-3515.
- Acosta, E. M., J. B. Sánchez, M. A. Bañón. 2008. Auxinas. In: Azcón-Bieto J., M. Talón eds. 2008. Fundamentos de Fisiología Vegetal. Ediciones Universitat de Barcelona. 669p.
- Adobkar, I., M. Saad Ahmed, M. Elshabed. 2012. Plant tissue culture media. Annarita Leyva and Laura M.R. Rinaldi (eds) In: Recent advances in plant *in vitro* culture. IntechOpen, DOI: 10.5772/50569. Available from: <https://www.intechopen.com/books/recent-advances-in-plant-in-vitro-culture/plant-tissue-culture-media>. ISBN 978-953-51-0787-3.
- Aina, O., K. Quesberry and M. Gallo. (2012). Thidiazuron-induced tissue culture regeneration from quartered-seed explants of *Arachis paraguariensis*. Crop Science 52: 1076-1083
- Alcántara, C. J. S., G. J. Acero, J. D. Alcántara C. y R. M. Sánchez M. 2019. Principales reguladores hormonales y sus interacciones en el crecimiento vegetal. NOVA 17(32): 109-129.
- Alice, L. A., C. Campbell S. 1999. Phylogeny of *Rubus* (Rosaceae) based on nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer region sequences. American Journal of Botany 86(1): 81-97.
- Allcaco, J. C. 2016. Estandarización para la propagación clonal *in vitro* de *Rubus idaeus* var. Heritage “frambuesa roja” de importancia comercial. Tesis Licenciatura. Universidad Ricardo Palma, Facultad de Ciencias Biológicas. Lima, Perú.
- Amalia, F., S. C. Debnath and Y. R. Yeoung. 2014. Effects of calcium gluconate and ascorbic acid on controlling shoot necrosis during micropropagation of primocane-fruiting raspberry (*Rubus idaeus* L.) cultivars. African Journal of Biotechnology 13(47): 4361-4368.
- Anaya, D. J. M., A. M. Ochoa, D. H. Martínez y S. F. Salazar. 2010. Organogénesis indirecta de *Agave parviflora*, una especie en peligro y con alto potencial económico. VII Simposio Internacional sobre la Flora Silvestre en Zonas Áridas. 134 p.
- Armstrong, D. J. 1994. Cytokinins. Chemistry: Activity and Function. Mok, D. W. S. y Mok, M. C. eds. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781351071284> 325 p.
- Astrid, G. G. 2008. Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos. Revisión. Acta Biológica Colombiana 13(3): 27-36.
- Azofeifa, A. 2009. Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. Agronomía Mesoamericana 20(1): 153-175.

- Bairu, M. W., W. A. Stirk, K. Dolezal y J. Van Staden. 2007. Optimizing the micropropagation protocol for the endangered *Aloe polyphylla*: can metapolin and its derivatives serve as replacement for benzyladenine and zeatin? *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 90: 15-23.
- Barba, A. A. 2014. Reguladores de crecimiento vegetal *In*: Hurtado M. D. V. y M. M. Merino E. editores. *Cultivo de Tejidos Vegetales*. México: Editorial Trillas 232 p.
- Bascopé, J. A. 2013. Realidad productiva de la frambuesa EE.UU. y México. Informe de Experto. Oficina de Estudios y Políticas Agrarias. Santiago, Chile. 42p.
- Becerra, V. y M. Paredes. 2000. Uso de marcadores bioquímicos y moleculares en estudios de diversidad genética. *Agricultura Técnica* 60(3): 270.
- Bhatia, S. y R. Dahiya. 2015. Concepts and techniques of plant tissue culture science. *Modern Applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Sciences* 10.1016/B978-0-12-802221-4.00004-2. 121-156.
- Bhojwani, S. S. y M. K. Razdon. 1996. *Plant tissue culture. Theory and Practice*. Elsevier. New York. 235p.
- Blassan, P. G. y H. Abrahamse. 2019. Increase oxidative stress induced by *Rubus* bioactive compounds induced apoptotic cell death in human breast cancer cells. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2019: 18p
- Bonilla, M. L. B., K. Espinosa P., A. Posso M. T., H. D. Vásquez A. y J. Muñoz E. F. 2008. Establecimiento de una colección de trabajo de uchuva del suroccidente colombiano. *Acta Agronómica* 57(2): 95-99.
- Broertjes, C., S. Roest and G. S. Bokelmann. 1976. Mutation breeding of *Chrysanthemum cinerariaefolium in vitro*. Report, ITAL, Wageningen, 42p.
- Bushway, L., M. Pritts y D. Handley. 2008. *Raspberry & blackberry production guide*. NRAES-35 (Natural Resource, Agriculture and Engineering Service), New York. 157p.
- Bustillo-Avendaño, E., S. Ibañez, O. Sanz, J. A. Sousa B., I. Gude, J. Perianez-Rodríguez, J. L. Micol, J. C. Del Pozo, M. A. Moreno-Risueno y J. M. Pérez-Pérez. 2018. Regulation of hormonal control, cell reprogramming and patterning during *de novo* root organogenesis. *Plant Physiology* 176: 1709-1727.

- Calva, C., G. y L. Ríos E. (1999). Cultivo de callos y acumulación de metabolitos secundarios. En: Rodríguez V. R., C. Calva G., R. Ramos E. G. y M. Salazar A. (Eds) Aspectos aplicados de la biotecnología. DGSCA-UNAM México. pp 267-301.
- Cancino-Escalante, G. O., E. Quevedo G., C. Edilia V. y C. Díaz C. 2015. Propagación *in vitro* de materiales seleccionados de *Rubus glaucus* Benth (mora de castilla) en la provincial de Pamplona, region nororiental de Colombia. Revista Colombiana de Biotecnología 17(2): 7-15.
- Cappelletti, R., S. Sabbadini y B. Mezzetti. 2016. The use of TDZ for the efficient *in vitro* regeneration and organogenesis of strawberry and blueberry cultivars. Scientia Horticulturae 207: 117-124.
- Cheng, Z. J., L. Wang, W. Sun, Y. Zhang, C. Zhou, Y. H. Su, W. Li, T. T. Sun, X. Y. Zhao, X. G. Li, Y. Cheng, Y. Zhao, Q. Xie y X. S. Zhang. 2013. Pattern of auxin and cytokinin responses for shoot meristem induction results from the regulation of cytokinin biosynthesis by auxin response factor3. Plant Physiology 161:240-251.
- Collado, R., R. Barbón, D. Agramonte, F. Jiménez, M. Pérez, O. Gutiérrez y D. Ramírez (2004). Establecimiento *in vitro* de apices y segmentos nodales de *Swietenia macrophylla* king. Biotecnología Vegetal. 4(3): 143-146.
- Constantini, M. J., R. Henke R. y M. Mansur A. 1976. Effects of activated charcoal and growth regulator on growth and organogenesis in tobacco callus. In vitro 12: 293-296.
- Cousineau, J. C. y D. J. Donnelly. 1991. Adventitious shoot regeneration from leaf explants of tissue cultured and greenhouse-grown raspberry. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 27: 249-255.
- Crespo-Rosas, J. C., M. C. G. López-Peralta, E. Hernández-Meneses y B. Cruz-Galindo. 2019. Regeneración *in vitro* de *Salvia hispanica* L. por organogenesis. Agrociencia 53: 1221-1232.
- Dawson, J. C., K. M. Murphy and S. S. Jones. 2007. Decentralized selection and participatory approaches in plant breeding for low-input systems. Euphytica 160(2): 143- 154.

- Debnath, S. C. 2004. Bioreactor-induced adventitious shoot regeneration affects genotype-dependent morphology but maintains clonal fidelity in red raspberry. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 50: 777-788.
- De Klerk, G., B. Arnholdt-Schmitt, R. Lieberei, K. H. Neumann. 1997. Regeneration of roots, shoots and embryos: Physiological, biochemical and molecular aspects. *Biología Plantarum* 39 (1): 53-66.
- Del Pozo, J. C., M. A. López-Matas, E. Ramírez-Parra y C. Gutiérrez. 2005. Hormonal control of the plant cell cycle. *Physiologia Plantarum* 123: 173-183.
- Dewir, Y. H., Nurmansyah, Y. Naidoo y J. A. Teixeira da Silva. 2018. Thidiazuron-induced abnormalities in plant tissue cultures. *Plant Cell Reports* 37(11): 1451-1470.
- Dolan, A. 2013. Nursery production of plants. *In: Funt R. C. and H. K. Hall eds. Raspberries.* CAB International. USA. pp 10.
- Duchefa-biochemic. 2010. Growth regulators. <https://www.duchefa-biochemic.com/product/details/number/T0916>. Consultado el día 28 de diciembre de 2019.
- Duncan, D. B. 1995. Multiple range and multiple F test. *Biometrics* 11: 1-42.
- Enríquez, G. 1991. Descripción y evaluación de los recursos genéticos. *In: Castillo R., J. Estrella y C. Tapia (eds.) 1991. Técnicas para el manejo y uso de los recursos genéticos vegetales.* Abya Yala. Quito, Ecuador pp 116-160.
- Eyduran, S.P., E. Eyduran y Y.S. Agaoglu 2008. Estimation of fruit weight by cane traits for various raspberries (*Rubus idaeus* L.) cultivars. *African Journal of Biotechnology* 7(17): 3044-3052.
- Ferrie, A. M. R. y K. L. Caswell. 2011. Isolated microspore culture techniques and recent progress for haploid and doubled plant production. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 104: 301-309.
- Fiola, J. A., M. A. Hassan, H. J. Swartz, R. H. Bors, R. McNicols. 1990. Effect of thidiazuron, light fluence rates and kanamycin on *in vitro* shoot organogenesis from

- excised *Rubus* cotyledons and leaves. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 20: 223-222.
- Gaj, D. M. 2004. Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Growth Regulation* 43: 27-47.
- Gamborg, O. L., R. A. Miller y K. Ojima. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research* 50(1): 151-158.
- García, R. J. C., G. G. García y M. A. Ciordia 2009. El cultivo del frambueso. Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA). Asturias, España. 1-72.
- García, J., G. García y M. Ciordia. 2014. El cultivo del frambueso. Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA). Asturias, España. 1-73.
- Gardner, E. J., M. J. Simmons y D. P. Snustad. 2007. Principios de genética. Editorial Limus, 4ª edición. D. F., México. 119 p.
- Gaspar, T. H., C. Kevers, O. Faivre-Rampant, M. Crevecoeur, C. L. Penel, H. Greppin y J. Dommès. 2003. Changing concepts in plant hormone action. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 39: 85-106.
- Geldner, N. y S. Robatzek. 2008. Plant receptors go endosomal: a moving vie won signal transduction. *Plant Physiology* 147: 1565-1574.
- George, E. 1996. Plant propagation by tissue culture: part 2. In practice. 2ª ed. Exegetics Limited England. 1361 p.
- George, E. F. y P. C. Debergh. 2008. Micropropagation: Uses and Methods. *In: George E. F., M. A. Hall, G. J. De Klerk. Editores. 2008. Plant propagation by tissue culture 3ª edición. Springer, Dordrecht, [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5005-3\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5005-3_2). 503p.*
- Georgieva, M., I. Badjakov, I. Dincheva, S. Yancheva y V. Kondakova. 2016. *In vitro* propagation of wild Bulgarian small berry fruits (bilberry, lingonberry, raspberry and strawberry). *Bulgarian Journal of Agricultural Science* 22(1): 46-51.

- GIS, Green Import Solutions. Ácido indolbutírico. 2019. <http://www.greenimportsol.com/producto/acido-indolbutirico/>. Consultado el 28 de diciembre de 2019.
- Gómez, K. 1998. Cultivo de células y tejidos. Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. (2): 25-44.
- González-Andrés, F. 2001. Caracterización vegetal: Objetivos y enfoques. *In: González-Andrés F. y J. Pita V. J. M. (eds.). Conservación y caracterización de recursos fitogenéticos. I. N. E. A. Mundi-Prensa. Valladolid, España. Pp 189-198.*
- Graham, J. and N. Jennings. 2009. Raspberry breeding *In: Jain S. M. y P. M. Priyadarshan (eds.). Breeding Plantation Tree Crops: Temperate Species. Springer Science + Business Media. New York. Pp 295.*
- Graham, J., K. Smith, S. McCallum, P. E. Hedley, D. W. A. Dolan y C. A. Hackett. 2015. Towards an understanding of the control of ‘Crumbly’ fruit in red raspberry. *Springer Plus 4(1): 1-9.*
- Graham J., L. Lasi y S. Millam. 1997. Genotype-specific regeneration from a number of *Rubus* cultivars. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture 48: 167-173.*
- Graham, J., R. Brennan. 2018. Introduction to the *Rubus* genus. *In: Graham J., R. Brennan eds. Raspberry Breeding, Challenges and Advances. Springer Nature. Switzerland. Pp 1-16.*
- Granados-Ríos, K. 2017. Variación somaclonal *in vitro* de frambuesa (*Rubus idaeus* L.) var. Josephine. Tesis de licenciatura. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Uruapan, Michoacán, México. 46p.
- Grant, J.E., E. Dommissé M., M. Christey C. y A. Conner J. 1991. Gene transfer to plants using *Agrobacterium*. *In: Murray DR (ed) Advanced methods in plant breeding and biotechnology. CAB International, Oxon, UK. Pp 50-73.*
- Greenway, M. B., I. C. Phillips, M. N. Lloyd, J. F. Hubstenberg y G. C. Phillips. 2012. A nutrient medium for diverse applications and tissue growth of plant species *in vitro*. *In Vitro Cellular and Development Biology-Plant 48: 403-410.*

- Gupta, S., V. Mahalaxmi. 2009. *In vitro* high frequency direct plant regeneration from whole leaves of blackberry. *Scientia Horticulturae* 120: 22-26.
- Gutiérrez, M. A., R. F. Santacruz, P. J. L. Cabrera y G. B. Rodríguez. 2003. Mejoramiento genético vegetal *in vitro*. *Revista Digital Científica y Tecnológica e- Gnosis* 1(4): 0-19.
- Hall, H. K. y C. Kempler. 2011. Raspberry breeding. *Fruit Vegetable and Cereal Science and Biotechnology* 5: 44-62.
- Hassan, M. A., H. J. Swartz, G. Inanime and P. Mullineaux. 1993. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of several *Rubus* genotypes and recovery of transformed plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 33: 9-17.
- Hernández, V. A. E. 2013. Caracterización morfológica de recursos fitogenéticos. *Revista Bio Ciencias* 2(3): 113-118.
- Howell, S. H., Lali S. y Che P. 2003. Cytokinins and shoot development. *Trends in Plant Science* 8: 453-459.
- Hunkova J., G. Libiakova y A. Gajdosova. 2016. Shoot proliferation ability of selected cultivars of *Rubus* spp. as influenced by genotype and cytokinin concentration. *Journal of Central European Agricultural* 17(2): 379-390.
- Hummer, K. E., N. V. Bassil y L. A. Alice. 2016. *Rubus* ploidy assessment. *Acta Hortícola* 1133: 81-88.
- Hurtado M. D. V. y M. M. E. Merino. 2014. *Cultivo de Tejidos Vegetales*. México. Editorial Trillas. 232p.
- Hutchinson, M., S. Murch, P. K. Saxena (1996). Morphoregulatory role of thidiazuron: evidence of the involvement of endogenous auxin in thidiazuron-induced somatic embryogenesis of geranium (*Pelargonium x hortorum* Bailey). *Journal of Plant Physiology* 149: 573-579.
- Jacinto, A. M. E. 2018. Evaluación de tres niveles de auxinas y citoquininas para la obtención de plantas madre de rosa (*Rosa* sp.) variedad Freedom en condiciones *in*

- in vitro*. Revista de la Carrera de Ingeniería Agronómica-UMSA 4(2): 1073-1081.
- Jadán, M., J. Ruíz, N. Soria y R. A. Mihai. 2015. Synthetic seed production and the induction of organogenesis in blackberry (*Rubus glaucus* Benth). Romanian Biotechnological Letters 20 (1): 10134-10142.
- Joyce, S. M., A. C. Cassells and S. M. Jain. 2003. Stress and aberrant phenotypes in *in vitro* culture. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 74: 103-121.
- Kakimoto, T. 2003. Biosynthesis of cytokinins. Journal Plant Research 116(3): 233-239.
- Kakimoto, T. 2003. Perception and signal transduction of cytokinins. Annual Review of Plant Biology 54(1): 605-607.
- Kalai, K., M. Csanyi, A. Meszaros y E. Balazs. 2009. Investigation of factors influencing the regeneration efficiency of *Rubus* species. Acta Agronómica 57(2): 149-154.
- Kessel, D. A. 2012. Mejora genética de la fresa (*Fragaria ananassa* Duch.), a través de métodos biotecnológicos. Cultivos Tropicales 33: 34-41.
- Kim C. y W. Dai. 2020. Plant regeneration of redraspberry (*Rubus idaeus* L.) cultivars 'Joan J' y 'Polana'. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant 56: 390-397.
- Kim, M. J., K. L. Sutton y G. K. Harris. 2016. Raspberries and related fruits. Encyclopedia of Food and Health. Elsevier. Pp 586-591.
- Korban, S. S., P. A. O'connor y A. Elobeidy. 1992. Effect of thidiazuron, naphtalene acetic acid, dark incubation and genotype on shoot organogénesis of *Malus* leaves. Journal of Horticultural Science 67: 340-349.
- Krikorian, A. D. 1993. Propagación clonal *in vitro*. In: Roca W. M., L. A. Mroginski Editores. 1993. Cultivo de Tejidos en la Agricultura Fundamentos y Aplicaciones. CIAT. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Publicación CIAT No. 151. 1039p.
- Kulaeva, O. N. 1980. Cytokinin action on enzyme activities in plants. *In plant Growth Substances*. Springer, Berlín, Heidelberg. Pp 119-128.

- Kumar N. y M. P. Reddy. 2011. *In vitro* plant propagation: a review. Journal For Environmental Science 27: 61-72.
- Larson, C., C. Gómez, M. Sánchez y D. Ríos. 2006. Inducción de caulogénesis indirecta en *Eucalyptus globulus*. Bosque 27(3): 250-257.
- Lazic, T. y D. Razic 2007. Organogénesis *in vitro* from the leaf of blackberry cv. Cacanska bestrna. Genetika 39(1): 69-78.
- Linnaei, Caroli. 1753. Species plantarum. HOLMIAE. Laurentii salvii. 572p.
- Ling, A. P. K., K. P. Tan y S. Hussein. 2013. Comparative effects of plant growth regulators on leaf and stem explants of *Labisla pumila* var. Alata. Journal of Zhejrang University Science B 14(7): 621-631.
- Litz, R. E., Jarret, R. L. 1991. Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos: embriogénesis somática y organogenesis. En: Roca, W. (ed) Cultivo de Tejidos en la Agricultura. CIAT. Florida, Estados Unidos. 143 p.
- Liu, C. Z., S. J. Murch, M. E. L. Demerdash y P. K. Saxeria. 2003. Regeneration of the Egyptian medicinal plant *Artemesia juddaica* L. Plant Cell Reports 21: 525-530.
- Lloyd, G. y B. McCown. 1980. Commercially feasible micropropagation of mountain *Laurel latifolia*, by use of shoot tip culture. Combined Proceedings-International Plant Propagators Society 30: 421-427.
- Luna, S. R. 2014. Cultivo de anteras y polen. In: Hurtado M. D. V. y M. M. E. Merino. 2014. Cultivo de Tejidos Vegetales. Editorial Trillas. Mexico. 232p.
- Machakova I., E. Zazimalova y E. F. George. 2008. Plant growth regulators I: introducción, auxins, their analogues and inhibitors. En: George E. F., M. A. Hall y G. De Klerk (eds.) 2008. Plant propagation by Tissue Culture 3<sup>rd</sup> Edition. Springer. The Netherlands. Pp 503.
- Mazumdar, P. A. Basu, C. Mahanta, L. Sahoo. 2020. Age and orientation of cotyledonary leaf explants determine the efficiency of *de novo* plant regeneration and

- Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation in *Jatropha curcas* L. South African Journal Botany 76: 337-344.
- McNicol R. J., J. Graham. 1990. *In vitro* regeneration of *Rubus* from leaf and stem segments. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 21: 45-50.
- Méndez-Álvarez D. y A. Abdelnour-Esquivel. 2014. Establecimiento *in vitro* de *Terminalia amazonia* (Gmel) Excell. Revista Forestal Mesoamericana Kurú 11(27): 07-21.
- Meng, R., T H. H. Chen, C. E. Fino y Y. Li. 2004. Improving *in vitro* plant regeneration from leaf and petiole explant of 'Marion' blackberry. Horticulturae Science 39(2): 316-320.
- Meng, R. y C. Finn. 2002. Determining ploidy level and nuclear DNA content in *Rubus* by flow cytometry. Journal of the American Society for Horticultural Science. 127 (5): 767-775.
- Mezzetti, B., G. Savini, F. Carnevali y D. Mott. 1997. Plant genotype and growth regulators interaction affecting *in vitro* morphogenesis of blackberry and raspberry. Biología Plantarum 39(1): 139-150.
- Michalczuk, L., T. J. Cooke, J. D. Cohen. 1992. Auxin levels at different stages of carrot somatic embryogenesis. Phytochemistry 31: 1097-1103.
- Millan, M. B. y J. Graham. 1999. Organogenesis and micropropagation in red raspberry using forchlorfenuron (CPPU). Journal of Horticultural Science & Biotechnology 74(2): 219-223.
- Millán-Soto G., M. L. Robertt, M. E. Tiznado-Hernández, A. Gutiérrez y M. Esqueda. 2019. Organogénesis de rizoma de espárrago (*Asparagus officinalis* L.) por combinación de auxinas y citocininas. Agrociencia 53: 549-561.
- Minas, G. J. and Neocleous D. 2007. A protocol for rapid clonal micropropagation *in vitro* of primocane-fruiting red raspberry cultivars. AGRIS. 7p.
- Molina-Bravo, R. 2019 Advances and challenges in raspberry and blackberry breeding *In*: Lang, G. A. (ed.). Achieving sustainable cultivation of temperate zone tree fruits and

berries volumen 2: Case studios, Burleigh Dodds Science Publishing, Cmbridge, U.K. 2019. 35p.

Monzón, J. 2005. Propagation *in vitro* de pinabete *Abies guatemaltensis* Rehder por medio de la multiplicación de ápices de brotes. Tesis de licenciatura. Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.

Morales, C. 2009. Cultivo de berries: Consideraciones generales. Boletín INIA N° 187. Villa Alegre: Instituto de Investigaciones Agropecuarias INIA.

Morales, A. C. G., J. Riquelme J., J. Hirzel C., A. France I., A. Pedreros L., H. Uribe C. y P. Abarca R. 2017. Manual de manejo agronómico de frambuesa *In*: Morales A. C. G. Boletín INIA N° 07. Instituto de Investigaciones Agropecuarias. Santiago, Chile 114p.

Mroginski, L, P. Sansberro y E. Fiaschland. 2010. Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales. *In*: Levitus G., V. Echenique, C. Rubinstein, E. Hopp, Mroginski, editores. Biotecnología y Mejoramiento Vegetal. Buenos Aires, Argentina: Editorial. pp 650.

Muhitch, M. J. y J. Fleycher. 1985. Influence of culture age and spermidine-treatment on the acumulation of phenolic compounds in suspensión cultures. *Plant Physiology* 78: 25-28.

Murashige, T. y F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.

Murthy, B. N. S., S. Murch J., P. Saxena K. 1998. Thidiazuron a potent regulator of *in vitro* plant morphogenesis. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*. 4: 267-275

Olivera, Y., L. Hernández, D. Cruz R., W. Ramírez y J. Lezcano C. 2009. Nota técnica: Caracterización morfobotánica de tres especies cespitosas. *Pastos y Forrajes* 32(3): 8p.

Owens y De Novoa, C. Conner A. J. 1992. Comparison of *in vitro* shoot regeneration protocols from *Rubus* leaf explants. *Journal of Crop and Horticultural Science* 20: 471-476

- Paciolla, C., S. Fortunato, N. Diplerro, A. Paradiso, S. De Leonardis, L. Mastropasqua y M. C. De Pinto. 2019. Vitamin C in plants: from functions to biofortification. *Antioxidants*. 8: 519-526.
- Palomo-Ríos, E., M. A. Quesada, A. J. Matas, F. Pliego-Alfaro y J. A. Mercado. 2018. The history and current status of genetic transformation in berry crops. *In: The Genomes of Rosaceous-Berries and Their Wild Relatives*. Springer Nature. Spain. Pp 139-160.
- Passey, A., K. Barretle, D. James. 2003. Adventitious shoot regeneration from seven commercial strawberry cultivars (*Fragaria x ananassa* Duch.) using a range of explant types. *Plant Cell Reports* 21: 397-401.
- Perl, A., Loton O., M. Abu-Abied. 1996. Holland D. Establishment of an *Agrobacterium*-mediated transformation system for grape (*Vitis vinifera* L.): The role of antioxidants during the grape-*Agrobacterium* interaction. *Nature Biotechnology* 8: 535-542.
- Pierron-Darbone, A. 2012. Raspberry plant named 'Adelita'. US20120311748P1. Pamplona (Ed).
- Pompeu, B. G., P. Lupino G., V. A. Vitorello y R. Antunes A. 2008. Antioxidant isoenzyme responses to nickel-induced stress in tobacco cell suspension culture. *Scientia Agricola* 65: 548-552.
- Premkumar, G., R. Sankaranarayanan, S. Jeeva y K. Rajarathinam. 2011. Cytokinin induced shoot regeneration and flowering of *Scoparia dulcis* L. (Scrophulariaceae)-an ethnomedicinal herb. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 1(3): 169-172.
- Prierik, R. Cultivo *in vitro* de plantas superiores. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa. 1990. 301p.
- Pritts, M. 2008. Primocane-friuting raspberry production. *Hortscience* 39(4): 868-886.
- Pulianmackal, A. J., A. Kareem, V., K. Durgaprasad, Z. Trivedi B., K. Prasad. 2014. Competence and regulatory interactions during regeneration in plants. *Frontiers in Plant Science* 5: 142

- QC Quimicompany. Kinetina 2019. <https://quimicompany.com.co/productos/medios-para-cultivos-vegetal/hormonas-y-reguladores-de-crecimiento-2/citoquininas/kinetina-2/>. Consultado el día 28 de diciembre de 2019.
- Radice, S. 2010. Morfogénesis. *En*: Levitus G., V. Echenique, C. Rubinstein, E. Hopp, Mroginski, editores. Biotecnología y Mejoramiento Vegetal. Buenos Aires, Argentina: Editorial. Pp 650.
- Read, P. y A. Economou. 1987. Stock plant influence on tissue culture success. *Acta Horticulturae* 212: 111p.
- Restrepo, C., Gómez F. A., A. Gil, J. M. Torres y A. L. Urrea. 2018. *In vitro* propagation of avocado *Persea americana* Mill. Cv. Hass through morfogénesis. *Acta Agronómica* 67(1): 160-167.
- Robert, M. L., M. M. Arce y A. Eastmond. 1993. Biotecnología vegetal. Editorial Limusa. México. Pp 69-102.
- Saini, S., I. Sharma., N. Kaurz y P. K. Pati. 2013. Auxin: a master regulator in plant root development. *Plant Cell Reports* 32:741-757.
- Sánchez-Calvo, L. y S. Alvarenga-Venutolo. 2015. Calogénesis y establecimiento del cultivo de células en suspensión de *Uncaria tomentosa* (Willd.) D. C. (uña de gato). *Tecnología en Marcha* 28(1): 105-120.
- Schaller, G. E., A. Bishopp y J. J. Kieber. 2015. The Ying-Yang of hormones: cytokinin and auxin interactions in plant development. *The Plant Cell* 27: 44-63.
- Schumülling, T. 2004. Cytoquinin. *In*: Schumülling, T. Encyclopedia of Biological Chemistry. Berlín: (eds) Lennarz, W., M. D. Lane. Press/Elsevier Science. Berlín, Alemania. 1-7p.
- Segura, J. 2008. Citoquininas. *In*: Azcón-Bieto J., M. Talón eds. 2008. Fundamentos de Fisiología Vegetal. Ediciones Universitat de Barcelona. 669p.

- Shahzad, A., S. Sharma, S. Parveen, T. Saeed, A. Shaeen, R. Akhtar y Z. Ahmad 2017. Historical perspective and basic principles of plant tissue culture. *Plant Biotechnology: Principles and Applications*. Springer, Singapore. Pp 1-36
- SIAP, Sistema de información agroalimentaria y pesquera. SAGARPA Secretaría de agricultura, ganadería, desarrollo rural, pesca y alimentación. 2016. Atlas agroalimentario. Atlas Agroalimentario. [http://agroalimentario.nube.siap.gob.mx/gobmx\\_publicaciones\\_siap/pag/2016/Atlas\\_Agroalimentario\\_2016](http://agroalimentario.nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2016/Atlas_Agroalimentario_2016). Consultado el día 30 de agosto de 2018.
- SIAP Sistema de información agroalimentaria y pesquera, SAGARPA Secretaría de agricultura, ganadería, desarrollo rural, pesca y alimentación. 2017. Atlas agroalimentario. Atlas Agroalimentario. [http://agroalimentario.nube.siap.gob.mx/gobmx\\_publicaciones\\_siap/pag/2017/Atlas\\_Agroalimentario\\_2017](http://agroalimentario.nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2017/Atlas_Agroalimentario_2017). Consultado el día 08 de septiembre de 2018.
- SIB, Sistema de Información de Biodiversidad. Taxonomía para *Rubus*. [En línea]. Dirección URL: <http://www.sib.gov.ar/taxonomia/genero/rubus>. Consultada: 06 de julio de 2019.
- Singh, N.D., Sahoo L., Sarin N.B., Jaiwal P.K.J.P.S. 2003. The effect of TDZ on organogénesis and somatic embryogenesis in pigeon pea (*Cajanus cajan* L. Millsp.). *Plant Science* 164(3): 341-347.
- Staden J. V., E. Zazimalova y E. F. George. 2008. Plant growth regulators II: Cytokinins, their analogues and antagonists. *En: George E. F., M. A. Hall y G. De Klerk (eds). 2008. Plant propagation by Tissue Culture 3<sup>rd</sup> Edition*. Springer. The Netherlands. Pp 205-226.
- Statistical Analysis System. 2002. SAS Institute Inc., SAS/STAT. User's Guide, version 9.0. Carey, N.C.
- Taiz, L. y E. Zeiger. 2010. *Plant Physiology*. 5<sup>th</sup> Ed. Sinaeur Associates Inc., Massachusetts. 778p.
- Tanaka H., Johkan M., Mitskuri K., Tezuka T., Furukawa H. y Oda M. 2012. Intact roots

promote shoots regeneration from hypocotyl independent of exogenous plant growth regulators in eggplant *in vitro*. Lant Root 7: 5-11.

Téllez-Román, J., M. C. G. López-Peralta, E. Hernández-Menses, A. A. L. Estrada, H. A. M. Zavaleta y M. M. Livera. 2017. Morfogénesis *in vitro* de *Mammillaria plumosa* Weber. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 8(4): 863-876.

Thomas T. D. 2008. The role of activated charcoal in plant tissue culture. Biotechnology Advances 26: 618-631.

Turrens, J., 2003. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. The Journal of Physiology. 552 (2): 335-344.

Turk, B. A., H. J. Swartz, R. H. Zimmerman. 1994. Adventitious shoot regeneration from *in vitro*-cultured leaves of *Rubus* genotypes. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 38: 11-17.

Undurraga, P.D. y S. Vargas S., 2013. Manual de frambuesa. Boletín INIA N° 264. Centro Regional de Investigación Quilamapu. Chillán, Chile. 107p.

Van Staden, J., C. Fennell, N. Taylor. 2006. Plant stress *in vitro*: the role of phytohormones. Acta Horticulturae. 725: 55-62.

Vasil I. K. 1998. Biotechnology and food security for the 21<sup>st</sup> century: A real-world perspective. Nature Biotechnology 16: 399-400

Vázquez-Ramos, J. M. y M. P. Sánchez. 2003. The cell cycle and seed germination. Seed Science Research 13: 113-130.

Vijendra, P. D., S. G. Jayanna, V. Kumar, H. Gajula, J. Rajashekar, T. Sannabommaji y G. Basappa. 2017. Antioxidant status during *in vitro* plant regeneration in *Lucas aspera* Spreng. International Journal of Pure & Applied Bioscience 5(5): 1529-1537.

Vujovic, T., D. Ruzic y R. Cerovic. 2014. Adventitious organogénesis via intermediate callus formation in representatives of *Prunus*, *Pyrus* and *Rubus* genera. Romanian Biotechnological Letters 19 (3): 9297-9309.

Wang, H., Y. Yang, M. Li, J. Liu y W. Jin (a). 2019. Reinvigoration of diploid strawberry

(*Fragaria vesca*) during adventitious shoot regeneration. Scientific Reports 9(1): 130007

Wang, Y., Q. Chen, T. Chen, J. Zhang, W. He, L. Liu, Y. Luo, B. Sun, Y. Zhang, H. Tang y X. Wang (b). 2019. Allopolyploid origin in *Rubus* (Rosaceae) inferred from nuclear granule bound starch synthase I GBSSI sequences. Plant Biology 19: 303

Weber, C. 2012. Raspberry variety. Review. College of Agriculture and Life Science. 5p.

Weber, C. 2013a. Cultivar development and selection. *In*: Funt R.C. and H. K. Hall eds. Raspberries. CAB International. United Kingdom. Pp 72.

Weber, C. 2013b. Propagation. *In*: Funt R.C. and H. K. Hall eds. Raspberries. CAB International. United Kingdom. Pp 72.

Zawadzka, M. y T. Orlikowska. 2006. The influence of FeEDDHA in red raspberry cultures during shoot multiplication and adventitious regeneration from leaf explants. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 85: 145-149.

## IX. APÉNDICE

**Cuadro 1A.** Composición del medio de cultivo MS y preparación a partir de soluciones “stock” concentradas.

<b>Macronutrientes</b>	<b>Concentración</b>	<b>mL L<sup>-1</sup></b>
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1.65 mg L <sup>-1</sup>	
KNO <sub>3</sub>	1.9 mg L <sup>-1</sup>	
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.37 mg L <sup>-1</sup>	X10
CaCl <sub>2</sub>	0.33 mg L <sup>-1</sup>	100
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.17 mg L <sup>-1</sup>	
<b>Micronutrientes</b>		
KI	0.83 mg L <sup>-1</sup>	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2 mg L <sup>-1</sup>	
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	22.3 mg L <sup>-1</sup>	
Zn SO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	8.6 mg L <sup>-1</sup>	X100
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.25 mg L <sup>-1</sup>	10
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.025 mg L <sup>-1</sup>	
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.025 mg L <sup>-1</sup>	
<b>Hierro</b>		
Na <sub>2</sub> EDTA	37.3 mg L <sup>-1</sup>	X200
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27.8 mg L <sup>-1</sup>	5
<b>Vitaminas</b>		
Inositol	100 mg L <sup>-1</sup>	
Ácido nicotínico	0.5 mg L <sup>-1</sup>	X200
Piridoxina HCL	0.5 mg L <sup>-1</sup>	5
Tiamina HCL	0.1 mg L <sup>-1</sup>	
Glicina	2 mg L <sup>-1</sup>	

**Cuadro 2A.** Análisis de varianza para la variable oxidación de explantes de hojas de frambuesa cv. 'C-6' *in vitro*, en medio de cultivo adicionado con BAP, CIN (0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 y 3 mg L<sup>-1</sup>) y TDZ (0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 mg L<sup>-1</sup>) solos o combinados con AIB (0 y 0.5 mg L<sup>-1</sup>) evaluados a los 40 días de su establecimiento.

Fuente de varianza	de Grados de libertad	de Suma de cuadrados	de Cuadrado de la media	F- valor	Pr>f
Tratamientos	34	87670.8571	2578.5546	4.09	<.0001**
Error	140	88320.0000	630.8571		
Total correcto	174	175990.8571			
CV=63.15	R <sup>2</sup> = 0.50				

**Cuadro 3A.** Análisis de varianza para la variable oxidación de explantes de hojas de frambuesa cv. 'Joan J.' *in vitro*, en medio de cultivo adicionado con BAP, CIN (0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 y 3 mg L<sup>-1</sup>) y TDZ (0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 mg L<sup>-1</sup>) solos o combinados con AIB (0 y 0.5 mg L<sup>-1</sup>) evaluados a los 40 días de su establecimiento.

Fuente de varianza	de Grados de libertad	de Suma de cuadrados	de Cuadrado de la media	F- valor	Pr>f
Tratamientos	34	108219.4286	3182.9244	5.15	<.0001**
Error	140	86560.00000	618.2857		
Total correcto	174	194779.4286			
CV=61.63508	R <sup>2</sup> = 0.55560				

**Cuadro 4A.** Análisis de varianza para la variable oxidación de explantes de hojas de frambuesa cv. 'A-1' *in vitro*, en medio de cultivo adicionado con BAP, CIN (0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 y 3 mg L<sup>-1</sup>) y TDZ (0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 mg L<sup>-1</sup>) solos o combinados con AIB (0 y 0.5 mg L<sup>-1</sup>) evaluados a los 40 días de su establecimiento.

Fuente de varianza	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F- valor	Pr>f
Tratamientos	34	174253.7143	5125.1092	9.10	.0001**
Error	140	78880.00000	563.4286		
Total correcto	174	253133.7143			
CV=37.6260	R <sup>2</sup> = 0.6884				

**Cuadro 5A.** Análisis de varianza para la variable oxidación de explantes de hojas de frambuesa cv. 'UMC-702' *in vitro*, en medio de cultivo adicionado con BAP, CIN (0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 y 3 mg L<sup>-1</sup>) y TDZ (0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 mg L<sup>-1</sup>) solos o combinados con AIB (0 y 0.5 mg L<sup>-1</sup>) evaluados a los 40 días de su establecimiento.

Fuente de varianza	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-valor	Pr>f
Tratamientos	34	176128.000	5180.2353	13.45	<.0001**
Error	140	53920.000	385.1429		
Total correcto	174	230048.000			
CV=27.56	R <sup>2</sup> = 0.76				

**Cuadro 6A.** Análisis de varianza para la variable oxidación de explantes de hojas de frambuesa cv. 'Her' *in vitro*, en medio de cultivo adicionado con BAP, CIN (0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 y 3 mg L<sup>-1</sup>) y TDZ (0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 mg L<sup>-1</sup>) solos o combinados con AIB (0 y 0.5 mg L<sup>-1</sup>) evaluados a los 40 días de su establecimiento.

Fuente de varianza	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-valor	Pr>f
Tratamientos	34	259885.7145	7643.6975	27.30	<.0001**
Error	140	39200.0000	280.0000		
Total correcto	174	299085.7143			
CV=28.70	R <sup>2</sup> = 0.86				

**Cuadro 7A.** Análisis de varianza para la variable explantes con brotes de hojas de frambuesa cv. 'C-6' *in vitro*, en medio de cultivo adicionado con BAP, CIN (0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 y 3 mg L<sup>-1</sup>) y TDZ (0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 mg L<sup>-1</sup>) solos o combinados con AIB (0 y 0.5 mg L<sup>-1</sup>) evaluados a los 40 días de su establecimiento.

Fuente de varianza	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-valor	Pr>f
Tratamientos	34	7232.000	212.70588	2.24	<b>0.0006**</b>
Error	140	13280.000	94.85714		
Total correcto	174	20512.000			
CV=173.91	R <sup>2</sup> = 0.35				

**Cuadro 8A.** Análisis de varianza para la variable explantes con brotes de hojas de frambuesa cv. 'Joan J.' *in vitro*, en medio de cultivo adicionado con BAP, CIN (0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 y 3 mg L<sup>-1</sup>) y TDZ (0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 mg L<sup>-1</sup>) solos o combinados con AIB (0 y 0.5 mg L<sup>-1</sup>) evaluados a los 40 días de su establecimiento.

Fuente de varianza	de Grados de libertad	de Suma de cuadrados	de Cuadrado de la media	F- valor	Pr>f
Tratamientos	30	50870.85714	1496.20168	11.48	<.0001**
Error	140	18252.0000	130.37143		
Total correcto	174	69122.85714			
CV=112.25	R <sup>2</sup> = 0.73				

**Cuadro 9A.** Análisis de varianza para la variable explantes con brotes de hojas de frambuesa cv. 'A-1' *in vitro*, en medio de cultivo adicionado con BAP, CIN (0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 y 3 mg L<sup>-1</sup>) y TDZ (0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 mg L<sup>-1</sup>) solos o combinados con AIB (0 y 0.5 mg L<sup>-1</sup>) evaluados a los 40 días de su establecimiento.

Fuente de varianza	de Grados de libertad	de Suma de cuadrados	de Cuadrado de la media	F- valor	Pr>f
Tratamientos	34	14844.94857	436.61613	6.81	<.0001**
Error	140	8976.40000	64.11714		
Total correcto	174	23821.34857			
CV=163.31	R <sup>2</sup> = 0.62				

**Cuadro 10A.** Análisis de varianza para la variable explantes con brotes de hojas de frambuesa cv. 'C-6' *in vitro*, en medio de cultivo adicionado con BAP, CIN (0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 y 3 mg L<sup>-1</sup>) y TDZ (0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 mg L<sup>-1</sup>) solos o combinados con AIB (0 y 0.5 mg L<sup>-1</sup>) evaluados a los 40 días de su establecimiento.

Fuente de varianza	de Grados de libertad	de Suma de cuadrados	de Cuadrado de la media	F- valor	Pr>f
Tratamientos	34	18422.85714	541.84874	4.23	<.0001**
Error	140	17920.00000	128.00000		
Total correcto	174	36342.85714			
CV=131.99	R <sup>2</sup> = 0.50				

**Cuadro 11A.** Análisis de varianza para la variable explantes con brotes de hojas de frambuesa cv. 'Her' *in vitro*, en medio de cultivo adicionado con BAP, CIN (0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 y 3 mg L<sup>-1</sup>) y TDZ (0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 mg L<sup>-1</sup>) solos o combinados con AIB (0 y 0.5 mg L<sup>-1</sup>) evaluados a los 40 días de su establecimiento.

Fuente de varianza	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F- valor	Pr>f
Tratamientos	30	27611.42857	812.10084	6.70	<.0001**
Error	140	16990.00000	121.14286		
Total correcto	174	44571.42857			
CV= 120.38	R <sup>2</sup> = 0.61				

**Cuadro 12A.** Análisis de varianza para la variable coeficiente de multiplicación de explantes de hojas de frambuesa cv. 'C-6' *in vitro*, en medio de cultivo adicionado con BAP, CIN (0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 y 3 mg L<sup>-1</sup>) y TDZ (0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 mg L<sup>-1</sup>) solos o combinados con AIB (0 y 0.5 mg L<sup>-1</sup>) evaluados a los 40 días de su establecimiento.

Fuente de varianza	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F- valor	Pr>f
Tratamientos	30	18.6844800	0.549552	2.61	<.0001**
Error	140	29.5040000	0.210742		
Total correcto	174	48.1888000			
CV= 239.09	R <sup>2</sup> = 0.38				

**Cuadro 13A.** Análisis de varianza para la variable coeficiente de multiplicación de explantes de hojas de frambuesa cv. 'Joan J.' *in vitro*, en medio de cultivo adicionado con BAP, CIN (0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 y 3 mg L<sup>-1</sup>) y TDZ (0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 mg L<sup>-1</sup>) solos o combinados con AIB (0 y 0.5 mg L<sup>-1</sup>) evaluados a los 40 días de su establecimiento.

Fuente de varianza	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F- valor	Pr>f
Tratamientos	34	29.157942	0.857586	9.15	<.0001**
Error	140	30.120000	0.093714		
Total correcto	174	42.277942			
CV=117.4833	R <sup>2</sup> = 0.689673				

**Cuadro 14A.** Análisis de varianza para la variable coeficiente de multiplicación de explantes de hojas de frambuesa cv. 'A-1' *in vitro*, en medio de cultivo adicionado con BAP, CIN (0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 y 3 mg L<sup>-1</sup>) y TDZ (0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 mg L<sup>-1</sup>) solos o combinados con AIB (0 y 0.5 mg L<sup>-1</sup>) evaluados a los 40 días de su establecimiento.

Fuente de varianza	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F- valor	Pr>f
Tratamientos	30	5.397942	0.158763	5.20	<.0001**
Error	140	4.272000	0.030514		
Total correcto	174	9.669942			
CV= 175.69	R <sup>2</sup> = 0.558219				

**Cuadro 15A.** Análisis de varianza para la variable coeficiente de multiplicación de explantes de hojas de frambuesa cv. 'UMC-702' *in vitro*, en medio de cultivo adicionado con BAP, CIN (0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 y 3 mg L<sup>-1</sup>) y TDZ (0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 mg L<sup>-1</sup>) solos o combinados con AIB (0 y 0.5 mg L<sup>-1</sup>) evaluados a los 40 días de su establecimiento.

Fuente de varianza	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F- valor	Pr>f
Tratamientos	30	9.60158730	0.282399	6.06	<.0001**
Error	140	6.5888889	0.046634		
Total correcto	174	16.1304761			
CV= 139.10	R <sup>2</sup> =0.59				